

BIOFILMS BACTERIANOS

Meneses ML¹, Landoni MF²

¹ Becaria CONICET; ² Investigadora Principal CONICET.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN: *Las poblaciones bacterianas tienen la habilidad de adaptarse rápida y óptimamente a los cambios en los ambientes en los que existen. De esta manera, en ambientes propicios, con ausencia o baja incidencia de factores estresantes, se las puede encontrar de forma individual, también llamada planctónica. Sin embargo, los cambios bruscos en el ambiente que las rodea, conducen a un cambio importante en el comportamiento de la bacteria individual, la cual tiende a contactar y “comunicarse” con las bacterias aledañas para conformar una patina bacteriana, llamada biofilm. Los biofilm son responsables de las infecciones bacterianas crónicas y/o recidivantes en humanos y animales. La característica fundamental de los biofilm bacterianos es su amplia resistencia frente a una variedad de antimicrobianos, la cual es consecuencia de mecanismos distintos a los reportados para la bacteria en estado planctónico. La formación de biofilms comienza a ser reconocida como un proceso de desarrollo multicelular. Esta es la llave de las nuevas estrategias terapéuticas: el cambio del blanco a tratar, dejar de pensar en la bacteria para empezar a pensar en ese organismo multicelular conformado por bacterias al que se denomina biofilm.*

Palabras clave: biofilm, bacteria planctónica; resistencia antimicrobiana; infecciones bacterianas; infecciones bacterianas crónicas.

TÍTULO EN INGLES

ABSTRACT: *Bacterial populations have the ability to adapt quickly and optimally to changes in its environment. Thus, in favourable environments, with no or low incidence of stressors, they can be found in individual form also called planktonic. However, sudden changes in the surrounding environment leads to a significant change in the behaviour of the individual bacteria, which tends to contact and “communicate” with neighbour bacteria to form a conglomerate called biofilm. Biofilms are responsible for chronic/recalcitrant infections in humans and animals. The most important feature of bacterial biofilms is their high resistance to a wide range of antimicrobials, by mechanism other than those reported for planktonic bacteria. Biofilms development is beginning to be recognized as a process of multicellular development. This is the key to a new therapeutic strategy: changing the therapeutic target from the planktonic bacteria to this multicellular organism called biofilm.*

Key words: biofilm, planktonic bacteria; antimicrobial resistance; bacterial infection; chronic bacterial infection.

Fecha de recepción: 03/11/11

Fecha de aprobación: 30/07/12

Dirección para correspondencia: MF Landoni, Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

E-mail: landoni@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones bacterianas tienen la habilidad de adaptarse rápida y óptimamente a los cambios en los ambientes en los que existen (1). De esta manera, en ambientes propicios con ausencia o baja incidencia de factores estresantes se las puede encontrar de forma individual, también llamada planctónica. Sin embargo, los cambios bruscos en el ambiente que las rodea, entre ellos, baja presión de oxígeno, o presencia de antimicrobianos, conducen a un cambio importante en el comportamiento de la bacteria individual, la cual tiende a contactar y “comunicarse” con las bacterias aledañas para conformar una patina bacteriana, llamada biofilm (2).

Los biofilms son estructuras complejas conformadas por poblaciones bacterianas, las cuales se comportan como organismos multicelulares. Los biofilms no deben considerarse una mera aglomeración de bacterias, por el contrario deben ser contemplados como una población que reacciona y actúa como un organismo único, de ahí la calificación de organismo multicelular (1).

Los biofilms se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza ya que representan la forma habitual de crecimiento de las bacterias.

En la clínica se los considera responsables de la mayoría de las infecciones recidivantes o en aquellas asociadas a implantes. Los primeros

reportes de la importancia de los biofilms en procesos infecciosos en humanos datan de inicios de la década de 1980 en hospitales de la Ciudad de Memphis y en la Universidad de Tennessee, donde se observó que muchos pacientes padecían sepsis asociada a catéteres intravasculares (*Staphylococcus coagulasa negativo*) (3). Pero no fue hasta la década de los 90 que se los comenzó a investigar en relación a su rol como responsables de infecciones crónicas (4).

Actualmente es ampliamente aceptado que los biofilms son causantes de muchas enfermedades infecciosas bacterianas, todas ellas caracterizadas por su difícil erradicación y carácter recidivante (2, 5).

Existen numerosas infecciones con estas características, para las cuales se ha demostrado un biofilm bacteriano como agente etiológico; entre ellas: las prostatitis bacterianas (*Escherichia coli*), endocarditis (*Streptococcus*), neumonías (*Pseudomonas*, *Streptococcus*), otitis recidivantes (*Haemophilus influenzae*) y, como se mencionara, las infecciones asociadas a dispositivos médicos de implantes (implantes ortopédicos, catéteres urinarios, marcapasos) (6, 7). En Medicina Veterinaria, aunque menos estudiados, se está empezando a reconocer que enfermedades como neumonías (*Pasteurella multocida*), meningitis (*Streptococcus suis*), abscesos hepáticos (*Fusobacterium necrophorum*), mastitis infecciosas (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*), piodermias (*Staphylococcus epidermidis*) y otitis externas (*Pseudomonas aeruginosa*) son causadas por bacterias en estado de biofilm (8, 9, 10).

La formación de biofilms es un proceso temporal que involucra la transición a través de distintas etapas de organización multicelular, identificadas como: (i) fase planctónica, (ii) fase de adhesión, (iii) fase de formación de microcolonias, (iv) fase de formación de macrocolonias y (v) fase de dispersión (11)

La fase de adhesión se ha dividido posteriormente en una etapa reversible y una irreversible en reconocimiento a que la adhesión a la superficie inicialmente es débil. En esta etapa se produce la activación de mecanismos específicos que permiten la transición celular a una asociación con la superficie de muy alta estabilidad. La formación de agrupaciones celulares discretas se conoce como formación de microcolonias, lo que puede suceder ya sea por crecimiento clonal de las células adheridas o por translocación activa a través de la superficie. Las microcolonias crecen en tamaño y coalescen para formar las macrocolonias. La macrocolonia típica consiste de torres semejantes a hongos separadas por espacios llenos de líquido. Sin embargo, también son posibles estructuras alternativas como por ejemplo, estructuras planas. Las células, dentro de la



Figura 1. Ejemplos de biofilms. (A) en ríos; (B) en drenajes; (C) en catéteres; (D) en dientes; (E) en herida de piel; (F) en un caso de otitis externa.

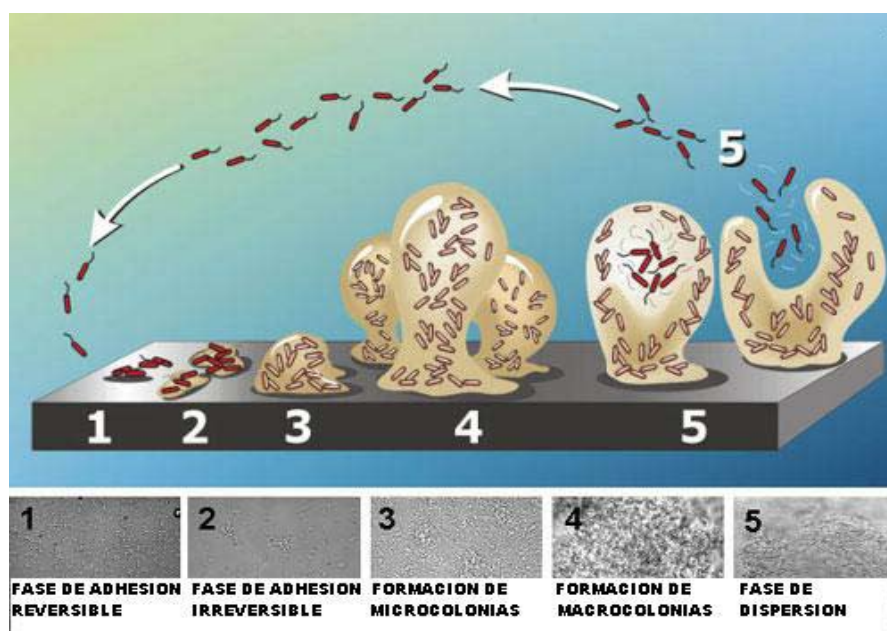


Figura 2. Esquema de las fases de desarrollo de biofilms (Modificado de (11))

macrocolonia, están contenidas en una matriz de exopolisacáridos que también contiene restos de células muertas y ADN extracelular. Por último, las macrocolonias pueden disolverse liberando las células desde el biofilm. El retorno de las células a la fase planctónica completa la imagen idealista del ciclo de desarrollo. En conjunto, estas cinco transiciones en la forma visualmente demarcada constituyen los puntos de control intuitivos del ciclo de desarrollo del biofilm.

La consideración de los biofilms como organismos multicelulares se basa en su capacidad de crecer, alimentarse, reproducirse, etc. de manera organizada y orquestada a través de sistemas de comunicación célula – célula (12). Las bacterias como parte de una comunidad se comunican a través de señales químicas. Estas señales pueden depender de la densidad celular o población o ser producidas en diferentes etapas del ciclo celular (13, 14).

El sistema de comunicación entre las bacterias que conforman el biofilm se ha definido como quórum sensing (12).

El quórum sensing es un sistema que consiste en una molécula señal llamada *autoinductor* que puede difundir hacia fuera o dentro de la célula, como en el caso de bacterias Gram negativas, o ser sintetizada como péptidos precursores, modificada y exportada de la célula a través de una maquinaria de transporte de proteínas (15, 16, 17, 18).

Los sistemas de quórum sensing difieren entre los distintos géneros bacterianos y una misma bacteria puede poseer más de un tipo de sistema, por ejemplo en *Pseudomonas aeruginosa* se han descrito dos sistemas diferentes (Las I/ Las R y RhI I/ RhI R) los cuales pueden estar

interconectados (13, 2).

Los mecanismos de señalización son los responsables de determinar, en respuesta a señales del medio ambiente, la morfología de los biofilms (desde pilares cilíndricos a estructuras filamentosas semejantes a hongos) y la organización de las complejas redes de canales acuosos específicamente diseñados para permitir la circulación de nutrientes y eliminación de desechos. Asimismo, tienen la capacidad de remodelar, en forma rápida, el biofilm en caso de modificaciones abruptas en el medio ambiente (19). Como se puede observar, este comportamiento define un organismo multicelular altamente evolucionado.

Es importante remarcar que las bacterias además de comunicarse entre ellas, pueden comunicarse con el hospedador. Este tipo de comunicación, denominada inter-reino, se lleva a cabo a través de los mismos receptores bacterianos que reconocen a los autoinductores, dada su capacidad de reconocer moléculas de tipo hormonal producidas por los huéspedes (20).

Desde hace mucho tiempo era reconocida por los médicos de terapia intensiva la baja incidencia de infecciones por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (O157:H7) en pacientes bajo tratamiento con beta-bloqueantes (21). Fueron los trabajos de Sperandio y su grupo los que reportaron las causas de esta baja incidencia (22, 23, 24, 25, 26, 27). Estos autores demostraron que las bacterias (en este caso *E. coli*) en intestino eran capaces de detectar los aumentos de epi y norepinefrina (incrementados en este tipo de pacientes debido al stress y dolor). El aumento de las concentraciones circulantes de estas catecolaminas conduce a un trasvasamiento al lumen

intestinal que es reconocido por las bacterias allí presentes, las cuales responden con un aumento del crecimiento, activación de los factores de virulencia y formación de biofilm.

Bansal y col (28), presentan una interesante hipótesis sobre los mecanismos de colonización de *E. coli* O157:H7; según esta hipótesis los gradientes de epi y norepinefrina influyen en la migración quimiotáctica de *E. coli* O157:H7 hacia la superficie de las células epiteliales del intestino. Cuando las concentraciones son bajas, las células bacterianas tienden a moverse de manera paralela a la superficie. Sin embargo, el aumento de los niveles de catecolaminas conduce a una migración bacteriana hacia la superficie de las células epiteliales intestinales lo que facilita su adherencia. Un detalle importante, que refleja la organización de las poblaciones bacterianas, es la interacción de las cepas de *E. coli* O157:H7 con las cepas de *E. coli* productoras de indol y las bacterias comensales no coli (13). Se ha reportado que el indol actuaría como repelente de *E. coli* O157:H7, de manera que la colonización y formación de biofilm se daría exclusivamente en las zonas ocupadas por bacterias comensales no coli.

Como se menciona previamente, la hipótesis de que los biofilms bacterianos son los responsables de las infecciones bacterianas crónicas y/o recidivantes es cada vez más aceptada (1, 4, 29, 30). Esto es de fundamental importancia; una terapéutica antibacteriana dirigida a la bacteria en estado planctónico conducirá inexorablemente al fracaso terapéutico. Por lo tanto, nuevos esquemas terapéuticos dirigidos a los biofilms son imprescindibles si se pretende alcanzar una cura bacteriana de estos procesos infecciosos.

La característica fundamental de los biofilm bacterianos es su amplia resistencia frente a una variedad de antimicrobianos (31). Es importante remarcar que el concepto clásico de resistencia antimicrobiana se refiere a la resistencia adquirida de las bacterias en estado planctónico. Estos mecanismos, todos ellos irreversibles, están mediados a través de mutaciones o adquisición de genes por medio de intercambios genéticos e incluyen (a) inactivación enzimática del antimicrobiano (betalactamasas), (b) modificación de el sitio diana del antimicrobiano en la bacteria (estreptomycin) o (c) expresión de bombas de eflujo (fluoroquinolonas) (32).

Los mecanismos a través de los cuales los biofilms resisten a los antimicrobianos son diferentes y reflejan las características estructurales y fisiológicas de "organismo multicelular bacteriano".

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que las bacterias en estado de biofilm poseen una resistencia 10 a 1000 veces mayor que la observada con las mismas cepas bacterianas en

estado planctónico (8, 33, 34, 35).

La resistencia antimicrobiana de los biofilms no se debe a la presencia de genes de resistencia ni a la selección de mutantes resistentes, lo que, como se mencionara, es una característica de la resistencia antibacteriana de las bacterias en estado planctónico. Las bacterias en estado de biofilm solo expresan genes considerados estructurales.

A la fecha, aun cuando este es un tema en crecimiento dinámico, se han propuesto los siguientes mecanismos para explicar la alta resistencia de los biofilms frente a los antimicrobianos (6, 31):

1.- Penetración alterada de los antimicrobianos a través de la matriz del biofilm (reducida tasa, lenta velocidad) (36). Esta hipótesis plantea la posibilidad de una muy lenta o incompleta penetración de los antimicrobianos al interior del biofilm. Esto sería consecuencia de un efecto de dilución en la matriz así como, de la presencia de enzimas capaces de metabolizar a los antibióticos (37). También se reporta un efecto carga, especialmente para los aminoglucósidos, que son cationes (por la presencia del grupo azúcar) e interactúan con las cargas negativas de los polímeros que conforman la matriz extracelular (38, 39).

2.- La 2da hipótesis, se asienta en las características químicas del microambiente del biofilm (6). Se ha demostrado que dentro del biofilm se generan microgradientes de nutrientes, entre ellos de oxígeno; estos estudios demuestran que todo el oxígeno es consumido en las capas más superficiales del biofilm, creándose en el interior nichos de anaerobiosis (40). Por otro lado, también se observan gradientes en microescala de productos de desecho, lo que conduce a diferencias de pH en las distintas profundidades del biofilm. La anaerobiosis, así como, los pHs extremos ejercen un profundo efecto sobre la actividad de los antimicrobianos (41, 42). Los aminoglucósidos son menos efectivos en anaerobiosis y los macrólidos en pHs ácidos. Asimismo, este gradiente de nutrientes se asocia con cambios en el ciclo bacteriano de las bacterias que conforman el biofilm; se pueden encontrar dentro de la misma población, bacterias en crecimiento logarítmico (blanco para antimicrobianos que actúan en pared) y otras en estado estacionario (que serían refractarias a estos antimicrobianos) (36). Otra consecuencia de los microgradientes es la inducción en la bacteria de repuestas osmóticas al stress, lo que induce cambios en la distribución de porinas de la pared bacteriana reflejado con una disminución de la permeabilidad de los antimicrobianos (42).

3.- La 3ra hipótesis postula que en el interior del biofilm se observan sub-poblaciones fenotípicamente diferentes, de tipo persistente

también llamadas bacterias viables no cultivables (43).

Como se ha mencionado, este terreno de estudio es amplio y, al menos en veterinaria, muy poco investigado.

En la actualidad existen escasos estudios sobre la capacidad de formar biofilms de las bacterias responsables de las infecciones recidivantes en animales domésticos. Asimismo, se continúa aplicando la terapia clásica diseñada para bacterias en estado planctónico, las cuales poseen un perfil patogénico y de resistencia antimicrobiana totalmente diferente a los biofilms.

La formación de biofilms comienza a ser reconocida como un proceso de desarrollo multicelular. Esta es la llave de las nuevas estrategias terapéuticas: el cambio del blanco a tratar, dejar de pensar en la bacteria para empezar a pensar en ese organismo multicelular conformado por bacterias al que se denomina biofilm.

BIBLIOGRAFÍA

- Monds R. & O'Toole G. (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiol.* 17: 73-87.
- Pace J., Rupp M. & Finch R.G (2006). *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy.* 1st Ed. Taylor & Francis.USA.
- Christensen G., Simpson A., Younger J., Baddour L., Barret F., Melton F. & Beachey E. (1985). Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22: 996-1006
- Costerton J., Stewart P. & Greenberg E. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
- Fey P. (2010) Modality of bacterial growth presents unique targets: How do we treat biofilm-mediated infections?. *Curr Opin Microbiol.* 13: 610-615.
- Costerton W., Veeh M., Shirtliff M. , Pasmore C., Post C. & Ehrlich G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J.Clin. Invest.* 112:1466-1477
- Bryers J. (2008). *Medical Biofilms.* Biotech. Bioengineering,100: 1-18.
- Olson M., Ceri H., Morck D., Buret A. & Read R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet Res.* 66:86-92.
- Clutterbuck A., Woods E., Knottenbelt D., Clegg P., Cochrane C. & Percival S. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 121: 1-17.
- Grenier D., Grignon L. & Gottschalk M. (2009). Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Vet. J.* 179 : 292-295.
- Coogan N. & Keener J. (2004) The role of biofilm matrix in structural development. *Math.Med.Biol.* 21:147-166.
- Waters C.& Bassler B. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:319-346
- Jayaraman A. & Wood T. (2008). Bacterial Quorum Sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual Rev. Biomed. Engineering* 10:145-167.
- Lee J., Jayaraman A. & Wood T. (2007). Indole is an interspecies biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol.* 7:42-48.
- Parsek M., Val D., Hanzelka B., Cronan J. & Greenberg E. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4360-4365
- Marketon M., Gronquist M., Eberhard A. & Gonzales J. (2002). Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel N-acyl homoserine lactone. *J. Bacteriol.* 184:5686-5695
- Manefield M. & Turner S. (2002). Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiol.* 148:3762-3764
- Taga M. & Bassler B. (2003). Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:14549-14554
- Madhu Sharma A. & Yadav S. (2008) Biofilms: microbes and disease. *Br.J. Infect.Dis.* 12:526-530
- Williams P. (2007) Quorum sensing, communication and cross kingdom signalling in bacterial world. *Microbiol.* 153:3923-3938.
- Novotny N., Lahm T., Markel T., Crisostomo P., Wang M., Wang Y., Ray R., Tan J., Al-Azzani D. & Meldrum D. (2009) Beta blockers in sepsis: Re-examining the evidence. *Shock* 31: 113-119.
- Sperandio V., Torres A., Jarvis B., Nataro J. & Kaper J. (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:8951-6.
- Clarke M. & Sperandio V. 2005. Events at the host-microbial interface of the gastrointestinal tract. III. Cell-to-cell signalling among microbial flora, host, and pathogens: there is a whole lot of talking going on. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288:G1105-9
- Waldor M.K. & Sperandio V.(2007) Adrenergic regulation of bacterial virulence. *J Infect Dis.* 195:1248-9.
- Reading N., Rasko D.A., Torres A.G. & Sperandio V.(2009)The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.*106:5889-94.
- Pacheco A.R. & Sperandio V.(2009) Inter-kingdom signalling: chemical language between bacteria and host. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:192-8.
- Hughes D. & Sperandio V. (2008) Inter-Kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat.Rev.Microbiol.* 6:111-120

M. Meneses y col.

28. Bansal T., Englert D., Lee J., Hegde M., Wood T. & Jayarama A. (2007) Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect.Immun.* 75: 4597-4607
29. Darouiche R. (2004). Treatment of infections associated with surgical implants. *N. Engl. J. Med.* 350:1422-1429.
30. Fergie N., Bayston R., Pearson J. & Birchall J. (2004). Is otitis media with effusion a biofilm infection? *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 29:38-46.
31. Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Rolin S. & Ciofu O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilm. *Int.J.Antimicrob.Agents* 35 :322-332.
32. Tenover F. (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria *Am.J.Infect.Control.* 34:3-10
33. Stewart P. & Costerton W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138.
34. Conley J., Olson M., Cook L., Ceri H., Phan V. & Davies H. (2003) Biofilm formation by group A streptococci: is there a relationship with treatment failure? *J.Clin.I Microbiol.* 41: 4043-4048.
35. Mah T. & O'Toole G. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9: 34-39.
36. Gilbert P., Collier P.J. & Brown M.R (1990) Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1865-1868.
37. Hoyle B.D., Jass J. & Costerton J.W. (1990) The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J. Antimicrob. Chemother.* 26: 1-5.
38. Gordon C.A., Hodges N.A. & Marriott C. (1988) Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 22: 667-674.
39. Nichols W. (1988) Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:518-523.
40. Lewis K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* 45: 999-1007
41. Ishida H. (1998) In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1641-1645.
42. Anderson G. & O'Toole G. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr.T. Microbiol.* 322:85-105.
43. Lewis K. (2010) Persister cells. *Annu.Rev.Microbiol.* 64: 357-372.