



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IMPACTO DE BIOFILMS BACTERIANOS  
EN ENFERMEDADES EN HUMANOS**

*Trabajo Monográfico de Actualización*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA  
KARLA BELEM MARTÍNEZ MONTES**

**MÉXICO, D.F.**

**2011**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: RODOLFO PASTELÍN PALACIOS

**VOCAL:** Profesor: RAÚL GARZA VELASCO

**SECRETARIO:** Profesor: PATRICIA GÓMEZ DE LEÓN CRUCES

**1er. SUPLENTE:** Profesor: NORMA ANGÉLICA CASTELLANOS CHÁVEZ

**2o. SUPLENTE:** Profesor: SANTIAGO RÍOS ÁVILA

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR,  
EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DRA. PATRICIA GÓMEZ DE LEÓN CRUCES**  
**ASESOR DEL TEMA**

**KARLA BELEM MARTÍNEZ MONTES**  
**SUSTENTANTE**

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Se agradece el apoyo de financiamiento de beca para la elaboración de la tesis a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) mediante su programa DGAPA-PAPIIT, Proyecto IN 208 410-3

# AGRADECIMIENTOS

---

A mi Directora de Tesis, la Dra. Patricia Gómez de León Cruces, por haber confiado en mi persona, por su asesoramiento científico, sus observaciones críticas, sus sustanciales sugerencias y sus atinadas correcciones durante la redacción de esta Tesis.

A mis profesores de carrera por sus enseñanzas teórico-prácticas, por su valiosa colaboración y voluntad en las actividades académicas, por su fundamental ayuda a lo largo de la carrera, por sus estímulos para que siguiera y siga creciendo intelectualmente y sobretodo por su participación en mi formación como una profesional capaz y digna de tan maravillosa facultad, mi querida Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. A la UNAM por ser mi *alma máter*, que me ha proveído de tan valioso alimento intelectual.

A todos los profesores que a lo largo de mi vida académica me han influido y motivado para alcanzar mis metas, por su predisposición para exigirme dar lo mejor de mí, por desarrollar mis aptitudes y habilidades, por sus observaciones críticas a mi trabajo, por aclarar mis dudas, por transmitirme sus conocimientos y enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es en el fondo una recompensa.

# AGRADECIMIENTOS

---

Gracias a Dios por poner en mi camino esta noble carrera, por estar conmigo a cada paso.

A mis Padres, Belem y Jorge, por enseñarme que la responsabilidad, el rigor y la constancia son herramientas fundamentales para llegar a la meta. Por su constante apoyo y paciencia a lo largo de estos años, me queda claro que sin su amor y deseos porque sus hijos tengan un mejor futuro en la vida no habría llegado tan lejos. Por estas razones quiero dedicarles esta Tesis, que es el resumen de mis 4 años y medio en la facultad y la puerta a una nueva etapa en mi vida como profesional.

A mis hermanos, para quienes espero ser siempre un buen ejemplo. A mi hermana, Tania Denis, por su cariño, por tener siempre una sonrisa contagiosa que motiva y reconforta; a mi hermano, Jorge Ulises, por su ayuda y apoyo técnico durante la carrera, porque con sus dudas me impulso a desempolvar, reafirma y aprender más conocimientos.

A mi novio que me ha brindado su amor, su apoyo y paciencia, por su comprensión en mis momentos de crisis y sus palabras de motivación durante los años en la facultad (y los futuros); y por la felicidad que comparte conmigo, gracias por ser parte de mi vida.

A mis amigas de la E.N.P. 6 que me permitieron ingresar en sus vidas dentro y fuera del salón de clases, y quienes a través de su amistad me brindan la ayuda y fortaleza para alcanzar mis sueños y ser feliz. A mi amiga Karim, por las noches de desvelos en que me motivo y apoyo para terminar mis tareas o estudiar para un examen, lo que siguió haciendo hasta esta Tesis, gracias chica por ayudarme con mi tesis de "lomas".

A mis amigos de la Facultad, Claudia, Maribel y Oscar, que me acompañaron y ayudaron, por las tardes locas de departamentales, las odiseas en los laboratorios y los momentos de catarsis en "Las Ardillas". Por su gran amistad ocupan un lugar especial en mi vida. Amiga Claudia, el destino te envió una tarde a la biblioteca y provocó una sucesión de eventos que ahora me tiene al final de esta carrera; por ser amiga y compañera de estudios durante esta inolvidable aventura, gracias.

# **IMPACTO DE BIOFILMS BACTERIANOS EN ENFERMEDADES EN HUMANOS**

## **ÍNDICE GENERAL**

---

AGRADECIMENTOS .....	3
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ÍNDICE DE CUADROS .....	10
ABREVIATURAS .....	11
<b>Capítulo 1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo 2 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>Capítulo 3 METODOLOGÍA .....</b>	<b>17</b>
<b>Capítulo 4 COMUNIDADES ADHERIDAS .....</b>	<b>19</b>
4.1 Comunidades Adheridas a Superficies y Comportamiento Colectivo. ....	19
4.2 Estructura del Biofilm .....	21
4.3 La Matriz del Biofilm .....	22
4.4 Metodologías para la Formación <i>in vitro</i> y Estudio de Biofilms .....	23





<b>Capítulo 5 FORMACIÓN DE BIOFILMS</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1</b> Regulación del Proceso de Formación de Biofilms .....	27
5.1.1 Quorum Sensing .....	27
5.1.2 Papel del Quorum Sensing en el Proceso de Formación de Biofilms .....	28
<b>5.2</b> Papel de las Señales Ambientales .....	30
<b>5.3</b> Inicio de la Formación de Biofilm: Adherencia Primaria – Adherencia Secundaria .....	31
5.3.1 Impacto de la Movilidad en la Adherencia .....	33
5.3.2 Adhesinas: Fimbriales y Afrimbriales .....	33
<b>5.4</b> Maduración del Biofilm .....	37
5.4.1 Relación Exopolisacáridos-Biofilm .....	38
<b>5.5</b> Liberación de Formas Sésiles .....	40
<b>5.6</b> Diferencias Básicas entre las Formas Sésiles y Formas Planctónicas .....	41
<b>Capítulo 6 FORMAR BIOFILMS CONFIERE BENEFICIOS</b> .....	<b>42</b>
<b>6.1</b> Protección contra Presiones Ambientales .....	43
6.1.1 Protección contra Antibióticos / Resistencia .....	43
6.1.2 Protección contra el Sistema Inmune .....	47
<b>6.2</b> Disponibilidad de Nutrientes y Cooperación Metabólica .....	51
<b>6.3</b> Adquisición de Nuevos Rasgos Genéticos .....	52
<b>Capítulo 7 EL PAPEL DE LOS BIOFILMS EN LA ENFERMEDAD</b> .....	<b>53</b>
<b>7.1</b> Infecciones Asociadas a Biofilms Bacterianos .....	54
<b>7.2</b> Biofilms y Patogénesis: Algunas Entidades Clínicas .....	57
➤ Caries dental y Periodontitis .....	57
➤ Endocarditis .....	58



➤ Prostatitis .....	58
➤ Osteomielitis .....	59
<b>7.3 Infecciones Asociadas a Dispositivos e Implantes Médicos</b>	
Contaminados por Bacterias Formadoras de Biofilms .....	60
<b>Capítulo 8 INFECCIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO ASOCIADAS</b>	
<b>A BIOFILMS BACTERIANOS .....</b>	<b>62</b>
<b>8.1 Justificación .....</b>	<b>62</b>
<b>8.2 Biofilms por <i>Haemophilus influenzae</i> no Tipificable</b>	
Asociables a Infecciones del Tracto Respiratorio .....	62
➤ Otitis Media Crónica OMC .....	66
➤ Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica EPOC .....	67
➤ Fibrosis Quística FQ .....	69
<b>Capítulo 9 PERSPECTIVAS Y PROPUESTAS.....</b>	<b>71</b>
<b>Capítulo 10 CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
BIBLIOGRAFÍA.....	76
PÁGINAS WEB .....	91

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>FIGURA 1:</b> Estructura de un biofilm formado por <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	20
<b>FIGURA 2:</b> Cultivos estáticos en placas de microtitulación .....	25
<b>FIGURA 3:</b> Acil homoserina lactona, molécula señal del Qs .....	27
<b>FIGURA 4:</b> Dinámica de formación de un biofilm bacteriano .....	30
<b>FIGURA 5:</b> Matriz de biofilms formados por cepas tipo silvestre y mutantes deficientes para la síntesis de EPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
<b>FIGURA 6:</b> Ventajas que confiere la vida en biofilms frente a la vida planctónica .....	42
<b>FIGURA 7:</b> Protección contra el sistema inmune .....	50
<b>FIGURA 8:</b> Interacciones Bacteria-Hospedero .....	55
<b>FIGURA 9:</b> Biofilms formados <i>in vitro</i> por HiNT .....	64

# ÍNDICE DE CUADROS

---

<b>CUADRO 1: Moléculas de adherencia fimbriales y afimbriales presentes en bacterias relacionadas con procesos infecciosos en humanos. . . . .</b>	<b>35</b>
<b>CUADRO 2: Actividad modificada de los antimicrobianos por presencia de biofilms. . . . .</b>	<b>46</b>
<b>CUADRO 3: Algunas infecciones humanas asociadas a biofilms bacterianos . . . . .</b>	<b>56</b>
<b>CUADRO 4: Bacterias formadoras de biofilms que contaminan implantes. . . . .</b>	<b>60</b>

# ABREVIATURAS

---

Acil HSLs: Acilhomoserin lactona

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CPA: Células presentadoras de antígenos

CSLM: Escáner por Microscopia Confocal Láser

EPS: Exopolisacáridos

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia

FQ: Fibrosis Quística

Gram+: Gram positiva

Gram-: Gram negativa

Hi: *Haemophilus influenzae*

HiNT: *Haemophilus influenzae* No Tipificable

Ig: Inmunoglobulina

IVUC: Infección de Vías Urinarias Crónica

LOS: Lipooligosacárido

OM: Otitis Media

OMC: Otitis Media Crónica

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SEM: Escáner por Microscopia Electrónica

TAC: Radiografía de tórax

TEM: Microscopia Electrónica de Transmisión

***IMPACTO DE  
BIOFILMS BACTERIANOS EN  
ENFERMEDADES EN HUMANOS***



# Introducción

Uno de los mayores logros de la medicina moderna consiste en el progreso contra las enfermedades infecciosas. La mayoría de las infecciones agudas de hoy en día se tratan eficazmente con antibióticos y se previenen a través de vacunas.<sup>25, 44, 102</sup> Sin embargo, más de la mitad son causadas por bacterias capaces de producir infecciones crónicas<sup>19, 69, 102</sup> que responden pobremente a tratamientos con antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización. Ejemplos de estas infecciones son: Otitis Media Crónica (OMC), Infección de Vías Urinarias Crónica (IVUC) y Prostatitis, entre otras.<sup>26, 35, 50, 51, 127, 151</sup>

El concepto de bacterias como formas de vida unicelulares es universalmente aceptado y un instrumento típico para el estudio de la patogénesis microbiana, es el empleo de crecimientos bacterianos en cultivos puros; no obstante, un cultivo puro esencialmente planctónico (constituido por células de forma libre) rara vez se encuentra en la naturaleza.<sup>25, 102</sup>

Desde hace más de 60 años, la observación de una variedad de hábitats naturales ha permitido establecer que la mayoría de los microorganismos persisten adheridos a superficies dentro de un ecosistema estructurado y no como organismos de flotación libre.



En las tres últimas décadas, empleando los avances en microscopía y tecnologías de Biología Molecular se ha logrado definir a detalle esta forma de vida interdependiente, en la que los microorganismos funcionan como parte integral de una población o comunidad.<sup>19, 25</sup>

En el ambiente clínico, estas comunidades son muy frecuentes.<sup>15, 102, 151</sup> El análisis directo de tejidos afectados por infecciones bacterianas e implantes contaminados, muestra que en la mayoría de casos la bacteria responsable de la infección crece adherida a la superficie colonizada, formando comunidades de bacterias denominadas Biofilms,<sup>69, 102</sup> éstos se constituyen por células sésiles asociadas entre sí, embebidas en una matriz compuesta por moléculas poliméricas extracelulares.<sup>19, 132</sup>

Las agrupaciones naturales de bacterias dentro de la matriz, funcionan como un consorcio en cooperación coordinada y complejidad relativa. Por tanto, además de los mecanismos de resistencia innata a antibióticos que poseen algunas bacterias (como la síntesis de  $\beta$ -lactamasas), las que residen dentro del biofilm pueden ser hasta 1000 veces más resistentes al tratamiento con antibióticos que el mismo organismo creciendo planctónicamente.<sup>69, 102, 116</sup> Los mecanismos por los cuales alcanzan esta resistencia son aún tema de especulación; entre estos mecanismos de resistencia se incluyen: a) cambios fenotípicos en el entorno del biofilm; b) inactivación de antibióticos por polímeros extracelulares o modificación por enzimas; y c) disminución de la tasa de crecimiento como resultado de la concentración limitada de nutrientes.<sup>19, 53, 60, 69, 102</sup>

Las infecciones por biofilms se asocian a síntomas típicamente recurrentes, aún después de tratamientos repetidos con antibióticos, debido a que el tratamiento estándar solamente es capaz de eliminar bacterias planctónicas. Las formas sésiles sobreviven, se multiplican dentro del biofilm y, posteriormente se diseminan a partir de éste cuando la terapia antibiótica termina.<sup>19, 69</sup>

Respecto a las acciones emprendidas por el sistema inmune del hospedero, los microorganismos formadores de biofilms liberan antígenos que estimulan la producción de anticuerpos; sin embargo, las infecciones son pobremente resueltas por el sistema inmune, puesto que las bacterias al interior del biofilm son resistentes a estos mecanismos de defensa. De hecho, esta respuesta inmune potencia el daño a los tejidos circundantes.<sup>26, 60, 69</sup>



En países desarrollados, se ha sugerido que las principales causas de mortalidad son las enfermedades cardiovasculares y cáncer. Sin embargo, las enfermedades infecciosas causaron 4,057,000 muertes en el 2005, ubicándose como la segunda causa de mortalidad mundial; México no está exento de este hecho como lo revelan las cifras emitidas por la OMS: 18,214 muertes por año asociadas a infecciones.<sup>69</sup>

Por el gran impacto que las infecciones bacterianas representan en materia de salud y el papel que juegan los biofilms en la incidencia y prevalencia de dichas infecciones,<sup>15</sup> es indispensable y prioritaria una mejor comprensión de su formación, estructura y funcionamiento, lo que conducirá a desarrollar nuevas estrategias para hacer frente a estas infecciones.

## Objetivos

- a) Recopilar información actualizada para generar una revisión bibliográfica minuciosa sobre biofilms bacterianos y su papel en enfermedades infecciosas.
- b) Desarrollar una fuente de información que ofrezca una herramienta útil para las investigaciones actuales y a futuro, sobre biofilms bacterianos asociados a enfermedad, con énfasis en enfermedades respiratorias.
- c) Plantear los aspectos más relevantes respecto a los biofilms bacterianos, en relación con su posible papel en la patogénesis de la enfermedad.
- d) Generar un acervo de información que sirva de apoyo a proyectos de investigación dirigidos a la búsqueda de moléculas (enzimas y fármacos, entre otras) con el potencial para actuar en el control/eliminación de biofilms bacterianos.
- e) Destacar la importancia de las investigaciones sobre el bloqueo o la interrupción del evento inicial (adherencia) en la formación del biofilm.
- f) Aportar información que resalte el hecho de que los biofilms bacterianos son asunto que merece una mayor atención, dado su impacto en salud y visto desde la perspectiva de calidad de vida del paciente, así como del desgaste económico generado al presupuesto del sector salud.
- g) Aportar información que permita la actualización y mejora de los programas educativos, de pre y postgrado, relacionados con el tema.

## Metodología

Se realizó la búsqueda de publicaciones originales en bancos virtuales de información: Pubmed, Scopus, Medline y Google académico, empleándose para la búsqueda palabras clave (tanto en español como en inglés) tales como: biofilm, biofilms bacterianos, biopelículas, infecciones crónicas, *Haemophilus influenzae* no tipificable, EPOC, Fibrosis Quística, Otitis Media y contaminación de implantes. Se consideraron secuencialmente las referencias de los artículos revisados.

También se utilizaron como material de apoyo tesis doctorales realizadas en universidades nacionales e internacionales de prestigio, como la Universidad Complutense de Madrid, la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Colombia y de la misma UNAM. Se revisaron libros de actas y resúmenes de congresos (especialmente de América Latina), síntesis ejecutivas e informes de instituciones y dependencias, nacionales e internacionales.

El criterio de selección de las revisiones se basó inicialmente en la recuperación de publicaciones recientes, de entre 2000 y 2010, principalmente de los últimos cinco años. Para el caso de los artículos, se consideraron publicaciones en revistas científicas de las áreas biológicas y de la salud con índices de factores de impacto mayores de 2.5 puntos. A la información contenida en las síntesis ejecutivas e informes de instituciones, se le asignó validez según las fuentes de origen, la institución que la avala y las referencias bibliográficas que la sustentan.



Para la información general sobre biofilms, se seleccionaron los artículos con información de amplio espectro relacionada a biofilms bacterianos. Respecto a la información más específica sobre biofilms construidos por diferentes especies bacterianas, en particular la de biofilms producidos por *Haemophilus influenzae* no tipificable, se eligieron los artículos que permitieran obtener información y respuestas concretas y medibles sobre la naturaleza, formación, existencia y aspectos clínicos específicos asociados a dichos biofilms. Estos artículos con frecuencia eran de carácter experimental *in vivo* e *in vitro*, del tipo descriptivos, casos-contróles y de cohortes; provenientes de grupos de investigación en la materia: Murphy *et al.*, Swords *et al.*, Gómez de León *et al.*, Starner *et al.*, O'toole *et al.*, Costerton *et al.*, etc.

La clasificación y revisión de la información, se realizó considerando los aspectos relevantes de la información del estudio y/o de la metodología empleada. Las explicaciones dadas por los autores según sus resultados y/o sus perspectivas, se correlacionaron en algunos casos comparando los diferentes puntos de vista entre los autores.

## ***Comunidades adheridas en el mundo real***

### **4.1 Comunidades Adheridas a Superficies y Comportamiento Colectivo**

¿Qué es una comunidad bacteriana? Desde la perspectiva ecológica, las poblaciones bacterianas se originan a partir de células individuales metabólicamente similares constituyendo agrupaciones denominadas gremios (grupos). Los conjuntos de gremios (por ejemplo, del tipo fermentadoras, sulfato y sulfuro reductoras y metanogénicas) conducen procesos fisiológicos interdependientes entre las comunidades microbianas. Los microorganismos también forman agrupaciones naturales en suspensiones y en interfases agua-aire en las cuales se agregan como gránulos o flóculos.<sup>25, 98</sup>

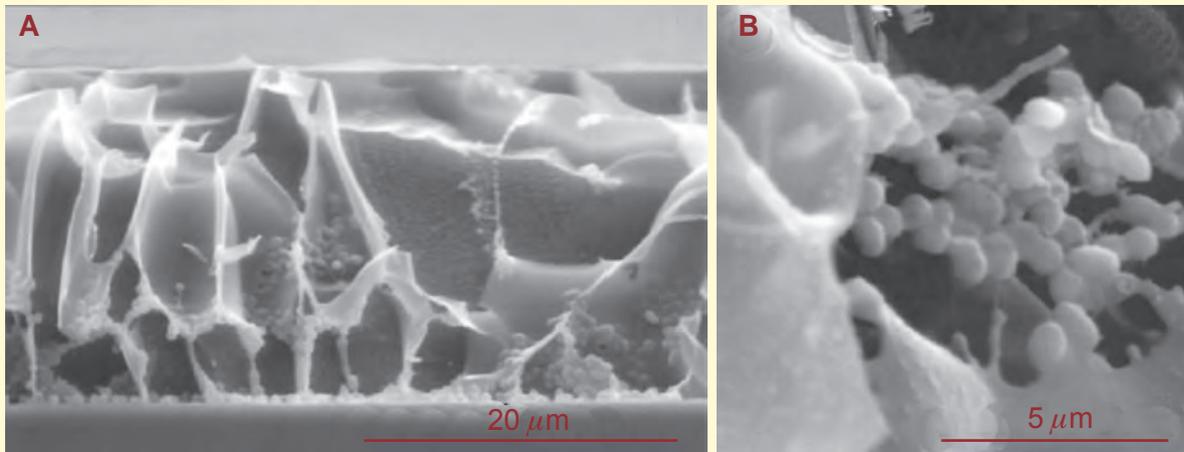
En 1999, Costerton *et al.* refieren a un biofilm como un agregado de bacterias fijas a una superficie en una matriz hidratada de naturaleza polimérica sintetizada por las mismas. Un año más tarde, Davey y O'toole (2000) describieron un biofilm como el conjunto de microorganismos y sus productos extracelulares, asociados a un sustrato y generalmente adheridos a superficies abióticas o bióticas.<sup>19, 25</sup>

Por su parte, Murphy y Kirkham (2002) definieron un biofilm como una comunidad de bacterias estructurada, envuelta en una matriz polimérica autoproducida y adherida a una superficie viviente o inerte.<sup>96</sup>

Desde la perspectiva de Lasa *et al.* (2005), los biofilms son comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos (EPS) y adheridos a una superficie inerte o tejido vivo.<sup>69</sup>

Considerando las definiciones anteriores y para efectos de esta revisión, los biofilms son microcolonias (conjunto de varios grupos de clonas bacterianas) adheridas a superficies abióticas o bióticas.<sup>25, 31, 123, 152</sup> Éstas se hallan embebidas en una matriz, compuesta por EPS y otros productos extracelulares tanto de origen bacteriano como del propio hospedero, que les permite estar estructuralmente bien definidas (Fig. 1).<sup>31, 60, 90, 132, 134</sup>

**FIGURA 1:** Estructura de un biofilm formado por *Streptococcus pneumoniae*<sup>91</sup>



Análisis con SEM de un biofilm formado por *Streptococcus pneumoniae*. (A) La arquitectura del biofilm es similar a una colmena, en las paredes de estas estructuras son visibles las células bacterianas residentes al interior de este biofilm. (B) Se observa la distribución de bacterias tanto en las paredes de la arquitectura colmenar, como integradas a microcolonias unidas por material filamentososo.

La estructura del biofilm presenta vacíos intersticiales que actúan como divisores de las microcolonias, a los que se conocen como canales de agua.<sup>19, 25, 69, 96, 134</sup>

La capacidad de formar biofilms no parece restringirse a ninguna especie bacteriana en particular, por lo cual se considera que, bajo condiciones ambientales adecuadas, todas las bacterias son capaces de formarlos.<sup>69</sup>



En esencia, los biofilms representan una entidad basada en comunidades interdependiente desarrolladas a partir de una única especie o de múltiples especies microbianas.<sup>25</sup>

## 4.2 Estructura del Biofilm

La organización estructural del biofilm tiene una característica propia, que le diferencia del modo de crecimiento a partir de un cultivo líquido convencional.

La aplicación de la microscopía láser confocal de barrido (CSLM) en la investigación de biofilms, ha modificado radicalmente la percepción sobre su estructura y función. La microscopía confocal ha revelado la estructura tridimensional del biofilm y la heterogeneidad del mismo.<sup>25, 109, 131, 132, 134</sup>

Los biofilms formados *in vivo* e *in vitro*, por una sola especie o mixtos, presentan características estructurales en común. La mayoría han mostrado cierto nivel de heterogeneidad como agregados y no monocapas; están embebidos en una matriz de EPS que varía en densidad y en la cual se crean vacíos intersticiales por donde fluye el agua denominados canales de agua.<sup>13, 31, 35, 53, 90, 132</sup>

La integridad estructural del biofilm depende de la matriz extracelular, que puede ser muy versátil y contribuir de manera significativa a la organización de la comunidad. Las diferencias en la arquitectura del biofilm son reflejo de las variaciones en la composición y la estructura de la matriz.<sup>25, 116</sup>

Respecto a la composición, como señalan Lawrence *et al.* (2000) las microcolonias iniciales pueden desarrollarse de diferentes maneras, generando distinta arquitectura de la matriz.<sup>13, 20, 134</sup> Así, dentro de la matriz pueden existir diferentes secciones formadas por diferencias en la densidad celular, que a su vez depende, entre otros parámetros, de la naturaleza de las poblaciones microbianas, de la actividad metabólica, de la secreción de EPS y de la expresión de genes específicos durante el desarrollo inicial del biofilm.<sup>132</sup>



Los diferentes entornos en que puede formarse un biofilm están sujetos a una amplia gama de condiciones hidrodinámicas que afectarán en gran medida la arquitectura de la matriz. Por ejemplo, las tensiones tangenciales a las que está expuesto un biofilm, afecta su morfología y dinámica, al tiempo que determinan la tasa de erosión de las células.<sup>35, 53, 104</sup>

En flujos turbulentos, la matriz consiste principalmente de geles débiles de EPS, construyendo un biofilm de apariencia líquida y viscosa. En matrices relativamente fluidas, como las formadas en biofilms maduros, es posible, durante los procesos de crecimiento y desarrollo, la redistribución de los diferentes tipos celulares que lo componen. Por otro lado, la combinación de flujo turbulento y una gran fuente de carbono, producen movimientos ondulatorios y zigzagueantes en los conglomerados celulares, cambiando así la apariencia del biofilm. En flujos laminares, la matriz se forma de geles rígidos de EPS y hay menor tendencia al movimiento con la corriente de manera que las células y microcolonias permanecen inmovilizadas de forma efectiva.<sup>53, 104, 132, 134</sup>

De igual forma, la biología microbiana afecta la estructura del biofilm, la proximidad de microorganismos diferentes permite las interacciones físicas y, además, la comunicación mediante moléculas o factores difusibles. Otras condiciones tales como: el tipo de superficie, las propiedades de la interfase y la disponibilidad de nutrientes del medio ambiente, también pueden afectar la organización espacial del biofilm.

En conclusión, la estructura del biofilm es afectada tanto por la microbiología como por parámetros ambientales; por ello, los biofilms pueden ser polimórficos y estructuralmente adaptados a los cambios en la disponibilidad de nutrientes.<sup>35, 104, 113, 134</sup>

### 4.3 La Matriz del Biofilm

La biomasa del biofilm puede variar considerablemente: los valores de carbono orgánico total indican que el contenido celular representa del 2 al 15%.<sup>13, 35, 134</sup>

Wimpenny *et al.* (2000), demostraron que la naturaleza de la matriz depende de factores intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos se plantean de acuerdo



con el perfil genético de las células microbianas y los factores extrínsecos, incluyen el ambiente físico-químico en que se encuentra; que a su vez, es influenciado por el transporte de solutos y sus gradientes de difusión.<sup>134</sup>

En primera instancia, la matriz se compone por agua y células microbianas aunque, también la integran un complejo de polímeros secretados, nutrientes absorbidos y metabolitos, moléculas y detritus (residuos del deterioro y lisis celular) de su entorno. Todas las principales macromoléculas: proteínas, polisacáridos, ADN y ARN, pueden estar presentes; además de peptidoglicanos, lípidos, fosfolípidos y otros componentes celulares.<sup>25, 98, 116, 134</sup>

La mayor parte de la matriz es agua (hasta un 97%). Ésta se encuentra distribuida dentro de finas estructuras denominadas canales de agua,<sup>31, 98, 134</sup> éstos permiten los procesos de difusión de nutrientes e intercambio de productos metabólicos a través de la movilidad y retención del agua. El flujo de agua también contribuye a moldear la arquitectura del biofilm. Por lo anterior, los canales son fundamentales, tanto en la formación como en el mantenimiento del biofilm.<sup>25, 116, 134</sup>

En 2002, Whitchurch *et al.* detectaron células muertas en algunos biofilms, sugiriendo que los detritus pueden formar parte de la matriz; más aún, informaron que el ADN extracelular desempeña un papel importante en el establecimiento de la estructura del biofilm.<sup>97, 116</sup>

## 4.4 Metodologías para la Formación *in vitro* y Estudio de Biofilms

---

Dada la diversidad de microorganismos analizados y la variedad de técnicas para su estudio, en investigación se emplean una serie de sistemas generales, que facilitan la reproducibilidad de los experimentos entre distintos laboratorios.

Las metodologías para la formación de biofilms *in vitro* pueden agruparse en 4 sistemas de cultivo convencionales:



- (1) Sistemas *flow cell* o cultivos continuos en cámaras de flujo, asociados a observaciones por microscopía.

Son cámaras pequeñas diseñadas con superficies transparentes, que sirven de soporte para la formación del biofilm. Permiten la alimentación continua del biofilm a partir de nutrientes presentes en el medio de cultivo y constantemente se introducen sustratos y se extraen desechos, ya que el flujo es capaz de penetrar en el biofilm pasando entre las bacterias. Con estos sistemas, se pueden realizar estudios de desarrollo en condiciones de incubación estáticas (sin flujo del medio) o dinámicas (con flujo del medio). Son sistemas ideales para observaciones con CSLM.<sup>9, 149</sup> Algunas variantes de esta metodología han sido descritas a mayor detalle por Starner *et al.*, 2006.

- (2) Cultivos estáticos en placas de microtitulación.

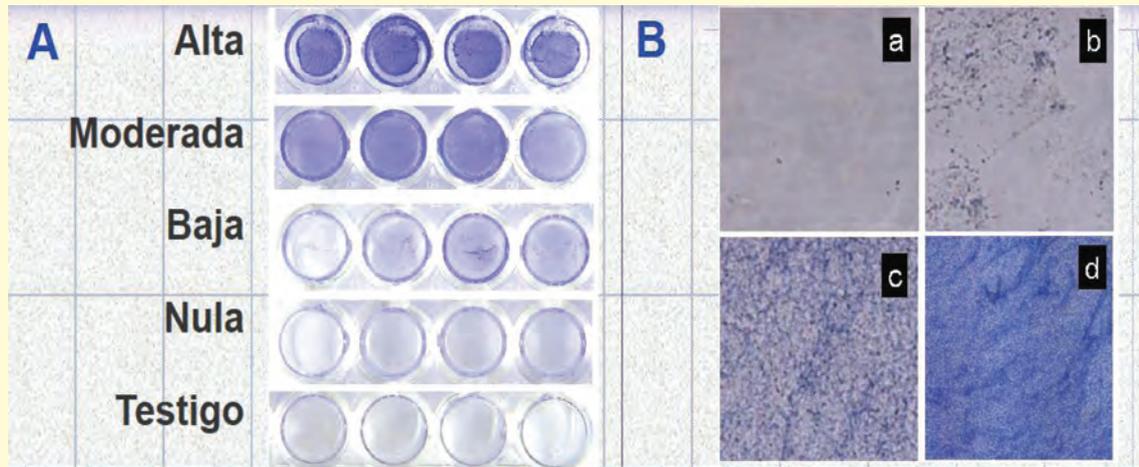
Se emplean como superficie para el desarrollo de biofilms, pocillos de placas de microtitulación (Fig. 2). Son sistemas basados en el cultivo en batch de biofilms, donde existe una concentración fija de nutrientes que disminuye hasta agotarse por el crecimiento de las bacterias. Debido al número de pocillos por placa, se pueden analizar una gran cantidad de variables experimentales a la vez, incluyendo condiciones de cultivo, tratamientos, caracterización de mutantes, etc.<sup>35, 43, 100</sup>

- (3) Sistemas dinámicos de incubación *in vitro*.

Son sistemas en donde se utilizan tuberías de diferentes materiales como soporte para el desarrollo del biofilm. El cultivo se realiza en condiciones de flujo de una fase líquida, similar a lo que ocurriría en una tubería de transporte de productos líquidos.<sup>104, 137, 149</sup>

- (4) Sistemas de observación de la morfología colonial y de biofilms desarrollados por células que han crecido en interfase líquido-aire y visualización de colonias que crecen en agar.

En este caso, se considera que algunas morfologías de las colonias, representan un símil de las estructuras tridimensionales complejas observadas en un biofilm y se ha demostrado que es dependiente de la composición de los EPS.<sup>9, 35, 149</sup> Estos sistemas permiten realizar estudios a gran escala y detectar diferentes tipos de mutantes de interés.

**FIGURA 2: Cultivos estáticos en placas de microtitulación<sup>100</sup>**

A. Se observa la presencia de material adherente en el fondo de los micropozos en placa, se muestra la variabilidad en la capacidad de formación de biofilms de *Haemophilus influenzae* no tipificable.

B. A nivel microscópico (100x), los biofilms mostraron una apariencia de redes homogéneas que se extienden sobre toda la superficie de los pozos, difiriendo entre sí en la densidad por unidad de área, de acuerdo con las categorías nula (a), baja (b), moderada (c) y alta (d).

Algunos de estos métodos combinan técnicas de observación macro y microscópica y/o técnicas de observación directa, empleando métodos convencionales como recuento bacteriano o pruebas bioquímicas.<sup>13, 35</sup>

Las técnicas basadas en la observación directa de la adherencia y la colonización microbiana, utilizan microscopios ópticos, confocales o electrónicos. Los microscopios ópticos, debido a su fácil acceso y versatilidad, han sido la opción más empleada; sin embargo, presentan varias limitaciones para el estudio completo de biofilms y la necesidad de fijación y/o tinción de las muestras provocan la muerte de los microorganismos e imposibilitan estudiar la estructura tridimensional del biofilm.<sup>23, 35, 98, 104</sup>

Antes del empleo de la microscopía confocal, la microscopía electrónica era el método de elección para analizar biofilms en alta resolución. Sin embargo, la preparación de la muestra para su observación provoca su deshidratación.<sup>131, 132, 134</sup>



El empleo del microscopio electrónico de barrido no se ha descartado por completo, puesto que es posible cuantificar a los microorganismos adheridos a superficies opacas (como plásticos, metales, cerámicas o catéteres); ésto sería imposible por otros métodos.<sup>23, 35</sup>

Por su parte, la microscopía confocal permite visualizar muestras completamente hidratadas, generando una imagen en alta resolución de la estructura tridimensional del biofilm y proporcionando una observación de la ultraestructura y de las interacciones bacteria-superficie. Lo anterior es resultado de la combinación de la iluminación láser, con el uso de objetivos apocromáticos y el procesamiento por computadora de las imágenes, de esta forma, es posible generar reconstrucciones tridimensionales del espécimen observado.<sup>23, 35, 132, 134</sup>

Adicionalmente, mediante el empleo de marcadores, se puede evidenciar y cuantificar el contenido de células viables o componentes de la matriz celular *in situ*, para identificar la presencia de epítomos específicos, ciertas macromoléculas o monómeros, y trazar la distribución de cada especie microbiana en biofilms mixtos.<sup>23, 35, 109, 131, 132, 134</sup>

Los métodos indirectos permiten la cuantificación de los microorganismos formadores del biofilm, lo cual implica retirar el biofilm de los materiales a los que están adheridos por raspado, agitación o sonicación, dilución posterior y recuentos bacterianos. Las principales limitaciones en estas técnicas residen en que: 1) no permiten realizar el análisis estructural del biofilm; 2) las etapas abrasivas pueden disminuir el número de células viables; y 3) no todos los microorganismos obtenidos resultan cultivables.<sup>74</sup>

La utilización de tinciones y bioquímicas son una buena alternativa para el estudio y cuantificación de la formación de biofilms.<sup>13, 23, 104</sup> Estos ensayos son ejecutados en placas de microtitulación para determinar la biomasa total (matriz, células vivas y muertas), para cuantificar de células viables,<sup>103</sup> o estudiar los diferentes componentes de la matriz. Los ensayos que miden la biomasa total no son útiles para evaluar la acción de antimicrobianos en biofilms, puesto que no es posible diferenciar entre células viables y muertas.<sup>35</sup> Por ello, se emplean técnicas que cuantifican la actividad metabólica con tinciones vitales como las de sales de tetrazolio, diacetato de fluoresceína y resazurina o azul de alamar.<sup>103, 121</sup> De forma general, las principales limitaciones de estos métodos son la sensibilidad del colorante vital a ciertas condiciones tales como luz y calor, las cuales pueden controlarse fácilmente en el laboratorio.<sup>35, 105</sup>

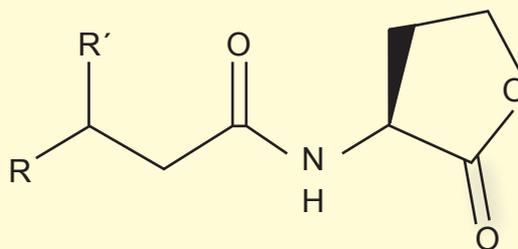
## FORMACIÓN DE BIOFILMS

### 5.1 Regulación del Proceso de Formación de Biofilms

#### 5.1.1 Quorum Sensing

Aunque se han empleado numerosas técnicas para describir la arquitectura del biofilm, hasta hace poco no estaba claro si esta complejidad estructural estaba regulada o era consecuencia de procesos estocásticos (al azar). Una evidencia reciente sugiere que el proceso de formación de biofilms puede regularse a nivel de densidad poblacional vía expresión génica, lo cual implica un control mediado por moléculas de señalización celular como la acil homoserina lactona *acil-HSL* (Fig. 3). Este proceso de control es denominado Quorum sensing Qs.<sup>15, 35, 97, 98, 146, 1w, 3w</sup>

**FIGURA 3:** Acil homoserina lactona, molécula señal del Qs<sup>1w</sup>



Las acil homoserina lactonas (acil-HSL) están compuestas por una cadena acilo de 4 a 14 átomos de carbono unida por un enlace amida a una homoserina lactona. En el tercer carbono de la cadena acilo puede haber un grupo ceto o un grupo hidroxilo.



Bonnie Bassler (2003) explica que el Qs es el lenguaje de comunicación célula-célula que presentan las bacterias. En un número creciente de cepas bacterianas se ha evidenciado este tipo de comunicación, en el cual las bacterias parecieran percibir cambios en el medio y coordinar la expresión genética a favor de la supervivencia de toda la comunidad: se coordinan, defienden u organizan ataques.<sup>12, 35, 61, 1w, 3w</sup>

El sistema Qs es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal denominada autoinductor.<sup>69, 1w, 3w</sup> Las bacterias hacen un censo y miden las concentraciones de autoinductores, las cuales, correlacionan con el grado de densidad celular.<sup>12, 146, 1w</sup> Cuando en el medio extracelular se acumula una cantidad suficiente del autoinductor, éste activa a un receptor específico que altera la expresión de genes, provocando el inicio de cambios fenotípicos en la comunidad y, con ello, el comportamiento de la población.<sup>15, 31, 39, 69, 97</sup> Así, se regulan varias funciones tan diversas como movilidad, expresión de factores de virulencia, esporulación, producción de antibióticos, intercambio de material genético, e incluso, el desarrollo del biofilm.<sup>35, 61, 122, 146</sup>

Las bacterias sólo actuarán cuando su Qs les indique que hay concentraciones específicas de cierto autoinductor en determinados tiempos y espacios; pero no sólo interactúan consigo mismas, sino también con sus hospederos.<sup>1w</sup>

En bacterias Gram-, el principal autoinductor es la acil-HSL, aunque también participan quinolonas (como en el caso de *P. aeruginosa*), ácidos grasos modificados o furanonas. Por su parte, las bacterias Gram+ suelen utilizar péptidos modificados; por ejemplo, en *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pneumoniae* estos péptidos están involucrados en la regulación de competencia (toma de DNA exógeno) y en *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, la señalización de QS por péptidos, regula la producción de factores de virulencia.<sup>12, 13, 31, 96, 97, 98</sup>

### 5.1.2. Papel del Quorum Sensing en el Proceso de Formación de Biofilms

---

Una gran cantidad de evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está controlado por una cascada compleja de reguladores. Un trabajo



pionero con *P. aeruginosa* demostró que la formación del biofilm está regulada por el proceso de autoinducción antes mencionado como sistema Qs.<sup>31, 35, 61, 69, 97, 146</sup>

Estudiando mutantes de *P. aeruginosa*, incapaces de sintetizar acil-HSLS, se demostró que la arquitectura del biofilm se modificaba radicalmente, concluyéndose que la formación estructural del biofilms requiere de moléculas reguladoras. Lo anterior puede extrapolarse a otros biofilms bacterianos, tal como lo demuestra un estudio en que se emplearon cepas de *S. gordonii*, donde se muestra la importancia de la comunicación celular en la formación de un biofilm funcional por bacterias Gram+.<sup>25, 116, 134</sup>

A partir del año 2000, los avances en genómica y proteómica han permitido avanzar en el estudio de sistemas complejos como los biofilms, e inclusive, se han identificado más de 800 proteínas, las cuales cambian de concentración a lo largo de las distintas fases de desarrollo del biofilm.<sup>9w</sup>

Curiosamente, después de alcanzar una alta densidad celular, algunas especies bacterianas activan la secreción de polímeros mientras otras la detienen. ¿Por qué utilizar Qs para detener la secreción de polímeros en situaciones de alta densidad celular? Una respuesta simple sugiere que el cese de producción de polímeros puede dar una ventaja al reorientar los recursos disponibles hacia los procesos de división o crecimiento bacteriano; sin embargo, esta ventaja sólo se produce dentro de un periodo limitado.<sup>12, 97, 147</sup>

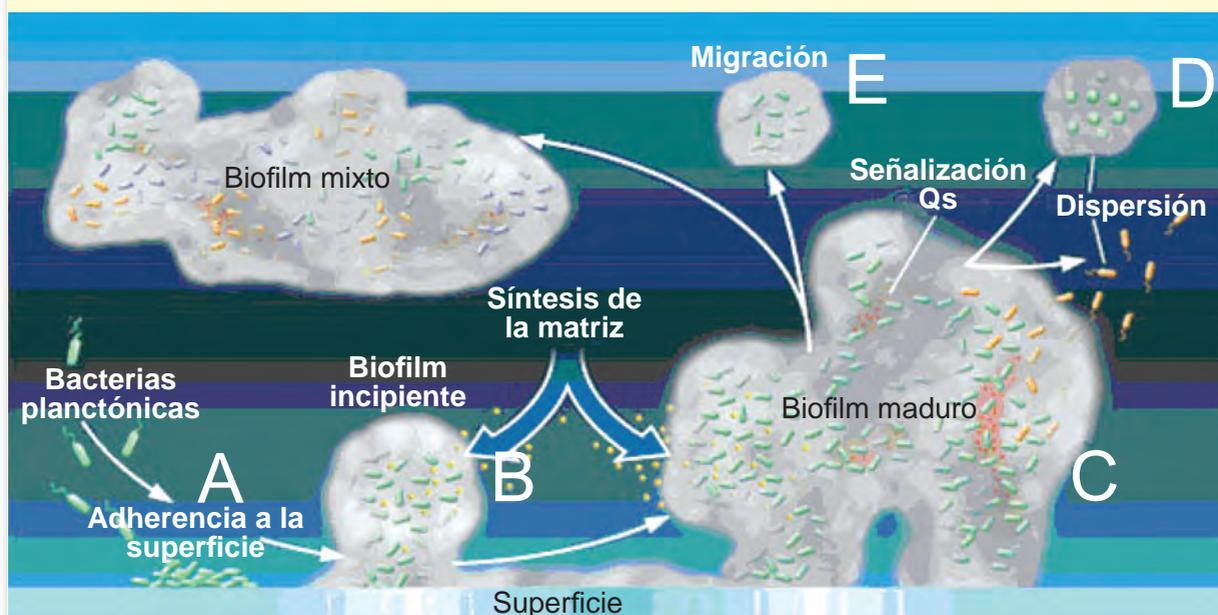
Además del Qs otros reguladores globales, como CsrA en *E. coli* y CytR de *V. cholerae*, han demostrado ser determinantes para el desarrollo del biofilm. Por otro lado, Lasa *et al.* (2005), estudiando a *S. aureus* demostraron por primera vez que un regulador de virulencia global denominado SarA es, a su vez, un regulador de formación de biofilms, lo que implica una conexión entre los procesos de virulencia y la formación de biofilms.

Aparte de la regulación a nivel transcripcional, existe evidencia de formación de biofilms regulada a nivel postranscripcional.<sup>69</sup> Finalmente, parece lógico que la formación del biofilm se produzca en respuesta a condiciones ambientales y, por lo tanto, que existan sistemas del tipo fosfotransferencia de dos-componentes (two-component systems), que transmitan la señal ambiental al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental.<sup>53, 69, 153</sup>

## 5.2 Papel de las Señales Ambientales

Los resultados publicados sobre el análisis de formación de biofilms, han permitido determinar que las diferentes especies bacterianas muestran etapas en común en la formación de biofilms (Fig. 4), incluyendo: (i) adherencia inicial a la superficie; (ii) formación de microcolonias; y (iii) maduración de las microcolonias en un biofilm terminal enmascarado en una matriz de recubrimiento.<sup>15, 25, 35, 60</sup>

**FIGURA 4: Dinámica de formación de un biofilm bacteriano<sup>60</sup>**



Secuencia de pasos para la formación de un biofilm. Las bacterias planctónicas se adhieren a una superficie (A). En etapas tempranas se genera un biofilm incipiente (B); con el paso del tiempo las actividades mediadas por el sistema de Qs permiten la señalización interna de manera que se sintetiza la matriz del biofilm y se genera un biofilm maduro (C). Como último paso, se liberan formas planctónicas desde el biofilm (D), o bien, ocurre migración de porciones del biofilm maduro (E).

El proceso comienza cuando la bacteria “se sensibiliza” a ciertos parámetros ambientales que inducen la transición desde el crecimiento planctónico a la vida sobre una superficie.



Las señales ambientales varían enormemente entre organismos y entre las que influyen en la adherencia inicial, se encuentran: concentración de nutrientes, osmolaridad, pH, disponibilidad de hierro, tensión de oxígeno, temperatura, algunas determinantes moleculares y estructurales relacionadas con la adherencia, entre otras.<sup>13, 31, 25, 69, 104, 134</sup>

*Debido a la naturaleza de esta revisión, las etapas de formación del biofilm son referidas a su desarrollo en el hospedero, entiéndase por medio ambiente el ecosistema que abarca la superficie de tejido a colonizar.*

### 5.3 Inicio de la Formación de Biofilms: Adherencia Primaria – Adherencia Secundaria

La adherencia a la superficie representa la etapa inicial del proceso de formación del biofilm y corresponde a un evento dependiente de una serie de variables, incluyendo la especie bacteriana implicada, la composición de la superficie, factores ambientales y los productos de genes específicos. La capacidad para posicionarse en un nicho a partir del cual se propagarán los invasores, constituye un elemento clave de la adaptabilidad bacteriana.<sup>13, 15, 25, 69, 91, 98, 104</sup>

En el año 2000, Boland *et al.* fueron los primeros en considerar una etapa previa a la adherencia, denominada “acondicionamiento de superficie”, la cual implica la interacción entre la bacteria y el medio ambiente.<sup>9w</sup> Se produce cuando, por presencia del cuerpo extraño, la superficie natural es modificada, ya sea adsorbiendo agua, albúmina, lípidos, moléculas de la matriz extracelular, complemento, fibronectina, sales inorgánicas, etc. Una vez acondicionada la superficie, sus propiedades se alteran permanentemente; por lo tanto, la afinidad de un microorganismo es muy diferente cuando entra en contacto con una superficie no colonizada, que con una superficie previamente acondicionada.<sup>13, 31, 104, 132, 134, 149</sup>

La adherencia bacteriana, como un proceso básico en la formación del biofilm, se puede dividir en dos etapas: la etapa primaria o acoplamiento y la etapa secundaria o fase de bloqueo.<sup>35, 74</sup>



En la etapa primaria ocurre la adherencia pasiva, que como regla empírica y simplista, está mediada por las interacciones inespecíficas entre las bacterias y superficies abióticas. La adherencia a superficies bióticas, se logra a través de moléculas específicas denominadas adhesinas, por lo que es conocida como adherencia activa y ocurre durante la etapa secundaria.<sup>31, 35, 132, 152</sup>

La etapa primaria constituye el encuentro fortuito entre microorganismo planctónico y superficie acondicionada. Esta etapa es reversible en función de una serie de variables físico-químicas que definen la interacción entre la superficie bacteriana y la superficie acondicionada del tejido.

Inicialmente la bacteria se coloca en estrecha aproximación a la superficie, sea por azar (por ejemplo, mediante una corriente de flujo que circula sobre una superficie), o en forma dirigida, vía quimiotaxis y/o motilidad.<sup>13, 31, 152</sup> Una vez que se alcanza la proximidad crítica (generalmente 1 nm), el resultado final de la adherencia dependerá de la suma neta de fuerzas de atracción o repulsión generadas entre ambas superficies.

Los tipos de fuerzas incluidas en la adherencia pasiva, pueden ser: interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, impedimento estérico, fuerzas de Van der Waals, temperatura y fuerzas hidrodinámicas. Las interacciones electrostáticas tienden a favorecer la repulsión, porque la mayoría de bacterias y superficies inertes están cargadas negativamente.<sup>31, 104, 132, 134</sup>

La etapa secundaria comprende la unión entre la adhesina bacteriana y su receptor en la célula hospedera, la cual suele ser bastante específica. Al término de esta etapa y en ausencia de intervenciones físicas o químicas, la adherencia es irreversible.

Durante la fase de bloqueo, los microorganismos de la misma especie pueden unirse entre ellos, o bien, con otros organismos de diferente especie que también se encuentren adheridos a dicha superficie, formando así agregados. La presencia de microorganismos en una superficie puede promover la adherencia de otros.<sup>31, 84</sup>



### 5.3.1 Impacto de la Motilidad en la Adherencia

---

La motilidad contrarresta las repulsiones hidrofóbicas, ayudando a que la bacteria alcance la superficie. Se han descubierto numerosos mecanismos de posicionamiento bacteriano mediados por organelos de motilidad (estructuras que se extienden a partir de la superficie celular) y movimientos característicos como translocación mediante sacudidas y desplazamientos. El más común es el mecanismo de motilidad flagelar.<sup>81, 96, 148</sup> En bacterias Gram– (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*), se ha observado que flagelos, fimbrias de tipo I, IV y curli son importantes para la etapa de adherencia primaria;<sup>31, 35, 53, 69, 111</sup> sin embargo, su papel exacto en el desarrollo del biofilm puede diferir considerablemente de un organismo a otro.<sup>25</sup>

Aunque la motilidad ha demostrado ser importante en eventos de adherencia temprana, no es requisito indispensable para la adherencia. Debe notarse que bacterias Gram+ no móviles, tales como estafilococos, estreptococos y micobacterias, también son capaces de adherirse y formar biofilms.<sup>69, 132</sup>

### 5.3.2 Adhesinas: Fimbriales y Afimbriales

---

Durante la adherencia activa dependiendo de la naturaleza del entorno, participan diferentes adhesinas, que median el contacto con la superficie de la célula hospedero, superando a la repulsión neta entre superficies por interacción de moléculas específicas.<sup>31, 132, 134</sup>

A la fecha, se han definido tres tipos de interacción adhesina-receptor:<sup>31, 35, 81, 112, 152</sup>

- Lectina-hidrato de carbono (por ejemplo, la fimbria tipo 1 de *E. coli* y la célula epitelial de la vejiga urinaria).
- Proteína-proteína (por ejemplo, proteína F de *Streptococcus pyogenes* y fibronectina de la célula del epitelio respiratorio).
- Hidrofobina-proteína (como el ácido lipoteicoico y la fibronectina del hospedero).



Las adhesinas pueden ser fimbriales o afimbriales (Cuadro 1). Los mecanismos de adherencia mejor estudiados son los mediados por fimbrias (en casos particulares Pili + la denominación específica). El término fimbria se refiere a apéndices finos, semejantes a pelos comunes que, a diferencia de los flagelos, no aportan movilidad, pero por ser de naturaleza proteica (pilina), poseen propiedades antigénicas y hemoaglutinantes diferentes; se distingue este término, de aquellos con propiedades “sexuales” o pili sexuales.

Normalmente, la proteína localizada en el extremo de la fimbria, es propiamente la adhesina, que se adhiere a su receptor en la célula hospedera; éste, por regla general, está constituido por residuos de hidratos de carbono, de glucoproteínas o glucolípidos. Ocasionalmente, la proteína mayoritaria de la fimbria actúa como adhesina.<sup>23, 35, 36, 57, 152</sup>

Algunas adhesinas bacterianas están reguladas a nivel transcripcional permitiendo, bajo diferentes influencias ambientales, la transición de organismos sésiles a formas planctónicas.<sup>31</sup>

Las adhesinas fimbriales están presentes en la mayoría de las bacterias Gram-, por ejemplo, la adherencia inicial de *Pseudomonas aeruginosa* está mediada por hidrofobinas y/o adhesinas tipo lectinas.<sup>152</sup> O'Toole y Kolter (2000) desarrollaron cepas mutantes de *P. aeruginosa*: una deficiente en producción de Pili IV y, la otra carente de movilidad flagelar; ambas perdieron la capacidad de producir biofilms aunque, *in vitro*, las mutantes Pili IV forman una monocapa sobre la superficie, pero son incapaces de formar microcolonias (etapa incipiente de biofilm). Ello indica que la formación de microcolonias tiene lugar a partir de un mecanismo de agregación celular que requiere de movilidad y no solamente por crecimiento clonal a partir de una célula bacteriana concreta. La mutante carente de flagelos se adhiere a la superficie, lo que supone, que el flagelo sólo es importante para la aproximación.<sup>56, 138</sup>

El Pili IV también se presenta en *Moraxella catarrhalis* y resulta necesario, tanto para la formación como para la maduración de su biofilm.<sup>78</sup>

En cuanto a las adhesinas de *Escherichia coli*, Randla *et al.* (2006) determinaron que la expresión constitutiva de Pili 1 es suficiente para promover la formación del biofilm. Estudios recientes han concluido que la subunidad FimH del Pili 1, es la adhesina que media el enlace específico con azúcares o glicolípidos del hospedero, tales como la manosa.<sup>56, 111</sup>

**CUADRO 1: Moléculas de adherencia fimbriales y afimbriales presentes en bacterias relacionadas con procesos infecciosos en humanos**

Microorganismo	Adhesina	Referencia*
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ácido teicoico MSCRAMM FnBPA Cna ClfA Ebps Bap	Otto, 2009 Vila <i>et al.</i> , 2008 Lasa <i>et al.</i> , 2005 Hussein <i>et al.</i> , 2000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AtIE Ácido teicoico MSCRAMM Fbe (SdrG) Embp SSP-1 y SSP-2	Otto, 2009 Gutierrez <i>et al.</i> , 2006 Lasa <i>et al.</i> , 2005 Rup <i>et al.</i> , 2001 Huissein <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptococcus faecalis</i>	Pili Ebp	Vargas <i>et al.</i> , 2008 Jurciseck <i>et al.</i> , 2007 Anjali <i>et al.</i> , 2006 Mandlik <i>et al.</i> , 2005
<i>Clostridium perfringens</i>	Pili IV Proteína CcpA	Vargas <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pili IV CupA, B y C Flagelos	Faleiro, 2010 Terán <i>et al.</i> , 2009 Vila <i>et al.</i> , 2008 Ruer <i>et al.</i> , 2007 Randal <i>et al.</i> , 2006 Lasa <i>et al.</i> , 2005 Dunne, 2002 O'Toole <i>et al.</i> , 1999
<i>Escherichia coli</i>	Fimbria tipo 1 Curli Flagelos	Faleiro, 2010 Shynya <i>et al.</i> , 2010 Randla <i>et al.</i> , 2006 Whiteley <i>et al.</i> , 2001 Pratt <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i> uropatógena	Pili P	Faleiro, 2010 Horia <i>et al.</i> , 2010 Vila <i>et al.</i> , 2008
<i>Vibrio vulnificus</i>	Pili IV Proteína PiliA	Rohenee <i>et al.</i> , 2005
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Pili IV	Nicole <i>et al.</i> , 2007 Luke <i>et al.</i> , 2007
<i>Haemophilus influenzae</i>	HMW HMW PME3 Hap	Terán <i>et al.</i> , 2009 Webster <i>et al.</i> , 2006 Leu <i>et al.</i> , 2004 Fink <i>et al.</i> , 2003 Murphy <i>et al.</i> , 2002 Rao <i>et al.</i> , 1999

\*Referencias recuperadas según publicaciones más relevantes entre 1998 y 2010



Las bacterias que integran al género *Salmonella* presentan el denominado Pilus P. Como en Pili 1, los Pili P presentan una subunidad adhesina PapG que media interacciones con moléculas específicas del hospedero. Tanto el Pilus 1 como el Pilus P son importantes factores de virulencia en relación con la adherencia a la célula hospedero y, por ende, con la colonización.<sup>56</sup>

En 2009, Terán *et al.*, empleando microscopía de fuerza atómica, visualizaron en muestras de *Haemophilus influenzae* no tipificables, apéndices celulares que sugieren la presencia de un posible pilus tipo Hif. En estadios tempranos de la formación de biofilms, Hif tiene un papel crítico, principalmente en la adherencia y cohesión celular; mas aún, su presencia se asocia a una mayor patogenicidad.

Ejemplos de adhesinas fimbriadas en Gram+ relacionadas con la formación de biofilms incluyendo los denominados Pilus Ebp de *Streptococcus faecalis* y Pilus IV (junto con la proteína CcpA) de *Clostridium perfringens*, ambos necesarios para la efectiva formación de biofilms.<sup>64, 65, 81, 148</sup>

Con respecto a las adhesinas afimbriales, se trata de moléculas (principalmente proteínas) localizadas en la membrana externa de bacterias tanto Gram+ como Gram-. En Hi, se han encontrado una serie de adhesinas afimbriadas de naturaleza proteica: HMW, HMW2, PME3, Hap.<sup>38, 76, 96, 112, 142</sup> Éstas han mostrado una importante participación en la adherencia de Hi a células del sistema respiratorio del hospedero.

Aunque los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* pueden presentar estructuras parecidas a fimbrias de bacterias Gram-, éstas no parecen desempeñar un papel importante en la adherencia. No obstante, en estas bacterias se ha descrito la participación de proteínas de superficie como las adhesinas afimbriales AtIE, Bap, Esp.<sup>69, 8w</sup>

En estafilococos, la interacción específica tiene lugar principalmente mediante adhesinas afimbriales y fibronectina del hospedero. Empleándose mutantes de *S. epidermidis* incapaces de producir biofilm, se demostró que la proteína AtIE era necesaria para la producción eficiente de biofilms. También se ha sugerido que el ácido teicoico interviene en la unión entre esta bacteria y el fibrinógeno del hospedero.<sup>49, 58, 8w</sup> En *Staphylococcus aureus*, las proteínas que excreta al medio actúan como puentes



entre un ligando de la superficie tisular y la bacteria; entre ellas, la proteína de adhesión extracelular (EAP) ha demostrado favorecer la autoagregación de *S. aureus* y, con ello, facilita la formación del biofilm.<sup>152</sup>

En algunas especies de estreptococos, existe una adhesina afimbriada que media la unión de la bacteria a la fibronectina, una glucoproteína presente en la superficie de la célula hospedero. Estas proteínas actúan como adhesinas ancladas al peptidoglicano bacteriano.

## 5.4 Maduración del Biofilm

Una vez consolidada la fase de bloqueo, inicia la etapa temprana de maduración del biofilm. Durante ésta, la bacteria se divide y las células hijas se extienden alrededor del sitio de adherencia formando una microcolonia, similar a lo que ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar.<sup>15, 69, 104</sup> Al alcanzar el umbral de densidad poblacional y, a través de la señalización vía Qs, se promueve la autoinducción de la síntesis de la matriz extracelular.<sup>15, 20, 24, 59, 105, 9w</sup> En este punto, comienza la secreción de material polimérico desde la pared celular bacteriana hacia el medio circundante. El material excretado, junto con otras moléculas extracelulares orgánicas e inorgánicas del entorno, constituyen la matriz del biofilm.<sup>25, 31, 69, 132, 8w</sup>

La etapa tardía de la maduración corresponde a la formación de la arquitectura característica del biofilm. La formación involucra el crecimiento tridimensional y la definición de la arquitectura típica, según la especie bacteriana que construye; por ejemplo, forma de colmenar para *Streptococcus pneumoniae* y forma de hongo para *Pseudomonas aeruginosa*. Esto es resultado de los siguientes eventos: interacciones entre bacterias adheridas, desarrollo de puentes célula-célula y progresión de la síntesis de la matriz, que en conjunto estabilizan dicha estructura tridimensional.<sup>15, 35, 91, 134.</sup>

Este proceso conlleva a la creación de ambientes heterogéneos, por lo cual en un biofilm maduro las bacterias que lo componen presentan características fenotípicas distintas a las de sus contrapartes planctónicas.<sup>5, 35</sup>



### 5.4.1 Relación Exopolisacáridos-Biofilm

En estudios de rutina, al centrifugarse un cultivo en medio líquido es posible distinguir diferentes polisacáridos extracelulares. Aquellos que permanecen asociados a la célula constituyen la cápsula bacteriana y se denominan polisacáridos capsulares, mientras los que permanecen en el sobrenadante se nombran de forma general exopolisacáridos EPS.<sup>116</sup>

Al examinar comunidades organizadas en biofilms, no es fácil distinguir esta división, puesto que muchos de los polisacáridos extracelulares producidos son insolubles y no se separan fácilmente de las células, complicando la determinación precisa de sus estructuras químicas. No obstante las dificultades asociadas a su estudio, los EPS son, los componentes del biofilm mejor estudiados. Hasta el momento se ha comprobado que ciertos EPS son tanto componentes clave de la matriz, como factores de virulencia bacteriana.<sup>25, 116</sup>

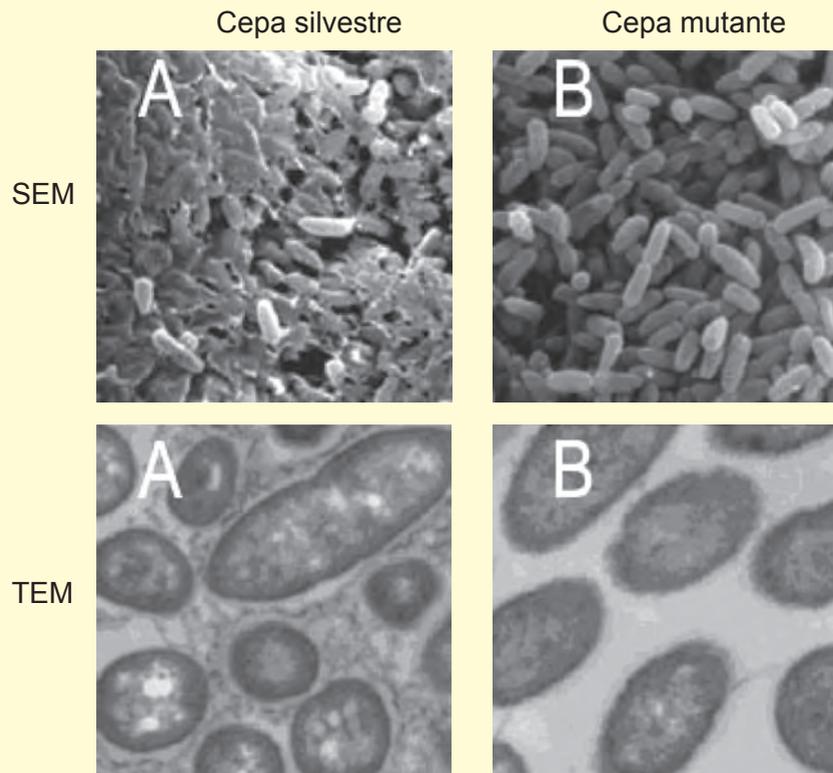
Análisis genéticos apoyan la idea de que, en muchas especies bacterias, diferentes polisacáridos juegan un papel importante en la definición de la arquitectura del biofilm.<sup>15, 1w, 3w</sup> Los EPS encontrados en biofilms son polímeros polianiónicos, polisacáridos o glicoproteínas de diversos azúcares, tales como glucosa, fructosa, manosa y N-acetilglucosamina, entre otros, cuyas características químicas proporcionan una consistencia limosa y pegajosa.<sup>15, 20, 24, 59, 91, 105, 9w</sup>

La composición de los EPS es diferente para cada especie; en *P. aeruginosa*, está constituido principalmente por alginato; en *Salmonella typhimurium* es celulosa; en *Vibrio cholerae* están presentes EPS ricos en glucosa y galactosa, y en *S. aureus* se trata de N-poli-acetilglucosamina, entre algunos ejemplos.<sup>69</sup> Sin embargo, estudios recientes indican que una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede sintetizar distintos EPS como componentes de la matriz.<sup>69, 132, 134</sup>

El alginato es el exopolisacárido más estudiado; la sobreexpresión de alginato en *P. aeruginosa* aislada a partir de muestras de pacientes con Fibrosis Quística, permitió determinar su papel en el desarrollo del biofilm<sup>60, 69</sup> (Fig. 5).

Diversos estudios indican que, aunque los EPS no se requieren necesariamente para la adherencia inicial a la superficie, su producción es esencial para el desarrollo del biofilm, debido a que forman un agregado que actúa como una columna vertebral a la que otras especies pueden integrarse.<sup>134</sup>

**FIGURA 5:** Matriz de biofilms formados por cepas tipo silvestre y mutantes deficientes para la síntesis de EPS de *Pseudomonas aeruginosa*



A) Las cepas silvestres producen arquitectura típica con una matriz sólida.

B) Las cepas mutantes, deficientes en la síntesis de EPS, son incapaces de construir una matriz sólida y mantener la arquitectura típica del biofilm.

Danese *et al.* (2000) demostraron que en *E. coli* el ácido colánico, su principal EPS, permite el desarrollo arquitectónico de su biofilm. Watnick y Kolter (2000), empleando una mutante de *V. cholerae*, incapaz de sintetizar EPS, encontraron que la cepa, no es competente para producir la arquitectura típica del biofilm. Con ello, concluyeron que los EPS estabilizan las interacciones con la superficie bacteriana,



contribuyendo a la formación de la estructura característica del biofilm;<sup>25, 116, 134</sup> más aún, los EPS pueden desempeñar funciones distintas en comunidades microbianas similares, bajo condiciones ambientales diferentes.<sup>69, 132</sup>

Es por esto que, además de considerarse como componentes estructurales principales de la matriz, los EPS también desempeñan un papel importante en el proceso de desarrollo, debido a que pueden interactuar entre sí o con moléculas heterogéneas, a menudo cationes multivalentes, para producir geles. También interactúan con proteínas y glicoproteínas, tanto en su estado de solutos como una vez unidos a la superficie de células bacterianas. Estas interacciones afectan la estructura general y las propiedades de la matriz.<sup>60, 69, 132, 134</sup>

## 5.5 Liberación de formas sésiles

La complejidad global del biofilm y su densidad, se incrementan con la multiplicación activa de los organismos adheridos, el potencial de crecimiento está limitado por la disponibilidad y perfusión de nutrientes, ya que existe un flujo hidrodinámico óptimo que, en lugar de erosionar las capas más externas, favorece el crecimiento bacteriano. Otros factores de control interno son: pH, perfusión de oxígeno, fuentes de carbono y osmolaridad.<sup>31, 53, 104, 113</sup>

En cierto punto, se alcanza el equilibrio dinámico y se alcanza una masa celular crítica. En este momento, las bacterias en la profundidad del biofilm entran en estado quiescente (reposo) o mueren, a consecuencia de los siguientes factores: falta de nutrientes, perfusión inadecuada, disminución de pH,  $pO_2$ , o acumulación de alteraciones metabólicas por subproductos tóxicos. Mientras lo anterior ocurre, en las capas más externas, las señales moleculares del Qs inician el patrón de desprendimiento programado, indicando a la bacteria que se libere del biofilm y regrese al estadio planctónico. Las bacterias disgregadas pueden colonizar nuevas superficies, cerrando así el proceso de formación del biofilm.<sup>13, 18, 25, 31, 41, 51, 91, 98, 149</sup>



## 5.6 Diferencias Básicas entre Formas Sésiles y Formas Planctónicas

---

Una vez maduro el biofilm, genera alteraciones en los patrones de crecimiento bacteriano, de cooperación fisiológica y de eficiencia metabólica, proporcionando una forma de coordinación comunal funcional.<sup>31, 69, 98</sup>

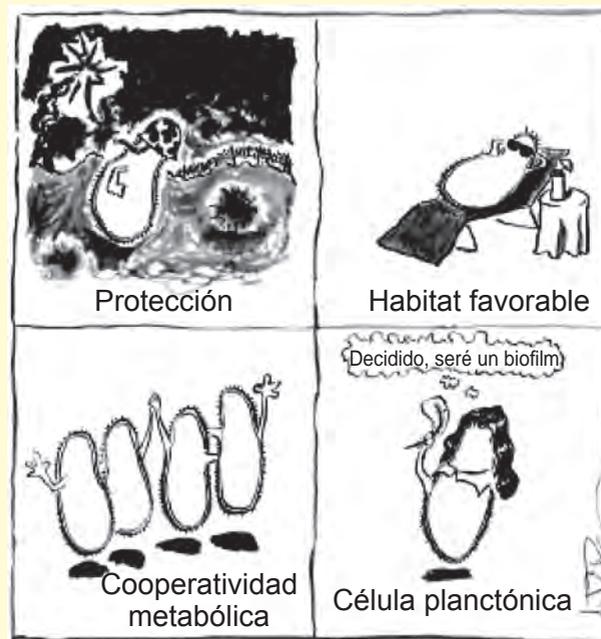
Las bacterias que se encuentran en un biofilm, muestran diferencias fenotípicas con respecto a las bacterias planctónicas, así como distintos patrones de expresión génica.<sup>13, 57, 99</sup> Por ejemplo, existe represión de genes relacionados con estructuras flagelares y pili.

Svensäter *et al.* (2001) afirmaron que ciertas enzimas glicolíticas involucradas en el metabolismo energético y la síntesis de ácidos, se encuentran reprimidas en los biofilms; en contraste, las proteínas necesarias para los procesos biosintéticos (síntesis y plegamiento de proteínas) y el desarrollo bacteriano presentan una expresión aumentada.<sup>135, 3w</sup>

## ¿FORMAR BIOFILMS c On Fle Re Bene Flc IOS?

Existen especulaciones sobre las ventajas que para la bacteria, tiene la vida en biofilm frente a la vida planctónica. A pesar de las dificultades que representan tratar de comprobar estas especulaciones en forma experimental, la siguiente sección describire algunas razones del porqué los microorganismos forman biofilms (Fig. 6).

**FIGURA 6:** Ventajas que confiere la vida en biofilms frente a la vida planctónica



Las principales “motivaciones” para la formación de biofilms en un proceso infeccioso: protección contra presiones ambientales, disposición de nutrientes y cooperatividad metabólica.



## 6.1 Protección contra Presiones Ambientales

Cuando residen dentro del biofilm, las bacterias experimentan cierto grado de resguardo y homeostasis. Como se mencionó con anterioridad, uno de los componentes clave de este micronicho, es la matriz.

En la naturaleza, las células bacterianas tienen que adaptarse rápidamente a variaciones en el medio circundante. Sin embargo, Stoodley *et al.* (2000) sugieren que para las bacterias que residen en un biofilm esto no es necesario, puesto que la matriz proporciona un amortiguador contra los cambios en el medio.<sup>13, 104</sup>

La matriz de EPS tiene potencial para impedir físicamente el acceso de ciertos agentes antimicrobianos al biofilm, actuando como intercambiador de iones. El efecto parece más pronunciado con antibióticos hidrofílicos y cargados positivamente tales como los aminoglucósidos.<sup>35, 37, 47, 61, 79, 116, 133</sup>

### 6.1.1 Protección contra Antibióticos / Resistencia

En medicina es importante la actividad de los biofilms, debido a que las infecciones asociadas a ellos normalmente no son eliminadas y producen episodios recurrentes. Una de las principales razones, como se mencionó con anterioridad, es el hecho de que al interior del biofilm las bacterias son mil veces más resistentes a los antibióticos.<sup>35, 47, 60, 61, 69, 116, 133, 9w</sup>

El concepto convencional de protección contra antibióticos se enfoca a la adquisición de mecanismos de resistencia frente a agentes antimicrobianos, los cuales son mediados por mutaciones o adquisición de genes vía intercambio genético, y generalmente son irreversibles. Estos mecanismos promueven la inactivación enzimática del antibiótico ( $\beta$ -lactamasas), la disminución de su concentración al interior de la bacteria (sistemas de expulsión activa), o bien, provocan modificaciones en los blancos moleculares sobre los que actúan los antibióticos (por ejemplo, la resistencia a vancomicina en enterococos).<sup>57, 116, 123</sup>

El grado de resistencia alcanzado en infecciones asociadas a biofilms no puede ser explicado únicamente por los mecanismos de resistencia presentes en las formas



planctónicas. Más aún, se ha demostrado que las bacterias desarrolladas en el biofilm son capaces de recuperar la sensibilidad original de la cepa bacteriana una vez que se han dispersado o extraído del biofilm. Ello implica que, en estas estructuras, el grado de protección contra antimicrobianos no se debe esencialmente a mecanismos codificados genéticamente ni a la selección de mutantes resistentes presentes en subpoblaciones.<sup>35, 37, 60, 61, 133</sup>

Considerando lo anterior, la razón por la cual al interior del biofilm existe protección contra antibióticos, alude a una resistencia multifactorial, que varía de una especie a otra y radica fundamentalmente a las características estructurales y fisiológicas del propio biofilm.<sup>39, 116, 149</sup>

Algunos de los mecanismos de protección contra antimicrobianos relacionados con la formación de biofilms (Cuadro 2, ver páginas 46 y 47), incluyen:

(i) **Reducción de la penetración o difusión de los agentes antimicrobianos.**

Diferentes estudios han comprobado que todos los antibióticos estudiados son capaces de difundir a través de la matriz y penetrar hasta el interior del biofilm, alcanzando en pocas horas concentraciones bactericidas para formas planctónicas. No obstante, los EPS se comportan como una barrera física para estas moléculas, modificando su transporte al interior. En biofilms de *P. aeruginosa*, se ha demostrado que las fluoroquinolonas penetran rápidamente y los aminoglucósidos lentamente.<sup>15, 60, 73, 98, 108</sup>

Por otra parte, los EPS son generalmente aniónicos y pueden reaccionar o adsorber antibióticos cargados positivamente tales como los aminoglucósidos, restringiendo su permeabilidad.<sup>24, 54</sup>

(ii) **Tasa metabólica de crecimiento diferenciado.**

En el biofilm, las bacterias se encuentran bajo un gradiente de nutrientes, generando zonas diferenciadas de actividad metabólica: células metabólicamente activas en la capa superficial del biofilm y células metabólicamente inactivas al interior. Estas zonas corresponden a diferentes zonas de sensibilidad antibiótica; la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria se ve acompañada por un aumento de la resistencia.



La mayoría de los antibióticos son activos sobre células en crecimiento, así que las células situadas en la profundidad del biofilm podrían estar protegidas de la acción tóxica de estas sustancias.<sup>57, 116, 149</sup> Por ejemplo, la penicilina y ampicilina sólo actúan contra células en crecimiento y su acción es directamente proporcional a la actividad metabólica. Antibióticos tales como las cefalosporinas, los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas tienen acción sobre células en fase estacionaria, pero resultan más activos en células en división.<sup>15, 53, 60, 98</sup>

### (iii) Efecto del microambiente del biofilm sobre la actividad antimicrobiana.

Se ha comprobado *in vitro* que el microambiente al interior del biofilm, en donde las condiciones ácido-básicas y aeróbicas-anaeróbicas pueden variar, afecta también la acción de antimicrobianos.<sup>116, 149</sup>

Las presiones relativamente altas de CO<sub>2</sub> suelen comprometer la actividad de los aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas. Field *et al.* (2005) demostraron que las concentraciones de oxígeno pueden reducir la sensibilidad a tobramicina en biofilms formados por *P. aeruginosa*.

La naturaleza polianiónica del EPS de alginato producido por *P. aeruginosa*, generan zonas en el biofilm en donde es posible concentrar cationes divalentes, lo que causa alteraciones en la actividad de antimicrobianos como aminoglucósidos y tetraciclinas.<sup>15, 74, 79</sup>

### (iv) Sistemas de detección de antibióticos vía Qs, respuesta al estrés e interruptores genéticos, que convierten a las formas planctónicas susceptibles en formas resistentes a antibióticos.

La detección vía Qs de antibióticos, provoca la activación de respuestas al estrés; en consecuencia, se promueve la activación de interruptores genéticos. Estos eventos desencadenan cambios en la fisiología de las bacterias y la aparición de fenotipos específicos en los biofilms que neutralizan mediante mecanismos de resistencia, los efectos de los antibióticos.

La transcripción de genes también provoca la expresión de enzimas específicas con capacidad de hidrolizar al antibiótico en cuestión.<sup>12</sup> Por ejemplo, en los biofilms

de *P. aeruginosa*, como reacción al estrés provocado por la presencia de imipenem y piperacilina, se activa la expresión de  $\beta$ -galactosidasa.

De igual forma, al entrar en contacto con concentraciones de antibiótico, ocurre un aumento en la actividad de múltiples bombas de eflujo, de lo cual se tienen registros en biofilms de *E. coli* ante la presencia de cloranfenicol.<sup>15, 27, 60, 72, 113</sup>

#### (v) Neutralización de antibióticos por productos bacterianos.

Aunque en principio la resistencia a antibióticos en los biofilms parecía independiente a los mecanismos expresados por bacterias planctónicas,<sup>149, 39, 18</sup> evidencias recientes confirman la posibilidad de que los mecanismos convencionales de resistencia también se expresen en biofilms, contribuyendo a la supervivencia del mismo. Por ejemplo, se ha demostrado en biofilms de *P. aeruginosa*, tras tratamiento prolongado con betalactámicos, que se activa el gen de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica, lo cual contribuye a la persistencia de diversas infecciones.<sup>60, 116</sup>

**CUADRO 2: Actividad modificada de los antimicrobianos por presencia de biofilms**

Atributos y Mecanismos <sup>z</sup>	Especies bacterianas estudiadas	Principales agentes antimicrobianos afectados	Referencia*
Impermeabilidad del biofilm a los agentes antimicrobianos	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. epidermidis</i>	Aminoglucósidos Betalactámicos Vancomicina Teicoplanina	Castrillón <i>et al.</i> , 2010 Jeff, 2009 Vázquez <i>et al.</i> , 2009 Rodríguez <i>et al.</i> , 2007 Morales, 2007 Bdi-Ali <i>et al.</i> , 2006 Nazar, 20004 Post <i>et al.</i> , 2004 Herrera, 2004 Lewis, 2001 Mah <i>et al.</i> , 20001
Alteración de la tasa de crecimiento	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. epidermidis</i>	Betalactámicos Ciprofloxacino Tobramicina Pipericina	Castrillón <i>et al.</i> , 2010 Vázquez <i>et al.</i> , 2009 Rodríguez <i>et al.</i> , 2007 Huitrón <i>et al.</i> , 2007 Morales, 2007 Donlan <i>et al.</i> , 2002 Tanaka <i>et al.</i> , 1999 Costerton <i>et al.</i> , 1999

Afectación del microambiente del biofilm a la actividad antibacteriana	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	Aminoglucósidos Macrólidos Tetraciclinas Azitromicina Betalactámicos Tobramicina	Castrillón <i>et al.</i> , 2010 Vázquez <i>et al.</i> , 2009 Jeff, 2009 Huitrón, 2007 Lindsay <i>et al.</i> , 2006 Serrano <i>et al.</i> , 2005 Field <i>et al.</i> , 2005 Gillis <i>et al.</i> , 2005 Rivera <i>et al.</i> , 2005 Herrera, 2004 Mah <i>et al.</i> , 2003 Danese <i>et al.</i> , 2000 Bagge <i>et al.</i> , 2000 Lee <i>et al.</i> , 2000 Xu <i>et al.</i> , 2000
Transferencia horizontal de elementos génicos	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>L. lactis</i>	Betalactámicos Aminoglucósidos	Reisner <i>et al.</i> , 2006 Luo <i>et al.</i> , 2005 Fux <i>et al.</i> , 2005 Herrera, 2004 Parsek <i>et al.</i> , 2003
Detección de antibióticos vía Qs	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	Aminoglucósidos Cloranfenicol Inhibidores del Qs	Castrillón <i>et al.</i> , 2010 Jeff, 2009 Rivera <i>et al.</i> , 2005 Bjarnsholt <i>et al.</i> , 2005 Donlan <i>et al.</i> , 2002 Lee <i>et al.</i> , 2000 Singh <i>et al.</i> , 2000
Activación de genes de resistencia vía Qs	<i>P. aeruginosa</i>	Betalactámicos	Jeff, 2009 Vázquez <i>et al.</i> , 2009 Rodríguez <i>et al.</i> , 2007 Cámara, 2007 Fux <i>et al.</i> , 2005 Colón <i>et al.</i> , 2003

\*Referencias recuperadas según publicaciones más relevantes entre 1999 y 2010.

‡De la matriz del biofilm o de la bacteria.

### 6.1.2 Protección contra el Sistema Inmune

El sistema inmune del ser humano puede ser muy simple o extraordinariamente complejo ya que, desde el sistema inmune innato hasta el sistema inmune adaptativo, cuentan con medios físicos, químicos y celulares para defender al organismo contra agentes patógenos.



En la parte celular, los neutrófilos pueden fagocitar bacterias de modo inespecífico, los linfocitos B de forma específica y los macrófagos de ambas. En el primer caso, el fagocito simplemente ingiere la bacteria tras tener contacto con ella, si la bacteria no presenta envoltura extracelular será fagocitada sin dificultad. Esta defensa inespecífica en contra del patógeno se facilita por barreras físicas, la acción del sistema del complemento y una serie de proteínas sanguíneas pero, en general, es sólo un mecanismo de respuesta primaria: sistema inmune innato.<sup>125, 9w, 11w</sup>

Para que la respuesta inmune genere una memoria inmunológica activa de larga duración, debe estar mediada por la activación de linfocitos T y B: respuesta inmune adaptativa.

Fagocitada y digerida (proteólisis) la bacteria, las CPA cargan su MHCII con péptidos antigénicos, al reconocer el TCR del linfocito T el complejo MHCII/antígeno se promueve la activación. La activación del linfocito B puede medirse por linfocitos T CD4+ (activación T-dependiente) o por macrófagos a través de la presentación antigénica al BCR del linfocito B (activación T-independiente).

La activación de linfocitos B es una combinación de su proliferación y diferenciación terminal en células plasmáticas productoras de anticuerpos, dirigidos fundamentalmente contra antígenos superficiales. Los anticuerpos circulantes encontrarán componentes específicos de bacterias individualizadas y se unirán a ellos, esta unión produce un cambio en el anticuerpo que, por un lado activa al complemento, y por el otro, facilita la unión de fagocitos; la eliminación de bacterias opsonizadas se produce en forma rápida y efectiva (Fig. 7A).<sup>16, 39, 44, 53, 2w, 7w, 11w</sup>

En cuanto a los aspectos químicos, los fagocitos secretan agentes oxidantes tales como los radicales superóxido y diversas enzimas independientes de oxígeno; por ejemplo, lisozimas y lactoferrinas.<sup>15, 39, 60</sup>

Algunas de las defensas del sistema inmune innato son letales contra las formas planctónicas, manteniendo sano al hospedero sin depender del sistema inmune adaptativo. Sin embargo, aunque las bacterias formadoras de biofilms tienen interacciones complejas con componentes del sistema inmune innato: leucocitos (granulocitos, serie monolito-macrófago), sistema del complemento, membranas mucosas, agentes



quelantes, etc.; en cuanto logran evadirlos y generar el biofilm son capaces de resistir sus ataques.<sup>53, 60, 69, 2w, 7w, 11w</sup>

La subsistencia de los microorganismos del biofilm ante el sistema inmune, ocurre por medio de diferentes mecanismos de evasión y resistencia (los cuales no son excluyentes entre sí). A continuación se describen dichos mecanismos:

- **Adherencia irreversible a la superficie.**

Una vez alcanzada la etapa de adherencia secundaria, los recursos físico-químicos del sistema inmune innato resultan inefectivos. La adherencia es irreversible por lo cual los movimientos propios del tejido colonizado (ejemplo, movimientos peristálticos en estómago e intestinos, la tos en pulmones, etc.) y los productos bioquímicos excretados por las células del hospedero (moco, saliva, etc.) son incapaces de erosionar y eliminar efectivamente la monocapa inicial. En el mismo sentido la matriz, evita la eliminación del biofilm por estos medios.<sup>59, 63, 65, 142</sup>

- **Disminución de la capacidad para opsonizar y fagocitar al biofilm y las bacterias que residen en él.**<sup>60, 98, 108</sup>

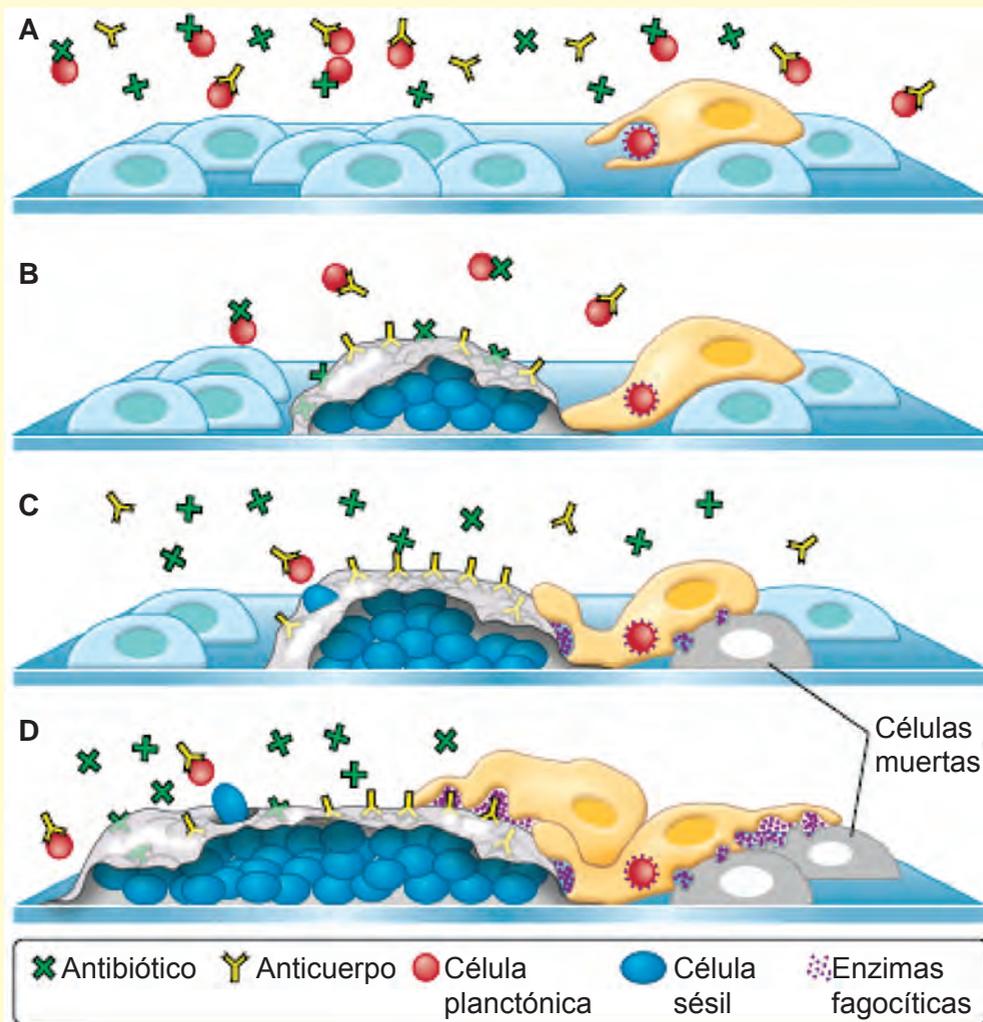
La mayoría de las bacterias en estado planctónico son fácilmente opsonizadas y fagocitadas.

**Caso a)** Para opsonizar un biofilm, más allá de producir anticuerpos IgG contra componentes de la pared bacteriana, se requiere sintetizar principalmente IgG contra componentes de la matriz;<sup>17, 11w</sup> aún más, al interior del biofilm las determinantes antigénicas bacterianas se encuentran ocultas por la matriz (Fig. 7B). En ambas circunstancias, el patógeno no es reconocido o se dificulta su reconocimiento por los anticuerpos circundantes y los receptores de linfocitos B y T, evitando sean objeto de la fagocitosis y la lisis por citotoxicidad específicamente.<sup>85</sup>

**Caso b)** A causa de la naturaleza de la matriz cualquier proteína de alto peso molecular se “hundirá” en esta gruesa capa gelatinosa. En el caso de las inmunoglobulinas

(Ig), al hundirse, su fracción Fc no queda expuesta a sus receptores en la superficie de macrófagos, impidiendo la fagocitosis y subsecuente presentación antigénica a linfocitos T cooperadores<sup>15, 85, 11w</sup> (Figs. 7B-D y 7C-D).

**FIGURA 7: Protección contra el sistema inmune<sup>60</sup>**



(A) Respuesta de fagocitos a una infección, las células fagocíticas, anticuerpos y antibióticos son capaces de actuar frente a células planctónicas del biofilm (B-D) La formación de biofilm impide que los fagocitos, anticuerpos y antibióticos accedan a las bacterias en su interior. (C-D) Los biofilms son reconocidos como agentes patógenos por los fagocitos, induciendo la liberación de enzimas y otros compuestos tóxicos, causando la muerte de células sanas



**Caso c)** La presencia del biofilm activa la respuesta inmune del tipo celular; sin embargo, sus dimensiones evitan que pueda ser fagocitado. La liberación de enzimas y otros factores por los fagocitos pueden producir daños en el tejido circundante al biofilm (Fig. 7D), favoreciendo el desarrollo del mismo.<sup>27, 53, 98, 11w</sup>

- **Penetración limitada de leucocitos y sus productos al interior del biofilm.**

La composición química y propiedades físicas (especialmente el tamaño) de leucocitos y sus productos, combinados con la naturaleza de la matriz y el tamaño de los espacios intersticiales en la estructura tridimensional del biofilm, dificultan la penetración de éstos al interior del mismo; inclusive, se dice que la difusión hasta las profundidades del biofilm es prácticamente nula.<sup>60, 53</sup>

La penetración completa de los productos secretados por leucocitos también se dificulta por la síntesis de enzimas catalíticas al interior del biofilm; por ejemplo, la catalasa bacteriana impide la penetración total del peróxido de hidrógeno.<sup>85, 11w</sup>

## **6.2 Disponibilidad de Nutrientes y Cooperación Metabólica**

En lo que respecta a la disponibilidad de nutrientes, la mayoría de los polímeros que constituyen la matriz son aniónicos y por ende capaces de enlazarse a cationes, permitiendo que actúe como reserva de carbono y energía, lo que supone una fuente alterna de nutrientes esenciales.<sup>25, 134</sup>

Por otra parte, los canales de agua funcionan como un sistema circulatorio primitivo al proporcionar, a través de la fase acuosa, un medio eficaz de intercambio de nutrientes y metabolitos, mejorando así su disponibilidad y la eliminación de productos tóxicos.<sup>25, 52, 54, 70, 100</sup>

En términos de temporalidad, los biofilms proporcionan un entorno ideal para el establecimiento de relaciones sintrópicas, una forma de simbiosis donde dos tipos de bacterias metabólicamente diferentes dependen mutuamente del sustrato sintetizado por la otra.<sup>13, 102, 9w</sup>



En biofilms mixtos las cohortes de colonias son resultado de la asociación entre bacterias metabólicamente cooperativas, ya que su proximidad facilita tanto el intercambio de sustratos intraespecies como la distribución o la eliminación de productos metabólicos.<sup>35, 57, 104, 149</sup> Por ejemplo, las bacterias generalmente son incapaces de utilizar los EPS que sintetizan; sin embargo, las diferentes especies que componen el biofilm pueden degradar y emplear los EPS sintetizados por sus vecinas.<sup>25, 134</sup>

### 6.3 Adquisición de Nuevos Rasgos Genéticos

Estudios realizados por Hausner *et al.* (1999) y Christensen *et al.* (2000), demostraron muestran que desde la década de los 90, la ocurrencia de conjugación bacteriana en el interior de biofilms.

Los biofilms son ambientes ideales para la transferencia génica horizontal de plásmidos o fagos, a través de mecanismos de transformación tales como la conjugación y la transducción; debido a que, la arquitectura del biofilm promueve la estabilidad física de los microorganismos al tiempo que la elevada biomasa celular bacteriana redundante en una alta concentración local de ADN extracelular.<sup>25, 35, 98, 104</sup>

Debido a que los plásmidos pueden codificar resistencia a múltiples antimicrobianos, la asociación con biofilms proporciona dos mecanismos que sinérgicamente se pueden seleccionar, incrementando la resistencia bacteriana a los antibióticos.<sup>69, 98</sup>

Los estudios recientes muestran un incremento en la tasa de transferencia génica horizontal entre bacterias desarrollándose en biofilms, lo que sugiere que la redistribución de genes entre éstas es un proceso continuo con importantes consecuencias en su adaptación evolutiva.<sup>69, 102, 120</sup>

Por otro lado, se ha planteado que cepas portadoras de plásmidos “promotores del desarrollo en forma de biofilms” transfieren éstos a bacterias receptoras, promoviendo la formación de biofilms; por ejemplo, sin plásmidos asociados estos microorganismos producen únicamente microcolonias de escaso desarrollo.

## *El papel de los Biofilms En la Enfermedad*

La mortalidad por infecciones a nivel mundial representa una carga importante para los ministerios de salud. Durante el 2008, en los Estados Unidos se registraron 1.7 millones de casos asociados a procesos infecciones, de los cuales 99,000 resultaron en fallecimientos. El mismo año, en la Unión Europea se presentaron 3 millones de casos, de éstos el 32% fueron debidos a IVU, el 15% por neumonías y el 14% fueron septicemias; de éstos, 50,000 fallecieron. En México no existen datos que permitan conocer estas cifras.<sup>15, 16, 53, 98, 113</sup>

Se estima que aproximadamente el 65% de las infecciones bacterianas en humanos son causadas por biofilms, existen indicadores de que el 60% de las infecciones nosocomiales se deben a ellos, principalmente las relacionadas con contaminación de dispositivos e implantes médicos.<sup>15, 98, 110, 113, 120</sup>

Considerando las estimaciones reportadas por la unión americana respecto a los costos clínicos generados por infecciones y sus complicaciones, entre \$17,000 - \$32,000 dólares anuales,<sup>10, 53, 152</sup> se deduce que para el país, tanto la pérdida humana como la carga económica vinculada a infecciones asociadas a biofilms es abrumadora.



Bajo este panorama, se argumenta en favor de considerar las enfermedades relacionadas a biofilms como un asunto que merece la atención de las autoridades de salud a nivel mundial y nacional. Por lo tanto, el aporte de información sobre biofilms y la búsqueda de métodos de control disminuirán su su impacto en el ámbito de la salud, y en consecuencia la carga económica vinculada a ello.

## 7.1 Infecciones Asociadas a Biofilms Bacterianos

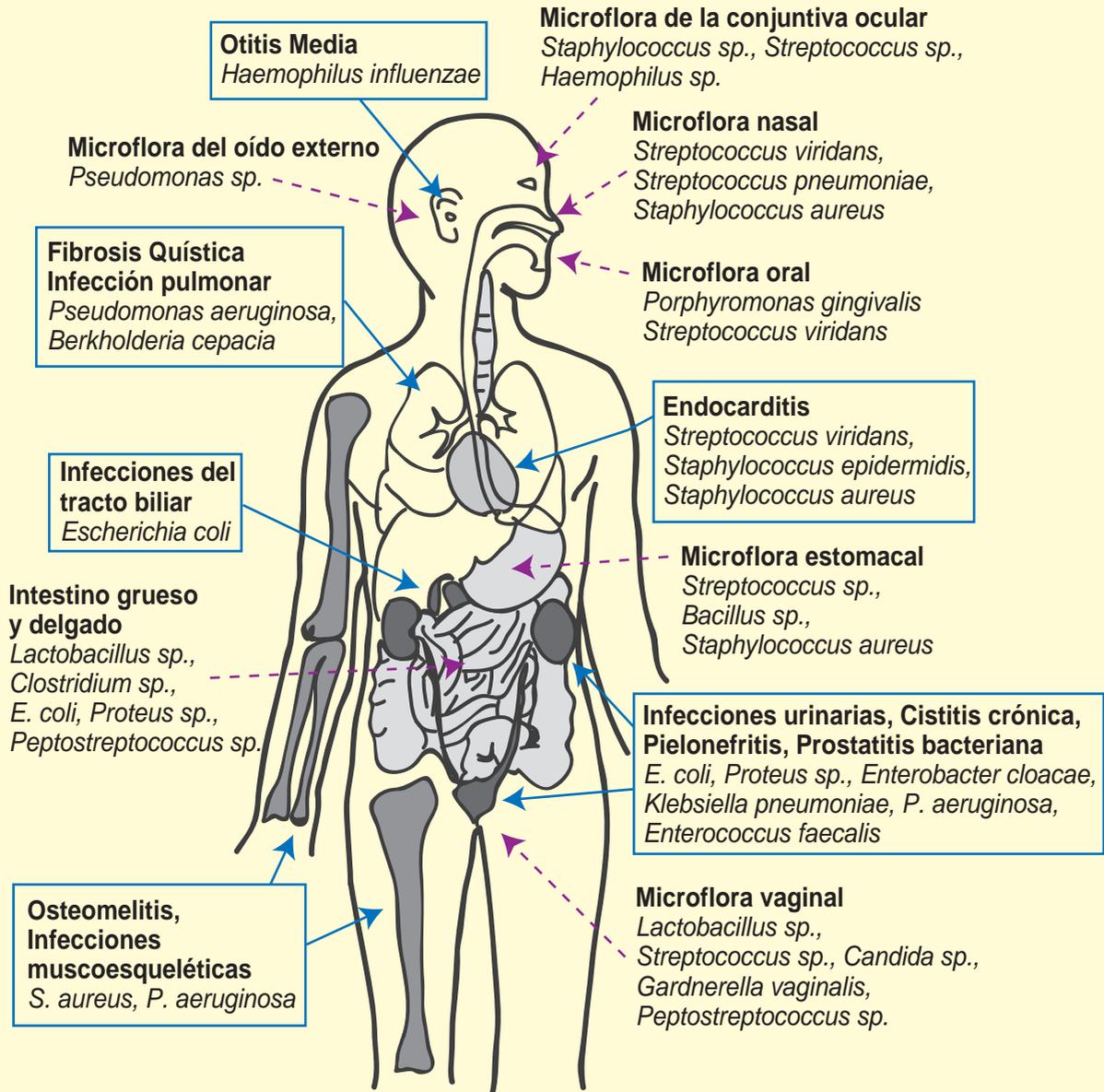
La diversidad en las interacciones bacteria-hospedero es notable, estas interacciones mutualistas van desde relaciones simbióticas que benefician a ambas partes, hasta infecciones agudas en las que los agentes patógenos matan rápidamente al hospedero (Fig. 8). Por ejemplo, más de la mitad de las enfermedades infecciosas están relacionadas con especies bacterianas originalmente comensales en el cuerpo humano, o bien, son comunes en nuestros ambientes; tales como la bacteria de la piel *Staphylococcus epidermidis* y la bacteria de ecosistemas acuáticos *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales pueden causar infecciones crónicas devastadoras en hospederos inmunocomprometidos.<sup>19</sup>

Las especies bacterianas causantes de infecciones agudas (como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Escherichia coli*), también pueden producir infecciones del tipo crónicas.<sup>102, 116</sup> Una infección crónica es resultado de conjugar la moderación de la virulencia bacteriana con la limitación del proceso infeccioso mediante la acción del sistema inmune.

La formación de biofilms puede ser la raíz de muchas infecciones bacterianas persistentes y crónicas (Cuadro 3). Por un lado, la disminución de invasividad es una combinación de varios factores que ocurren durante las distintas fases de formación del biofilm, incluyendo la menor o nula expresión de determinantes de invasividad y de motilidad.<sup>102</sup> Mientras que, al desarrollarse como biofilms, por los mecanismos ya mencionados, las bacterias se adaptan a su medio y son menos perceptibles al sistema inmune; en resumen, más persistentes.<sup>35, 53, 57, 104</sup>

El estudio de tejidos provenientes de pacientes con infecciones crónicas (no relacionadas a implantes) comprobó la presencia de biofilms, tanto de una sola especie como mixtos, permitiendo su asociación al desarrollo y persistencia de estas infecciones.<sup>19, 35, 53, 57, 104</sup>

**FIGURA 8: Interacciones Bacteria-Hospedero<sup>5w</sup>**



Las flechas punteadas marcan regiones anatómicas colonizadas por bacterias comensales, las flechas sólidas señalizan regiones que normalmente son estériles y pueden ser colonizadas por bacterias formadoras de biofilm, desencadenando las infecciones listadas en las cajas.

**CUADRO 3: Algunas infecciones humanas asociadas a biofilms bacterianos**

Enfermedad-Infección	Microorganismo responsable	Referencia*
<b>Fibrosis quística Neumonía</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>H. influenzae</i>	Moscoso <i>et al.</i> , 2009 Murphy <i>et al.</i> , 2009 Davies <i>et al.</i> , 2009 Jeff, 2009 Psaltis, 2008 Moreau <i>et al.</i> , 2008 Moscoso <i>et al.</i> , 2006 Herrera, 2004 Drago, 2004 Post <i>et al.</i> , 2004 Jass <i>et al.</i> , 2003 Parsek, 2003 Hoiby, 2002 Lyczak, 2002 Rao <i>et al.</i> , 1999 Biltón <i>et al.</i> , 1995
<b>Otitis media</b>	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Barkai <i>et al.</i> , 2009 Murphy <i>et al.</i> , 2009 Buchinsky <i>et al.</i> , 2007 Bakaletz <i>et al.</i> , 2007 Post <i>et al.</i> , 2007 Lasa <i>et al.</i> , 2005 Rao <i>et al.</i> , 1999
<b>Periodontitis Caries dental Gingivitis</b>	<i>Streptococcus sp.</i> , <i>Fusobacterium sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Bacteroides sp.</i> , <i>Haemophilus sp.</i> , <i>Porphyromonas sp.</i> , <i>Peptostreptococcus sp.</i> , Bacterias anaerobias Gram-	Huitrón, 2007 Offenbacher <i>et al.</i> , 2007 Selwitz <i>et al.</i> , 2007 Bryers <i>et al.</i> , 2006 Thomas <i>et al.</i> , 2006 Herrera, 2004
<b>Prostatitis</b>	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia</i> , <i>E. faecalis</i> . Bacterias gramnegativas	Faleiro, 2010 Bartoletti, 2009 Lasa <i>et al.</i> , 2005 Rivera <i>et al.</i> , 2005 Parsek, 2003
<b>Endocarditis valvular</b>	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i>	Lasa <i>et al.</i> , 2005 Rivera <i>et al.</i> , 2005 Parsek <i>et al.</i> , 2003 Donlan <i>et al.</i> , 2002
<b>Fascitis necrotizante</b>	Estreptococos del grupo A	Presterl <i>et al.</i> , 2005
<b>Osteomielitis</b>	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Brady, 2008 Wagner, 2005 Kandemir, 2005
<b>Infecciones nosocomiales</b>	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>A. israelii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Nazar, 2007 Cerca <i>et al.</i> , 2006 Lasa <i>et al.</i> , 2005 Parsek <i>et al.</i> , 2003 Donlan <i>et al.</i> , 2001

\* Referencias recuperadas según publicaciones más relevantes entre 1999 y 2010.



Las infecciones asociadas a biofilms comparten características clínicas; a continuación se proponen los siguientes criterios para definir las infecciones causadas por biofilms (aunque existen objeciones, estos criterios abarcan las características generales): (a) Colonización de tejido dañado, cuerpo extraño o biomaterial por bacterias formadoras de biofilm; (b) Evidencia de desarrollo de biofilms, en el examen directo del tejido infectado se observan bacterias en microcolonias alojadas en una matriz; (c) Infección confinada a una localización determinada, la diseminación ocurre como fenómeno secundario; (d) Manifestación tardía de la sintomatología, a causa del lento crecimiento del biofilm; (e) La infección es difícil o imposible de erradicar con antibióticos a pesar de que las bacterias responsables son susceptibles en el estado planctónico.<sup>19, 69, 102</sup>

## 7.2 Biofilms y Patogénesis: Algunas Entidades Clínicas

Entre las enfermedades en que se ha establecido una asociación directa con el desarrollo de biofilms se encuentran: la Caries dental, la Periodontitis, la Otitis Media Crónica, las infecciones del tracto biliar, la Osteomielitis, la Endocarditis de válvulas nativas y la Prostatitis.<sup>15, 19, 69, 116</sup> A continuación se describen en términos generales algunas de estas enfermedades:

### > CARIES DENTAL Y PERIODONTITIS

En la cavidad bucal, la temperatura, humedad, nutrientes y requerimientos de oxígeno son favorables para el crecimiento bacteriano. Las bacterias localizadas en la saliva pueden considerarse bacterias planctónicas, mientras las encontradas en la superficie dura de los dientes y en los espacios interdentarios son bacterias sésiles con capacidad de formar biofilms. Estos biofilms son el componente principal de la placa dentobacteriana, el agente etiológico de caries y enfermedades periodontales.<sup>98, 123, 149</sup>

En la primera etapa del desarrollo, el biofilm dental contiene una gran cantidad de bacterias Gram+ con poca capacidad de formar ácidos orgánicos y EPS; posteriormente, en las capas más profundas a causa de las condiciones anaeróbicas predominan las bacterias Gram-, en este momento el biofilm adquiere capacidad cariogénica: conforme madura el biofilm las bacterias heterogéneas que lo conforman



sintetizan exoproductos ácidos, estos provocan desmineralización de la pieza dental, facilitando la destrucción del tejido que compone y/o rodea a la pieza, y se genera la caries.<sup>28, 51, 107, 123, 153, 5w</sup>

El daño al tejido también provoca la Periodontitis crónica, inflamación del tejido de las encías que eventualmente conduce a la pérdida de dientes. La principal bacteria asociada a la Periodontitis es *Porphyromonas gingivalis*, la cual construye biofilms por coagregación con colonizadores primarios de la superficie dental tales como *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus sanguis*. Estas bacterias, además de formar biofilms, tienen capacidad para alterar el flujo de calcio en las células de la mucosa epitelial y liberar toxinas potenciando el daño al tejido.<sup>25, 102, 113</sup>

### > ENDOCARDITIS

La Endocarditis se produce cuando bacterias desde la orofaringe, el tracto gastrointestinal o el tracto genitourinario entran hasta el torrente sanguíneo y alcanzan el tejido dañado de las válvulas mitral, aorta, tricúspide o pulmonar. Las células endoteliales dañadas secretan fibronectina, la cual es utilizada como receptor por adhesinas bacterianas, las bacterias se multiplican en la lesión y forman un biofilm, acentuando el daño y llegando a provocar embolias sépticas.<sup>10, 15, 69, 83, 154, 5w</sup>

Las bacterias formadoras de biofilm asociados a Endocarditis son principalmente *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.<sup>102, 106, 113</sup>

Como en la mayoría de los casos de infecciones relacionadas a biofilms, una vez establecido el biofilm y existe evidencia clínica, los tratamientos antimicrobianos resultan poco efectivos.

### > PROSTATITIS

La glándula prostática puede infectarse por bacterias que ascienden desde la uretra o por reflujo de orina contaminada. Las bacterias más comunes son *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus sp.*<sup>5, 8, 10, 14, 52</sup>

La congestión de la glándula permite el fácil desarrollo del biofilm, su presencia activa la respuesta inmune y provoca la inflamación. Si la infección no se trata en sus



inicios las bacterias persistirán adheridas al epitelio en forma de biofilms, originando la Prostatitis Crónica.<sup>35, 69, 102</sup>

La aparición de síntomas es gradual, los pacientes pueden ser asintomáticos entre los episodios o tener síntomas leves todo el tiempo, éstos abarcan hematuria, vacilación y retención urinaria, febrícula, incontinencia y disuria.<sup>5, 8</sup>

El tratamiento incluye una combinación de medicamentos, cirugía y cambios en el estilo de vida. Se trata con un ciclo prolongado de antibióticos (6-12 semanas o más), con mayor frecuencia son trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina; sin embargo, la mayoría de antibióticos no penetran bien el tejido prostático, continuando la infección e inclusive se forman pequeños cálculos compuestos por biofilm bacterianos.<sup>10, 14, 28, 29, 36</sup>

### ➤ OSTEOMELITIS

Los traumatismos, la colocación de dispositivos e implantes médicos y las enfermedades de inmunodeficiencia son factores predisponentes para la colonización de tejidos blandos. En un medio tan favorable las bacterias pueden formar biofilms, la presencia de éste activa la respuesta inmune contribuyendo a la inflamación crónica de la médula ósea y los tejidos adyacentes, al tiempo que provoca desmineralización y necrosis progresiva del hueso.<sup>10, 14, 15, 5w, 6w</sup>

Mediante el análisis con MSC de muestras del tejido óseo de pacientes con osteomielitis crónica se encontraron señales de desarrollo de biofilms, detectando formación de microcolonias adheridas al tejido y bacterias rodeadas por una densa matriz fibrosa, estos desarrollos eran tan nítidos y de tan amplia extensión que fue posible visualizar en la superficie del hueso infectado una zona oscurecida definida. Estos hallazgos implican una asociación del biofilm con ésta enfermedad.<sup>5w</sup>

En conclusión, aunque los avances recientes han permitido comprender las bases genéticas y moleculares del comportamiento de las comunidades bacterianas, aún es necesario una gran cantidad de trabajo adicional para establecer un vínculo directo entre los requerimientos para el desarrollo del biofilm y los factores ambientales necesarios para causar la enfermedad; con ello, sería posible encontrar blancos terapéuticos para el control de las infecciones asociadas a biofilms.<sup>12, 15, 19, 102</sup>



### 7.3 Infecciones Asociadas a Dispositivos e Implantes Médicos Contaminados por Bacterias Formadoras de Biofilms

Mediante SEM se detectó sobre la superficie de implantes y dispositivos empleados en medicina, la formación de biofilms.<sup>19, 23, 39, 53, 152</sup>

Los biofilms pueden desarrollarse en dispositivos e implantes médicos, tales como lentes de contacto, catéteres venosos, conectores, tubos endotraqueales, dispositivos intrauterinos, válvulas cardíacas, marcapasos, catéteres de diálisis, prótesis de cadera, prótesis de voz, etcétera (Cuadro 4).<sup>15, 19, 60, 98, 107, 113</sup>

**CUADRO 4. Bacterias formadoras de biofilms que contaminan implantes<sup>69</sup>**

Implante	Bacteria formadora de biofilm
Implantes ortopédicos	<i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>
Sistemas de drenaje de líquido cefalorraquídeo.	<i>Staphylococcus</i> sp.
Catéteres endovasculares Válvulas mecánicas de corazón	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>
Implantes dentarios	Cocos grampositivos acidogénicos ( <i>Streptococcus</i> sp.)
Suturas	<i>Staphylococcus</i> sp.
Ventilación asociada a neumonía	Gramnegativos
Catéter venoso central	<i>S. epidermidis</i>
Tubos endotraqueales	Gran variedad de bacterias y hongos
Catéter urinario	<i>E. coli</i> y otros gramnegativos
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y cocos grampositivos

En la mayoría de pacientes que desarrollan infecciones asociadas a dispositivos e implantes contaminados por biofilms, la tasa de mortalidad es cercana al 70%; considerando que se colocan millones de implantes al año, cada implante representa una superficie potencial para la formación de éstos, y por ende, el desarrollo de infecciones.<sup>10, 106, 113, 140, 152, 154</sup>

Las bacterias Gram+ más frecuentes en estos materiales son *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus viridans*; y las Gram– son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas*



*aeruginosa*; dependiendo del implante y la duración de su uso en el paciente, éstos pueden formarse por una o múltiples especies.<sup>69, 116, 149, 152</sup>

Estos microorganismos provienen del agua, del ambiente, de la piel de los pacientes o de los responsables de su cuidado, este último aspecto es relevante dado que las bacterias resistentes originadas en el biofilm podrían extenderse de paciente a paciente a través de las manos del personal sanitario.<sup>15, 29, 69</sup>

Cuando un implante se contamina varios factores influyen en el desarrollo de biofilm sobre su superficie; inicialmente, las bacterias deben permanecer adheridas el tiempo suficiente para que la adherencia sea irreversible, esto depende de las características físico-químicas del implante, el flujo de líquido al que esté sometido, el número de bacterias adheridas y las defensas del hospedero.<sup>14, 57, 152</sup>

Para el caso de catéteres venosos centrales su superficie acaba recubierta de proteínas del plasma, como la fibronectina, el fibrinógeno y la laminina, éstas actúan como receptores de adhesinas; en las sondas urinarias la fuente de contaminación asciende desde la bolsa recolectora hasta el lumen del catéter, en este caso las bacterias se unen directamente al material del catéter sin que intervengan las proteínas del paciente.<sup>10, 35, 69</sup>

Una vez consolidado, el biofilm actúa como un fuente de infección; por ejemplo, existe evidencia de que los biofilms en válvulas son la causa principal de Endocarditis en pacientes sometidos a reemplazo de válvula coronaria, además, su formación en lentes de contacto contribuye al desarrollo de queratitis.<sup>27, 35, 83, 102</sup>

Por otra parte, la aparición de infecciones sistémicas, ineficiencia en la diálisis debido a trombosis en el catéter, corrosión de metales y formación de cristales por bacterias que sintetizan ureasa, son algunas de las principales complicaciones en infecciones asociadas a contaminación de implantes por bacterias formadoras de biofilms.<sup>106, 152, 140, 155</sup>

Actualmente, las estrategias para evitar la contaminación van desde el uso de técnicas asépticas durante la implantación hasta el recubrimiento del lumen interno del implante con agentes antimicrobianos o anticoagulantes.<sup>35, 69, 83, 98, 9w</sup>

## Infecciones del tracto respiratorio asociadas a biofilms bacterianos

### 8.1 Justificación

Aunque el tracto respiratorio superior es de fácil acceso a patógenos cuenta con una serie de barreras defensivas para evitar la invasión aguda; no obstante, en lo que respecta a las infecciones crónicas (de oídos, nariz y garganta), éstas son frecuentes y representan un enorme desafío para el sistema sanitario. Las infecciones respiratorias de etiología bacteriana son responsables de una considerable morbilidad a nivel mundial, e inclusive, son causa de secuelas discapacitantes.<sup>43, 87, 92, 95, 96, 100, 109, 113, 115, 143, 149, 151, 5w</sup>

*En este rubro enfatizamos en **Haemophilus influenzae** no tipificable HiNT, dada la experiencia con que cuenta el grupo de trabajo al que me he integrado para la realización de esta tesis.*

### 8.2 Biofilms por *Haemophilus influenzae* no Tipificable Asociables a Infecciones del Tracto Respiratorio

Las cepas de *Haemophilus influenzae* son genéticamente diversas, cohabitan principalmente como comensales o agentes patógenos de su único hospedero el hombre, siendo su nicho ecológico el tracto respiratorio humano.<sup>64, 128, 138</sup>



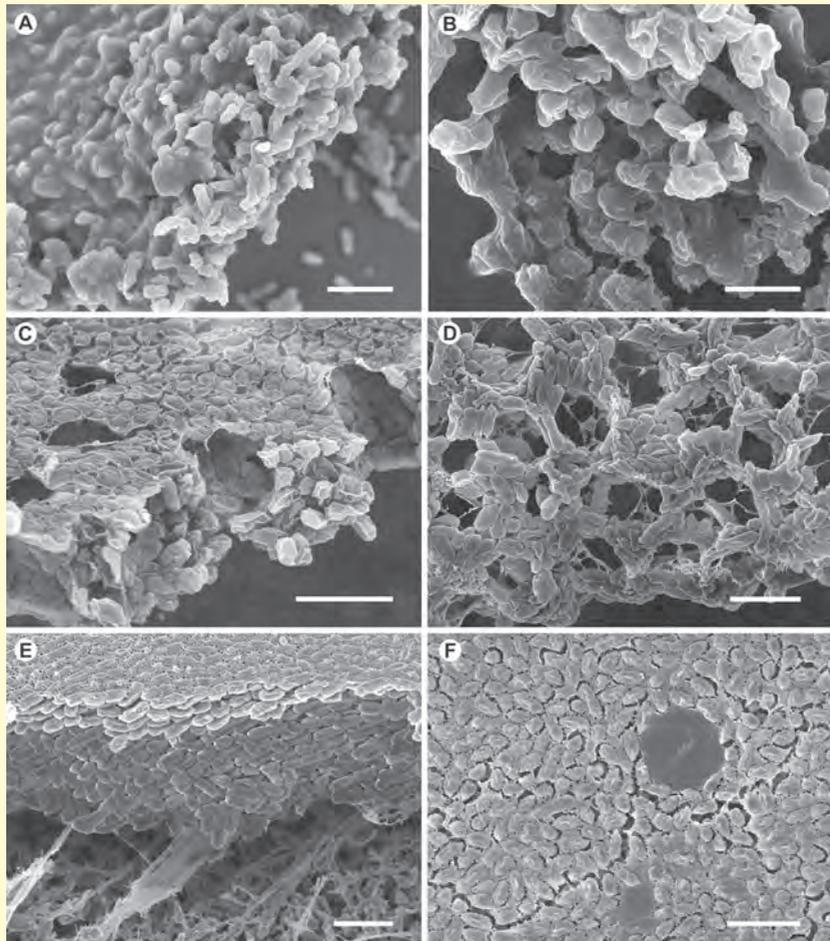
Se trata de una bacteria con forma de cocobacilo, aunque muestra un marcado pleomorfismo, especialmente durante los estadios tardíos de su crecimiento *in vitro* o cuando se le aísla de pacientes que han recibido antimicrobianos. Se clasifica como Gram–, no móvil y no esporulada; generalmente el microorganismo es aerobio pero puede crecer como anaerobio facultativo, además presenta requerimientos nutricionales exigentes, siendo autótrofo a factor V y factor X.<sup>93, 59, 88, 93, 112, 142</sup>

Por medio de pruebas serológicas, la Dra. Margaret Pittman determinó que, en función de su constituyente polisacárido *Haemophilus influenzae* podía presentar dos variantes fenotípicas, en forma capsulada y no capsulada. Entre las cepas capsuladas identificó seis diferentes serotipos basados en las diferencias antigénicas del polisacárido capsular, a los que designó con las letras a, b, c, d, e, y f. Las cepas que carecen de cápsula no pueden tipificarse serológicamente, de ahí su denominación como *Haemophilus influenzae* no tipificable.<sup>44, 45, 68, 93</sup>

En 1883 Robert Koch identificó a *Haemophilus influenzae* como bacteria patógena, principalmente el serotipo b es el agente etiológico de la meningitis y la neumonía bacteriana, la epiglotitis, la septicemia, entre otras. Las enfermedades invasivas causadas por Hi tipo b prácticamente se han erradicado en países donde el esquema de vacunación infantil incluye las vacunas antineumocócica y antiHib.<sup>32, 42, 44, 45, 68, 112, 129, 130</sup>

La reducción en el estado de portador inducida por vacunas conjugadas es benéfica desde el punto de vista de mecanismos de inmunidad de comunidad; sin embargo, debido a fenómenos de desplazamientos, las cepas no capsuladas mantienen su importancia como agentes causales de infecciones respiratorias, aumentando la proporción de colonización nasofaríngea y adquiriendo mayor relevancia como patógenos en procesos infecciosos crónicos.<sup>42, 44, 84, 92, 93, 117</sup>

La colonización nasofaringe por *Haemophilus influenzae* no tipificable ocurre en estadios tempranos de la infancia, su transmisión ocurre de persona a persona mediante gotas de saliva en aerosol.<sup>112</sup> Mientras que en las cepas capsuladas se reconoce al polisacárido capsular como el principal factor de virulencia, en las cepas de HiNT la virulencia se asocia a la producción *in vivo* de biofilm.<sup>68, 88, 96, 136</sup> Se ha demostrado que HiNT puede formar biofilms tanto *in vitro* (Fig. 9) como *in vivo*.<sup>59, 89, 65, 127, 128</sup>

**FIGURA 9: Biofilms formados *in vitro* por HiNT<sup>9w</sup>**

Micrografías por SEM de biofilms formados por HiNT a las 24 horas de incubación en diferentes condiciones.

A-B) Se bañan cubreobjetos estériles en una suspensión de caldo BHI e inóculo de HiNT: (A) Conglomerados planos de bacterias embebidas en una matriz extracelular amorfa. (B) Cada bacteria HiNT está cubierta de una capa viscosa que oculta su superficie.

C-D) Se colocan en agar chocolate los filtros empleados en la filtración de la suspensión BHI-HiNT: (C) El filtro está cubierto con una alfombra plana que consiste en HiNT estrechamente unidos entre sí. (D) Se observan los vacíos intersticiales entre los agregados de bacterias

E-F) Se colocan filtros estériles en placas de agar chocolate y se inoculan con la suspensión BHI-HiNT, la parte superficie es expuesta al aire: (E) Se observa desarrollo total de un biofilm de HiNT adherido al filtro. (F) El lado expuesto al aire se cubrió con una fina capa de matriz extracelular.

Escalas de la barra: A,C,E y F = 2  $\mu$ , B y D = 1  $\mu$



Los biofilms de HiNT formados *in vitro* expresan proteínas de membrana externa denominadas P2, P5 y P6 que actúan como adhesinas; y lipooligosacáridos (LOS) con capacidad de incorporar ácido sialico o ácido N-acetilneuramínico (sialilación bacteriana), estos LOS presentan dos epítomos diferentes.<sup>65, 101</sup> Mientras los biofilms generados *in vitro* bajo condiciones que simulan el entorno natural del hospedero o *in vivo* en mamíferos, han mostrado incorporar dentro de la matriz del biofilm glicofomas específicas de LOS sialilados.<sup>131, 138</sup> Estos resultados implican que LOS con capacidad de sialilación son importantes para la unión a sialoglicoproteínas presentes en la membrana de las células mucosas, contribuyendo a la adherencia bacteriana y proporcionando protección contra el sistema inmune por mimetismo con las glicoproteínas del hospedero; además, datos recientes indican que la sialilación bacteriana puede promover la agregación bacteriana en forma de microcolonias favoreciendo la formación *in vivo* de biofilm por HiNT.<sup>64, 65, 101, 131, 136, 138</sup>

Otros estudios, demostraron *in vivo* que al desarrollarse los biofilms de HiNT sobre el tejido del oído medio de chinchillas, éstos contenían una cantidad considerable de ADN de doble cadena dispuesto en una malla densa (que entrelazaba finos y gruesos filamentos a través de los canales de agua) sugiriendo que, tanto el ADN como los Pili IV podrían conferir estabilidad estructural al mismo, sirviendo como un puente intrabacterial.<sup>64</sup>

A consecuencia de la capacidad para producir biofilms en el epitelio respiratorio, HiNT puede prolongar su colonización y contribuir a la recurrencia de procesos infecciosos como: Otitis Media Crónica OMC, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica EPOC, Fibrosis Quística FQ y Neumonía;<sup>50, 63, 65, 92, 93, 127</sup> también, se ha asociado a manifestaciones clínicas sistémicas como Meningitis.<sup>93, 95, 131</sup>

Las enfermedades se producen cuando HiNT invade las células epiteliales respiratorias, iniciando uno o más mecanismos proinflamatorios. La transcripción del promotor Pilus A en HiNT juega un papel importante en la patogénesis, y se ha detectado su presencia y participación al interior de biofilms formado por HiNT, tanto *in vitro* como *in vivo*, la expresión de esta enzima está relacionada con la adherencia a células epiteliales.<sup>64, 65, 96, 127, 148</sup>

Además del Pilus A, en cepas de procedencia clínica se encontró una adhesina autotransportadora implicada en la adhesión a células hospederas y en la formación



de microcolonias, denominada “Hap”<sup>38</sup>; las variaciones en el gen Hap entre las distintas cepas de HiNT resultan significativas para la formación *in vitro* de biofilms.<sup>38, 112, 141</sup>

### > OTITIS MEDIA CRÓNICA OMC

La Otitis Media Crónica OMC es una infección persistente que afecta al oído medio. El ascenso de patógenos desde la colonización nasofaríngea hasta el interior del oído medio, es consecuencia de la disfunción del tubo de Eustaquio provocada por una previa infección viral del tracto respiratorio. En general, estos cuadros se asocian con dolor, secuelas auditivas y la necesidad de colocación de dispositivos auriculares e implantes cocleares.<sup>32, 40, 66, 69, 98</sup>

La OMC se divide en Supurativa y Silenciosa. La primera se define como la persistencia de otitis por más de 3 meses, caracterizada por perforación mesotimpánica con supuración mucopurulenta abundante; la segunda no presenta ningún síntoma pero lentamente lleva a secuelas graves y complicaciones por destrucción del conducto auditivo y sus anexos, siendo exclusivamente detectable por TAC y corregible por técnicas quirúrgicas.<sup>52, 93, 151</sup>

Aunque la OMC es causada por un grupo variable de microorganismos *Haemophilus influenzae* no tipificable es el principal agente causal, sobretodo en infantes.<sup>4, 32, 50, 52, 78, 93, 101</sup>

La formación de biofilms por HiNT explica la mayoría de las observaciones clínicas, microbiológicas y epidemiológicas de la OMC, numerosos estudios empleando modelos experimentales con tejido animal y humano han descrito la asociación entre la formación de biofilms por HiNT y la ocurrencia de OMC.<sup>2, 4, 11, 50, 89, 102</sup> Por ejemplo, Murphy y Charmiane en el 2002, demostraron que HiNT está presente en forma de biofilms sobre tejidos del oído medio obtenidos de pacientes con OMC; para corroborar su hallazgo, infectaron chinchillas con HiNT y observaron al extraer los tejidos desarrollo de biofilms sobre éstos.<sup>32, 96</sup>

La colocación de implantes puede promover tanto el inicio de la infección crónica (por injerto de implante contaminado) como su permanencia; por ejemplo, una forma de aliviar la presión sobre la membrana timpánica y aumentar la ventilación es colocar



tubos timpanostómicos que atraviesan el tímpano y posibilitan la colonización, formación de biofilms y ocurrencia de OMC.<sup>3, 69, 154.</sup>

El equipo de Hall-Stoodley (2006) estudió muestras de mucosa del oído medio de niños y adultos que tras inserción de implante coclear padecían OMC y no respondían a múltiples ciclos de antibióticos. Las muestras se examinaron mediante criterios morfológicos y metodológicos (CLSM, marcaje de ARN, FISH e inmunotinción), encontrando evidencias de biofilms bacterianos. En lo que respecta a las evidencias, evaluando conglomerados de HiNT en el interior de una matriz, encontrados en una muestra de paciente con supuración, éstos resultaron PCR positiva a Hi. También se detectaron en dos casos de OMC sin supuración una variedad de morfologías, que iban desde microcolonias hasta grandes grupos de bacterias; la morfología de Hi observada en estos biofilms fue coincidente con cocobacilos, similar a la de los desarrollados en biofilms *in vitro*, pero distinta a la forma bacilar observada durante el crecimiento planctónico.<sup>50, 51</sup>

En conjunto, los resultados anteriores confirman la existencia *in vivo* de biofilms de HiNT en pacientes con OMC, y apoyan su papel en la patogénesis y cronicidad de dicha enfermedad.<sup>3, 50, 51, 66, 69, 98, 154</sup>

En cuanto al tratamiento, si bien la otitis media aguda pueden resolverse con tratamiento antibiótico oral, la infección crónica por HiNT requiere tratamiento parenteral, siendo los antibióticos la primera opción.<sup>93, 94</sup>

### ➤ ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA EPOC

Dentro del término Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica EPOC, se incluyen principalmente el Emfisema y la Bronquitis crónica.

La EPOC es un trastorno no reversible y progresivo, se caracteriza por la obstrucción o limitación crónica en el flujo aéreo pulmonar, a causa de una concentración excesiva de flúidos y mucosidad, esta limitación se asocia a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones y la vía aérea superior.

El desarrollo primario de la EPOC se asocia a la exposición a partículas nocivas y humo de tabaco y leña, estos agentes desencadenan una respuesta inflamatoria



exagerada provocando lesiones tisulares que predisponen a la fácil colonización por bacterias oportunistas, tales como HiNT y *P. aeruginosa*, que a su vez agravan la situación del paciente con EPOC.<sup>1, 21, 33, 75, 82, 101, 115</sup>

En 2005 los estudios de Murphy *et al.*, empleando tejido pulmonar de pacientes con EPOC, evidenciaron la relación entre el desarrollo de biofilms por HiNT y la prevalencia y progresión de la EPOC, al correlacionar *in vivo* el aumento de expresión de glutarredoxina (enzima expresada durante la infección de vías respiratorias) con la presencia de biofilm por HiNT. Esta enzima se expresó en mayor concentración en *Haemophilus influenzae* desarrollándose en biofilms que en el estado planctónico; además, la sobreexpresión de glutarredoxina ocasiona una respuesta inmune exagerada contribuyendo así al desencadenamiento de las exacerbaciones características de la EPOC.<sup>19, 39, 94, 101</sup>

Continuando con la búsqueda de evidencias sobre la formación de biofilms por HiNT en tejido pulmonar, el grupo de Pang (2008) empleando modelos animales de EPOC (ratones), al mismo tiempo que demostraron su presencia en el tejido determinaron que éstos se desarrollaban como comunidades multicelulares.<sup>33, 71, 95, 96, 136</sup>

En México, aunque los datos más recientes (2009) revelan que la EPOC ocupa el cuarto lugar de muertes entre mujeres y el quinto entre hombres, no se cuenta con información concerniente al papel de HiNT en esta entidad clínica. No obstante, los datos obtenidos por Gómez de León *et al.*, revelan que:

- a) Estudiando cepas de HiNT obtenidas a partir de individuos sanos mexicanos, se evidenció la capacidad de producción de biofilms. Argumentando que esta condición seguramente facilita la sobrevivencia y permanencia del organismo durante el estado portador, impidiendo la eliminación por anticuerpos de las cepas localizadas en el tracto superior en el estado de salud.<sup>43</sup>
- b) Mediante la experimentación con cepas provenientes de pacientes con EPOC se evaluó la habilidad de generar biofilms, lo cual permitió categorizar las cepas según su nivel de producción de biofilms. Cerca del 25% fueron altamente productoras, en tanto que casi la mitad fueron moderadamente productoras, siendo el resto pobremente productoras; inclusive, se encontró un reducido grupo de cepas

no productoras de biofilm, aproximadamente un 10%. Estos resultados permiten considerar las variaciones en la capacidad de formación de biofilm por cepas de HiNT y su posible significancia en cepas aisladas de pacientes con EPOC. El análisis integral de los estudios en el laboratorio podrá ser útil para el sector salud de nuestro país, desde el punto de vista de la selección del tratamiento antimicrobiano óptimo para pacientes con EPOC.<sup>43, 136</sup>

Las investigaciones realizadas hasta el momento (tanto a nivel nacional como internacional), a parte de demostrar la formación de biofilms de HiNT en pacientes con EPOC, pueden explicar las variaciones de la respuesta inflamatoria en las diferentes fases de la EPOC; siendo la inflamación mayor durante los episodios de exacerbación comparada con la observada en las fases estables de la enfermedad.<sup>43, 95, 115</sup> Lo anterior implica que, en la fase estable, la presencia y actividad del biofilm generan un estímulo proinflamatorio constante y la liberación de agentes neutrofílicos daña el tejido circundante, contribuyendo a la destrucción progresiva y obstrucción de la vía aérea (características de esta entidad); al tiempo que el desarrollo de biofilms asegura la prevalencia del agente infeccioso y con ello el carácter crónico de la EPOC.<sup>1, 71, 101</sup> Por otro lado, al momento de liberar formas planctónicas se promueve tanto la respuesta neutrofílica inflamatoria (completa) como de inmunidad específica, lo cual parece ser el mecanismo generador de las exacerbaciones recurrentes durante la EPOC.<sup>21, 33, 46</sup>

### ➤ FIBROSIS QUÍSTICA FQ

La Fibrosis Quística FQ es una enfermedad autosómica recesiva, existe una mutación en el gen regulador de la conductancia transmembranal que interviene en la producción de sudor, jugos gástricos y moco; es un trastorno multisistémico que causa la formación y acumulación de moco espeso y pegajoso, afectando fundamentalmente pulmones, intestinos, páncreas e hígado. La dificultad para respirar es el síntoma más común, emergente de infecciones pulmonares crónicas asociadas principalmente a bacterias formadoras de biofilms.<sup>26, 55, 76, 80, 119, 150</sup>

En la primera etapa, los pacientes desarrollan infecciones respiratorias intermitentes (similares a la bronquitis) causadas por una variedad de bacterias, incluyendo *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* y *P. aeruginosa*.<sup>60, 113, 114, 126, 127, 128, 10w</sup> HiNT planctónica infecta comúnmente durante la niñez (en las etapas tempranas de la enfermedad)



induciendo inflamación local y daños a las vías respiratorias, y actuando como puerta de enlace para la colonización por *P. aeruginosa*.<sup>43, 93, 118, 126, 127, 143</sup>

Durante el 2006, el equipo de Starner evidenció por primera vez *in vivo*, mientras estudiaba muestras de lavado broncoalveolar de pacientes jóvenes asintomáticos con FQ, la presencia de biofilms de HiNT en las vías respiratorias inferiores. Para corroborar sus observaciones realizaron cultivos a partir de las cepas de estos pacientes, encontrando también *in vitro* desarrollo de biofilms por HiNT. Otro criterio para asegurar la formación de biofilms fue el considerar la formación de una matriz autoproducida y no parte del moco epitelial, lo cual fue demostrado cultivando cepas mutantes: 2019wecA (matrix) y 2019siA/B (sialilación); éstas no desarrollaron matriz, asegurando así que la matriz del biofilm observado en las muestras de pacientes con FQ es autoproducida y, por ende, existe un biofilm verdadero. Los resultados globales fueron morfológica y funcionalmente relacionados a la producción de biofilm por HiNT durante la FQ.<sup>6, 48, 126, 136, 6w</sup>

La formación de biofilms por HiNT en sinergia con la respuesta hiperactiva del hospedero resulta pieza clave en el daño irreversible de las vías respiratorias. El inicio de la infección crónica es clínicamente significativo ya que coincide con la disminución de la función pulmonar y el aumento en la sintomatología respiratoria, con el tiempo la inflamación crónica destruye el pulmón y causa insuficiencia respiratoria.<sup>6, 22, 26, 55, 60, 76, 102, 113, 114, 119, 126, 127, 128, 10w</sup>

## *Pers Pectivas y Pro Puestas*

En México, la escasez de información referente a biofilms y la ausencia de datos estadísticos de enfermedades infecciosas han impedido los avances para la mejor comprensión sobre el control y el tratamiento de las enfermedades infecciosas; considerando ésto, el objetivo de la tesis ha sido contribuir al acervo nacional aportando un documento actualizado y de amplio espectro sobre biofilms y su asociación a enfermedades infecciosas.

Bajo este contexto, se establecen los siguientes criterios como propuestas para la realización de trabajos de investigación que resulten de utilidad para la prevención y control de las enfermedades relacionadas a biofilms:

1. En primera instancia, serían deseables estrategias con enfoques hacia moléculas que tengan como blanco de acción a las adhesinas. La estrategia viable para la prevención y control es el empleo de enzimas y fármacos con actividad catalítica sobre adhesinas, tanto fimbriales como afimbriales, impidiendo de esta forma los procesos involucrados en la colonización.
2. En otro plano, se propone desarrollar líneas de investigación orientadas a facilitar el acceso y la difusión eficiente de agentes del sistema inmune (leucocitos y sus productos) y fármacos, como métodos de control y tratamiento durante la infección; entre las alternativas se encuentran:
  - I. El empleo de moléculas y métodos físicos (sonicación, pulsos eléctricos) que alteren a los EPS de la matriz; de forma tal que, leucocitos y sus productos





- IV. Desarrollar metodologías de detección rápida de contaminación (por ejemplo pruebas colorimétricas) y auxiliares de la esterilización (por ejemplo sonicación, pulsos eléctricos, etc.).
  
5. Una estrategia promisoría es la interferencia bacteriana, que implica cambios en el medioambiente del biofilm mediante la introducción de especies bacterianas benignas, para establecer una inhibición competitiva con las bacterias patógenas.

Hasta ahora sólo se consideró el biofilm asociado con patogenicidad, sin embargo, en el estado de salud también se favorece su desarrollo; éstos se forman en zonas no estériles y están en “equilibrio” con el sistema inmune, resultando inocuos para la persona. No obstante, la activación de mecanismos relacionados a la invasividad (distintos a la simple presencia del biofilm) y/o cambios en el estado de salud del hospedero rompen el equilibrio y promueven la transición al estado de enfermedad. El conocimiento de los mecanismos de transformación entre el estado planctónico y el estado sésil asociaría estos cambios con los eventos que ocurren en el estado de portador y que, en consecuencia, conducen al estado de enfermedad. Por ello, se plantea el formular proyectos enfocados en descifrar los diferentes patrones de expresión génica tanto en bacterias planctónicas como en sésiles.

De acuerdo con lo expuesto, en México deben establecerse programas basados en estudios que determinen la asociación entre enfermedades infecciosas y bacterias productoras de biofilms. Además de realizar esfuerzos colectivos entre dependencias que den lugar a mejoras en la investigación, el diseño y, sobretodo, en la aplicación de estrategias de prevención, control y eliminación de biofilms.

## *Con Conclusiones*

1. Los datos expuestos permitieron confirmar la relevancia que tiene el biofilm como responsable del inicio, progreso (evolución) y cronicidad de la enfermedad.
2. Fue posible establecer estrategias de prevención y perspectivas de control y tratamiento para las infecciones asociadas a biofilms, sugiriendo como alternativas de primera elección aquellas que eviten la colonización bacteriana.
3. Desde un punto de vista clínico, los hallazgos bibliográficos revelaron la necesidad de realizar más estudios sobre la evaluación del daño ocasionado al organismo (patología).
4. En la revisión realizada, no se encontró información sobre un régimen especializado del tratamiento antimicrobiano indicado en los casos que se demuestra asociación entre la ocurrencia/prevalencia de enfermedad y la presencia de biofilms. Estudios orientados en este sentido son necesarios.
5. Aunque el papel preciso del biofilm en la patogénesis presenta controversia, la literatura revisada en esta tesis, aportó una demostración objetiva de la presencia de dichas estructuras en las superficies mucosas de los pacientes; así como de sus diferencias en la formación para algunos especímenes, esto implica un rol patogénico diferencial para causar enfermedad.



6. El criterio metodológico empleado en el desarrollo de esta tesis fue el adecuado ya que permitió recuperar y analizar información actualizada según las diferentes fuentes de origen. Lo anterior redundó en la posibilidad de correlacionar dicha información según los puntos de vista de diferentes autores.
7. Considerando la situación nacional, se concluyó que es indispensable comenzar a promover y apoyar las investigaciones referentes a biofilms, con el fin de reducir su impacto en la salud y mejorar la calidad de vida de los pacientes. De igual forma, deben plantearse estudios de vigilancia para contar con datos estadísticos relacionados con las enfermedades infecciosas asociadas a biofilms.

# BIBLIOGRAFÍA



1. ANZUETO A., SETHI S., MARTINEZ J.  
Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Proceedings of the American Thoracic Society, Vol. 4, 2007, Abstract.
2. ARMBRUSTER C. E., HONG W., PANG B., DEW K., JUNEAU R., BYRD M., LOVE C., KOCK N., SWORDS E.  
LuxS Promotes Biofilm Maturation and Persistence of Nontypeable *Haemophilus influenzae* in Vivo via Modulation of Lipooligosaccharides on the Bacterial Surface, Infection and Immunity, Vol. 77, No. 9, Septiembre 2009, p: 4081–4091.
3. BAKALETZ LO.  
Bacterial biofilms in otitis media: Evidence and relevance. Pediatr Infect Dis J., Vol. 10 , No. 26, (Sup), 2007, p: S17-S19.
4. BARKAI G., LEIBOVITZ E., GIVON-LAVI N., DAGAN R.  
Potential contribution by nontypeable *Haemophilus influenzae* in protracted and recurrent acute otitis media, Pediatr Infect Dis J, Vol. 28, No. 6, 2009, p: 466-71.
5. BELOIN C., ROUX A., GHIGO J. M.  
*Escherichia coli* biofilms, Bacterial biofilms., Curr Top Microbiol Immun, 2008, Abstract.
6. BILTON D., PYE A., JOHNSON M. M., MITCHELL J. L., DODD M., WEBB A. K., STOCKLEY R. A., HILL S. L.  
The isolation and characterization of non-typeable *Haemophilus influenzae* from the sputum of adult cystic fibrosis patients, Eur Respir J, Vol., 1995; p: 948–953.
7. BOLAND, T., LATOUR R. A., SUTZENBERGER F. J.  
Molecular basis of bacterial adhesion, Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications, 1st ed. Humana Press, Totowa, N.J; 2000, p. 29-41.
8. BOUCHET V., HOOD D., LIT J., BRISSON J. R., RANDLE G., MARTIN A., LI Z., GOLDSTEIN R., SCHWEDA E., PELTON S., RICHARDS G., MOXON E.  
Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media, PNAS, Vol. 100, No. 15, Julio 2003.



9. BRANDA S. S., VIK S., FRIEDMAN L., KOLTER R.  
Biofilms: the matrix revisited, *Trends Microbiol.*, Vol 13, 2005, p:20-26.
10. BRYERS D. J.  
Medical biofilms. *Biotech Biotechnol.*, Vol. 100, 2008, p:1-18.
11. BUCHINSKY F., FORBES M., HAYES J., SHEN K., COMPLIMENT J., HOGG J., HILLER L., HU F., POST C., EHRLICH G.  
Virulence phenotypes of low-passage clinical isolates of Nontypeable *Haemophilus influenzae* assessed using the chinchilla laniger model of otitis media, *BMC Microbiolog.*, Vol. 7, 2007, Abstract.
12. CÁMARA M.  
Quorum sensing: un mecanismo universal de comunicación que permite la coordinación del comportamiento de poblaciones bacterianas, Universidad de Nottingham, Reino Unido, 2007.
13. CABELLOS AVELAR T.  
Análisis de los determinantes genéticos de la formación y/o disgregación de biocapas bacterianas, Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, México, 2007.
14. CARVALHO C. C. R.  
Biofilms: recent developments on an old battle, *Recent Patents in Biotechnology*, 2007, Vol. 1, p:49-57.
15. CASTRILLÓN A. L., PALMA A, PADILLA M.  
Importancia de las biopelículas en la práctica médica, *Dermatología Rev Mex* Vol 54, No. 1, Enero-Febrero, 2010.
16. CASTRO R., ERVITI J., LEYVA R.  
Globalización y enfermedades infecciosas en poblaciones indígenas de México, *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, Vol 23., Sup: 1, 2007, p: 541-550.
17. CERCA N., JEFFERSON K., OLIVEIRA R., PIER G., AZEREDO J.  
Comparative Antibody-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* Cells Grown in a Biofilm or in the Planktonic State, *INFECTION AND IMMUNITY*, Vol. 74, No. 8, Agosto. 2006, p: 4849–4855.
18. COLÓN M., MEMBRILLO J.  
Comunicación entre bacterias, Instituto de Investigaciones Biomédicas.
19. COSTERTON W., PHILIP S. S., GREENBERG E. P.,  
Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, Review, *Science Microbes, Immunity, and Disease*, *Science*, Vol. 284, No. 1318, Mayo 1999.
20. COWAN, S. E.  
Commensal interactions in a dual species biofilm exposed to mixed organic compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol 66, 2000, Abstract



21. CHIN C., MANZEL L., LEHMAN E., HUMLICEK A., SHI L., STARNER T., DENNING G., MURPHY T., SETHI S., LOOK D.  
*Haemophilus influenzae* from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation induce more Inflammation than Colonizers, Am J. Respir. Crit. Care Med. Vol 172, 2005, pp 85–91.
22. CHMIEL J. F., BERGER M., KONSTAN M. W.  
The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. Clin Rev Allergy Immunol, 2002, Vol. 23, Abstract.
23. CHRISTENSEN G. D., SIMPSON W. A., ANGLIN J. O., GAINOR B. J.  
Methods for evaluating attached bacterial and biofilms an overview, Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications, Ed. Humana Press Inc., USA 2000, p: 213-233.
24. DANESE P. N., PRATT L. A., KOLTER R.  
Exopolysaccharide production is required for development of *E. coli* K12 biofilm architecture, J. Bacteriol, Vol. 182, 2000, Abstract.
25. DAVEY M. E., O'TOOLE G. A.,  
Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics, American Society for Microbiology, Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 64, No. 4, Dec. 2000, p: 847-867.
26. DAVIES J., BILTON D.  
Bugs, Biofilms, and Resistance in Cystic Fibrosis, Respiratory Care, Vol 54, No. 5, Mayo 2009, p: 628-640.
27. DONLAN R. M.  
Biofilms: Microbial life on surfaces, Emerg Infect Dis., Vol. 8, No. 9, 2002; p: 881-890.
28. DONLAN R. M., COSTERTON J. W.  
Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, Clin Microbiol Rev., 2002, Vol. 15, p: 167-193.
29. DONLAN R. M.  
Biofilms and device-associated infections, Emerging Infect Dis., Vol. 2, No. 7, 2001, p: 277-281.
30. DRAGO L.  
Batteri e biofilm nelle infezioni respiratory, Bacteria and biofilm in respiratory tract infections, Le Infezioni in Medicina, Supplemento 2, 2009, p: 1-9.
31. DUNNE M. W.,  
Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately, American Society for Microbiology, CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Vol. 15, No. 2, Abril 2002, p: 155-166.



- 32.** EHRLICH G. D., VEEH R., WANG X.  
Mucosal Biofilm Formation on Middle-Ear Mucosa in the Chinchilla Model of Otitis Media, *JAMA*, Vol. 287, No. 13, Abril 2002, p:1710-1715.
- 33.** ELDIKA N., SETHI S.  
Role of nontypeable *Haemophilus influenzae* in exacerbations and progression of chronic obstructive pulmonary disease, *Curr Opin Pulm Med.*, No. 2, Vol. 12, Marzo 2006, Abstract.
- 34.** ERWIN A., SMITH A.  
Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior, *Trends in Microbiology*, Vol. 15, No. 8, Agosto 2007, p: 355-362.
- 35.** FALEIRO NAVES P. L.  
Formación de biopelículas por *E. coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Madrid, 2010, p: 25-60.
- 36.** FARREL J., BUCHINSKY FORBES M., HAYES J., SHEN K., EZZO S., COMPLIMENT J., HOW J., HILLER L., HU F., POST C., EHRLICH G.  
Virulence phenotypes of low-passage clinical isolates of Nontypeable *Haemophilus influenzae* assessed using the chinchilla laniger model of otitis media, *BMC Microbiology*, Vol. 7, No. 56, Junio 2007.
- 37.** FIELD T. R., WHITE A., ELBORN J. S., TUNNEY M. M.,  
Effect of oxygen limitation on the in vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* grown planktonically and as biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Vol. 24, 2005, Abstract.
- 38.** FINK D. L., BUSCHER A. Z., GREEN B., FERNSTEN P., ST. GEME J. W.  
The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-Distribution of Bacterial Proteins in Biofilms Formed by Non-typeable *Haemophilus influenzae*, *Cellular Microbiology*, Vol. 5, No. 3, Marzo 2003, Abstract.
- 39.** FUX C. A., COSTERTON J., STEWART P., STOODLEY P.  
Survival strategies of infectious biofilms, *TRENDS in Microbiology*, Vol.13, No.1, Enero 2005, p: 34-40.
- 40.** GALLI J., CALÒ L., ARDITO F., IMPERIALI M., PASSALI G. C., CARNEVALE N., FADDA G., PALUDETTI G.  
Bacterial biofilm identification in the rhinopharyngeal mucosa of children with recurrent infection of the upper respiratory tract and otitis media, *Pediatr Med Chir.*, No. 30, Vol. 1, Enero-Febrero 2008, Abstract.



41. GOLLER C. C., ROMEO T.  
Environmental influences on biofilm development. *Bacterial biofilms*, Curr Top Microbiol. Immun., 2008, p: 37-66.
42. GÓMEZ DE LEÓN P., DÍAZ F., SANTOS J.  
Effect of the DTwP *Haemophilus influenzae b* Conjugate Vaccination in Mexico, Archives of Medical Research, 2010.
43. GÓMEZ DE LEÓN P., SANTANDER T. S., RIVERA F., DÍAZ F., MARTÍNEZ K., QUIÑONES F., SADA E., SANTOS J. I.  
Formación de Biofilms por cepas clínicas de *Haemophilus influenzae NT* en México, Aspectos microbiológicos y clínicos de las infecciones respiratorias, 14SEIMC, 2001, 400-P.
44. GÓMEZ DE LEÓN P., DÍAZ J., VILLASEÑOR A., SEGURA J., CARRANZA M., ARREDONDO J., SANTOS J.  
Immuoglobulin G avidities in infants in Mexico alter primary immunization with the doses of PRP-T *Haemophilus influenzae type b*, Clinical and Vaccine Immunology, No. 15, Vol. 6, 2008, p: 1024-1027.
45. GÓMEZ DE LEÓN P., DÍAZ J., VILLASEÑOR A., SEGURA J., GIONO S., SANTOS J.  
Anticapsular Polysaccharide IgG Concentrations in Mexican Children Formerly Immunized with *Haemophilus influenzae b* PRP-T Vaccine, Human Vaccines, Vol. 3 No. 5, 2007, p: 187-191.
46. GONZÁLEZ R. F., PÉREZ E., PICAZO J. J.  
Papel de la infección en la exacerbación de la EPOC, Unidad de Microbiología Clínica, Hospital Clínico San Carlos, Emergencias, Madrid 2005, No. 17, p: 7-12.
47. GORDON C. A., HODGES N. A., MARRIOTT C.  
Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*, J Antimicrob., Chemother., Vol 22, 1988, Abstract.
48. GREINER L. L., WATANABE H., PHILLIPS N. J., SHAO J., MORGAN A., ZALESKI A., GIBSON B. W., APICELLA M. A.  
*Nontypeable Haemophilus influenzae* strain 2019 produces a biofilm containing N-acetylneuraminic acid that may mimic sialylated O-linked glycans. Infect Immun., Vol. 72, 2004, p: 4249-4260.
49. GUTIERREZ VENEGAS G., CARDOSO JIMÉNEZ P.  
Ácido lipoteicoico: receptores y mecanismos de transducción, Revista de Educación Bioquímica, UNAM, Vol. 25, No. 2, 2006.
50. HALL-STOODLEY L., ZE HU F., GIESEKE A., NISTICO L., NGUYEN D., HAYES J., FORBES M., GREENBERG D., DICE B., BURROWS A., WACKYM A., STOODLEY P., POST J., EHRLICH G., KERSCHNER J.



- Direct Detection of Bacterial Biofilms on the Middle-Ear Mucosa of Children With Chronic Otitis Media, JAMA, No.2, Vol. 296, Julio 2006, p: 202-211.
51. HALL-STOODLEY L., STOODLEY P.  
Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens, TRENDS in Microbiol. No. 13, 2005, p: 7-10.
  52. HARRISON A., DYER D., GILLASPY A., RAY W., MUNGUR R., CARSON M., ZHONG H., LINDA J., LEWIS L., BAKALETZ L., MUNSON R.  
Genomic Sequence of an Otitis Media Isolate of Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Comparative Study with *H. influenzae* Serotype d, Strain KW20, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 187, No. 13, Julio 2005, Abstract.
  53. HERRERA MENDOZA M. T.  
El Papel del Biofilm en el Proceso Infeccioso y la Resistencia, NOVA Publicación Científica, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogota, Colombia, Vol. 2, No. 002, Enero-Diciembre 2004, p: 71-80.
  54. HEILMANN C., HUSSAIN M., PETERS G., GOTZ F.  
Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface, Mol Microbiol., Vol. 24, 1997, Abstract
  55. HOIBY N.  
Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies, J. Cyst. Fibros. Vol. 1, 2004, p: 249-254.
  56. HORIA K., MATSUMOTO S.  
Bacterial adhesion: From mechanism to control, Biochemical Engineering Journal, No. 48, 2010, Abstract.
  57. HUITRÓN MORALES L.  
Biofilm: Factor de fracaso en el tratamiento endodóntico, Tesis, Facultad de Odontología, UNAM, 2007, p: 38-47.
  58. HUSSAIN M., HEILMANN C., HERMANN M.  
Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin, Microb Pathog., Vol. 31, 2001, Abstract.
  59. IZANO ERA A., SHAH SUHAGI M., KAPLAN JEFFREY B.  
Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms, Microb. Pathog., Vol. 46. No. 4, Abril 2009, p: 207-213.
  60. JEFF G. L.,  
Bacterial Biofilms Resist Key Host Defenses, Microbe, Vol. 4, No. 2, 2009, p: 66-71.
  61. JIANG X, PACE J. L., RUPP M., FINCH R.G.,  
Microbial biofilms. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy, CRC Press, USA, 2006, p: 19.



- 62.** JORGENSEN J. H., TURNIDGE J. D.,  
Washington JA Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods.  
Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology;  
1999. Resumen p:1526-43.
- 63.** JURCISEK J., GREINER L., WATANABE H., ZALESKI A., APICELLA M., BAKALETZ L.  
Role of Sialic Acid and Complex Carbohydrate Biosynthesis in Biofilm Formation by  
Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the Chinchilla Middle Ear, *INFECTION AND  
IMMUNITY*, No. 6, Vol. 73, Junio 2005, p: 3210-3218.
- 64.** JURCISEK J. A., BAKALETZ L.  
Biofilms Formed by Nontypeable *Haemophilus influenzae* In Vivo Contain both Double-  
Stranded DNA and Type IV Pilin Protein, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, No. 10,  
Vol. 189, Mayo 2007, p: 3868-3875.
- 65.** JURCISEK J. A., BOOKWALTER J., BAKER B., FERNANDEZ S.,  
NOVOTNY L., MUNSON R., BAKALETZ L.  
The PilA protein of non-typeable *Haemophilus influenzae* plays a role in biofilm  
formation, adherence to epithelial cells and colonization of the mammalian upper  
respiratory tract, *Molecular Microbiology*, No. 5, Vol 65, 2007, p: 1288-1299.
- 66.** KILPI T., HERVA E., KAIJALAINEN T.  
Bacteriology of acute otitis media in a cohort of Finnish children followed for the first two  
years of life, *Pediatr Infect Dis J.*, Vol. 20, 2001, p: 654-662.
- 67.** KOBAYASHI H.  
Airway biofilms: implications for pathogenesis and therapy of respiratory tract infections,  
*Treat Respir Med.*, No. 4, Vol. 4, 2005, Abstract.
- 68.** LACLAIRE L., TONDELLA M. C., BEALL D., NOBLE C.,  
RAGHUNATHAN P., ROSENSTEIN N., POPOVIC T.  
Identification of *Haemophilus influenzae* Serotypes by Standard Slide Agglutination  
Serotyping and PCR-Based Capsule Typing, *Journal of Clinical Microbiology*, No. 1,  
Vol. 41, 2003, Enero 2003, p: 393-396.
- 69.** LASA J. L., DEL POZO J. R., PENADÉS J., LEIVA,  
Biofilms bacterianos e infección, *An. Sist. Sanit. Navar.*, Vol. 28,  
Nº 2, Mayo-Agosto 2005, p: 163-1750.
- 70.** LAWRENCE, J. R.  
Multiple parameter imaging, and microbial biofilms. Application of multiple parameter  
imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial  
biofilms. *J. Microbiol. Meth.* Vol. 32, 1998, p: 253-261.
- 71.** LEANORD A., WILLIAMS C.  
*Haemophilus influenzae* in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary  
disease, *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 19, 2002, p: 371-375.



- 72.** LEE A., MAO W., WARREN M.S.,  
Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance, *J Bacteriol*, Vol. 182, 2000, p: 3142-3150.
- 73.** LEWIS K.  
Riddle of biofilm resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol 45, 2001, Abstract.
- 74.** LINDSAY D., VON HOLY A.  
Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know, *J Hosp Infect*, Vol. 64, 2008, p: 313-325.
- 75.** LÓPEZ VARELA M., MUIÑO A., PÉREZ PADILLA R., JARDIM J.R., TÁLAMO C., MONTES DE OCA M., VALDIVIA G., PERTUZÉ J., HALBERT R., MENEZES A. M.  
Tratamiento de la EPOC en 5 ciudades de América Latina: estudio PLATINO, *Arch Bronconeumol*, Vol. 44, 2008, Abstract.
- 76.** LIU L., CHU L., LIU Q., WANG C., XIA Y., PENG X.  
A comparative study on biofilm formation of nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa* under single culture or co-culture, *African Journal of Microbiology Research*, No. 3, Vol. 4, Febrero 2010, p: 180-184.
- 77.** LIU D.F., MASON K.W., MASTRI M., PAZIRANDEH M., CUTTER D., FINK D.L., ST. GEME J. W.  
The C-terminal fragment of the internal 110-kilodalton passenger domain of the Hap protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potential vaccine candidate, *Infect. Immun.* Vol. 72, Abstract.
- 78.** LUKE N., JURCISEK J., BAKALETZ L., CAMPAGNARI A.  
Contribution of *Moraxella catarrhalis* Type IV Pili to Nasopharyngeal Colonization and Biofilm Formation, *Infection and Immunity*, Vol. 75, No. 12, 2007, Abstract.
- 79.** MAH T. F. C., O'TOOLE G. A.  
Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends Microbiol.*, Vol. 9, 2001, Abstract.
- 80.** MALDONADO M., MARTÍNEZ A., ALOBID I., MULLOL J.  
The antrochoanal polyp., *Rhinology.*, No. 42, Vol. 4, Diciembre 2004, Abstract.
- 81.** MANDLIK A., SWIERCZYNSKI A., DAS A., TON-THAT H.  
Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development, *Trends in Microbiology*, No. 16, Vol. 1, 2006; Abstract.
- 82.** MARTÍ-LLITERAS P., REGUEIRO V., MOREY P., HOOD D. W., SAUS C., SAULEDA J., AGUSTÍ A. G., BENGOCHEA J. A.,  
Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke, *Infection and Immunity*, Vol. 10. No. 77, 2009, p: 4232-4242.



- 83.** MERMEL L. A.  
Prevention of intravascular catheter-related infections, *Ann Intern Med.* 2000, No. 132, Abstract.
- 84.** MERRITT K., Y. H. AN.  
Factors influencing bacterial adhesion, In Y. H. An and R. J. Friedman (ed.), *Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications*, Humana Press, Totowa, N. J., 2000, p: 53–72.
- 85.** MORALES H.  
Mastitis Bovina, un problema de adaptabilidad y resistencia bacteriana.
- 86.** MOREY P., CANO V., MARTÍ P., MAURO S., BENGOCHEA J., GARMENDIA J.  
Diseción molecular y celular de la interacción del patógeno respiratorio *Haemophilus influenzae* No Tipable (HiNT) con el epitelio respiratorio humano, Seminario CIMERA, Resumen, España, Noviembre 2009.
- 87.** MORRIS P: D.  
Bacterial biofilm in upper respiratory tract infections, *Current Infectious Disease Reports*, No. 3, Vol 9, Mayo 2007, p: 186-192.
- 88.** MOXON R., SWEETMAN W., DEADMAN M., FERGUSON D., HOOD D.  
*Haemophilus influenzae* biofilms: hypothesis or fact?, *Trends in Microbiology*, No. 3., Vol. 16, Marzo 2008, p: 95-100.
- 89.** MORIYAMA S., HOTOMI M., SHIMADA J., BILLAL D., FUJIHARA K., YAMANAKA N.  
Formation of biofilm by *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric intractable otitis media, *Auris Nasus Larynx International Journal of ORL & HNS*, Vol. 36, No. 5, Octubre 2009, Abstract.
- 90.** MOSCOSO M., GARCÍA E., LÓPEZ R.  
Biofilm Formation by *Streptococcus pneumoniae*: Role of Choline, Extracellular DNA, and Capsular Polysaccharide in Microbial Accretion, *Journal of Bacteriology*, Vol. 188, No. 22, Noviembre 2006, p: 7785-7795.
- 91.** MOSCOSO M., GARCÍA E., LÓPEZ R.  
Pneumococcal biofilms, *International Microbiology*, Vol. 12, No. 2, 2009, p :77-85.
- 92.** MURPHY T., BAKALETZ L. O., SMEESTERS P. R.  
Microbial Interactions in the Respiratory Tract, *The Pediatric infectious disease journal*, No. 10, Vol. 28, Sup 21 p: 2009.
- 93.** MURPHY T. F., HOWARD F., BAKALETZ L. O., KYD J., FORSGREN A., CAMPOS J., VIRJI M., PELTON S. I.  
*Haemophilus influenzae* no tipificable: patógeno en pediatra, *The Pediatric Infectious Disease Journal*, Vol. 28, No. 1, Enero 2009, p: 1-3.



- 94.** MURPHY T. F., KIRKHAM C., SETHI S., LESSE A. J.  
Expression of a peroxiredoxin-glutaredoxin by *Haemophilus influenzae* in biofilms and during human respiratory tract infection, FEMS Immunol Med Microbiol., No. 44, Vol. 1, Abril, p: 81-89.
- 95.** MURPHY T., BRAUER A., SCHIFFMACHER A., SETHI S.  
Persistent Colonization by *Haemophilus influenzae* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Vol 170, 2004, p: 266-272
- 96.** MURPHY T. F., KIRKHAM C.,  
Biofilm formation by *nontypeable Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili, BMC Microbiology, Vol. 2, No. 7, Abril 2002.
- 97.** NADELL C. D., XAVIER J. B., LEVIN S. A., FOSTER K. R.,  
The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms, PLoS BIOLOGY, Vol. 6, Sup: 1, E.14, Enero 2008, p: 172-179.
- 98.** NAZAR C. J.  
Biofilms bacterianos, Revisión bibliográfica, Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello, Vol. 67, No. 1, Abril 2007, p: 61-72.
- 99.** O'TOOLE G. A., KAPLAN H. B, KOLTER R.  
Biofilm formation as microbial development., Annu. Rev. Microbiol., Vol 54, 2000, p: 49-79.
- 100.** PADUA GARCÍA J., HERNÁNDEZ R., SÁNCHEZ C.,  
QUIÑÓNEZ R., PAPUA X., DÍAZ F., RAMÍREZ A.  
Exacerbación infecciosa de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, Neumología y Cirugía de Torax, No. 3, Vol. 67, 2008, Abstract.
- 101.** PANG B., HONG W., WEST-BARNETTE S. L., KOCK N. D., SWORDS W. E.  
Diminished ICAM-1 expression and impaired pulmonary clearance of *nontypeable Haemophilus influenzae* in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease/emphysema, Infect Immun., No. 76, Vol. 11, Noviembre 2008, p: 4959-67.
- 102.** PARSEK M. R., SINGH P. K.,  
Bacterial Biofilms: An emerging link to disease pathogenesis, Annu. Rev. Microbiol., Vol. 57, Junio 2003, p: 677-701.
- 103.** PEETERS E., NELIS H. J., COENYE T.  
Comparisons of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbial Methods 2008, Vol. 72, Abstract.
- 104.** PEREZ MIGUEL O.  
Estructura de Biopelículas, Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ingeniería, México, 2007.



- 105.** PETTIT R. K., WEBER C. A., KEAN M. J., HOFFMANN H.,  
PETTIT G. R., TAN R., FRANKS K. S., HORTON M. L.  
Microplate Alamar Blue Assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother*, Vol 49, 2005, Abstract.
- 106.** PITTET B., MONTANDON D., PITTET D.  
Infection in breast implants, *Lancet Infect Dis.*, 2005, Vol. 5, Abstract.
- 107.** PIERA S. G.  
Estudio del biofilm: Formación y Consecuencias, Escola de Prevenció i Seguretat Integral, Curso 2002-2003.
- 108.** POST J. C., HILLER N. L., NISTICO L.  
The role of biofilms in otolaryngologic infections: Update, *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, Vol. 15, 2007, p: 15:347-351.
- 109.** PSALTIS A. J.  
The role of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis, Tesis doctoral, University of Adelaide, Faculty of Health Sciences, Octubre 2008.
- 110.** RAMADAN H. H.  
Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, Vol. 14, No. 3, 2006, p: 183-6.
- 111.** RANDAL B., EVERETT M., WAHL S., LEE YU, ORNDORFF P., PARKER W.  
Secretory IgA and mucin-mediated biofilm formation by environmental strains of *Escherichia coli*: role of type 1 pili, *Molecular Immunology*, Vol. 43, 2006, Abstract.
- 112.** RAO V., KRASAN G., HENDRIXSON D., DAWID S., GEME J.  
Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 23, 1999, p: 99-129.
- 113.** RIVERA TAPIA J. A., ROMÁN MENDEZ C.  
Biopelículas y Salud Pública, *Análisis Médicos*, Vol. 50, No. 4, Octubre-Diciembre 2005, p: 172-176.
- 114.** ROMAN F., CANTON R., PÉREZ-VÁZQUEZ M., BAQUERO F., CAMPOS J.  
Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 4, 2004, p: 1450-1459.
- 115.** ROMO GONZÁLEZ F., PÉREZ E. C., PICAZO J. J.  
Papel de la infección en la exacerbación de la EPOC, Unidad de Microbiología Clínica. Hospital Clínico San Carlos. *Emergencias*, Vol 17, Madrid, 2005, p: 7-12.
- 116.** RODRÍGUEZ J. M., PASCUAL A.,  
Actividad de los antimicrobianos en biocapas bacterianas, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, Vol 26, No. 2, 2008, p: 107-114.



117. ROUPHAEL N., SATOLA S., FARLEY M., RUDOLPH K., SCHMIDT D., GÓMEZ DE LEÓN P., ROBBINS J., SCHNEERSON R., CARLONE G., ROMERO S.  
Evaluation of Serum Bactericidal Activity Assays for *Haemophilus influenzae* serotype A, AIP/CDC office and the NIH, 2009.
118. ROSENFELD M., GIBSON R. L., MCNAMARA S., EMERSON J., BURNS J. L., CASTILE R., HIATT P., MCCOY K., WILSON C. B., INGLIS A.,  
Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with fibrosis, *Pediatr Pulmonol*, Vol. 32, 2001, p: 356-366.
119. ROWE S.M., MILLER S., SORSCHER E.J.  
Cystic fibrosis. *N Engl J Med.*, No. 19, Vol. 352, Mayo 2005, Abstract.
120. SANCLEMENT J. A., WEBSTER P. L., THOMAS J., RAMADAN H. H.  
Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis, *Laryngoscope*, No. 115, 2005, Abstract.
121. SARKER S.D., NAHAR L., KUMARASAMY.  
Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals, *Methods*, Vol. 42, 2007, Abstract.
122. SAUER K., RICKARD A. H., DAVIES D. G.  
Biofilm and biocomplexity. *Microbe*, Vol. 7, 2007, p: 347-353
123. SERRANO GRANGER J., HERRERA D.  
La placa dental como biofilm, ¿Cómo eliminarla?, *RCOE*, Vol. 10, No. 4, 2005.
124. SETHI S.  
Bacteria infection and the pathogenesis of COPD, *CHEST.*, No. 117, 2000, Abstract.
125. SINGH K., PARSEK M., GREENBERG P., WELSH M.  
A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development, *NATURE*, Vol 417, No. 30, Mayo 2002, p: 552-555.
126. SINGH P. K., SCHAEFER A. L., PARSEK M. R., MONINGER T. O., WELSH M. J., GREENBERG E. P.  
Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, Vol. 407, 2000, p: 762-764.
127. STARNER T. D., ZHANG N., KIM G., APICELLA M., MCCRAY P.  
*Haemophilus influenzae* Forms Biofilms on Airway Epithelia Implications in Cystic Fibrosis, *J Respir Crit Care Med*, Vol 174, 2006, p: 213-220.
128. STARNER T. D., SHROUT J. D., PARSEK M. R., APPELBAUM P. C., KIM G.  
Subinhibitory concentrations of azithromycin decrease *nontypeable Haemophilus influenzae* biofilm formation and diminish established biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother*, Vol. 52, No 1, 2008, p: 137-145.



- 129.** STEINER S., HOLDER P., GOMEZ DE LEON P., SPEAR W., HENNESSY T., CARLONE G. M.  
Avidity Determinations of *Haemophilus influenzae* Type b Polyribosylribitol Phosphate (PRP) Antibodies. Clin. Diagn. Lab. Immunol., No. 9, Vol. 12, 2005, p:10029-10035.
- 130.** STEINER S., SPEAR W., BROWN N., HOLDER P., HENNESSY T., GOMEZ DE LEON P., CARLONE G. M.  
Measurement of Serum Bactericidal Activity to *Haemophilus influenzae* type b by using a Chromogenic and Fluorescent Metabolic Indicator., Clin. Diagn. Lab. Immunol, No. 1, Vol. 11, 2004, p: 89-93.
- 131.** SANDAL I., HONG W., SWORDS E., INZANA T.  
Characterization and Comparison of Biofilm Development by Pathogenic and Commensal Isolates of *Histophilus somni*, Journal of Bacteriology, Vol. 189, No. 22, Noviembre 2007, p: 8179-8185.
- 132.** STEVEN S., BRANDA A., SHILD V., FRIEDMAN L., KOLTER R.  
Biofilms: the matrix revisited, Review, TRENDS in Microbiology, Vol.13, Enero 2005, p: 20-26.
- 133.** STEWART P. S., COSTERTON J. W.  
Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet, Vol. 258, 2001, Abstract.
- 134.** SUTHERLAND I. W.  
The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment, TRENDS in Microbiology, Vol.9 No.5, Mayo 2001, p: 222-227.
- 135.** SVENSÅTER, G., WELIN, J., WILKINS, J. C., BEIGHTON D. Y., HAMILTON, I. R.  
Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol. No. 205, 2001, Abstract.
- 136.** SWORDS W. E., MOORE M. L., GODZICKI L., BUKOFZER G., MITTEN M. J., VONCANNON J.  
Sialylation of Lipooligosaccharides Promotes Biofilm Formation by Nontypeable *Haemophilus influenzae*, Infection and Immunity, Vol. 72, No. 1, Enero 2004, p: 106-113.
- 137.** TANAKA G., SHIGETA M., KOMATSUZAWA H., SUGAI M., SUGINAKA H., USUI T.  
Effect of the growth rate of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on the susceptibility to antimicrobial agents: beta-lactams and fluoroquinolones, Chemotherapy. Vol. 45, 1999, Abstract.
- 138.** TERÁN ARCE F., CARLSON R., MONDS J., VEEH R., HU F., STEWART P., LAL. R., EHRLICH G., AVCI R.  
Nanoscale Structural and Mechanical Properties of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Biofilms, Journal of Bacteriology, Vol. 191, No. 8, 2009, p: 2512-2520.



- 139.** THOMAS J. G, NAKAISHI L. A.  
Managing the complexity of a dynamic biofilm, *J Am Dent Assoc.*, Vol. 137 (Supl), 2006, p: 10S-15S.
- 140.** TRAMPUZ A., PIPER K. E., JACOBSON M. J.,  
HANSEN A. D., UNNI K. K., OSMON D. R.  
Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection, *New Engl J Med.*, No. 357, 2007, p: 654-63.
- 141.** WANG D., WANG Y., LIU Y. N.  
Bacterial biofilm formed by *Hemophilus influenzae in vitro*. *Acad. J. PLA.*, Vol 29, 2008, p: 364-365.
- 142.** WEBSTER P., WU S., GOMEZ G., APICELLA M., PLAUT A., ST. GEME J. W.  
Distribution of Bacterial Proteins in Biofilms Formed by Non-typeable *Haemophilus influenzae*, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry III*, Vol 5, No. 7, 2006, Abstract.
- 143.** WEST S. E., ZENG L., LEE B. L., KOSOROK M. R., LAXOVA A.,  
ROCK M. J., SPLAINGARD, M. J., FARRELL P. M.  
Respiratory Infections with *Pseudomonas aeruginosa* in Children With Cystic Fibrosis, *JAMA.*, Vol. 287, 2002, Abstract.
- 144.** WHITELEY, M., BANGERA, M. G., BUMGORNER, R. E.,  
PARSEK M. R., TEITZEL G. M., LORY S., GREENBERG E. B.  
Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. No. 417, 2001, Abstract.
- 145.** WIMPENNY J.  
Heterogeneity in biofilms, *FEMS Microbiol*, Vol. 24, 2000, p: 661-71.
- 146.** WILLIAMS P.  
Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world, *Microbiology*, Vol. 153, 2007, p: 3923-3938.
- 147.** WU T., CHEN J., MURPHY T. F., GREEN B. A., GU X. X.  
Investigation of nontypeable *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6 as a new carrier for lipooligosaccharide conjugate vaccines, *Vaccine*, No. 23, 2005, p: 5177-5185.
- 148.** VARGAS J., THERIT B., MEVILLE S.  
Type IV Pili and the CcpA Protein are needed for maximal biofilm formation by the Gram-Positive Anaerobic Pathogen *Clostridium perfringens*, *Infection and Immunity*, Vol. 76, No. 11, 2008, Abstract.
- 149.** VAZQUEZ G., FARINATI A.,  
Las bacterias se organizan: ¿comunidades simples o complejas?, *La Gaceta de Infectología y Microbiología Clínica*, Vol. 3, No. 2, Junio 2009, p: 6-11.



- 150.** VEGA-BRICEÑO L., SÁNCHEZ I.  
Fibrosis quística: Actualización en sus aspectos básicos Cystic Fibrosis: an overview of its basic aspects, Rev Chil Pediatr, No. Vol. 76, 2005, Abstract.
- 151.** VLASTARAKOS V. P., NIKOLOPOULOS P. T., MARAGOUDAKIS P., TZAGAROULAKIS A., FEREKIDIS E.  
Biofilms in Ear, Nose, and Throat Infections: How Important are They?, Vol 116, Supl. 4, Enero 2009, p: 668-673.
- 152.** VILA, J., SORIANO A., MENSAB J.  
Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos, Enferm Infecc Microbiol Clin, Vol 26, No. 1, 2008, p: 48-55.
- 153.** YUNG-HUA LI, PETER C., LAU Y., NAN TANG, GUNNEL S., RICHARD P. E., CVITKOVITCH D.  
Novel Two-Component Regulatory System Involved in Biofilm Formation and Acid Resistance in *Streptococcus mutans*, J Bacteriol., No. 184, Vol. 22, Noviembre 2002, Abstract.
- 154.** ZIMMERLI W., TRAMPUZ A., OCHSNER P.E.  
Prosthetic-joint infections, N Engl J Med. 2004, No. 351, Abstract.

## PÁGINAS WEB @

---

- 1w.** ANIBAL  
Quorum sensing, Abril 21, 2009, <http://sapereaudere.blogspot.com/2009/04/quorum-sensing.html>
- 2w.** BOWERS WILLIAM  
Immunology -Chapter Thirteen: Immunoregulation Microbiology and Immunology On-Line
- 3w.** COLÓN-GONZÁLEZ M., MEMBRILLO H. J.  
Comunicación entre bacterias  
[http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_04/Capitulo04.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_04/Capitulo04.pdf)
- 4w.** GALLAHER *ET AL.*  
BMC Microbiology 2006 <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/65/figure/F1?highres=y>
- 5w.** JASS JANA, SURMAN SUSAN  
Textbook. USC School of Medicine. 2006 <http://pathmicro.med.sc.edu/bowers/imm-reg.htm>  
Medical Biofilms <http://www.docstoc.com/docs/16424965/Medical-Biofilms-Detection-Prevention-and-Control>
- 6w.** KLOTTER J.  
Bacteriality Exploring Chronic Disease Biofilms implicated in chronic disease, Townsend Letter, Julio 2009, [http://findarticles.com/p/articles/mi\\_7396/is\\_312/ai\\_n32103060/](http://findarticles.com/p/articles/mi_7396/is_312/ai_n32103060/)
- 7w.** MAYER GENE  
Immunology - Chapter One: Innate (non-specific) Immunity Microbiology and Immunology On-Line Textbook. USC School of Medicine. 2006 <http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/innate.htm>



- 8w.** OTTO MICHAEL  
*Staphylococcus epidermidis* the 'accidental' pathogen, Nature, Reviews Microbiology, Vol. 7, 2009, [http://umanitoba.ca/faculties/medicine/units/medical\\_microbiology/courses/MicroPath97.705/PDF/Staphylococcus\\_epidermidis\\_accidental\\_pathogen.pdf](http://umanitoba.ca/faculties/medicine/units/medical_microbiology/courses/MicroPath97.705/PDF/Staphylococcus_epidermidis_accidental_pathogen.pdf)+otto+2009+AtIE,+Bap,+Esp
- 9w.** PIERA S. G,  
Estudio del Biofilm: Función y Consecuencias, Curso 2002-2003, Escola de Prenció i Seguretat Integral, <http://www.seguretatintegral.cat/noucat/recerca/linies/biorisc/alimentaria/biofilm.pdf>
- 10w.** PROAL A.  
Understanding Biofilms, 26 Mayo 2008, <http://bacteriality.com/2008/05/26/biofilm/>,
- 11w.** RIMBAUD  
Nuevas Alternativas en el Control de Mastitis: Inmunización del Ganado con Vacunas en Base a Exopolisacaridos, <http://www.vet-uy.com/articulos/bovinos/050/0013/bov013.htm>