

RESEÑA ANALÍTICA

Formación de biopelículas por *Vibrio cholerae*

Karen Marrero-Domínguez y Rafael Fando-Calzada.

Departamento de Biología Molecular, Área Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6412, La Habana, Cuba. Correo electrónico: karen.marrero@cnic.edu.cu

Recibido: 20 de febrero de 2010.

Aceptado: 6 de abril de 2010.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, formación de biopelícula, ambientes acuáticos, patogénesis.

Key words: *Vibrio cholerae*, biofilm formation, aquatic environments, pathogenesis.

RESUMEN. La bacteria *Vibrio cholerae* es un habitante natural de los ambientes marinos y el agente causal del cólera. En lugares donde la enfermedad es endémica ocurren brotes estacionales que pueden propagarse al resto del mundo. La capacidad de *V. cholerae* de causar epidemias está unida a su habilidad para sobrevivir por largos períodos de tiempo en los ambientes acuáticos. Se ha propuesto que las biopelículas (comunidades microbianas unidas a una superficie, embebidas en una matriz exopolimérica) son cruciales para la supervivencia de *V. cholerae* en los ambientes acuáticos en los períodos entre las epidemias, así como que son ventajosas para la transmisión de hospedero a hospedero durante ellas. La identificación de las señales ambientales y los factores reguladores que controlan la formación de las biopelículas en *V. cholerae* permitirá definir nuevos blancos terapéuticos para combatir a este patógeno en los ecosistemas acuático e intestinal y también ayudará a desarrollar herramientas para predecir y controlar las epidemias de cólera. En este trabajo se discuten estudios recientes relacionados con las señales ambientales y las proteínas reguladoras que intervienen en el desarrollo de las biopelículas por *V. cholerae*, así como la contribución de estas a su supervivencia ambiental. Además, se aborda la posible función de las biopelículas de *V. cholerae* durante la infección en humanos. Se han realizado notables avances en la comprensión de los factores que contribuyen a la formación y regulación de las biopelículas por *V. cholerae* en el ambiente, no así *in vivo*, a donde deben encaminarse los estudios futuros.

ABSTRACT. The bacterium *Vibrio cholerae* is a natural inhabitant of marine environments and the causative agent of cholera. Seasonal outbreaks occur in regions where cholera is endemics, which may subsequently propagate worldwide. The ability of *V. cholerae* to cause epidemics is related to its ability to survive for long periods of times in aquatic environments. It has been proposed that biofilms (surface attached microbial communities, enclosed in an exopolimeric matrix) are crucial for *V. cholerae* survival in aquatic environments in periods between epidemics and advantageous to its transmission from host to host during epidemics. Identification of the environmental signals and regulator factors that control biofilm formation by *V. cholerae* will allow defining novel drug targets to combat this pathogen at aquatic and intestinal ecosystems and will help to develop tools to predict and control cholera epidemics. Here, recent findings related to environmental signals and regulator proteins that are involved in biofilm development by *V. cholerae*, as well as, biofilm contribution to *V. cholerae* environmental survival are reviewed. Besides, the putative function of biofilms during human infection is also discussed. Significant progresses have been made in the understanding of the factors that contribute to biofilm formation and regulation by *V. cholerae* in the environment; however, the studies *in vivo* have been more limited, therefore future researches must be focused on this field.

INTRODUCCION

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen unidas irreversiblemente a superficies bióticas o abióticas, embebidas en una matriz hidratada de sustancias exopoliméricas, proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos.^{1,2} El desarrollo de biopelículas representa probablemente el crecimiento habitual de las bacterias en la naturaleza, ya que potencia su multiplicación y supervivencia y les da acceso a nutrientes y protección a predadores y compuestos antimicrobianos.³ De hecho, las biopelículas causan grandes problemas a nivel ambiental, industrial y clínico.^{2,4-12}

La formación de las biopelículas ha sido descrita como un programa de desarrollo multicelular,¹³⁻¹⁵ lo que implicaría la existencia de vías genéticas que coordinen un grupo de actividades esenciales para la transición

adecuada en forma y función. De hecho, el proceso de formación de una biopelícula involucra diferentes pasos que requieren una reprogramación de la expresión génica en respuesta al ambiente cambiante,¹⁶⁻²¹ en la que intervienen diversos factores.^{22,23} Sin embargo, la validez de considerar la formación de las biopelículas como un programa bacteriano de desarrollo multicelular ha comenzado a ser cuestionada en años recientes. Esto se debe a que no se han identificado genes que se expresen específicamente en las biopelículas, que formen parte de vías ordenadas jerárquicamente, las cuales controlen la transición a través de estados específicos durante el proceso de formación de la estructura tridimensional.²⁴

La capacidad de formar biopelículas no parece estar restringida a ningún grupo específico de bacterias y hoy se considera que bajo condiciones ambientales

adecuadas todos los microorganismos son capaces de formarlas. *Vibrio cholerae* es una bacteria Gram-negativa, miembro de la familia *Vibrionaceae* y agente causal de la enfermedad diarreica aguda cólera.²⁵ Este microorganismo coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado humano y secreta la toxina del cólera, la que provoca una diarrea en forma de agua de arroz, característica de la enfermedad. A diferencia de muchos agentes bacterianos que provocan diarreas, *V. cholerae* sobrevive en los ambientes acuáticos durante los períodos entre epidemias.²⁵ De hecho, este microorganismo reside primariamente en los océanos y estuarios, algunas veces asociado con la superficie externa o los intestinos de copépodos y crustáceos.²⁶ De esta manera, *V. cholerae* alterna entre un rápido crecimiento dentro de su hospedero y una prolongada supervivencia en los ambientes acuáticos.²⁷ La adaptación de *V. cholerae* a las condiciones cambiantes del ecosistema acuático, así como a los del hospedero, es crucial para su persistencia y colonización. Un factor clave para la supervivencia ambiental y transmisión de *V. cholerae* es su capacidad para formar biopelículas.^{28,29} La formación de estas estructuras por esta bacteria ha sido bien estudiada, tanto en ambientes naturales como en condiciones de laboratorio.^{25,30,31} Reportes recientes sugieren que el desarrollo de las biopelículas por *V. cholerae* puede ser importante, además, para y durante la infección en humanos.³²⁻³⁴ La elucidación de las señales ambientales que promueven la formación de las biopelículas por *V. cholerae*, así como los factores reguladores y los mecanismos moleculares que controlan este proceso será útil para predecir y controlar las epidemias de cólera. Por otra parte, el establecimiento de la función de las biopelículas en la patogénesis de *V. cholerae* facilitará la identificación de nuevos blancos terapéuticos para combatir a este patógeno durante su infección en humanos.

El objetivo del presente trabajo fue exponer y analizar estudios recientes relacionados con las señales ambientales y las proteínas reguladoras que participan en el desarrollo de las biopelículas por *V. cholerae*, así como discutir su contribución a la supervivencia ambiental de este microorganismo y su posible función durante el crecimiento en el hospedero.

ETAPAS DEL PROCESO DE DESARROLLO DE LA BIOPELÍCULA POR *V. cholerae* Y FACTORES QUE PARTICIPAN

El análisis microscópico del desarrollo de las biopelículas en diferentes microorganismos ha conducido a que este evento se describa como un proceso temporal, que involucra la transición a través de distintas etapas de una organización multicelular.¹³ Estas etapas han sido identificadas como i) células libres aisladas (plantónicas), ii) células aisladas unidas a una superficie, iii) formación de microcolonias, iv) formación de macrocolonias y v) dispersión. La etapa de unión a una superficie de las células aisladas ha sido dividida frecuentemente en estados reversibles e irreversibles. Debido a que la unión inicial a una superficie es generalmente débil, las células deben utilizar mecanismos activos para formar una asociación más estable con la superficie. La asociación irreversible de las células con la superficie también se ha denominado formación de una monocapa, en la cual las células aisladas se encuentran unidas a una superficie.^{35,36} La formación de microcolonias, por otro lado, se refiere a la creación de agrupamientos diferenciados de células, de tres a cuatro capas de profundidad, los que pueden ocurrir tanto por crecimiento clonal de las

células unidas o por un traslado activo de estas a través de la superficie. Posteriormente, las microcolonias crecen en tamaño y se fusionan creando las denominadas macrocolonias o biocapa confluyente, la que subsiguientemente se desarrolla como una biopelícula con estructura tridimensional, por el movimiento y crecimiento de las bacterias unidas. La macrocolonia arquetípica consiste en torres con forma de setas separadas por espacios llenos de fluido; sin embargo, también son posibles estructuras alternativas tales como estructuras planas. Dentro de la macrocolonia, las células son mantenidas juntas por una matriz de exopolisacáridos que también consiste de restos de células muertas, proteínas y ADN extracelular. Finalmente, las macrocolonias pueden dispersarse, liberando las células de la biopelícula. El regreso de las células a la fase planctónica completa la representación idealista del ciclo de desarrollo de una biopelícula.²⁴

La secuencia de eventos que conducen al inicio de la formación de las biopelículas por *V. cholerae* sobre superficies abióticas en condiciones de laboratorio y los genes requeridos para estos pasos fueron reportados hace más de una década.³⁷ Este estudio en una cepa de *V. cholerae* El Tor identificó y caracterizó a mutantes defectivos en la unión a una superficie abiótica, la motilidad en esta y la formación de la estructura tridimensional característica de la biopelícula.³⁷ Los resultados del estudio indicaron que el flagelo y el pelo tipo IV que media la hemoaglutinación sensible a manosa (MSHA, por sus siglas en inglés *mannose-sensitive haemagglutinin type IV pili*) aceleran, pero no son esenciales, para la unión a la superficie abiótica. Además, este estudio indicó que el flagelo es requerido para la dispersión a través de la superficie y que el exopolisacárido VPS (del inglés *Vibrio polysaccharide*), componente mayoritario de la matriz, es necesario para la formación de la estructura tridimensional de la biopelícula.³⁷ La importancia del flagelo en los pasos iniciales de la formación de la biopelícula por cepas de *V. cholerae* O139 fue también demostrada.³⁸ Un estudio posterior indicó, además, la importancia del MSHA para la formación de la monocapa por una cepa de este serogrupo.³⁹ El pelo MSHA también es requerido para la colonización eficiente de superficies bióticas, tales como el exoesqueleto quitinoso del zooplancton,⁴⁰ sustratos quitinosos⁴¹ y fibras de celulosa.⁴²

Se ha descrito que el motor del flagelo está involucrado en la regulación de la expresión del exopolisacárido y la formación de la biopelícula madura,⁴³ de modo que la motilidad parece influir en el desarrollo de las biopelículas por algunas cepas de *V. cholerae* O1 y O139 más allá de la unión inicial y el desarrollo de las microcolonias. Se postuló que el motor actúa como un receptor mecánico de la rotación del flagelo para inducir la expresión del exopolisacárido.⁴³ Una disminución de la rotación del flagelo pudiera indicar el comienzo de la síntesis de grandes cantidades del VPS y la formación de la biopelícula.⁴³ En concordancia con esta hipótesis, se reportó que la progresión del estado planctónico al estado de monocapa ocurre con la aparición concomitante de una subpoblación de células no flageladas (salvajes) o que carecen de un flagelo activo.³⁹ Interesantemente, la quimiotaxis también ha sido involucrada específicamente en la formación de la monocapa, a través del gen *cheY-3* y varias proteínas quimiotácticas metil-aceptoras.³⁶

Además de MSHA, otros dos pelos contribuyen a la formación de la biopelícula por *V. cholerae*, con la promoción de las interacciones célula-superficie y célula-célula: el pelo corregulado con la toxina (TCP, del inglés

toxin co-regulated pilus)⁴⁴ y el pelo regulado por quitina (ChiRP, del inglés *chitin-regulated pili*), denominado anteriormente PilA.⁴¹ La importancia relativa de estos pelos varía en diferentes condiciones y de cepa a cepa. El pelo TCP, asociado clásicamente a la virulencia de *V. cholerae* y esencial para la colonización intestinal,⁴⁵ está involucrado en la formación de microcolonias sobre la quitina, un sustrato relevante ambientalmente. Un mutante del pelo TCP de una cepa El Tor es capaz de formar la monocapa, pero no microcolonias, sobre un sustrato quitinoso.⁴⁴ Estudios recientes revelaron que la expresión de los pelos MSHA y TCP es controlada inversamente en múltiples niveles, lo que sugiere la posibilidad de que los dos pelos promuevan consecutivamente la formación de la monocapa y la biopelícula tridimensional.^{46,47}

La función de ChiRP está menos clara. ChiRP es requerido para la unión competitiva a una superficie de quitina (el caparazón de un cangrejo), pero no es necesario para la unión individual a partículas de quitina.⁴¹ Se ha postulado que ChiRP pudiera desempeñar una función diferente a la adhesión, tal como orientar ópticamente a la célula para la degradación de la quitina.⁴¹

El componente mayoritario de la matriz de la biopelícula de *V. cholerae* es el exopolisacárido VPS y su producción es esencial para el desarrollo de las estructuras tridimensionales características de la biopelícula.^{37,48} En *V. cholerae* se ha identificado que la matriz extracelular de las biopelículas contiene, además del VPS, a las proteínas RbmA, RbmC y Bap1. Los mutantes que no son capaces de producir estos polipéptidos forman biopelículas estructuralmente inestables.^{36,49,50} Sin embargo, aún no se ha determinado la función específica de estas proteínas en la matriz: si median las interacciones célula-célula o célula-superficie, a través de la unión de carbohidratos del VPS u otras estructuras celulares.

V. cholerae también puede formar biopelículas independientes del VPS en presencia de calcio^{51,52} y en condiciones hidrodinámicas,⁵³ aunque no se ha identificado la existencia de otro tipo de exopolisacárido en la matriz de estas biopelículas.⁵¹ En condiciones hidrodinámicas, los mutantes en los genes *vps* forman biopelículas tridimensionales similares a las desarrolladas por la cepa salvaje. La formación de la biopelícula independiente de los genes *vps*, en estas condiciones, se debe a la expresión del gen *rpoS*, el que regula negativamente la expresión de *vpsA*.⁵³

El aspecto menos estudiado en el proceso de formación de las biopelículas por *V. cholerae* es el relacionado con su dispersión a células individuales. Es aceptado ampliamente que la formación de las biopelículas es ventajoso para los microorganismos en diferentes condiciones. Sin embargo, cuando la biopelícula crece en tamaño, las células que residen en las capas más internas pudieran no tener acceso a los nutrientes o pudieran sufrir los efectos de la acumulación de productos de desechos tóxicos. Por estas razones, la inclusión en la biopelícula pudiera ser perjudicial, de manera que se supone que las bacterias deben ser capaces de detectar y responder a las condiciones ambientales desfavorables y regresar al estado planctónico. Debido a esto, se considera que la dispersión de la biopelícula debe ser un proceso altamente regulado que involucre muchos circuitos receptores. En *Escherichia coli* se han identificado varios mecanismos que promueven la dispersión de las biopelículas.²³ En *Pseudomonas aeruginosa* un estudio reciente identificó una molécula que provoca la dispersión de las biopelículas de diferentes especies

bacterianas.⁵⁴ Un estudio en *V. cholerae* indicó que este proceso es importante para controlar el grosor y la arquitectura de la biopelícula y es mediado a través de la inducción temporal de los sistemas de *quórum sensing* (la capacidad de la célula de percibir una alta densidad de la población y responder a ella, que se detalla posteriormente), que inhiben la síntesis del VPS, a través de su regulador terminal HapR.⁵⁵ Esta proteína no solo previene la formación de la biopelícula, sino también promueve el desprendimiento de las células de estas.³² Un posible mecanismo a través del cual HapR pudiera ejercer esta función es por activación de la expresión del gen *hapA*. Este gen codifica para una hemaglutinina/proteasa, enzima que promueve el desprendimiento de *V. cholerae* de células epiteliales cultivadas.⁵⁶⁻⁵⁸ Debido a que existen varias proteínas que mantienen la integridad de las biopelículas dependientes del VPS, HapA pudiera desempeñar una función en la dispersión de las biopelículas por degradación de esas proteínas. Por otra parte, será interesante determinar la posible contribución en el proceso de dispersión de una VPS liasa (cuyo gen codificador se encuentra adyacente a los otros genes *vps*), así como las señales ambientales y factores reguladores que controlan su expresión y actividad.

SEÑALES AMBIENTALES QUE MODULAN EL DESARROLLO DE LA BIOPELÍCULA POR *V. cholerae*

En general, la formación de las biopelículas es regulada fundamentalmente en los pasos de unión a la superficie, formación de la microcolonia, profundidad y arquitectura de la biopelícula madura.⁵⁹ Las señales que regulan los pasos iniciales de la formación de una biopelícula difieren entre especies bacterianas y reflejan el hábitat natural de estas. Los últimos pasos de la maduración de la biopelícula, que controlan su profundidad y arquitectura, son regulados por señales conservadas entre las especies bacterianas y reflejan la fisiología de las células en las biopelículas e incluyen los sistemas de señales de *quórum sensing*, represión catabólica y ausencia de nutrientes.⁵⁹ La adhesión a una superficie y la producción del exopolisacárido por las bacterias dependen de la composición orgánica e inorgánica del medio en el que se desarrollan.⁵⁹

En *V. cholerae* se han identificado varios factores ambientales que afectan la producción de las biopelículas en diversos pasos, tales como los monosacáridos, el calcio, hierro, sodio, bilis, glucosa, nucleósidos; así como también, se han descrito numerosas proteínas mediadoras de esta regulación.

Señales ambientales presentes en el medio acuático

Salinidad

V. cholerae puede sobrevivir y reproducirse en algunas fuentes de agua dulce con una muy baja salinidad, lo que pudiera ser importante en la incidencia de cólera en áreas donde la enfermedad es endémica al permitir la supervivencia del microorganismo en fuentes de agua potable.⁶⁰ En un estudio reciente, se determinó que la salinidad modula la formación de la biopelícula por *V. cholerae*, a través de los reguladores transcripcionales VpsR y VpsT.⁶¹ Se encontró que en un rango intermedio de salinidad, los genes que codifican para las proteínas involucradas en la síntesis del exopolisacárido y las proteínas de la matriz estaban sobre-expresados, aunque el regulador directo de esta respuesta no fue identificado. Además, se encontró que, solo en presencia de una baja osmolaridad, el regulador transcripcional que controla la adaptación a los cambios de osmolaridad OscR (del

inglés *osmolarity controlled regulator*) reprime la transcripción de los genes que codifican las proteínas involucradas en la síntesis del exopolisacárido y las proteínas de la matriz y aumenta la de los genes relacionados con la motilidad. Solo en condiciones de baja salinidad, un mutante Δ *oscR* fue menos mótil y aumentó la formación de la biopelícula.⁶¹ Se postuló que la formación de la biopelícula pudiera ser menos beneficiosa para la bacteria en estas condiciones.

Calcio

Los iones Ca^{2+} , abundantes en los ecosistemas marinos y de agua salobre, desempeñan una importante función en la formación de las biopelículas por otros microorganismos ya que estabilizan directamente las interacciones inter-celulares.⁶² Se encontró que *V. cholerae* puede formar una biopelícula independiente de los genes *vps*, para lo cual se requieren concentraciones de calcio en el orden de mmol/L, similares a las que se encuentran en los ambientes marinos.⁵¹ Se piensa que esta vía independiente del VPS sea la preferida en estos ambientes e involucra interacciones entre el Ca^{2+} y la cadena O del lipopolisacárido de la membrana externa (LPS).⁵² En un trabajo reciente se determinó además, el efecto del calcio sobre la formación de la biopelícula dependiente del VPS por *V. cholerae*.⁶³ En presencia de calcio, la biopelícula tiene un grosor menor y su superficie es más irregular. Un análisis del transcriptoma de la biopelícula en estas condiciones indicó que el calcio disminuye la expresión de los genes requeridos para la producción del VPS y las proteínas de la matriz de la biopelícula y para el sistema regulador de dos componentes CarSR (del inglés *calcium-regulated sensor* (CarS) y *regulator* (CarR)). Este sistema regula negativamente la expresión de los genes *vps* y la formación de la biopelícula por *V. cholerae*.⁶³

Quitina

La quitina es el polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y posiblemente el más abundante en el ambiente marino.⁶⁴ Este compuesto constituye una fuente de carbono, nitrógeno y energía para los microorganismos marinos, incluido *V. cholerae*.^{41,65} La quitina se encuentra en todos los reinos de la vida y es el componente principal de la pared celular de los hongos y del exoesqueleto de crustáceos.⁴¹ Se demostró que *V. cholerae* es capaz de formar biopelículas sobre superficies quitinosas, dependientes del pelo TCP.⁴⁴ La expresión de un TCP funcional, asociado a la superficie de la célula, parece ser específica de la biopelícula, ya que este solo fue detectado en células crecidas dentro de esta estructura.⁴⁴ Este resultado coincide con los de un estudio previo, en el cual no se detectó la inducción de la expresión de los genes que codifican para el TCP, así como tampoco la de los genes *vps*, durante el crecimiento en presencia de sustratos conteniendo quitina o sus componentes.⁴¹

Norespermidina

Varios reportes sugieren que las poliaminas pueden funcionar como señales extracelulares o metabólicas o ambas que modulan la formación de la biopelícula. La norespermidina es una molécula orgánica que contiene tres grupos aminos cargados positivamente⁶⁶ a pH 7 y activa la formación de la biopelícula por *V. cholerae*, a través de las proteínas NspS y MbaA.⁶⁷ MbaA es una proteína integral de membrana que contiene un dominio periplasmático y otros citoplasmáticos efectores, la cual ha sido identificada como un represor de la formación de la biopelícula.⁶⁸ NspS es homóloga a una proteína periplasmática de *Escherichia coli* que une espermidina.⁶⁷ La

eliminación de *nspS* disminuye la formación de la biopelícula y la transcripción de los genes *vps*. Se ha propuesto que la interacción del complejo norespermidina-NspS con la porción periplasmática de MbaA disminuye la capacidad de esta para inhibir la formación de la biopelícula en *V. cholerae*.⁶⁷ Se ha postulado que la norespermidina sirve de molécula señal extracelular que media la unión de *V. cholerae* a las superficies bióticas que poseen este compuesto, tales como otras bacterias, archaea, plantas y moluscos.⁶⁷ Interesantemente, un estudio reciente identificó una vía alternativa para la síntesis de symnorespermidina y espermidina en *V. cholerae*, la cual es necesaria para el desarrollo normal de la biopelícula y está ampliamente distribuida en las bacterias.⁶⁹

Monosacáridos

La adición de manosa a una monocapa de *V. cholerae* O139 crecida en un medio mínimo con aminoácidos permitió la progresión del estado de monocapa a la formación de microcolonias y a una biopelícula tridimensional.³⁹ Aun cuando los monosacáridos no deben encontrarse en una elevada concentración en el medio acuático, se postuló que la liberación de estos debido a la degradación de los polisacáridos existentes en una superficie por las células presentes en una monocapa pudieran indicar el progreso al estado de biopelícula tridimensional.³⁹ Los monosacáridos activan la transcripción de los genes *vps* en las células asociadas a las biopelículas y en menor proporción en las células libres. La adición de manosa, por otro lado, reprime la transcripción de *flaA* (gen que codifica la subunidad del flagelo) y activa la transcripción de los genes *vps* en células planctónicas y asociadas a las biopelículas.³⁹ Las biopelículas dependiente de los genes *vps* son activadas por monosacáridos, en particular por la adición de glucosa y manosa. La galactosa, sin embargo, no ejerce esta función.⁵¹ Se ha propuesto que la formación de la biopelícula dependiente de los genes *vps* sea importante en ambientes nutritivos e *in vivo*.⁵¹

Nucleósidos

El regulador CytR, que reprime la adquisición y catabolismo de los nucleósidos cuando estos son escasos, actúa como represor de la formación de la biopelícula en *V. cholerae*, a través de la represión de la transcripción de los genes *vps*.⁷⁰ Se ha propuesto que concentraciones intracelulares elevadas de nucleósidos, específicamente de citidina, pudieran promover la formación de la biopelícula en *V. cholerae*.⁷⁰ Aunque es poco probable que los nucleósidos sean abundantes en el ambiente acuático, se ha propuesto que el ADN y sus productos catabólicos que pudieran acumularse dentro de la matriz extracelular de la biopelícula pudieran ser una señal para reclutar nuevas bacterias hacia esta.⁷⁰

Indol

El aminoácido triptófano puede ser hidrolizado por la enzima triptofanasa para formar indol y piruvato, los que luego son usados como fuentes de carbono y nitrógeno en condiciones de escasez de nutrientes. Se ha propuesto que el indol actúe como una señal extracelular indicadora de la escasez de nutrientes en el ambiente y se ha descrito que influye en la formación de las biopelículas en varias bacterias.^{19,23,71-74} En un estudio con cepas de *V. cholerae* no-O1/O139, se observó que el indol aumentaba la producción del VPS en una de estas cepas.⁷⁵ Posteriormente, se estudió el efecto del indol sobre la formación de la biopelícula por *V. cholerae*.⁷⁶ El indol activó la transcripción de los genes *vps* y de los relacionados con la motilidad, resistencia a protozoos, utilización de hierro y transporte iónico.⁷⁶ Se determinó la cascada señalizadora del indol, la que incluye la pro-

teína DksA y los reguladores de la producción de VPS, VpsR y CdgA (la función de estas proteínas se detalla más adelante).⁷⁶ Estos resultados sugieren que *V. cholerae* puede responder por igual a la presencia del indol en su ambiente externo.

Señales del quorum sensing

El quorum sensing (QS), detección de quórum o autoinducción es un mecanismo que las bacterias usan para percibir la densidad de la población y sincronizar la expresión génica de la comunidad cuando la densidad celular es elevada.^{77,78} Este proceso involucra la producción, secreción y subsiguiente detección de moléculas difusibles que sirven como señales, denominadas autoinductores, cuya concentración aumenta cuando la densidad celular del organismo que las produce se incrementa. Una vez que estas moléculas o autoinductores alcanzan el umbral de la detección, son detectadas por las células e inducen respuestas sincronizadas en la comunidad, que solo son productivas cuando se llevan a cabo al unísono por un grupo de células.⁷⁷

En *V. cholerae* funcionan en paralelo múltiples circuitos de QS que controlan la virulencia y la formación de la biopelícula.⁷⁹⁻⁸³ El sistema de QS en *V. cholerae* usa al menos dos moléculas autoinductoras:^{32,84} CAI-1 (del inglés, *cholerae autoinducer-1*) y AI-2 (del inglés, *autoinducer-2*). CAI-1 es producida por la enzima CqsA y desempeña una importante función en la regulación de la biopelícula. AI-2 es sintetizado por LuxS y a diferencia de CAI-1, no es necesario para la regulación de la biopelícula.⁸⁵ CAI es producido por varias especies de *Vibrio*, lo que sugiere que funciona como una señal intra-género, mientras que AI-2 es producida y detectada por una amplia variedad de bacterias y presumiblemente facilita la comunicación inter-especies.⁸⁵⁻⁸⁸ CAI-1 tiene una mayor influencia en la expresión génica que AI-2 y por lo tanto, se considera la principal señal de QS en *V. cholerae*.⁸⁴

En el laboratorio, las células cultivadas *in vitro* alcanzan elevadas densidades celulares y los umbrales de detección de los autoinductores se obtienen fácilmente. En los ambientes naturales o en los hospederos eucarióticos, donde la abundancia de nutrientes es la excepción más que la regla, probablemente solo se alcancen densidades celulares lo suficientemente grandes, capaces de activar los circuitos del QS, en nichos ambientales específicos. El crecimiento en biopelículas; sin embargo, debe favorecer densidades celulares muy elevadas que activen los circuitos del QS y sus señales deben ser importantes durante el crecimiento en estas estructuras. De hecho, se demostró que en células asociadas en biopelículas ocurre una inducción del QS más temprano que en células planctónicas, lo que es importante para el grosor y dispersión de la biopelícula.⁵⁵ El mecanismo molecular que media la regulación de la formación de la biopelícula por el QS será detallado más adelante.

Señales ambientales presentes en el hospedero

Glucosa

La glucosa es una fuente de energía universal y un potente inductor de la colonización de las superficies para muchas especies microbianas. Es, además, el principal azúcar producido durante la digestión intraluminal de polisacáridos en el intestino delgado.⁸⁹ La adición de glucosa a un medio mínimo de cultivo de *V. cholerae* promueve la formación de la biopelícula.^{51,89} El crecimiento en presencia de glucosa da lugar a una disminución en las concentraciones celulares del AMP cíclico. En estas condiciones, se induce la formación de

la biopelícula, mientras que la adición de AMP cíclico conduce a una disminución en la formación de la estructura tridimensional. En concordancia, el complejo regulador global AMP cíclico (cAMP)-proteína receptora del AMP cíclico (CRP, del inglés *cAMP receptor protein*), que media la represión catabólica,⁹⁰⁻⁹² ha sido identificado como un regulador negativo de la formación de la biopelícula por *V. cholerae*,⁹³⁻⁹⁵ aunque el mecanismo usado para reprimir la formación de la biopelícula parece ser diferente según la cepa de *V. cholerae*.^{94,95} Además, un estudio reciente mostró que la forma fosforilada del componente enzimático I del sistema de transporte de carbohidratos dependiente del fosfoenolpiruvato (PTS, del inglés *phosphoenolpyruvate transport system*)⁹⁶ reprime específicamente el crecimiento de las células asociadas en la biopelícula, a través de la represión de la transcripción de los genes *vps*.⁸⁹ La forma fosforilada del componente enzimático I se acumula debido a la ausencia de azúcares PTS, tales como la glucosa, manosa y N-acetil-glucosamina, los que coincidentemente han demostrado promover el desarrollo de la biopelícula. Se propuso que esta vía reguladora es importante en el ambiente e intestino humano.

Bilis

La bilis es un importante componente del intestino humano. En su presencia *V. cholerae* induce la formación de la biopelícula y dentro de ella son más resistentes a la toxicidad de este compuesto que sus contrapartes planctónicas. La formación de la biopelícula es dependiente de los genes *vps* y de la regulación post-transcripcional de su activador transcripcional VpsR.³⁴ Sin embargo, no se ha identificado al mediador de esta respuesta.

Hierro

El hierro es un nutriente esencial y escaso para las bacterias. La adición de agentes quelantes a un medio de cultivo, a concentraciones que no inhiben el crecimiento de las células planctónicas, provoca una disminución de la producción de la biopelícula por una cepa de *V. cholerae* El Tor.⁹⁷ Además, la adición de agente quelantes de hierro a un medio de cultivo suprime el cambio a colonias rugosas en la cepa salvaje. El ARN RyhB, un regulador post-transcripcional del metabolismo celular del hierro, es el mediador de este efecto, aunque se desconoce el mecanismo molecular.⁹⁷

Muchas de las señales descritas han sido estudiadas solo en el laboratorio, de manera que se hace necesario relacionar las señales identificadas con los ambientes naturales o del hospedero en los cuales son funcionales. Igualmente, un estudio de estas señales en el ambiente natural es crítico para entender su función en la adaptación de la bacteria a su ambiente.

PRINCIPALES PROTEÍNAS REGULADORAS INVOLUCRADAS EN EL CONTROL DEL DESARROLLO DE LA BIOPELÍCULA POR *V. cholerae*

Diversos análisis genéticos-moleculares han revelado las proteínas reguladoras y a través de ellas, en algunos casos, las señales ambientales que afectan la formación de la biopelícula en *V. cholerae*. No obstante, la mayor parte de los trabajos han centrado su atención en la regulación de la producción del exopolisacárido. El proceso de formación de la biopelícula es complejo e involucra numerosos reguladores transcripcionales, particularmente, sistemas de transducción de señales de dos componentes y reguladores dependientes de la densidad celular o QS. El ácido diacético, un segundo mensajero intracelular, también ha sido involucrado en la formación de las biopelículas y se ha relacionado con

el QS y el regulador global CRP^{93,95} Adicionalmente, los factores sigma RpoS y RpoN⁹⁸ y la proteína Fis⁸¹ están involucrados en la formación de la biopelícula, aunque el mecanismo molecular que utilizan no se describirán en la presente revisión. Un reporte reciente informó que la formación de la biopelícula en *V. cholerae* depende, además, de la presencia del sistema de secreción TaT⁹⁹ y del regulador transcripcional LeuO.³⁶

Reguladores de dos componentes

VpsR

El regulador de respuesta VpsR es un regulador clave en la formación de la biopelícula por *V. cholerae*. VpsR activa la transcripción de los genes *vps* y la formación de las estructuras tridimensionales típicas de la biopelícula.^{98,100} Estudios iniciales sugieren que VpsR debe estar fosforilado para realizar su función.⁴³ Sin embargo, la proteína histidina-quinasa receptora que fosforila a VpsR no ha sido identificada aún, ya que el gen que codifica para esta no está unido físicamente a *vpsR*. La caracterización de la histidina quinasa relacionada ayudará a comprender la cascada reguladora que controla la expresión de los genes *vps* y las señales ambientales que regulan la producción del VPS.

VpsT

VpsT es un segundo activador de la transcripción de los genes *vps*, miembro de la familia de reguladores transcripcionales UhpA (FixJ).¹⁰¹ Una afectación de *vpsT* conduce a la formación de colonias lisas y a una disminución de la expresión de los genes *vps* y la formación de la biopelícula.¹⁰¹ Una caracterización de los mutantes *vpsR* y *vpsT* reveló que estos reguladores desempeñan diferentes funciones en el establecimiento de la arquitectura de la biopelícula. El mutante *vpsT* es capaz de formar biopelículas, aunque con una estructura tridimensional diferente, mientras que los mutantes *vpsR* y *vpsRvpsT* producen solo células aisladas o microcolonias unidas al sustrato.¹⁰² Los regulones VpsR y VpsT son ampliamente idénticos, aunque VpsR tiene un mayor impacto sobre la expresión global.¹⁰² De esta manera, VpsR es esencial para la expresión de los genes *vps* y la producción del VPS y la formación de la biopelícula, mientras que VpsT parece tener un papel auxiliar, quizás aumentando la actividad de VpsR. De hecho, en biopelículas crecidas en condiciones hidrodinámicas, en las que se reduce el efecto de la densidad celular al disminuir la acumulación de autoinductores, un mutante *vpsT* es capaz de formar una biopelícula bien desarrollada, lo que sugiere que la regulación de la formación de la biopelícula por *vpsT* es más sensible a los efectos de la densidad celular.¹⁰²

De hecho, recientemente se demostró que a una densidad celular elevada se reprime la transcripción del gen *vpsT*, pero no *vpsR*.¹⁰³ Un trabajo reciente vinculó directamente la expresión de los genes de virulencia y síntesis del VPS, a través del regulador de la virulencia AphA. Este regulador se requiere para activar la expresión de *tcpP*, cuyo producto génico activa a su vez todos los genes de la virulencia incluyendo a los responsables de la síntesis del TCP y la toxina del cólera y se demostró que se une a la región promotora de *vpsT*.¹⁰⁴ Además, un mutante del gen *aphA* posee niveles más bajos de expresión de *vpsT*, así como de formación de la biopelícula.¹⁰⁴ Un reporte reciente indicó además que VpsT regula inversamente la motilidad y la producción de la matriz extracelular en respuesta al segundo mensajero c-di-GMP.¹⁰⁵ Sin embargo, no se ha determinado aún si VpsR y VpsT son reguladores directos de los genes *vps*.

VpsS.

La proteína receptora histidina quinasa VpsS controla la formación de la biopelícula en *V. cholerae* a través de la activación de la expresión de los genes *vps*.¹⁰⁶ VpsS es una proteína receptora histidina quinasa híbrida que contiene dominios histidina quinasa y de respuesta, pero carece del dominio histidina fosfotransferasa. Esta proteína actúa a través de la proteína LuxU, que está involucrada en la cascada de transducción de señales del QS en *V. cholerae*. VpsS requiere además del regulador de respuesta LuxO para activar la expresión de los genes *vpsR* y *vpsT*. La inducción de los genes *vps* por VpsS es independiente de HapR.¹⁰⁶ Se ha sugerido que VpsR necesita ser fosforilado para activarse,⁴³ por lo cual será interesante determinar si VpsS fosforila directamente a VpsR, así como identificar las señales ambientales a las que responde VpsS.

Reguladores dependientes de la densidad celular o QS

Las especies de *Vibrio* usan el QS para controlar numerosas características grupales, incluyendo la luminiscencia, la virulencia y la formación de las biopelículas.¹⁰⁷ A diferencia de otras especies de patógenos que inducen la producción de factores de virulencia o la formación de la biopelícula o ambos procesos cuando se alcanza una densidad celular elevada, en presencia de los auto-inductores del QS, *V. cholerae* reprime estos fenotipos.¹⁰⁸

V. cholerae El Tor utiliza tres sistemas de QS para determinar la densidad de su población. En un sistema el receptor CqsS detecta a la molécula CAI-1 y en un segundo sistema, el complejo receptor LuxPQ responde a la molécula AI-2.^{84,108} El tercer sistema está compuesto por los reguladores dependiente de la fase de crecimiento VarSA-CsrA/BCD,⁸³ pero no se ha determinado la señal a la que responde.

A una densidad celular baja, en ausencia de auto-inductores, los receptores CqsS y LuxQ actúan como quinasas y se auto-fosforilan y transfieren el fosfato a la proteína LuxU que a su vez, lo transfiere al regulador de respuesta LuxO. Esta proteína fosforilada, junto al factor sigma 54, activa la transcripción de los genes que codifican cuatro ARNs pequeños denominados Qrr1-4 (del inglés, *quorum regulatory RNA*). Estos ARNs, junto con la chaperona Hfq, desestabilizan el ARN mensajero que codifica para el factor transcripcional HapR.^{57,80} Por otro lado, a una densidad celular baja, la quinasa receptora VarS es inactiva y no fosforila al regulador de respuesta VarA. Cuando VarA está defosforilado es incapaz de inactivar la transcripción de los genes que codifican para los ARN reguladores CsrBCD, que se unen a CsrA. Como consecuencia, el regulador post-transcripcional CsrA está libre en el citoplasma y activa a LuxO y por lo tanto, la expresión de los genes *qrr*, ocurriendo la represión de la expresión de *hapR*. El mecanismo exacto por el cual CsrA activa a LuxO no se conoce. De esta manera, a bajas densidades celulares, la proteína HapR no se produce y por lo tanto, los genes reprimidos por esta proteína se expresan y los activados no lo hacen. Además, recientemente se demostró que a bajas densidades celulares, LuxO fosforilado regula positivamente la expresión de los genes *vpsR* y *vpsT*,¹⁰⁶ a través de un mecanismo que no ha sido determinado aún.

A densidades celulares elevadas, los receptores CqsS y LuxPQ unen a sus autoinductores y este evento hace que estas proteínas cambien sus actividades de quinasas a fosfatasa. El fosfato es eliminado de LuxO a través de LuxU. La proteína LuxO defosforilada no activa la

transcripción de los genes *qrr*, y en ausencia de los ARNs Qrr, el ARN mensajero de *hapR* se traduce a la proteína HapR. Además, bajo esta condición, VarS se activa y fosforila a VarA. Esta proteína fosforilada activa la expresión de los genes que codifican los ARN reguladores CsrBCD. Estos ARN se unen a CsrA, evitando que pueda unirse a sus genes blancos. Esto disminuye la actividad de LuxO y por lo tanto, disminuye la expresión de los genes *qrr* y se potencia la expresión de *hapR*. De esta manera, a elevadas densidades celulares, HapR se produce y se une al ADN de los promotores de sus genes diana y regula la expresión génica.^{32,84,103,108,109}

En células de *V. cholerae* del biotipo El Tor, a una densidad celular elevada, HapR reprime la expresión del gen que codifica para el activador VpsT, lo que conduce a una disminución de la formación de la biopelícula.^{48,83,100,101,108} HapR también controla la expresión de *vpsR* en algunas cepas.⁹⁸ Los mutantes de HapR, de hecho, son más rugosos y presentan una mayor expresión de los genes *vps* que la cepa salvaje y forman biopelículas más gruesas y compactas que la cepa salvaje.^{32,98,108}

Mutantes del QS que sobreproducen VPS muestran una gran disminución en la habilidad para escapar de la biopelícula,^{32,55,110} lo que indica que el QS es importante para la dispersión. Además, los mutantes *hapR* no colonizan efectivamente el intestino en un modelo de ratón neonato^{32,111} y se ha sugerido que esto se deba a la incapacidad que tienen estos mutantes de reprimir los genes co-regulados con la biopelícula dentro del hospedero. La importancia de la regulación por el QS en la biología de *V. cholerae*, quedó demostrada recientemente, cuando se descubrió que en las cepas del biotipo clásico, que presentan una mutación en *hapR*,¹¹² existe una respuesta dependiente del QS (a través de las moléculas CAI-1 y AI-2), independiente de HapR, que reprime la expresión del VPS en presencia de elevadas densidades celulares.⁸²

Regulación de la formación de la biopelícula a través del c-di-GMP

El monofosfato cíclico de diguanosina (c-di-GMP, por sus siglas en inglés *cyclic diguanylic acid*) es un segundo mensajero ubicuo, regulador central de la transición del estado de vida libre, motil, a la formación de una biopelícula en muchas bacterias,¹¹³ incluyendo a *V. cholerae*.^{114,115} La producción y degradación del c-di-GMP es controlada por las enzimas diguanilato ciclasas (DGCs, por sus siglas en inglés *diguanylate cyclases*) y fosfodiesterasas (PDEs, por sus siglas en inglés *phosphodiesterases*), respectivamente.¹¹³ Los vibrios, en particular, contienen un número mucho mayor de DGCs y PDEs que otras bacterias¹¹⁶ y la abundancia de estas enzimas en *V. cholerae* revela que la señalización a través del c-diGMP desempeña una importante función en la adaptación de los vibrios a los diferentes ambientes.¹⁰⁷ Estas proteínas generalmente son modulares y además de poseer los dominios con la actividad enzimática, poseen una variedad de dominios receptores que probablemente reciben diversas señales del ambiente. Se piensa que estas señales sean transducidas como una alteración de la actividad enzimática que a su vez pudieran resultar en fluctuaciones locales o globales de las concentraciones del c-di-GMP, que pudieran provocar ajustes del comportamiento de la célula.^{113,117}

En la mayoría de los organismos y de las proteínas homólogas, mutaciones de los genes que codifican las DGCs disminuyen la formación de la biopelícula, mientras que mutaciones de los genes que codifican las PDEAs aumentan la formación de la biopelícula.¹¹⁸ Así, las DGCs

generalmente promueven la formación de la biopelícula mientras que las PDEAs la inhiben, lo que indica que el c-di-GMP es un regulador positivo de la formación de la biopelícula. En *V. cholerae*, incrementos de la concentración del c-di-GMP aumenta la formación de la biopelícula estimulando la transcripción de los genes *vps* y los reguladores transcripcionales *vpsR* y *vpsT*.^{114,119} Mutantes de los genes que codifican para las PDEs *mbaA*, *rocS*, *cdgC*, *cdpA* y *vieA* muestran también una mayor formación de la biopelícula, debido probablemente a un aumento de la concentración de c-diGMP.^{68,114,115,120-122}

Recientemente, la señalización a través del c-di-GMP en *V. cholerae* se ha relacionado con otras dos vías reguladoras, el QS^{103,123} y la regulación catabólica mediada por el cAMP-CRP.⁹⁵ En particular, el QS y el c-di-GMP actúan recíprocamente sobre la formación de la biopelícula: el QS reprime y el c-di-GMP activa el desarrollo de esta estructura. Evidencias recientes muestran que el regulador terminal del QS, HapR, producido en densidades celulares elevadas, reprime la formación de la biopelícula por dos mecanismos diferentes.¹⁰³ Primero, HapR controla la transcripción de 14 genes que codifican para un grupo de proteínas que sintetizan y degradan el c-di-GMP, lo que resulta en una reducción neta de la concentración celular del c-di-GMP a una densidad celular elevada y por lo tanto, una disminución de la formación de la biopelícula. Segundo, HapR se une directamente al gen *vpsT* y reprime su expresión, lo que da lugar también a una disminución en la formación de la biopelícula. Además, se demostró que las cepas clásicas y El Tor utilizan mecanismos diferentes para controlar la concentración del c-di-GMP y la formación de la biopelícula.¹²³

El complejo regulador AMPc-CRP se ha identificado como un regulador negativo de la formación de la biopelícula a múltiples niveles, aunque el mecanismo utilizado parece depender de la cepa analizada.⁹³⁻⁹⁵ Primero, el complejo AMPc-CRP regula negativamente la formación de la biopelícula a través de la activación de la expresión de *hapR*, el que a su vez regula negativamente la expresión de los genes biosintéticos del VPS y la de los genes codificadores de las proteínas de la matriz de la biopelícula; así como la de los genes *cdgA*, *vpsT* y dependiendo de la cepa de *vpsR*. Segundo, el complejo AMPc-CRP también regula negativamente la expresión de *vpsR*, *cdgA* y *rbmC* por unión directa a la región de sus promotores. Además, se determinó que el complejo AMPc-CRP regula la expresión de 10 genes codificadores de DGCs y PDEAs y se demostró, por un análisis fenotípico de mutantes, que la DGC CdgA es la mediadora fundamental de la regulación negativa de la formación de la biopelícula por este complejo. Este resultado evidenció la conexión entre la señalización del AMPc y el c-di-GMP en *V. cholerae*.¹⁰²

Aunque se han identificado muchas enzimas DGCs y PDEAs involucradas en la formación de la biopelícula, las señales a las cuales estas proteínas responden permanecen desconocidas, así como el mecanismo por el cual se controla su expresión o actividad. Una de las señales que ha sido implicada en la regulación de la formación de la biopelícula a través del c-di-GMP es la poliamina noespermidina, mediante MbaA. La eliminación del gen *mbaA* provoca un aumento en la formación de la biopelícula y en la transcripción de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis del exopolisacárido.^{67,68,114,121} Se piensa que MbaA funcione como una fosfodiesterasa específica del c-di-GMP, aunque esto no se ha demostrado experimentalmente.

El mecanismo usado por el c-di-GMP para regular la formación de la biopelícula en *V. cholerae* es uno de los mayores enigmas en la actualidad. Uno de los mecanismos identificados en otros microorganismos es la modulación de la actividad enzimática de la proteína a la que se unen. En los últimos años, se han reconocido otros tres tipos de blancos del c-di-GMP: los dominios PilZ, PeiD y los *riboswitches*.¹²⁴ En *V. cholerae* existen cinco proteínas que poseen dominios PilZ y dos de ellas, PlzC y PlzD, se unen al c-di-GMP y regulan la formación de la biopelícula, entre otros procesos.¹²⁵ Así, las proteínas con dominios PilZ pueden funcionar como receptores de c-diGMP y regular los procesos dependientes del c-diGMP en *V. cholerae*. Sin embargo, el mecanismo exacto a través del cual ellas regulan la formación de la biopelícula no ha sido dilucidado. Un trabajo reciente identificó a VpsT como receptora directa del c-di-GMP, la que cambia su oligomerización una vez que se une a esta molécula.¹⁰⁵

CONTRIBUCIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS A LA SUPERVIVENCIA AMBIENTAL DE *V. cholerae*

Las bacterias en el ambiente acuático se hallan raramente en estado libre, más bien, están asociadas con las superficies, lo que evita que sean arrastradas.⁶² *V. cholerae* es un habitante natural de diversos ambientes acuáticos, incluyendo lagos, ríos, estuarios y océanos.²⁶ Se ha encontrado como células individuales en la columna de agua y como células asociadas en biopelículas unidas a superficies del fitoplancton, zooplancton, crustáceos y plantas acuáticas.¹²⁶⁻¹³⁸ La importancia de la asociación de *V. cholerae* en los ambientes acuáticos está demostrada por la relación directa que existe entre el aumento de las poblaciones de vibrios y el florecimiento del fitoplancton y zooplancton,^{139,140} así como con los factores físicos que los dirigen.^{141,142} Experimentos de microcosmos en el laboratorio sugieren que las células de *V. cholerae* forman biopelículas en superficies bióticas y abióticas y de esta manera, se protegen con la barrera del VPS.¹³⁸ Las biopelículas de *V. cholerae* formadas durante estas asociaciones pueden ayudar en la supervivencia de la bacteria, ya que estas ofrecen protección a diferentes factores ambientales adversos tales como la depredación por protozoos,¹⁴³ luz ultravioleta,¹⁴⁴ agentes oxidantes¹⁴⁵ y metales tóxicos.¹⁴⁶

Se ha postulado que la capacidad de *V. cholerae* de formar biopelículas contribuye a las epidemias de cólera, al potenciar su persistencia ambiental en los reservorios acuáticos. Se demostró que cepas de los serogrupos de *V. cholerae* O1 y O139 sobreviven alrededor de un año, mayormente en estado no cultivable, unidas a biopelículas, en ecosistemas adyacentes a la costa de la Bahía de Bengala, lo cual explicaría por qué el cólera es endémico en esa región geográfica.²⁸ Un reciente estudio epidemiológico y ecológico en las villas costeras de la Bahía de Bengala, realizado entre las epidemias que han ocurrido estacionalmente, indicó que la mayor parte de las aguas que se usan como fuentes de agua potable contenían células de *V. cholerae* O1, no cultivables y unidas a biopelículas.¹⁴⁷ Estudios posteriores también mostraron que las células no cultivables de *V. cholerae* O1 presentes naturalmente en las biopelículas estaban más adaptadas a los ecosistemas acuáticos comparadas con las células de *V. cholerae* secretadas en las heces de cólera expulsadas al ambiente acuático.²⁹ Sin embargo, aún no se ha dilucidado completamente la retención del potencial patogénico de las células presentes en las biopelículas.

Se ha postulado que el crecimiento de *V. cholerae* en biopelículas en el ambiente también contribuye a su transmisión, a través de la acumulación y dispersión de grandes números de microorganismos, lo cual facilita que se alcancen las dosis infectivas adecuadas.¹⁴⁸ Una evidencia que apoya esta teoría es la disminución del número de casos de cólera en una villa de Bangladesh, luego de la filtración de agua potable a través de una tela con un tamaño de poro mayor que 20 μm , debido probablemente a la remoción de los ensamblados de *V. cholerae*.^{126,149} Igualmente se ha observado una estrecha correlación entre la altura de la superficie del mar en la Bahía de Bengala y las epidemias de cólera en Bangladesh. Esto puede ser explicado porque el agua de mar al inundar los estuarios adyacentes, lleva partículas y plancton colonizado con *V. cholerae* en forma de biopelícula que en última instancia introducen la bacteria a los ecosistemas de agua salobre.^{28,29} Se ha descrito además, que grupos multicelulares de *V. cholerae*, parecidos a biopelículas, son expulsados en las heces de humanos,³³ lo que puede ser una manera eficiente de entregar dosis infectivas del patógeno. De esta manera, la formación de las biopelículas por *V. cholerae* es muy importante en su ecología y en la epidemiología del cólera; sin embargo, su función durante la infección en humanos no se ha establecido claramente.

POSIBLE FUNCIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS DURANTE LA INFECCIÓN DE *V. cholerae*

Las biopelículas bacterianas se encuentran generalizadas en la naturaleza y existen en una variedad de ambientes incluyendo los suelos y sedimentos, así como la piel, boca e intestino humanos. Aun cuando se conoce mucho sobre la composición, estructura y metabolismo de las biopelículas orales, su estudio ha sido grandemente olvidado en el tracto gastrointestinal.¹⁵⁰⁻¹⁵²

En el caso de *V. cholerae* no se ha reportado que forme biopelículas en el intestino durante su colonización, pero se ha informado que forma agregados de estructura parecida a estas.³³ Estudios en animales sugieren que este fenómeno es importante en algunos modelos de infección,¹⁵³ mientras que otros apuntan a que no es esencial para la colonización en el modelo de ratón neonato.³² Sin embargo, una serie de evidencias indican que la biopelícula sí pudiera desempeñar un papel significativo durante el crecimiento de *V. cholerae* *in vivo* al cumplir varias funciones. En primera instancia, durante la infección inicial del hospedero, probablemente las células se encuentren formando parte de una biopelícula¹⁴⁹ y en esta estructura son más resistentes al ácido que las células planctónicas.³² Esto pudiera promover su supervivencia durante el paso por el estómago. Además, se ha demostrado que las células de *V. cholerae* forman biopelículas en presencia de bilis y dentro de esta estructura son más resistentes a la toxicidad de este compuesto que sus contrapartes planctónicas.³⁴ Sin embargo, al alcanzar el intestino, se requiere la dispersión de la biopelícula, activada por el QS, a células individuales para colonizar efectivamente el epitelio intestinal e iniciar la producción de los factores de virulencia.^{32,55} Abandonar la estructura de la biopelícula para poder colonizar la superficie intestinal debe ser un paso crítico para las células de *V. cholerae*, ya que en los casos en que este proceso está afectado, la eficiencia de la colonización intestinal disminuye.^{32,55} Este patrón se repite más tarde en la infección cuando la densidad de la población ha aumentado en el intestino y las señales del QS promueven la dispersión a células individuales. Es-

tas células pueden reiniciar la colonización de regiones adicionales en el intestino.³² De modo interesante, se ha sugerido que para una eficiente colonización intestinal es necesario una regulación temporal de la producción del VPS *in vivo*.¹⁵³ Además, en un modelo animal la expresión de los genes que codifican para el VPS se indujo *in vivo*.¹⁵⁴ No obstante, se deben realizar más estudios para determinar la función de las biopelículas de *V. cholerae* durante la infección en los diferentes modelos animales disponibles y con diferentes cepas.

CONCLUSIONES

En numerosos estudios *in vitro* se han dilucidado las señales ambientales, los circuitos de transducción de señales y efectores que son requeridos para la formación de la biopelícula por *V. cholerae*. Debido a que se propone que la unión de *V. cholerae* a las superficies en el ambiente es un factor crucial en su supervivencia en los sistemas naturales, se hace necesario realizar estudios que develen los mecanismos de transducción de señales que controlan la formación de la biopelícula por *V. cholerae* en los nichos humanos y marinos. Esto contribuirá a entender los mecanismos subyacentes en la emergencia y re-emergencia de este patógeno.

Aun cuando se han realizado notables avances en el conocimiento de las señales ambientales que regulan la formación de las biopelículas por *V. cholerae in vitro*, no se han dilucidado todos los mecanismos moleculares que median la respuesta a estas señales; así como tampoco el efecto de otras señales importantes *in vivo* tales como la concentración de oxígeno, acidez y temperatura. Además, se hace necesario determinar cómo interactúan los diversos sistemas reguladores descritos y la significación en el ambiente y en el hospedero de las señales estudiadas *in vitro*. Además, será importante determinar los factores que median la dispersión de las biopelículas de *V. cholerae* y su regulación con la finalidad de desarrollar nuevas herramientas para controlar la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sauer K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 2003;4(6):219.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-745.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:435-464.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418):1318-1322.
- Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):847-867.
- Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis.* 2001;33(8):1387-1392.
- Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science.* 2003;301(5629):105-107.
- Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;(437):7-11.
- Zegans ME, Shanks RM, O'Toole GA. Bacterial biofilms and ocular infections. *Ocul Surf.* 2005;3(2):73-80.
- Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:85-105.
- Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(4):767-775.
- Schaudinn C, Gorur A, Keller D, Sedghizadeh PP, Costerton JW. Periodontitis: an archetypical biofilm disease. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(8):978-986.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:49-79.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
- Lazazzera BA. Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(2):222-227.
- Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol.* 2003;48(1):253-267.
- Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminski M, Balestrino D *et al.* Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol.* 2004;51(3):659-674. 18. Ren D, Bedzyk LA, Thomas SM, Ye RW, Wood TK. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;64(4):515-524.
- Domka J, Lee J, Bansal T, Wood TK. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol.* 2007;9(2):332-346.
- Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:249-289.
- An D, Parsek MR. The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10(3):292-296.
- Pruss BM, Besemann C, Denton A, Wolfe AJ. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2006;188(11):3731-3739.
- Wood TK. Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. *Environ Microbiol.* 2009;11(1):1-15.
- Monds RD, O'Toole GA. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* 2009;17(2):73-87.
- Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(4):1301-1314.
- Colwell RR, Huq A. Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*. The causative agent of cholera. *Ann NY Acad Sci.* 1994;740:44-54.
- Faruque SM, Nair GB, Mekalanos JJ. Genetics of stress adaptation and virulence in toxigenic *Vibrio cholerae*. *DNA Cell Biol.* 2004;23(11):723-741.
- Alam M, Sultana M, Nair GB, Sack RB, Sack DA, Siddique AK *et al.* Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(4):2849-2855.
- Alam M, Sultana M, Nair GB, Siddique AK, Hasan NA, Sack RB *et al.* Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(45):17801-17806.
- Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol.* 1999;34(3):586-595.
- Yildiz FH, Schoolnik GK. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(7):4028-4033.
- Zhu J, Mekalanos JJ. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev Cell.* 2003;5(4):647-656.
- Faruque SM, Biswas K, Udden SM, Ahmad QS, Sack DA, Nair GB *et al.* Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(16):6350-6355.
- Hung DT, Zhu J, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* 2006;59(1):193-201.
- Moorthy S, Watnick PI. Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol Microbiol.* 2004;52(2):573-587.
- Moorthy S, Watnick PI. Identification of novel stage-specific

- ic genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Mol Microbiol.* 2005;57(6):1623-1635.
37. Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol.* 1999;34(3):586-595.
 38. Watnick PI, Lauriano CM, Klose KE, Croal L, Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol.* 2001;39(2):223-235.
 39. Moorthy S, Watnick PI. Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol Microbiol.* 2004;52(2):573-587.
 40. Chiavelli DA, Marsh JW, Taylor RK. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(7):3220-3225.
 41. Meibom KL, Li XB, Nielsen AT, Wu CY, Roseman S, Schoolnik GK. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(8):2524-2529.
 42. Watnick PI, Fullner KJ, Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J Bacteriol.* 1999;181(11):3606-3609.
 43. Lauriano CM, Ghosh C, Correa NE, Klose KE. The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2004;186(15):4864-4874.
 44. Reguera G, Kolter R. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *J Bacteriol.* 2005;187(10):3551-3555.
 45. Herrington DA, Hall RH, Losonsky G, Mekalanos JJ, Taylor RK, Levine MM. Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J Exp Med.* 1988;168(4):1487-1492.
 46. Hsiao A, Toscano K, Zhu J. Post-transcriptional cross-talk between pro- and anti-colonization pili biosynthesis systems in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* 2008;67(4):849-860.
 47. Hsiao A, Xu X, Kan B, Kulkarni RV, Zhu J. Direct regulation by the *Vibrio cholerae* regulator ToxT to modulate colonization and anticolonization pilus expression. *Infect Immun.* 2009;77(4):1383-1388.
 48. Yildiz FH, Schoolnik GK. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(7):4028-4033.
 49. Fong JC, Karplus K, Schoolnik GK, Yildiz FH. Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2006;188(3):1049-1059.
 50. Fong JC, Yildiz FH. The *rbmBCDEF* gene cluster modulates development of rugose colony morphology and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2007;189(6):2319-2330.
 51. Kierek K, Watnick PI. Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(9):5079-5088.
 52. Kierek K, Watnick PI. The *Vibrio cholerae* O139 O-antigen polysaccharide is essential for Ca²⁺-dependent biofilm development in sea water. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(24):14357-14362.
 53. Muller J, Miller MC, Nielsen AT, Schoolnik GK, Spormann AM. *vpsA*- and *luxO*-independent biofilms of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;275(2):199-206.
 54. Davies DG, Marques CN. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol.* 2009;191(5):1393-1403.
 55. Liu Z, Stirling FR, Zhu J. Temporal quorum-sensing induction regulates *Vibrio cholerae* biofilm architecture. *Infect Immun.* 2007;75(1):122-126.
 56. Finkelstein RA, Boesman-Finkelstein M, Chang Y, Hase CC. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect Immun.* 1992;60(2):472-478.
 57. Jobling MG, Holmes RK. Characterization of *hapR*, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi* *luxR* gene. *Mol Microbiol.* 1997;26(5):1023-1034.
 58. Silva AJ, Pham K, Benitez JA. Haemagglutinin/protease expression and mucin gel penetration in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *Microbiology.* 2003;149(Pt 7):1883-1891.
 59. Stanley NR, Lazazzera BA. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol.* 2004;52(4):917-924.
 60. Dunlap PV. *OscR*, a new osmolarity-responsive regulator in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2009;191(13):4053-4055.
 61. Shikuma NJ, Yildiz FH. Identification and characterization of *OscR*, a transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2009;191(13):4082-4096.
 62. Huq A, Whitehouse CA, Grim CJ, Alam M, Colwell RR. Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(3):244-247.
 63. Bilecen K, Yildiz FH. Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ Microbiol.* 2009.
 64. Gooday GW. Aggressive and defensive roles for chitinases. *EXS.* 1999;87:157-169.
 65. Pruzzo C, Vezzulli L, Colwell RR. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ Microbiol.* 2008;10(6):1400-1410.
 66. Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem.* 1984;53:749-790.
 67. Karatan E, Duncan TR, Watnick PI. *NspS*, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. *J Bacteriol.* 2005;187(21):7434-7443.
 68. Bomchil N, Watnick P, Kolter R. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. *J Bacteriol.* 2003;185(4):1384-1390.
 69. Lee J, Sperandio V, Frantz DE, Longgood J, Camilli A, Phillips MA *et al.*. An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem.* 2009;284(15):9899-9907.
 70. Haugo AJ, Watnick PI. *Vibrio cholerae* *CytR* is a repressor of biofilm development. *Mol Microbiol.* 2002;45(2):471-483.
 71. Martino PD, Fursy R, Bret L, Sundararaju B, Phillips RS. Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Can J Microbiol.* 2003;49(7):443-449.
 72. Domka J, Lee J, Wood TK. *YliH* (BssR) and *YceP* (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(4):2449-2459.
 73. Lee J, Jayaraman A, Wood TK. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by *SdiA*. *BMC Microbiol.* 2007;7:42.
 74. Zhang XS, Garcia-Contreras R, Wood TK. *YcfR* (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity. *J Bacteriol.* 2007;189(8):3051-3062.
 75. Mueller RS, McDougald D, Cusumano D, Sodhi N, Kjelleberg S, Azam F *et al.* *Vibrio cholerae* strains possess multiple strategies for abiotic and biotic surface colonization. *J Bacteriol.* 2007;189(14):5348-5360.
 76. Mueller RS, Beyhan S, Saini SG, Yildiz FH, Bartlett DH. Indole acts as an extracellular cue regulating gene expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2009;191(11):3504-3516.
 77. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:165-199.
 78. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:319-346.
 79. Miller MB, Skorupski K, Lenz DH, Taylor RK, Bassler BL. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell.* 2002;110(3):303-314.
 80. Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS, Bassler BL. The small RNA chaperone *Hfq* and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell.* 2004;118(1):69-82.
 81. Lenz DH, Bassler BL. The small nucleoid protein *Fis* is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing. *Mol Microbiol.* 2007;63(3):859-871.
 82. Hammer BK, Bassler BL. Regulatory small RNAs cir-

- cumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic *Vibrio cholerae*. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(27):11145-11149.
83. Lenz DH, Miller MB, Zhu J, Kulkarni RV, Bassler BL. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. Mol Microbiol. 2005;58(4):1186-1202.
 84. Miller MB, Skorupski K, Lenz DH, Taylor RK, Bassler BL. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. Cell. 2002;110(3):303-314.
 85. Xavier KB, Bassler BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. Curr Opin Microbiol. 2003;6(2):191-197.
 86. Henke JM, Bassler BL. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. J Bacteriol. 2004;186(20):6902-6914.
 87. Xavier KB, Bassler BL. Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2005;187(1):238-248.
 88. Xavier KB, Miller ST, Lu W, Kim JH, Rabinowitz J, Pelczar I *et al.*. Phosphorylation and processing of the quorum-sensing molecule autoinducer-2 in enteric bacteria. ACS Chem Biol. 2007;2(2):128-136.
 89. Houot L, Watnick PI. A novel role for enzyme I of the *Vibrio cholerae* phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in regulation of growth in a biofilm. J Bacteriol. 2008;190(1):311-320.
 90. Kolb A, Busby S, Buc H, Garges S, Adhya S. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. Annu Rev Biochem. 1993;62:749-795.
 91. Stulke J, Hillen W. Carbon catabolite repression in bacteria. Curr Opin Microbiol. 1999;2(2):195-201.
 92. Bruckner R, Titgemeyer F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. FEMS Microbiol Lett. 2002;209(2):141-148.
 93. Liang W, Silva AJ, Benitez JA. The cyclic AMP receptor protein modulates colonial morphology in *Vibrio cholerae*. Appl Environ Microbiol. 2007;73(22):7482-7487.
 94. Liang W, Pascual-Montano A, Silva AJ, Benitez JA. The cyclic AMP receptor protein modulates quorum sensing, motility and multiple genes that affect intestinal colonization in *Vibrio cholerae*. Microbiology. 2007;153(Pt 9):2964-2975.
 95. Fong JC, Yildiz FH. Interplay between cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein and cyclic di-GMP signaling in *Vibrio cholerae* biofilm formation. J Bacteriol. 2008;190(20):6646-6659.
 96. Deutscher J, Francke C, Postma PW. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria? Microbiol Mol Biol Rev. 2006;70(4):939-1031.
 97. Mey AR, Craig SA, Payne SM. Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: the RyhB regulon and role of ryhB in biofilm formation. Infect Immun. 2005;73(9):5706-5719.
 98. Yildiz FH, Liu XS, Heydorn A, Schoolnik GK. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. Mol Microbiol. 2004;53(2):497-515.
 99. Zhang L, Zhu Z, Jing H, Zhang J, Xiong Y, Yan M *et al.* Pleiotropic effects of the twin-arginine translocation system on biofilm formation, colonization, and virulence in *Vibrio cholerae*. BMC Microbiol 2009; 9:114.
 100. Yildiz FH, Dolganov NA, Schoolnik GK. VpsR, a Member of the Response Regulators of the Two-Component Regulatory Systems, Is Required for Expression of vps Biosynthesis Genes and EPS(ETr)-Associated Phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. J Bacteriol. 2001;183(5):1716-1726.
 101. Casper-Lindley C, Yildiz FH. VpsT is a transcriptional regulator required for expression of vps biosynthesis genes and the development of rugose colonial morphology in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. J Bacteriol. 2004;186(5):1574-1578.
 102. Beyhan S, Bilecen K, Salama SR, Casper-Lindley C, Yildiz FH. Regulation of rugosity and biofilm formation in *Vibrio cholerae*: comparison of VpsT and VpsR regulons and epistasis analysis of vpsT, vpsR, and hapR. J Bacteriol. 2007;189(2):388-402.
 103. Waters CM, Lu W, Rabinowitz JD, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of vpsT. J Bacteriol. 2008;190(7):2527-2536.
 104. Yang M, Frey EM, Liu Z, Bishar R, Zhu J. The virulence transcriptional activator AphA enhances biofilm formation by *Vibrio cholerae* by activating expression of the biofilm regulator VpsT. Infect Immun. 2010;78(2):697-703.
 105. Krasteva PV, Fong JC, Shikuma NJ, Beyhan S, Navarro MV, Yildiz FH *et al.* *Vibrio cholerae* VpsT Regulates Matrix Production and Motility by Directly Sensing Cyclic di-GMP. Science. 2010;327(5967):866-868.
 106. Shikuma NJ, Fong JC, Odell LS, Perchuk BS, Laub MT, Yildiz FH. Overexpression of VpsS, a Hybrid Sensor Kinase, Enhances Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. J Bacteriol. 2009.
 107. Yildiz FH, Visick KL. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. Trends Microbiol. 2009;17(3):109-118.
 108. Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Mol Microbiol. 2003;50(1):101-104.
 109. Kovacicova G, Skorupski K. Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by quorum sensing: HapR functions at the aphA promoter. Mol Microbiol. 2002;46(4):1135-1147.
 110. Nielsen AT, Dolganov NA, Otto G, Miller MC, Wu CY, Schoolnik GK. RpoS controls the *Vibrio cholerae* mucosal escape response. PLoS Pathog. 2006;2(10):e109.
 111. Zhu J, Miller MB, Vance RE, Dziejman M, Bassler BL, Mekalanos JJ. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(5):3129-3134.
 112. Joelsson A, Liu Z, Zhu J. Genetic and phenotypic diversity of quorum-sensing systems in clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 2006;74(2):1141-1147.
 113. Romling U, Amikam D. Cyclic di-GMP as a second messenger. Curr Opin Microbiol. 2006;9(2):218-228.
 114. Lim B, Beyhan S, Meir J, Yildiz FH. Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. Mol Microbiol 2006; 60(2):331-348.
 115. Tischler AD, Camilli A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. Mol Microbiol 2004; 53(3):857-869.
 116. Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. FEMS Microbiol Lett 2001; 203(1):11-21.
 117. Romling U, Simm R. Prevailing concepts of c-di-GMP signaling. Contrib Microbiol 2009; 16:161-181.
 118. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature 2005; 436(7054):1171-1175.
 119. Beyhan S, Tischler AD, Camilli A, Yildiz FH. Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. J Bacteriol. 2006;188(10):3600-3613.
 120. Rashid MH, Rajanna C, Ali A, Karaolis DK. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. FEMS Microbiol Lett. 2003;227(1):113-119.
 121. Lim B, Beyhan S, Yildiz FH. Regulation of *Vibrio* polysaccharide synthesis and virulence factor production by CdgC, a GGDEF-EAL domain protein, in *Vibrio cholerae*. J Bacteriol. 2007;189(3):717-729.
 122. Tamayo R, Schild S, Pratt JT, Camilli A. Role of cyclic Di-GMP during el tor biotype *Vibrio cholerae* infection: characterization of the *in vivo*-induced cyclic Di-GMP phosphodiesterase CdpA. Infect Immun. 2008;76(4):1617-1627.
 123. Hammer BK, Bassler BL. Distinct sensory pathways in *Vibrio cholerae* El Tor and classical biotypes modulate cyclic dimeric GMP levels to control biofilm formation. J Bacteriol. 2009;191(1):169-177.
 124. Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiol Mol Biol Rev. 2009;73(2):310-347.
 125. Pratt JT, Tamayo R, Tischler AD, Camilli A. PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. J Biol Chem. 2007;282(17):12860-12870.
 126. Huo A, Xu B, Chowdhury MA, Islam MS, Montilla R, Col-

- well RR. A simple filtration method to remove plankton-associated *Vibrio cholerae* in raw water supplies in developing countries. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(7):2508-2512.
127. Huq A, Small EB, West PA, Huq MI, Rahman R, Colwell RR. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl Environ Microbiol.* 1983;45(1):275-283.
 128. Huq A, West PA, Small EB, Huq MI, Colwell RR. Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 associated with live copepods in laboratory microcosms. *Appl Environ Microbiol.* 1984;48(2):420-424.
 129. Huq A, Huq SA, Grimes DJ, O'Brien M, Chu KH, Capuzzo JM *et al.* Colonization of the gut of the blue crab (*Callinectes sapidus*) by *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* 1986;52(3):586-588.
 130. Islam MS, Drasar BS, Bradley DJ. Attachment of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to various freshwater plants and survival with a filamentous green alga, *Rhizoclonium fontanum*. *J Trop Med Hyg.* 1989;92(6):396-401.
 131. Islam MS. Effect of various biophysicochemical conditions on toxigenicity of *Vibrio cholerae* O1 during survival with a green alga, *Rhizoclonium fontanum*, in an artificial aquatic environment. *Can J Microbiol* 1990;36(7):464-468.
 132. Tamplin ML, Gauzens AL, Huq A, Sack DA, Colwell RR. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56(6):1977-1980.
 133. Islam MS, Drasar BS, Sack RB. The aquatic environment as a reservoir of *Vibrio cholerae*: a review. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1993;11(4):197-206.
 134. Islam MS, Drasar BS, Sack RB. The aquatic flora and fauna as reservoirs of *Vibrio cholerae*: a review. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1994;12(2):87-96.
 135. Huq A, Colwell RR, Chowdhury MA, Xu B, Moniruzzaman SM, Islam MS *et al.* Coexistence of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Bengal in plankton in Bangladesh. *Lancet.* 1995;345(8959):1249.
 136. Shukla BN, Singh DV, Sanyal SC. Attachment of non-culturable toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 and *Aeromonas* spp. to the aquatic arthropod *Gerris spinolae* and plants in the River Ganga, Varanasi. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995;12(2):113-120.
 137. Islam MS, Mahmuda S, Morshed MG, Bakht HB, Khan MN, Sack RB *et al.* Role of cyanobacteria in the persistence of *Vibrio cholerae* O139 in saline microcosms. *Can J Microbiol.* 2004;50(2):127-131.
 138. Islam MS, Jahid MI, Rahman MM, Rahman MZ, Islam MS, Kabir MS *et al.* Biofilm acts as a microenvironment for plankton-associated *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Bangladesh. *Microbiol Immunol.* 2007;51(4):369-379.
 139. Epstein PR. Algal blooms in the spread and persistence of cholera. *Biosystems.* 1993;31(2-3):209-221.
 140. Huq A, Sack RB, Nizam A, Longini IM, Nair GB, Ali A *et al.* Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(8):4645-4654.
 141. Colwell RR. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science.* 1996;274(5295):2025-2031.
 142. Lobitz B, Beck L, Huq A, Wood B, Fuchs G, Faruque AS *et al.* Climate and infectious disease: use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(4):1438-1443.
 143. Matz C, McDougald D, Moreno AM, Yung PY, Yildiz FH, Kjelleberg S. Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(46):16819-16824.
 144. Espeland EM, Wetzel RG. Complexation, Stabilization, and UV Photolysis of Extracellular and Surface-Bound Glucosidase and Alkaline Phosphatase: Implications for Biofilm Microbiota. *Microb Ecol.* 2001;42(4):572-585.
 145. Elkins JG, Hassett DJ, Stewart PS, Schweizer HP, McDermott TR. Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(10):4594-4600.
 146. Teitzel GM, Parsek MR. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(4):2313-2320.
 147. Alam M, Sultana M, Nair GB, Sack RB, Sack DA, Siddique AK *et al.* Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(4):2849-2855.
 148. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* 2005;13(1):7-10.
 149. Colwell RR, Huq A, Islam MS, Aziz KM, Yunus M, Khan NH *et al.* Reduction of cholera in Bangladeshi villages by simple filtration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(3):1051-1055.
 150. Costerton JW, Rozee KR, Cheng KJ. Colonization of particulates, mucous, and intestinal tissue. *Prog Food Nutr Sci* 1983;7(3-4):91-105.
 151. Macfarlane S, Dillon JF. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol.* 2007;102(5):1187-1196.
 152. Macfarlane S. Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42 Suppl 3 Pt 1:S142-S143.
 153. Rashid MH, Rajanna C, Zhang D, Pasquale V, Magder LS, Ali A *et al.* Role of exopolysaccharide, the rugose phenotype and VpsR in the pathogenesis of epidemic *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;230(1):105-113.
 154. Xu Q, Dziejman M, Mekalanos JJ. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intraintestinal growth and midexponential phase in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(3):1286-1291.