



FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA COMO MECANISMO DE PERSISTENCIA Y RESISTENCIA BACTERIANA

*Jeannette Navarrete Ospina
Gladys Pinilla Bermudez
Liliana Constanza Muñoz Molina*



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
SELLO EDITORIAL

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA COMO MECANISMO DE PERSISTENCIA Y RESISTENCIA BACTERIANA

*Jeannette Navarrete Ospina
Gladys Pinilla Bermudez
Liliana Constanza Muñoz Molina*



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
SELLO EDITORIAL

Navarrete Ospina, Jeannette

Formación de biopelícula como mecanismo de persistencia y resistencia bacteriana / Jeannette Navarrete Ospina, Gladys Pinilla Bermúdez, Liliana Constanza Muñoz Molina. -- 1a ed. -- Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, 2021.

p. 118

Incluye referencias bibliográficas al final de cada capítulo.

ISBN 978-958-8359-97-7

1. Biopelícula 2. Resistencia bacteriana I. Pinilla Bermúdez, Gladys II. Muñoz Molina, Liliana Constanza III. Título

CDD: 579.17 ed. 23

CO-BoBN- a1073850

Primera edición, 2021

© Jeannette Navarrete Ospina, Gladys Pinilla Bermúdez, Liliana Constanza Muñoz Molina

© UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Sello Editorial Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Carrera 13 No. 38- 29, Edificio San Juan, noveno piso
selloeditorial@unicolmayor.edu.co
www.unicolmayor.edu.co

Diseño de portada y diagramación: Editorial Scripto SAS
Corrección de Estilo: Xpress Estudio Gráfico y Digital

Bogotá, Colombia

ISBN: 978-958-8359-97-7

El contenido de esta obra está protegido por las leyes y tratados internacionales en materias del Derecho de autor. Queda prohibida su reproducción total o parcial por cualquier medio impreso o digital conocido o por conocer sin contar con la previa autorización de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Tabla de contenido

Lista de tablas	9
Lista de figuras	11
Introducción	13
1 Matriz de la biopelícula	15
1.1 Componentes estructurales de la biopelícula	15
1.1.1 Polisacárido extracelular de adhesión	15
1.1.2 Enzimas	18
1.1.3 Proteínas estructurales.....	19
1.1.4 Lípidos y surfactantes	19
1.1.5 Agua	19
1.1.6 ADN extracelular en la biopelícula	20
1.2 Etapas de la formación de biopelícula	22
1.2.1 Unión inicial.....	23
1.2.2 Maduración	24
1.2.3 Dispersión	25
1.2.3.1 Señales que median la dispersión	25
1.3 Arquitectura de la biopelícula.....	26
1.4 Componentes de la superficie microbiana que reconoce moléculas de adhesión de la matriz (MSCRAMM).....	28
1.4.1 Factor cumpling.....	29
1.4.2 Proteínas de unión a la fibronectina	30
1.5 Propiedades mecánicas de la biopelícula.....	30
1.6 <i>Staphylococcus spp.</i> como modelo a nivel clínico en la formación de biopelícula	31
1.6.1 Características del género, fisiología y estructura de los <i>Staphylococcus spp.</i>	31
1.6.1.1 Cápsula y capa de polisacáridos extracelular.....	33
1.6.1.2 Peptidoglicano.....	34
1.6.1.3 Ácidos teicoicos	34

1.6.2	Mecanismos involucrados en la formación y regulación de biopelícula en <i>Staphylococcus spp.</i> dependientes de ica.....	35
1.6.2.1	Producción de PIA.....	36
1.6.3	Mecanismos de formación de biopelícula independientes de ica	37
1.6.4	Condiciones ambientales para la producción de biopelícula en <i>Staphylococcus</i>	37
1.7	Mecanismos que regulan la expresión de la biopelícula	38
1.7.1	Mecanismo de regulación del operón ica	39
1.7.2	Quorum sensing como regulador de la biopelícula	40
1.7.2.1	Quorum sensing y sistemas de regulación de dos componentes	41
1.7.2.2	Gen regulador accesorio (<i>agr</i>)	41
1.7.2.3	Gen regulador accesorio <i>Staphylococcico</i> (<i>sarA</i>).....	42
1.7.3	Regulación por medio de la proteína ESP del <i>Staphylococcus epidermidis</i>	45
	Referencias	47
2	Biopelícula: aspectos clínicos y de laboratorio	53
2.1	Importancia clínica de la biopelícula.....	53
2.2	Biopelícula e implantes médicos.....	58
2.3	Biopelícula e infecciones adquiridas en hospital (IAH).....	60
2.4	Mecanismos de resistencia de la biopelícula.....	62
2.5	Métodos de diagnóstico de biopelícula.....	63
2.5.1	Detección genotípica de la biopelícula: modelo de estudio <i>S. aureus</i>	63
2.5.1.1	Determinación genotípica del operón <i>icaADBC</i>	63
2.5.1.1.1	Diseño de cebadores para la determinación del operón <i>icaADBC</i> e <i>icaR</i>	64
2.5.1.1.2	Condiciones de PCR para la determinación de los genes <i>icaADBC</i> e <i>icaR</i>	69

2.5.1.1.3	Condiciones de PCR para la determinación de IS256	69
2.5.1.2	Diseño y evaluación de PCR múltiples para detectar los genes que codifican factores de adhesión en aislamientos de <i>Staphylococcus spp.</i>	71
2.5.1.2.1	Primers utilizados para la determinación de los factores de adhesión (clfA, clfB, fib y fnbB)	71
2.5.1.2.2	Condiciones de PCR múltiples para la amplificación genes de factores de adhesión	72
2.5.2	Determinación fenotípica de la biopelícula	74
2.5.2.1	Determinación cualitativa de la biopelícula por el método agar rojo congo (ARC)	74
2.5.2.2	Determinación cuantitativa de la biopelícula por el método de titulación en microplacas de poliestireno	75
Referencias	77
3	Estrategias antibiopelícula: respuesta inmune del huésped y péptidos antimicrobianos	83
3.1	Respuesta inmune en la biopelícula	83
3.1.1	Respuesta inmune innata y biopelícula.....	86
3.1.1.1	Fagocitosis	86
3.1.1.2	Toll like receptor (TLR)	91
3.1.1.3	Sistema de complemento.....	92
3.1.1.4	Citoquinas	93
3.1.2	Respuesta inmune adaptativa y biopelícula	94
3.1.2.1	Linfocitos B y anticuerpos.....	94
3.1.2.2	Linfocitos T	95
3.2	Estrategias antibiopelícula	96
3.2.1	Estrategias para combatir infecciones por implantes médicos y agentes que degradan la biopelícula	96
3.2.2	Péptidos antimicrobianos.....	100

3.2.3. Péptidos antibiopelícula contra <i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	103
3.2.3.1 Péptido nativo de la secuencia protéica de <i>icaR</i>	104
3.2.3.2 Síntesis de péptidos en fase sólida (estrategia Fmoc).....	108
3.2.3.3 Purificación de los péptidos	109
3.2.3.4 Caracterización de los péptidos	109
3.2.3.5 Evaluación de la toxicidad de los péptidos.....	110
Referencias	111

Lista de tablas

1	Matriz de la biopelícula.....	15
	Tabla 1.1 Funciones del polisacárido extracelular de adhesión en la biopelícula bacteriana	16
	Tabla 1.2 Componentes estructurales de <i>Staphylococcus spp</i>	32
2	Biopelícula: aspectos clínicos y de laboratorio	53
	Tabla 2.1 Lista parcial de infecciones humanas en las que están involucradas biopelículas bacterianas	54
	Tabla 2.2 Ejemplos de infecciones crónicas o agudas relacionadas con microorganismos productores de biopelícula	61
	Tabla 2.3 Secuencia de primer par la detección del operon <i>icaADBC</i> , elemento regulador <i>icaR</i> e <i>IS256</i>	65
	Tabla 2.4 Secuencias y tamaños de primers utilizados para factores de adhesión	72
	Tabla 2.5 Características genotípicas y fenotípicas de aislamientos de <i>Satphylococcus coagulasa</i> negativa provenientes de bacteremias y puntas de catéter	75
3	Estrategias antibiopelícula: respuesta inmune del huésped y péptidos antimicrobianos	83
	Tabla 3.1 Clasificación de los PAM	101
	Tabla 3.2 Ejemplos de PAM y su efecto sobre la bacteria	102
	Tabla 3.3 Lista de los diez fragmentos con mejor potencial antimicrobiano obtenidos del servidor AntiBP derivados de la secuencia de <i>icaR</i>	105
	Tabla 3.4 Aminoácidos naturales con predisposición para formar α -hélices	106
	Tabla 3.5 Tablas de los péptidos escogidos para ser sintetizados (IR1, IR2 e IR3) con sus respectivas características	107

Lista de figuras

1	Matriz de la biopelícula.....	15
	Figura 1.1 Representación gráfica de los fenotipos expresados por <i>S. aureus</i> sensible a la meticilina (MSSA) y resistente a la meticilina (MRSA).....	21
	Figura 1.2 Etapas de producción de la biopelícula. Inicio, formación y dispersión de la biopelícula.....	24
	Figura 1.3 Mecanismos de adherencia y dispersión bacteriana para la formación de la biopelícula	25
	Figura 1.4 Estructura de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
	Figura 1.5 Estructura de la pared celular de <i>Staphylococcus spp.</i>	33
	Figura 1.6 Modelo de la biosíntesis de PIA	35
	Figura 1.7 Estructura de polisacárido adhesina intercelular (PIA).....	36
	Figura 1.8 Proceso de autoinducción de agr.	43
2	Biopelícula: aspectos clínicos y de laboratorio	53
	Figura 2.1 Modelo esquemático de las fases que intervienen en la formación de biopelícula <i>S. epidermidis</i> y factores bacterianos implicados	59
	Figura 2.2 Alineamiento de secuencias de <i>Staphylococcus spp.</i> Para el gen <i>icaB</i>	66
	Figura 2.3 Confirmación de primers para el gen <i>icaB</i> mediante el programa Blast	66
	Figura 2.4 Alineamiento de secuencias de <i>Staphylococcus spp.</i> para el gen <i>icaC</i>	67
	Figura 2.5 Confirmación de primers para el gen <i>icaC</i> mediante el programa Blast.	68
	Figura 2.6 Condiciones de PCR para la amplificación de los genes <i>icaADBC</i> e <i>icaR</i>	69

Figura 2.7	Corrido electroforético de los genes del operón <i>icaADBC</i> e <i>icaR</i> de 103 pb, 156 pb, 198 pb, 259 pb y 469 pb, respectivamente, para la cepa USA 300. Carril 1: PPM; carril 2: <i>icaA</i> ; carril 3: <i>icaB</i> ; carril 4: <i>icaD</i> ; carril 5: <i>icaC</i> ; carril 6: <i>icaR</i>	70
Figura 2.8	Condiciones de PCR múltiple para la amplificación de los genes de los factores de adhesión.....	73
Figura 2.9	Amplificación por PCR de los genes que conforman en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> Carril	73
Figura 2.10	Agar rojo congo	74
Figura 2.11	Prueba de cristal violeta. Representación de la detección de biopelícula en placa de poliestireno teñida con cristal violeta.....	76
3	Estrategias antibiopelícula: respuesta inmune del huesped y péptidos antimicrobianos	83
Figura 3.1	Respuesta inmune innata y adaptativa en infecciones causadas por bacterias productoras de biopelícula ..	85
Figura 3.2	Microtécnica de fagocitosis y muerte intracelular de <i>Candida</i> : polimorfonucleares neutrófilos (PMN) que han fagocitado <i>Candida</i> . Se observa la muerte celular de las levaduras cuando son teñidas con el azul de metileno	87
Figura 3.3	Prueba de fagocitosis NBT (reducción de nitroazul de tetrazolium)	88
Figura 3.4	Reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por los TLR sobre la membrana de las células de la inmunidad innata para la producción de citoquinas proinflamatorias..	91
Figura 3.5	Representación esquemática en superficie de Conolli de un dímero de la proteína <i>icaR</i> que actúa como represor de la familia TetR. El dominio TetRN (rojo) muestra el sitio de unión al ADN.....	104

Introducción

Las biopelículas representan un estilo de vida de interdependencia bacteriana que forma comunidades, las cuales se unen a superficies inertes u orgánicas y pueden estar compuestas por una o múltiples especies microbianas. Dentro de esta comunidad forman una matriz de sustancias poliméricas extracelulares en la que ocurren modificaciones fenotípicas en la tasa de crecimiento y la transcripción de genes. En este ecosistema la biopelícula permite la comunicación y el intercambio de información genética relacionada con mecanismos de resistencia, por lo que se convierten en complejos difíciles de erradicar. Esto en razón a que la respuesta inmune del individuo, así como los tratamientos antimicrobianos, son ineficaces contra los microorganismos productores de biopelícula.

En esta publicación se describen las características para la formación de biopelícula, así como los componentes y los mecanismos tanto genéticos como moleculares que utilizan los microorganismos para la formación y regulación, además de factores de adhesión de la biopelícula. En especial, se profundiza el tema sobre la formación de biopelículas en el género *Staphylococcus* spp., el cual es un importante patógeno en infecciones nosocomiales que utiliza este mecanismo de persistencia, virulencia y resistencia bacteriana, y la intervención del quorum sensing que actúa como un lenguaje a través de señales químicas en la regulación de las biopelículas.

Finalmente, se describen las implicaciones clínicas de la formación de biopelículas en pacientes que usan dispositivos médicos y la evaluación de la respuesta inmune del huésped frente a la biopelícula. Además, este texto incluye nuevas estrategias terapéuticas tales como péptidos antimicrobianos con especificidad antibiopelícula.

1 Matriz de la biopelícula

*Jeannette Navarrete O.
Gladys Pinilla B.
Bibiana Chavarro P.*

La biopelícula es una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células de una o varias especies diferentes adheridas de manera irreversible a un sustrato o interfase biótico y/o abiótico, protegidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares autoproducidas, la cual presenta un fenotipo particular en relación con la tasa de crecimiento y la transcripción génica.

Aunque la composición de la biopelícula es variable, su componente mayoritario es agua, y en menor cantidad ADN, proteínas, restos de plaquetas, fibrina, calcio y otras macromoléculas procedentes de la lisis de las bacterias. La naturaleza de la matriz de los exopolisacáridos varía mucho dependiendo de las condiciones de crecimiento, de los medios y los sustratos. La biopelícula otorga ciertas ventajas a las bacterias que la conforman:

15

- Protección a un ambiente adverso.
- Resistencia a la acción bactericida de los antimicrobianos y la respuesta inmune del huésped.
- Cooperación metabólica con el intercambio de nutrientes.

Las comunidades que componen biopelículas poseen microambientes diferentes en cuanto a las variaciones de pH, concentraciones de oxígeno y potenciales eléctricos que permiten nichos adecuados a todas las especies, de modo que se favorece un intercambio de señales químicas y resistencia de forma indirecta a los mecanismos de defensa del huésped y se evita de esta forma el reconocimiento de anticuerpos, así como la actividad fagocítica al bloquear la opsonización.

1.1 Componentes estructurales de la biopelícula

1.1.1 Polisacárido extracelular de adhesión

La sustancia polimérica extracelular o exopolisacárido (EPS) constituyen entre el 50 % y el 90 % de la estructura de la biopelícula, de manera que

se trata del componente fundamental para su formación. La componen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros biopolímeros (por ejemplo, sustancias húmicas), pero, principalmente, polisacáridos, de los cuales son neutrales o polianiónicos, tal como ocurre en las bacterias gramnegativas. En el caso de las bacterias grampositivas, como, por ejemplo, el género *Staphylococcus*, los polisacáridos son, principalmente, catiónicos en los que predomina el polisacárido β -1,6-glucosaminoglucano.

El EPS se encuentran altamente hidratados gracias a los enlaces de hidrógeno, aunque los enlaces pueden ser hidrófilos e hidrófobos, lo que impide la desecación en la biopelícula. Su producción depende del estado de nutrientes, del medio de crecimiento, del exceso de carbono disponible y la limitación de nitrógeno, potasio o fosfato. El crecimiento bacteriano lento también mejora la producción de EPS, el cual está condicionado a su edad: a mayor edad, más producción de exopolisacáridos. Además, el EPS tienen varias funciones, tales como inmovilizar las células de la biopelícula, mantener la estrecha proximidad —de manera que permita las interacciones intensas, lo que incluye la comunicación de célula a célula— y proporcionar estabilidad mecánica, entre otras (véase la Tabla 1.1).

En general, las biopelículas muestran propiedades visco-elásticas, y en ellas se producen respuestas elásticas reversibles y deformación irreversible, dependiendo de las fuerzas que actúan sobre la matriz del los EPS. Así mismo, la interacción de iones inorgánicos multivalentes con EPS puede influir mucho en las propiedades mecánicas de las biopelículas; un ejemplo de esto es la presencia de iones Ca^{++} , lo cual incrementa la estabilidad mecánica.

La biopelícula en *Staphylococcus aureus* muestra una cualidad elástica sólida frente a los estímulos de corta escala como, por ejemplo, el tiempo y el fluido viscoso, en respuesta a estímulos a largo plazo.

Tabla 1.1 Funciones del polisacárido extracelular de adhesión en la biopelícula bacteriana

Función	Relevancia en la formación de biopelícula	Componentes EPS involucrados
Adhesión	Favorece las primeras fases de la colonización de superficies abióticas y bióticas, así como la fijación a largo plazo.	Polisacáridos, proteínas, ADN y moléculas anfifílicas

continúa (pág. 17)

Función	Relevancia en la formación de biopelícula	Componentes EPS involucrados
Agregación de las células bacterianas	Facilita la comunicación entre las células y promueve la inmovilización temporal de las poblaciones de bacterias, el desarrollo de altas densidades de células y el reconocimiento célula-célula.	Polisacáridos, proteínas y ADN
Cohesión de biopelículas	Forma una red de polímero hidratado, lo cual favorece la estabilidad mecánica de la biopelícula y permite la comunicación célula-célula.	Polisacáridos neutros y cargados, proteínas (p. ej., amiloides y lectinas) y ADN
Retención de agua	Mantiene un microambiente altamente hidratado alrededor de los microorganismos que forman la biopelícula, lo que conduce a su tolerancia a la desecación en entornos con escasez de agua.	Polisacáridos hidrófilos y, posiblemente, proteínas
Barrera protectora	Confiere resistencia a las defensas del huésped durante la infección y confiere tolerancia a varios agentes antimicrobianos.	Polisacáridos y proteínas
Absorción de compuestos orgánicos	Permite la acumulación de nutrientes desde el medio ambiente que contribuye a su desintoxicación.	Polisacáridos y proteínas cargadas o hidrófobos
Absorción de iones inorgánicos	Promueve la formación del gel de polisacárido, de intercambio iónico, formación de minerales y la acumulación de iones de metales tóxicos.	Polisacáridos y proteínas cargadas, como, por ejemplo, sustituyentes inorgánicos (fosfato y sulfato)
Actividad enzimática	Permite la digestión de macromoléculas exógenas para la adquisición de nutrientes y la degradación de EPS estructural, lo que permite la liberación de las células de la biopelícula.	Proteínas
Fuente de nutrientes	Proporciona una fuente de carbono que contiene fósforo y nitrógeno compuestos que usa la comunidad que conforma la biopelícula.	Potencialmente, todos los componentes del el EPS

Función	Relevancia en la formación de biopelícula	Componentes EPS involucrados
Intercambio de información genética	Facilidades de transferencia horizontal de genes entre células de la biopelícula.	ADN
Electrón donante o aceptor	Permite la actividad redox de la matriz de la biopelícula.	Proteínas (por ejemplo, los pili formación y nanocables) y, posiblemente, las sustancias húmicas
Exportación de los componentes de la célula	Libera material celular como resultado de recambio metabólico.	Vesículas de membrana que contienen ácidos nucleicos, enzimas, lipopolisacáridos y fosfolípidos
Exceso de energía	Exceso de carbono en carbono desequilibra a las relaciones de nitrógeno.	Polisacáridos
Unión de las enzimas	Favorece la acumulación, la retención y la estabilización de enzimas a través de su interacción con los polisacáridos.	Polisacáridos y enzimas

Fuente: Flemming & Wingender, 2010.

En una escala de tiempo intermedio, una biopelícula aumenta la fuerza de su matriz estructural en respuesta a las tensiones mecánicas mediante el aumento de la producción de EPS. Adicionalmente, este exopolisacárido también contribuye a las propiedades de resistencia antimicrobiana de biopelículas, al obstaculizar el transporte de masa de los antibióticos, probablemente, mediante la unión directa a estos agentes.

1.1.2 Enzimas

Los sustratos de las enzimas extracelulares incluyen polímeros solubles en agua tales como polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, además de compuestos insolubles en agua, como, por ejemplo, celulosa, quitina y lípidos, o partículas orgánicas que se encuentran atrapadas en la biopelícula. Existen enzimas que degradan los componentes del EPS y hace de la matriz

de la biopelícula un sistema digestivo externo que descompone biopolímeros a productos de baja masa molecular, los cuales luego pueden absorberse y utilizarse como fuentes de carbono y energía. De igual manera, esta degradación de EPS promueve el desprendimiento de las bacterias de la biopelícula. Otras enzimas pueden retenerse de manera eficiente gracias a su fuerte interacción con los polisacáridos, lo que le permite actuar como factor de virulencia en la biopelícula durante procesos infecciosos.

1.1.3 Proteínas estructurales

Las proteínas no enzimáticas en la biopelícula, como, por ejemplo, las asociadas a la superficie celular y las proteínas de unión a carbohidratos extracelulares conocidas como lectinas, están implicadas en la formación y estabilización de la red de matriz de polisacáridos y constituyen un enlace entre la superficie bacteriana y los EPS. En otro grupo de proteínas extracelulares se reconocen las proteínas de superficie asociadas a la biopelícula, las cuales poseen una masa de alto peso molecular, se encuentran en la superficie celular bacteriana y promueven la formación de la biopelícula.

Otros componentes proteínicos de la matriz son los amiloides. Estos son compuestos que se han definido como repeticiones ordenadas de moléculas de proteínas, dispuestas a manera de fibras de longitud indefinida en una estructura transversal- β . Los amiloides están implicados en la adhesión a superficies inanimadas a las células huésped, con su posterior invasión por su acción citotóxica sobre la célula. También se encuentran apéndices proteicos tales como pili, fimbrias y flagelos que actúan como elementos estructurales mediante la interacción con otros componentes de los EPS de la matriz de la biopelícula. Estos funcionan como estructuras de reticulación y aportan a la formación de una matriz extracelular rígida que proporciona la estabilidad a la matriz.

1.1.4 Lípidos y surfactantes

Son moléculas con propiedades hidrofóbicas, fundamentales para la adherencia de las bacterias a superficies inertes. A su vez, juegan un papel en la formación inicial y la dispersión de la biopelícula, de modo que facilitan la migración asociada a la superficie bacteriana.

1.1.5 Agua

Es el mayor componente de la matriz al proporcionar un entorno altamente hidratado, por lo que amortigua a las células de la biopelícula contra

fluctuaciones, así como brinda protección a las bacterias que lo conforman. A su vez, actúa como un tamiz molecular en el que se secuestran cationes, aniones, compuestos apolares y partículas; igualmente, es el medio en el que se desarrollan las diferentes reacciones químicas que propician, a su vez, el desarrollo de la biopelícula.

1.1.6 ADN extracelular en la biopelícula

Los ácidos nucleicos extracelulares (ADNe) provienen de la liberación del material genético de células que han sufrido procesos de autólisis y hacen parte de la composición del material polimérico de la biopelícula. De estos mecanismos de liberación por lisis se conocen dos tipos: suicidio y fratricidio; estos tienen como objetivo “sacrificar” algunos miembros de la población microbiana.

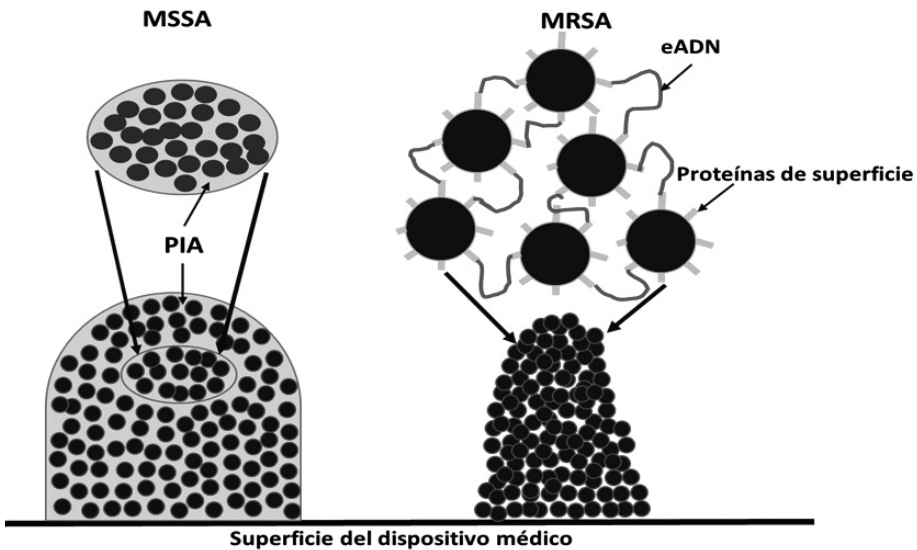
Especies como los *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus* utilizan ADNe en la conformación de la biopelícula. En el caso de *S. aureus*, se ha reportado el uso del mecanismo de autólisis de tipo altruista, proceso similar a la apoptosis en células eucariotas, ya que es la propia célula la que ejecuta la acción de lisis sobre ella misma, de manera que queda una subpoblación de células que aprovechan este material genético para la conformación de la biopelícula.

El mecanismo de lisis conocido como “fratricidio” consiste en la acción de células atacantes y células objetivo, en la cual algunas células atacan a una subpoblación de la misma especie con el objetivo de liberar los ácidos nucleicos; este proceso se considera similar al de necrosis reportado en células eucariotas y lo emplean especies bacterianas como el *Enterococcus faecalis* y el *Bacillus subtilis*.

El ADNe es importante en la fase inicial durante el desarrollo de la biopelícula en la especie *S. epidermidis*. Además, es el mayor componente requerido para la fase inicial de unión a las superficies, así como en la fase inicial del desarrollo de la biopelícula. Por otra parte, el ADNe presenta similitud con el ADN bacteriano de tipo cromosomal, demostrada al comparar fragmentos amplificados por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y al encontrar genes comunes como *YycF*, *srrA*, *sigB*, *saA*, los cuales se encuentran normalmente localizados en diferentes regiones del cromosoma de *S. epidermidis*. Esta observación reafirma la hipótesis según la cual el ADNe se origina a partir de una subpoblación que ha sido lisada previamente. Cabe anotar que la autolisina Atle (enzima que se activa para lisar la pared celular en presencia de agentes activos contra las células bacterianas

“antibióticos”) actúa como la principal mediadora en la liberación de ADNe, ya que con la delección del gen que expresa la autolisina *Atle* en cepas de *Staphylococcus epidermidis* los niveles de ADNe disminuyen de manera drástica (Figura 1.1).

Figura 1.1 Representación gráfica de los fenotipos expresados por *S.aureus* sensible a la meticilina (MSSA) y resistente a la meticilina (MRSA)



Nota: En las cepas MSSA dependientes de *ica* la biopelícula es mediada por PIA, mientras que las cepas de MRSA independientes de PIA requieren proteínas de superficie como las proteínas de unión a la fibronectina, lisis celular mediada por *Atle* y ADNe para la colonización de superficies y acumulación de biopelícula.

Los mecanismos de liberación de ADNe en *S. aureus* parecen ser diferentes debido a que, en esta bacteria, la lisis celular depende de hidrolasas controladas por el operón *cid*. Dos operones de *S. aureus* conocidos como *irgAB* y *cidABC* regulan la lisis celular y la tolerancia a los antibióticos de manera inversa. El operón *irg* disminuye la actividad de la enzima mureína hidrolasa e incrementa la tolerancia a la penicilina, mientras que, por otra parte, el operón *cid* incrementa la actividad extracelular de la enzima mureína hidrolasa al tiempo que disminuye la tolerancia a la penicilina. Estos operones reguladores de la actividad de la enzima mureína hidrolasa controlan,

además, el tiempo y la aparición de la lisis celular. En otros estudios se comprobó que en *S. aureus* la expresión del gen *cidA* contribuye a la adherencia tanto *in vitro* como *in vivo* al producir lisis celular y liberación del ADN genómico, y destacan el papel de ADNe en la formación de la biopelícula y la función del sistema genético de los operones *cid* y *irg* en *S. aureus* (Figura 1.1).

Ensayos realizados por Tetz y Tetz en el 2010 demostraron una disminución en la densidad poblacional al medir el efecto del tratamiento con DNAsaI sobre la biopelícula en especies de *S. aureus* y *E. coli* (48). La disminución de la concentración de biopelícula lleva a que la infección o colonización causada por la comunidad bacteriana disminuya, de modo que las hace más susceptibles al efecto inhibitorio de los antibióticos.

Lo anterior confirma también que la formación de biopelícula es un factor de virulencia y un mecanismo de resistencia que han desarrollado o adquirido las bacterias, debido a que esta estructura los protege contra la influencia de los factores ambientales y reduce la penetración de diferentes moléculas (lo que incluye antibióticos), permitiéndole a las bacterias ser más tolerantes a los agentes antimicrobianos. Además de participar en el desarrollo de la biopelícula y en la estabilización de su estructura, el ADNe tiene una importante función en el mecanismo de transferencia genética al promover la oportunidad de diseminar factores de virulencia y mecanismos de resistencia a los antibióticos mediante transferencia de genes.

El ADNe se observa en la agregación microbiana, en una conexión intercelular o como adhesina; tiene actividad antimicrobiana, lo que causa la lisis celular por cationes quelantes que estabilizan los lipopolisacáridos y la membrana exterior bacteriana. El ADNe juega un papel más importante en *S. aureus* y menos fundamental en *S. epidermidis*, ya que al primero le confiere integridad en la formación de biopelícula, mientras en el segundo esta función es propia del EPS.

1.2 Etapas de la formación de biopelícula

La formación de biopelícula se produce en varias etapas que implican la adhesión a la superficie para ser colonizada, la posterior acumulación en múltiples capas bacterianas, la maduración de la arquitectura de las biopelículas y, finalmente, el desprendimiento o dispersión de las células que pueden iniciar un nuevo ciclo de formación de biopelículas en otro espa-

cio. Los factores de virulencia implicados en la adhesión y la formación de biopelícula son, usualmente, parte del genoma accesorio, y como tal no son comunes para todas las cepas. Los primeros eventos implican la expresión de adhesinas, exopolisacáridos, proteínas implicadas en la agregación celular y la formación de biopelícula. Una vez la biopelícula alcanza su fase final de maduración el exceso de autoinducir la producción de polisacárido de adhesión intercelular (PIA) desencadena el inicio de la fase de dispersión, que se caracteriza por el aumento de expresión de RNAlII con la consiguiente producción de proteasas extracelulares.

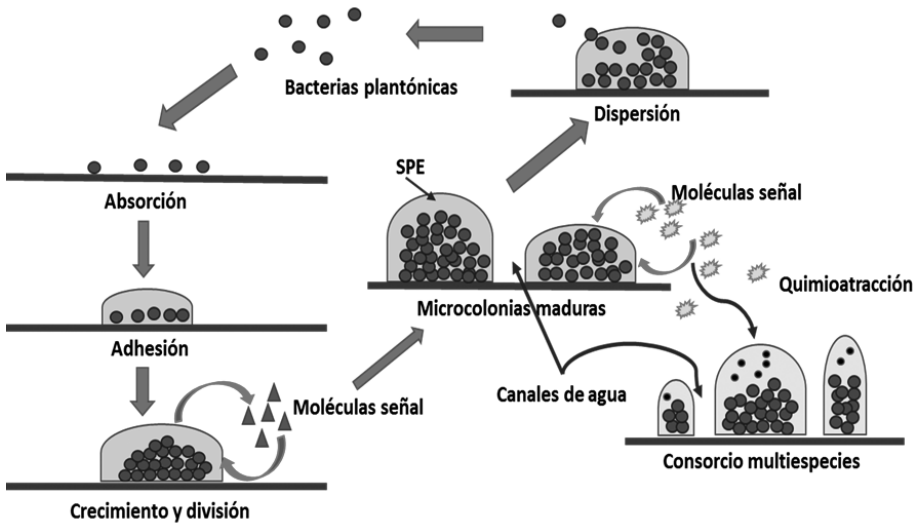
1.2.1 Unión inicial

La formación de biopelícula comienza con la adhesión inicial y la posterior agregación en estructuras multicelulares, proceso conocido como congregación, el cual consiste en el reconocimiento célula a célula, de tal forma que las bacterias que lo constituyen puedan reconocerse y adherirse a otras mediante adhesinas. Por tanto, requiere fuerzas adhesivas para la colonización de las superficies y la interacción de las células entre sí (Figura 1.2).

La adhesión a las superficies abióticas, como, por ejemplo, catéteres, se rige, principalmente, por la hidrofobicidad y las fuerzas electrostáticas que se dan entre las superficies celulares y el material, lo que favorece la unión a las proteínas, a las glicoproteínas o a los receptores de polisacáridos sobre las superficies del huésped (endotelio dañado en válvula nativa) o de los biomateriales (prótesis valvulares, ortopédicas, etc.). Tal como se observa en la Figura 1.2, se produce de manera progresiva una adsorción pasiva. La acumulación de múltiples capas bacterianas es un proceso activo mediado por componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva (MSCRAMM) y proteínas de superficie (Atle, Bap, SSP-1, SSP-2, SdrG), sin embargo, la unión entre ellas y la superficie es laxa y poco organizada, por lo que requieren de adherencia intercelular.

La adherencia se da cuando la bacteria se une a los epitelios y forma así microcolonias. En ese momento, las bacterias individuales que se han unido a los epitelios se multiplican y comienzan a emitir señales químicas que las comunican entre sí. Estas señales sirven para que, una vez alcanzada una concentración mínima, se activen los mecanismos genéticos de producción de exopolisacáridos y se formen tanto microcolonias como una biopelícula bacteriana.

Figura 1.2 Etapas de producción de la biopelícula. Inicio, formación y dispersión de la biopelícula



Fuente: Elaboración propia.

1.2.2 Maduración

La maduración de la biopelícula se suscita en la superficie colonizada, lo que genera una arquitectura compleja con canales, poros y una redistribución de las bacterias por fuera del sustrato. Esta maduración comprende procesos en los que las bacterias permanecen unidas durante la proliferación y los procesos disruptivos que forman canales en la estructura de la biopelícula, los cuales son necesarios para que los nutrientes lleguen a las células en las capas más profundas de la biopelícula. La formación de microcolonias y la acumulación de biopelícula requieren mecanismos para la agregación intercelular de las bacterias, en los cuales se encuentra la producción de exopolisacáridos que permite la adhesión.

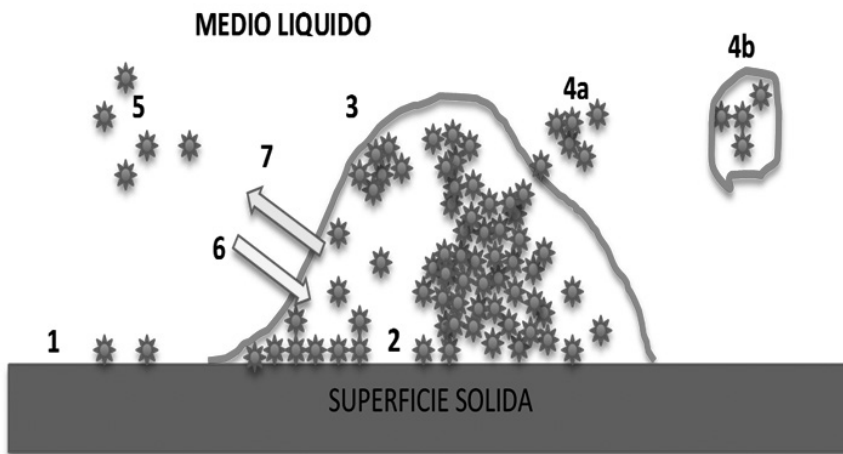
Así, para *S. aureus* y *S. epidermidis* el principal exopolisacárido producido y esencial para la formación de biopelícula se denomina polisacárido de adhesión intercelular (PIA), también conocido como poli-N-acetil-glucosamina (PNAG). El PIA tiene una carga positiva y promueve las interacciones intercelulares mediante la unión a las superficies de carga negativa de células bacterianas. Comúnmente, el PIA puede o no interactuar con los ácidos teicoicos y ácidos lipoproteicos para fomentar interacciones

intercelulares. Sin embargo, un número de cepas de *Staphylococcus spp.* muestra la formación de biopelícula independiente de PIA (Figura 1.2).

1.2.3 Dispersión

La dispersión de la biopelícula, por lo general, es precedida por la muerte y la lisis de las células en el centro de la biopelícula madura. Estas células muertas proporcionan nutrientes para las bacterias que se convertirán en las células de dispersión. En estas, los genes que regulan las características del fenotipo de la biopelícula, como, por ejemplo, los exopolisacáridos, son regulados en baja medida, mientras los genes que codifican los factores y son importantes para un estilo de vida móvil y las proteínas implicadas en la quimiotaxis están altamente regulados (Figura 1.3).

Figura 1.3 Mecanismos de adherencia y dispersión bacteriana para la formación de la biopelícula



Nota: 1) adherencia inicial; 2) crecimiento, división y producción de EPS; 3) adherencia; 4a) dispersión por erosión; 4b) dispersión por desprendimiento; 5) bacterias planctónicas; 6) entrada de nutrientes; 7) salida de productos.

1.2.3.1 Señales que median la dispersión

Entre las señales que median la dispersión se encuentran:

- **Nutrientes.** El aumento o la disminución en la concentración de nutrientes se correlacionan con la dispersión de las biopelículas. Cuando los

nutrientes son abundantes, las células dentro de la biopelícula se propagan a través de la superficie, con lo cual se dispersa por completo, y al volver a unirse a la superficie los niveles de nutrientes disminuyen.

- **Oxígeno.** La dispersión puede inducirse por falta de oxígeno, estrés ambiental al que están comúnmente sometidas las células en la biopelícula.

- **Óxido nítrico (ON).** Bajas concentraciones de ON endógeno o de fuentes externas inducen la dispersión de la biopelícula en especies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Legionella pneumophila*, *Nitrosomonas europea* y *Neisseria gonorrhoeae*. Una consecuencia de la dispersión mediada por ON es que las células pierden su alto nivel de resistencia a los antimicrobianos.

Los cambios relacionados con la dispersión de biopelícula parten de la descomposición parcial de la matriz, lo que permite la liberación de las células de dispersión. La producción de las células de dispersión y los mecanismos de liberación están íntimamente vinculados dentro de la biopelícula tanto espacial como temporalmente; para esto, las bacterias han desarrollado una serie de mecanismos efectores, tales como enzimas, tensioactivos y bacteriófagos, que degradan la matriz de la biopelícula liberando ADN, polisacáridos y proteínas, lo que lleva a la dispersión.

Estos efectores median los grandes cambios estructurales y metabólicos que una biopelícula experimenta durante la producción y liberación de las células de dispersión; los cambios incluyen la destrucción de las bacterias en el centro de las microcolonias, evacuando la biopelícula para dispersarse a nuevos hábitats. Este proceso también puede estar asociado con la pérdida sustancial de la biomasa de la biopelícula.

1.3 Arquitectura de la biopelícula

Si bien una comunidad microbiana que desarrolle biopelícula posee características únicas según su género, algunas se consideran generales en todos los microorganismos. Estas comunidades se disponen de tal manera que conforman una estructura tridimensional, soportada por una compleja sustancia extracelular denominada matriz o glicocálix. Al parecer, las células bacterianas que se encuentran en el interior de la biopelícula y componen entre el 15 % y el 20 % de la estructura no se dividen, lo cual indica que estas bacterias podrían adoptar un fenotipo un poco diferente al resto de las células que conforman la estructura.

La matriz es muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de la biopelícula, de manera que llega este elemento a representar hasta el 97 % de esta. Además de agua y células, la matriz está formada por exopolisacáridos que constituyen su componente fundamental, producidos por los propios microorganismos integrantes. Existen también otras macromoléculas, como, por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos y diversos productos que proceden de la lisis bacteriana. El conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas se conocen bajo el nombre de sustancias poliméricas extracelulares (SPE).

La calidad nutricional del medio ambiente influye en la producción de SPE; por otra parte, un incremento en la concentración de nutrientes está relacionado con un aumento en el número de células bacterianas adheridas, así como una disponibilidad excesiva de carbono y/o limitación del nitrógeno, potasio o fosfato que promueve las síntesis de SPE.

Un estudio realizado por O' Gara (37) en el 2007 acerca de los mecanismos genéticos y moleculares sobre la unión o adherencia de los microorganismos, demuestra que la arquitectura de la matriz de la biopelícula no es sólida. Las bacterias que conforman la biopelícula viven en una especie de escalones intercalados o torreones celulares que se extienden de forma tridimensional desde la superficie a la cual están adheridas. Estos torreones los componen microcolonias de diferentes células bacterianas, englobadas por exopolisacáridos y separadas unas de otras por espacios o canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno, incluso hasta zonas más profundas (Figura 1.1).

Las células situadas en las partes superiores de la biopelícula pueden tener acceso fácil a los alimentos, lo que incluye el oxígeno, y tienen pocos problemas con la descarga de residuos metabólicos. Estas células son metabólicamente activas, de gran tamaño y gozan de algunas ventajas de la vida multicelular, en la que un sistema circulatorio primitivo entrega los alimentos en el lugar microcolonial y quita productos metabólicos por el mismo proceso.

La existencia de canales de agua no garantiza que existan zonas de la estructura de la biopelícula con diferencias en las concentraciones de oxígeno, nutrientes y pH en donde las células más superficiales se encuentran metabólicamente activas en comparación con las áreas más profundas. En estas últimas, las bacterias deben adaptarse a una disponibilidad reducida de oxígeno. Además, las características del substrato al cual se unen y algunos aspectos del medio ambiente influyen en la estructura y la

formación de biopelícula. De esta manera, la biopelícula, en una superficie mucosa, es fisiológicamente diferente de aquellos formados en superficies inertes, como, por ejemplo, los biopolímeros usados en dispositivos médicos y catéteres.

1.4 Componentes de la superficie microbiana que reconoce moléculas de adhesión de la matriz (MSCRAMM)

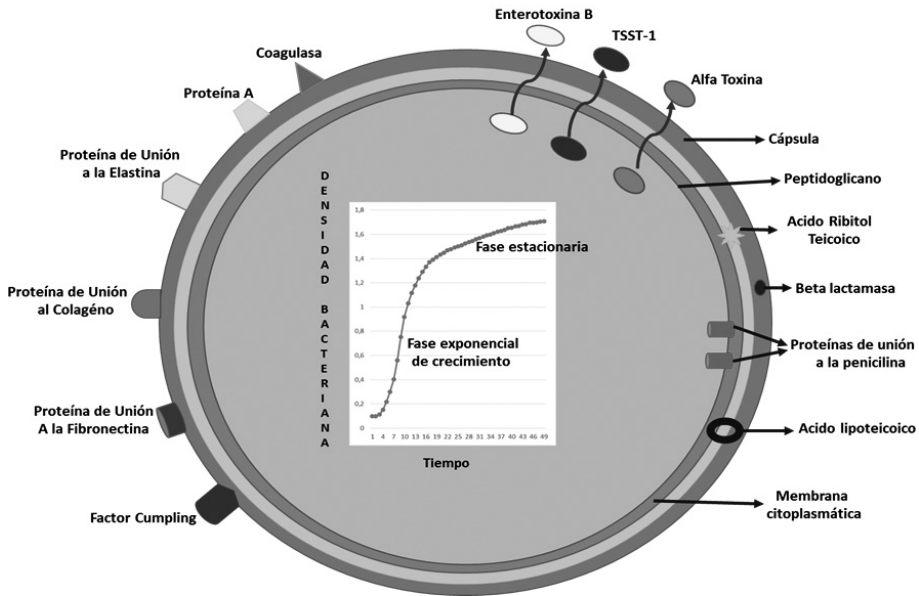
Los *Staphylococcus spp.* se adhieren a componentes de la matriz extracelular del hospedero a fin de iniciar la colonización. La adherencia está mediada por proteínas de la familia MSCRAMM, entre las que se encuentran las proteínas de unión a fibronectina A y B codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*, la proteína de unión a fibrinógeno, los factores *cumpling* A y B, codificados por los genes *fib*, *clfA* y *clfB*, respectivamente, que se encuentran implicados en el proceso de infección valvular e invasión tisular, lo cual permite a los microorganismos iniciar y mantener una infección adhiriéndose a sitios específicos en tejidos humanos o implantes biomédicos que persisten de manera indefinida al formar estructuras conocidas como biopelícula.

28

Las uniones por parte de las MSCRAMM al peptidoglicano de la pared celular de las bacterias se realizan de manera covalente. Estas proteínas se reconocen por su unión a la secuencia localizada en el extremo C-terminal que abarca la secuencia LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly); esta secuencia señal se encuentra en el extremo N terminal, posee aminoácidos cargados de forma positiva que se extienden en el citoplasma, un dominio que abarca la membrana hidrófoba y una pared celular-región de anclaje, todos en el extremo carboxilo terminal.

Un dominio de unión ligando en el N terminal que está expuesta en la superficie de la célula bacteriana permite que algunas de estas proteínas funcionen como adhesinas. Estas proteínas tienen propiedades antifagocíticas que se basan en su capacidad para unirse a la porción Fc de la inmunoglobulina (Figura 1.4). Además, contribuyen como factores de virulencia en cuanto son prescindibles en la formación de biopelícula. Su expresión en el crecimiento microbiano está dada en la fase exponencial, ya que las funciones de cada una de estas interfieren de manera directa en esta fase, lo cual contribuye a la adherencia y permite ocupar un considerable volumen de espacio.

Figura 1.4 Estructura de *Staphylococcus aureus*



Nota: A) superficie y proteínas secretadas (la síntesis de muchas de estas proteínas depende de la fase de crecimiento y la controlan genes reguladores tales como AGR); B) y C) secciones transversales de la envoltura celular. Muchas de las proteínas de la superficie tienen una organización estructural similar a la del factor de aglutinación, lo que incluye segmentos repetidos de aminoácidos (C). TSST-1 denota la toxina del síndrome de choque tóxico.

1.4.1 Factor cumpling

El factor *cumpling* está codificado por los genes *clfA* y *clfB*, genéticamente diferentes y que codifican tanto el factor *cumpling* A como el B. A continuación, se enlistan sus características.

- **Factor *cumpling* A (*clfA*).** Es un componente de las MSCRAMM, conformado por tres subdominios (N1, N2, N3) que anclan a las cadenas gamma del fibrinógeno y son reguladas por iones de calcio. El factor *clfA* promueve la adhesión bacteriana al inmovilizar el fibrinógeno, lo que explica su papel como factor de virulencia en modelos de infección y en la capacidad de generar una fuerte respuesta inmune.

- **Factor *cumpling* B (*clfB*).** Al igual que *ClfA*, hace parte del grupo de MSCRAMM y es igual capaz de unirse las cadenas alfa (α) del fibrinogeno; es

responsable de unirse a la citoqueratina diez (CK 10), la cual se expresa en la superficie de la célula en la fase exponencial de crecimiento (Figura 1.4).

1.4.2 Proteínas de unión a la fibronectina

Se han identificado dos proteínas de unión a fibronectina, FNBPA y FNBPB, codificadas por dos genes estrechamente vinculados, *fnbA* y *fnbB*, respectivamente; son similares en su organización, ya que poseen una alta homología en su secuencia. Estas proteínas trabajan de forma cooperativa, lo cual favorece la adherencia a los tejidos de cepas bacterianas tales como *Staphylococcus aureus*. De esta manera, cumplen un papel importante durante la infección séptica, ya que son factores indispensables en el establecimiento de esta infección analizada en modelos *in vitro* e *in vivo* (Figura 1.4).

Por otra parte, FNBPA es indispensable en la adhesión e internalización de las bacterias a la célula huésped, y esta capacidad está acorde con el nivel de activación de NF- κ B. Por su parte, FNBPB estimula la fagocitosis y, al igual que FNBPA, permite internalizar las bacterias. Las estadísticas muestran que la mayoría de aislamientos clínicos (70 %) codifican tanto FNBPA como FNBPB, mientras que el 20 % codifica solo FNBPA.

1.5 Propiedades mecánicas de la biopelícula

Los métodos moleculares demuestran que el desarrollo de la biopelícula y su estructura está claramente influenciado por varios factores regulados genéticamente. Sin embargo, las fuerzas físicas que actúan sobre la biopelícula pueden también influir en su estructura. Ensayos en los que la biopelícula se cultiva con velocidad de flujo laminar baja, es decir, que se someten a la influencia mecánica de un movimiento acuoso de baja velocidad, demuestran que la biopelícula presenta un comportamiento isotrópico, es decir, evidencia cierto grado de direccionalidad o plasticidad.

Sin embargo, estudios *in vitro* realizados por Stoodley en 1999 sobre la deformación estructural de biopelícula bacteriana causada a corto plazo por fluctuaciones en la velocidad del flujo y con una fuerza o presión de rozamiento alta, indicaron que la biopelícula tiende a alargarse en dirección al movimiento ejercido por el flujo de aire, de manera que forma una especie de filamentos.

Las deformaciones en la estructura de la biopelícula causadas por las variaciones transitorias de fricción fluida demostraron que, mecánicamente, la biopelícula se comporta como líquidos viscosos elásticos y puede

modelarse a manera de hidrogeles de polímero. Esta observación sugiere que los exopolisacáridos no solo determinan la arquitectura, sino también algunas propiedades de resistencia. La mecánica de la biopelícula es un campo emergente a nivel de investigación, del cual se podría extraer nuevos conocimientos sobre el desarrollo o la interrupción mecánica en la estabilidad de la biopelícula.

1.6 Staphylococcus spp. como modelo a nivel clínico en la formación de biopelícula

1.6.1 Características del género, fisiología y estructura de los *Staphylococcus spp*

El género *Staphylococcus spp.* se caracteriza por ser cocos de 0,5 y 1 μm de diámetro, son grampositivos, catalasa positiva y se agrupan en forma de racimo de uvas. Las características macroscópicas varían de acuerdo con la especie, pero, en general, se puede observar colonias de 1 a 3 μm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y, por lo general, pigmentadas con un color que puede ir desde el crema al amarillo, en medios no selectivos, ya que no son exigentes nutricionalmente. La especie *S. aureus* se caracteriza por la producción de pigmento, la cual se ve favorecida con incubaciones que van desde 24 a 48 horas a temperatura ambiente. Cuando crecen en agar sangre se puede observar una zona de β -hemólisis alrededor de las colonias, debido a las hemolisinas que ellos poseen. Son microorganismos aerobios o anaerobios facultativos que obtienen energía por procesos de fermentación y respiración.

Este género se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza a causa de su gran capacidad de resistir la sequedad y otros factores ambientales adversos. Además, forman parte de la flora comensal de los seres humanos. Existen más de 30 especies del género *Staphylococcus*, las cuales se dividen en dos grupos: a) estafilococos coagulasa positiva (ECP), como, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, el principal representante de este grupo, o *Staphylococcus intermedius*, *S. hyicus* y *S. delphini*; b) estafilococos coagulasa negativa (ECN), como, por ejemplo, *Staphylococcus epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* y *S. capitis*, entre otros.

Estos tipos de microorganismos han sido asociados a procesos de colonización de superficies cutáneas (50 %) y mucosas (20 %-30 %), lo cual favorece la transmisión persona a persona. La tasa de colonización depende del estado de salud de las personas, de modo que son más susceptibles los pacientes en

hemodiálisis, los diabéticos, personas que abusan de drogas intravenosas e inmunosuprimidos. Igualmente, se encuentran involucrados en diferentes tipos de infecciones a nivel de la epidermis (forúnculos, celulitis e impétigo), supurativas (formación de pus), infecciones más graves (neumonía, bacteremia, mastitis y flebitis), del tracto urinario y profundo (osteomielitis, endocarditis y meningitis).

Uno de los factores de virulencia importantes es su gran capacidad de adherencia, lo cual ha hecho de este género un patógeno potencial gracias a su facilidad para colonizar implantes médicos (p. ej., catéteres), lo que ocasiona bacteremias o septicemias. El análisis de los implantes y tejidos afectados por este tipo de infecciones muestra que dicha colonización se da por la formación de comunidades o biopelícula en las que las bacterias se encuentran protegidas de la acción de anticuerpos, células fagocíticas y de la acción de los antimicrobianos.

La estructura celular del *Staphylococcus spp.* es común de las bacterias grampositivas (véase la Tabla 1.2). El citoplasma está rodeado por la membrana citoplasmática y la pared celular, esta última reconocible en el exterior como una capa gruesa, bastante homogénea y menos electrodensa que la membrana citoplasmática; químicamente, las paredes están formadas por peptidoglicano y ácidos teicoicos (véase la Figura 1.5).

La proporción de peptidoglicano llega a ser de hasta un 50 % a 60 % del peso seco de las preparaciones de pared; en algunos casos, se ha encontrado la proteína A, componente característico de este género.

Tabla 1.2 Componentes estructurales de *Staphylococcus spp*

Componente bacteriano	Función
Cápsula	Inhibe quimiotaxis y dificulta la fagocitosis.
Polisacáridos extracelulares	Facilitan la adherencia a los dispositivos médicos.
Peptidoglicano	Evita lisis celular, estimula la producción de pirógenos y quimiotaxis leucocitaria.
Ácido teicoicos	Media la adherencia a la fibronectina.

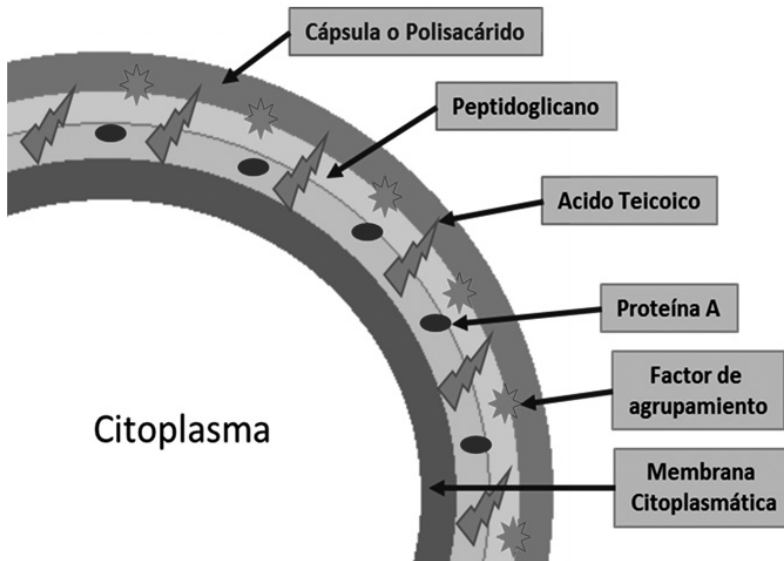
Nota: Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de la matriz (MSCRAMM). Aumenta la capacidad de adherencia tisular.

Fuente: tomado de Forbes (14).

1.6.1.1 Cápsula y capa de polisacáridos extracelular

La cápsula protege las bacterias al inhibir la fagocitosis de estos microorganismos por leucocitos polimorfonucleares (PMN), en donde, además, la mayor parte de los estafilococos producen una biopelícula hidrosoluble laxa (capa de polisacárido extracelular) formada por monosacáridos, proteínas y pequeños péptidos. Esta sustancia extracelular une las bacterias a tejidos y cuerpos extraños tales como catéteres, injertos y prótesis valvulares, convirtiéndose en una propiedad particularmente importante para su supervivencia.

Figura 1.5 Estructura de la pared celular de *Staphylococcus spp*



Nota: Modificado de Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles.

Fuente: modificada a partir de Borráz C., 2006.

En cepas de *Staphylococcus aureus* se han identificado 11 serotipos capsulares, de los cuales los serotipos con las cápsulas más gruesas son el 1 y el 2, que forman colonias mucoides; no obstante, estos no se asocian con enfermedad. Los serotipos 5 y 7 son los responsables de la mayor parte de las infecciones humanas y, en específico, el serotipo 5, que abarca a la mayoría de las cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM).

Ahora bien, *Staphylococcus epidermidis* y otros *Staphylococcus* coagulasa negativos son capaces de elaborar un polisacárido extracelular que forma una capa llamada glicocáliz, una glicoproteína extracelular que favorece la unión del microorganismo a la superficie del implante. Existen diferentes mecanismos mediante los cuales el glicocáliz crea resistencia a la terapia antibiótica, entre los que se encuentran inhibición de la penetración del agente antimicrobiano a través de la gruesa capa creada por la composición bioquímica de esta glicoproteína, inactivación de la actividad inhibitoria del antimicrobiano creado por el microambiente del glicocáliz o el estado metabólico de los microorganismos dentro de este. Esta capa confiere 500 veces más resistencia a los antibióticos.

1.6.1.2 Peptidoglicano

El peptidoglicano es el mayor componente de la pared bacteriana de microorganismos grampositivos, al punto que representa la mitad de la pared celular en peso. Está formado por cadenas de glicanos, ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. A diferencia de lo que sucede en microorganismos gramnegativos, la capa de peptidoglicano en bacterias grampositivas se compone de numerosas capas entrecruzadas, lo que confiere mayor rigidez a la pared celular. El peptidoglicano posee una actividad de tipo endotóxina, ya que estimula la producción de pirógenos endógenos, la activación del complemento, la formación de IL-1 por monocitos y la agregación de neutrófilos.

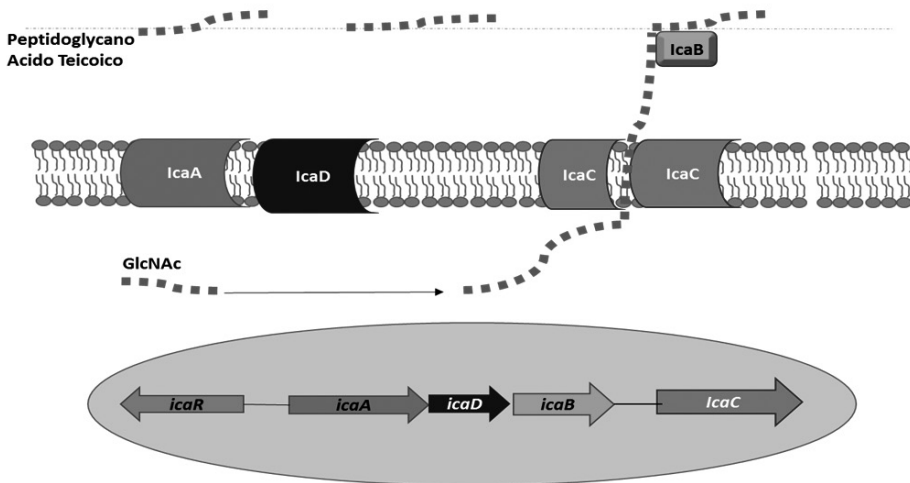
1.6.1.3 Ácidos teicoicos

Los ácidos teicoicos son polímeros fosfatados específicos en los que el 1,3 poliglicerol fosfato sustituido en la posición 2 del carbono glicerol con residuos de α D-Glc y de α D Glc Nac se une de manera covalente a residuos de ácido N-acetilmurámico de la capa de peptidoglicano, o a través de una unión lipofílica a la membrana citoplasmática (ácidos lipoteicoicos). Estos ácidos constituyen otro componente fundamental de la pared celular, los cuales representan entre un 30 % y un 50 % de su peso seco. Los ácidos teicoicos actúan en la adherencia específica de las bacterias grampositivas a las superficies mucosas y presenta afinidad por fibronectina, en donde, en el caso de los estafilococos, median la unión de las bacterias a las superficies mucosas a través de su asociación específica cuando se encuentran unidos al peptidoglicano. Esta adherencia a superficies mucosas ha sido evidenciada en estudios realizados con cepas aisladas de dispositivos e implantes médicos, en los cuales se encontró que algunas de estas cepas no presentaban el locus *ica* o algunas que, a pesar de tener el locus, no producían PIA.

1.6.2 Mecanismos involucrados en la formación y regulación de biopelícula en *Staphylococcus* spp. dependientes de *ica*

El operón *ica* está compuesto por los genes *icaA*, *icaD*, *icaC*, *icaB*, y el gen represor *icaR*; los productos de los tres primeros se encuentran en la membrana celular, mientras que el último se halla extracelularmente (Figura 1.6).

Figura 1.6 Modelo de la biosíntesis de PIA



Nota: *icaA* e *icaD* sintetizan oligómeros derivados de UDP-N-acetilglucosamina; la síntesis se detiene cuando se alcanza una longitud de 10-20 residuos. En presencia del *icaC* se forman polímeros más largos que reaccionan con antiseros específicos de PIA. Debido a la similitud de secuencia con desacetilasas, *icaB* podría catalizar la reacción de desacetilación.

Cada gen cumple funciones específicas en la formación de la biopelícula: *icaA* codifica la producción de una enzima N-acetilglucosaminiltransferasa, que tiene como función la síntesis del polímero N-acetilglucosamina; *icaA* se coexpresa con *icaD* y la actividad transferasa de la enzima que codifica *icaA* aumenta de manera notable. La catálisis de los oligómeros de N-acetilglucosamina producidos por *icaAD* alcanza una longitud máxima de 20 residuos y es solo cuando *icaAD* se coexpresa con *icaC* que codifica una proteína de la membrana putativa de cadenas de oligómeros más largos, aproximadamente

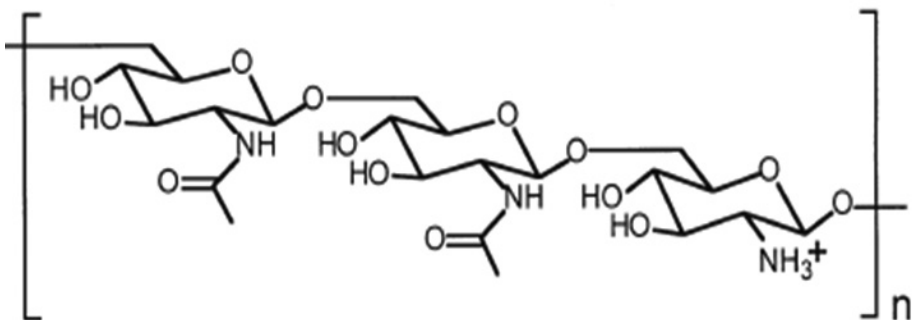
30 residuos. El gen *icaC* es una proteína de membrana que transporta oligómeros IcaAD, sintetizados a través de la membrana celular. El gen *icaB* se encuentra localizado corriente arriba del gen *icaD*, está asociado a la superficie celular bacteriana y contiene una señal de secuencia típica para codificar proteínas extracelulares, las cuales son secretadas cuando el microorganismo se encuentra en condiciones especiales de crecimiento (medios de cultivo, superficies de polímeros y otros).

1.6.2.1 Producción de PIA

El polisacárido PIA lo sintetizan enzimas codificadas por el operón *icaADBC*, un homoglicano de adhesión intercelular (PIA) también llamado PNAG (Figura 1.7); el PIA está localizado, principalmente, en la superficie celular y consiste en un enlace lineal β -1,6-glucosaminoglicano que contiene dos fracciones: polisacárido I, un homoglicano lineal con residuos de enlace β -1,6-2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranosil (promedio 80 %) que es N-acetilado; el resto es desacetilado, por tanto, posee carga positiva. El polisacárido II (<20 %) es estructuralmente parecido al polisacárido I, pero tiene un menor contenido de residuos no N-acetilados, contiene residuos sustituidos por fosfato y succinato, lo que le confiere características aniónicas. A PIA lo sintetizan, exportan y modifican los productos del locus del gen *icaADBC*.

36

Figura 1.7 Estructura de polisacárido adhesina intercelular (PIA)



Nota: El polisacárido es un homoglicano lineal compuesto de β -1,6-ligados residuos de N-acetilglucosamina; el 20 % de los residuos son desacetilados y, por tanto, están cargados positivamente.

Fuente: Tomado de Götz.

1.6.3 Mecanismos de formación de biopelícula independientes de ica

La proteína más importante involucrada en la formación de biopelícula independiente de ica es *Aap*, proteína de 220 kD que se divide proteolíticamente a una forma más pequeña (140 KD) para inducir la formación de biopelícula. El 27 % de las cepas que forman biopelícula aisladas a partir de infecciones articulares por medio de prótesis forman biopelícula independiente de PIA, en la mayoría de las cuales la formación de biopelícula parece estar mediada por *Aap*. Esta proteína puede ser idéntica a las proteínas SSP-1 y SSP-2 que han sido implicadas en la formación de la biopelícula independiente de ica, ya que han demostrado formar cadenas de proteínas en la superficie de *S. epidermidis*; por tanto, posiblemente, contribuyen a la adhesión célula-célula a través de grandes distancias. Esta capacidad podría explicar cómo las proteínas contribuyen en la etapa de agregación durante el desarrollo de la biopelícula; la formación de estructuras de fibrillas que se extienden sobre la superficie de *S. epidermidis* es dependiente de *Aap*.

En *S. aureus*, obtenido de muestras de animales con mastitis, se encuentra una proteína de la superficie de la envoltura de la pared celular denominada proteína asociada biopelícula *Bap*, la cual está implicada en la adhesión a una superficie de poliestireno, en la adhesión intercelular y la formación de biopelícula. Esta proteína también se encuentra en otras bacterias, lo cual sugiere que la familia de proteínas de la superficie *Bap* puede tener importancia generalizada en la formación de biopelícula independiente de ica.

1.6.4 Condiciones ambientales para la producción de biopelícula en *Staphylococcus*

Pocas cepas de este género y que contienen el gen ica logran la producción de biopelícula *in vitro*, sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales, algunas de ellas logran producirla. Estas condiciones se enlistan a continuación.

- *Condiciones aerobias o anaerobias.* Existen diferencias en la producción de biopelícula entre los *Staphylococcus*, de modo que se encuentra que existe transcripción del ica y la producción de PIA en *S. epidermidis* y *S. aureus* bajo condiciones anaerobias.

- *Concentración de azúcar.* La producción de PIA es mayor con la adición de D-glucosa, fructosa, D-galactosa, sacarosa, lactosa y maltosa en el medio de

crecimiento. Cramton 2001 reportó que la producción de PIA se incrementó al adicionar al medio D-glucosa, D-glucosamina o N-acetyl D-glucosamina a concentración de 0,1 %, y a concentraciones mayores es inhibida la producción de biopelícula.

- *Presencia o ausencia de hierro.* La formación de biopelícula por *S. epidermidis* se incrementa en concentraciones limitadas de hierro.
- *Magnesio.* El incremento en iones Mg^{+2} o Ca^{+2} incrementa, a su vez, la formación de biopelícula, mientras que la adición de EDTA la inhibe en *S. epidermidis*. Este efecto es resultado de la afinidad en el intercambio de cargas de la superficie y la bacteria para la adhesión primaria al sustrato.
- *Estrés osmótico.* El *S. epidermidis* incrementa la producción de biopelícula al incrementar la temperatura y la osmolaridad.
- *Etanol.* La transcripción del operon *icaADBC* se incrementa con la adición de etanol al medio de crecimiento y este efecto depende de la actividad de *IcaR*.

1.7 Mecanismos que regulan la expresión de la biopelícula

En el medio ambiente muchas bacterias viven en comunidades propiciadas por la biopelícula. Existen señales propias del medio y proteínas reguladoras que afectan la iniciación, formación y madurez de la biopelícula; estas difieren entre las especies bacterianas, lo que le permite a cada una colonizar de manera eficiente en un entorno preferido.

Entre las señales reguladoras para la formación de la biopelícula se encuentran la disponibilidad de nutrientes y la detección del *quorum sensing*; estas señales permiten cambios que afectan la madurez y la adquisición óptima de nutrientes, lo cual regula la profundidad de la biopelícula de tal manera que el máximo número de bacterias en esta se hallará a concentraciones subóptimas de nutrientes.

Lo anterior significa que en un medio rico o muy pobre en nutrientes se va a encontrar un mayor número de células en la fase plantónica, ya que existe mayor acceso a los nutrientes locales o puede migrar a un nuevo entorno. Asimismo, el control en la detección del *quorum* en la formación de canales y las estructuras a modo de pilares asegura la entrega eficiente de nutrientes a las células en una biopelícula.

1.7.1 Mecanismo de regulación del operón *ica*

La regulación de la expresión del locus *icaADBC* la media un número de factores reguladores. Estos factores incluyen proteínas reguladoras tales como *sarA* y σ^B , al igual que factores tales como *IcaR* y *TcaR*. A continuación, se describen algunos de estos factores.

- *Gen icaR*. Este gen codifica un represor transcripcional para el operón *icaADBC*, se encuentra ubicado entre la región promotora del operón *ica* y el codón de inicio de *icaA* —lo que ocasiona la represión en la expresión del operón— y actúa como un regulador negativo en la formación de biopelícula. Se ha demostrado que el represor *icaR* se une al DNA en el extremo 5' en la región de *icaA*, de manera que afecta la expresión del operón *icaADBC*. *IcaR* se conoce como el quinto gen del operón *Ica* y se transcribe de manera separada de los otros genes del operón. Los codones de inicio de *icaA* e *icaR* se encuentran separados, aproximadamente, por 163 pares de bases de ADN. Es una proteína de aproximadamente 22 KDa y perteneciente a la familia de proteínas reguladoras de transcripción conocida como *tetR*. Cuando se inactiva el gen *icaR*, los niveles de expresión de *icaA* aumentan, lo cual indica que *icaR* puede funcionar como un represor del operón *icaADBC*. En cepas a las cuales se les realizan deleciones dentro de la región que separa los genes de *icaA* e *icaR* no se afecta la expresión del producto de *icaR*, evidenciando así que el gen *icaR* no está autoregulado, característica que se conserva de igual manera tanto en la especie *S. aureus* como en *S. epidermidis*.

La transcripción de *icaA* puede ser inducida en presencia de concentraciones elevadas de NaCl, glucosa o etanol. Mientras que la actividad reguladora de *icaR* se disminuye en presencia de etanol, mas no en presencia de NaCl o glucosa. La expresión de *icaA* en cepas mutadas en el locus de *icaR* no se ve afectada por la presencia de etanol, pero sí con la presencia de NaCl o glucosa en la misma cepa. Esto permite concluir que la regulación de la expresión de *icaR* es dependiente de la presencia del etanol.

- IS256. Los elementos móviles denominados transposomas han sido relacionados con la regulación en la formación de biopelícula. Esta secuencia se denomina IS256, y se ha encontrado en varias copias en el cromosoma de algunas especies de *Staphylococcus spp*, aunque su modo de acción no se ha dilucidado por completo; se ha reportado que este elemento genético puede estar involucrado en un mecanismo de regulación negativa en los productos del operón *ica*.

- *Mecanismos externos*. Existen vías o cascadas bioquímicas que regulan la expresión de los productos del operón *ica*, debido a la presencia de sustancias,

como, por ejemplo, el etanol y el NaCl que, adicionadas al medio de crecimiento, pueden activar el operón *ica* de manera dependiente de *icaR*. Existe también otro represor de la transcripción de este operón denominado *TcaR*, el cual es miembro de la familia de reguladores transcripcionales *MarR* asociados al locus del control de la expresión de la teicoplanina.

1.7.2 Quorum sensing como regulador de la biopelícula

Varias especies del género *Staphylococcus* se han reconocido como importantes agentes etiológicos de infecciones oportunistas. Su mecanismo de acción es complejo y se compone de un amplio número de sistemas reguladores. En las primeras fases de la infección, la expresión de proteínas de superficie aumenta. Estas son claves por que le permiten a la bacteria atacar los tejidos del huésped y evadir su respuesta inmunológica. Una vez la densidad celular ha aumentado, la expresión de las proteínas celulares de superficie disminuye, lo cual permite que la expresión de los factores de virulencia aumente.

La capacidad que tienen algunas bacterias de formar biopelícula se da gracias a un sistema de comunicación entre los microorganismos denominado *quorum sensing*, el cual actúa como un auténtico lenguaje a través de señales químicas. Este sistema funciona a modo de acuerdo (*quorum*) entre las células bacterianas para la activación o represión de genes específicos, entre ellos los que regulan la producción de biopelícula mediante la liberación y la detección de ciertas sustancias llamadas autoinductores.

La respuesta de las bacterias a la comunicación entre ellas está controlada por oligopéptidos modificados que se secretan en el ambiente y sacan una respuesta reguladora en una concentración dada. El sistema de comunicación intercelular utilizado permite direccionar procesos específicos, como lo son, por ejemplo, la formación de biopelícula, la expresión de factores de virulencia, la producción de metabolitos secundarios y demás actividades que involucren densidad poblacional y sean útiles para su sobrevivencia.

Una vez las células han detectado la concentración de estas moléculas autoinductoras, obtienen una especie de información acerca de la densidad poblacional en el ambiente debido a que la concentración de estas señales es directamente proporcional al número de células. En el momento en el que se alcanza un número poblacional mínimo, es decir, ha llegado al *quorum*, las células comienzan a expresar una serie de genes con el objetivo de realizar acciones conjuntas o poblacionalmente concertadas; por esto, cuando se presenta

una densidad baja, las bacterias expresan los factores de la proteína que promueve la colonización, mientras que en la alta densidad de la célula las bacterias reprimen estos rasgos, así como la secreción iniciada de las toxinas y de las proteasas que se requieren para la difusión.

1.7.2.1 Quorum sensing y sistemas de regulación de dos componentes

La formación de biopelícula es un aspecto importante de muchas infecciones por *S. aureus*, incluyendo endocarditis, osteomielitis y las infecciones de dispositivos médicos implantados. Esto no solo con respecto a la patogénesis de la infección, sino, además, con respecto a la terapia antimicrobiana. En efecto, la presencia de biopelícula limita la eficacia de la terapia antimicrobiana hasta el punto en que, a menudo, se requiere intervención quirúrgica con el fin de eliminar el tejido infectado y/o los dispositivos implantados. Por esta razón, la investigación en los últimos años se ha encaminado a las bases moleculares de la formación de biopelícula en los *Staphylococcus spp.* Hasta la fecha, más de 20 genes están implicados en el desarrollo de biopelícula, donde, aproximadamente, la mitad de ellos cumple una función reguladora.

Los principales genes implicados en la regulación de la formación de biopelícula que presenta *S. aureus* y *S. epidermidis* son el gen regulador accesorio (*agr*) y el gen regulador accesorio estafilocócico (*sarA*); ambos locus juegan un papel importante en la regulación de diferentes mecanismos que permiten y facilitan la adhesión, diseminación y permanencia en el tejido o sitio de infección en el hospedero, así como la evasión de la respuesta inmune.

1.7.2.2 Gen regulador accesorio (*agr*)

El sistema *agr* se compone de dos unidades que se transcriben de forma separada, RNAII y RNAIII, las cuales accionan los promotores P2 y P3. La transcripción de P2 cubre un operón con cuatro genes (*agrA*, *agrC*, *agrD* y *agrB*) que son cotranscritos; *agrA* y *agrC* constituyen el módulo clásico de señalización de dos componentes (TCS), en el que *agrC* es el receptor transmembranal y *agrA* es el regulador responsable de la unión al ADN (Figura 1.8).

Ahora bien, *agrB* —una proteína transmembranal— y *agrD* se unen para generar un péptido autoinductor (PAI) constituido de 7-9 aminoácidos que contiene un anillo tiolactona, el cual, durante el crecimiento de la biopelícula se sintetiza y se secreta a través de un mecanismo que requiere múltiples peptidasas. Una vez alcanza una alta concentración se une a un receptor de superficie denominado histidina quinasa, (*agrC*), e inicia así una cascada

reguladora que controla la expresión de los factores de virulencia, tales como proteasas, hemolisinas y toxinas que provocan la dispersión de las células de la biopelícula y, a su vez, activa *agrA* regulando positivamente su propio promotor P2.

En *Staphylococcus*, el regulador *agr* es, hasta el momento, el único sistema que emplea un RNA regulador (RNAIII), ya que modula la expresión de los genes de virulencia (por lo general, a nivel traduccional), de modo que involucra la expresión de exotoxinas tales como β -toxina, α -toxina, δ -Toxina, serin proteasa, DNAsa y fibrinolisinias. La única función conocida de *agrA* en *S. aureus* es activar su propio promotor (P2), así como la del promotor P3, tal como se observa en la Figura 1.8. De esto se concluye que la autoactivación de *agr* causa un aumento exponencial en la expresión del operón P2 y los varios cientos de genes que regula positivamente RNAIII, de manera que implica una enorme carga metabólica.

La formación y la regulación de biopelícula por *Staphylococcus* es un proceso complejo y multifacético, lo cual depende del genotipo del organismo, así como de las condiciones experimentales. Así, por ejemplo, *agr* juega un papel importante en el proceso de desprendimiento. En estos, mediante microscopía confocal, mostraron que el desprendimiento de las células coincide con la expresión *agr* y se suma a la producción de un grupo de pequeños péptidos anfipáticos, conocidos como los modulinas fenol solubles (MFS) que se producen de manera *agr*-dependiente en *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Cuando la biopelícula es estática, *agr* suprime durante la fase exponencial de proteínas de unión a la superficie celular que favorecen las primeras etapas de la colonización, y aumenta la expresión de δ -hemolisina, la cual tiene un efecto negativo sobre la maduración de la estructura de la biopelícula por sus propiedades degradantes; además, sumado a la síntesis de la proteasa, *agr* disminuye la biopelícula por la degradación de proteínas fundamentales, como, por ejemplo, las adhesinas.

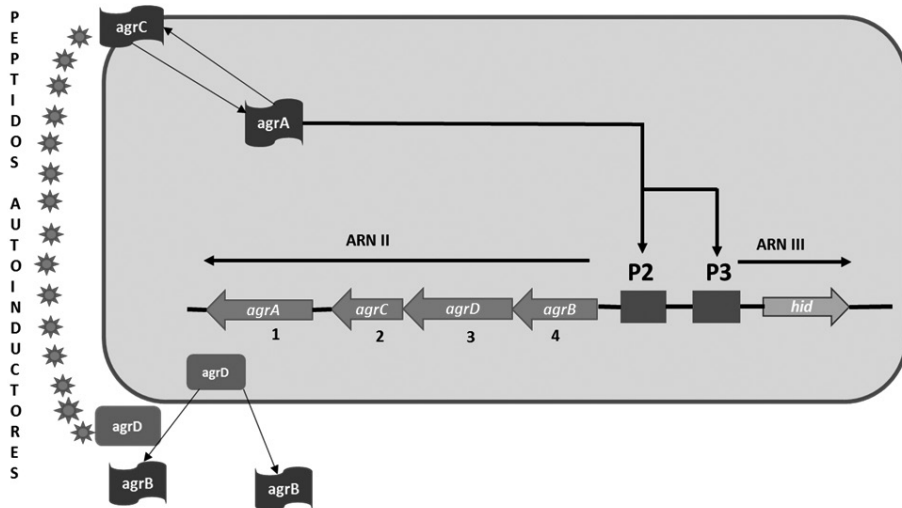
La situación es compleja en el flujo de biopelícula, aunque la expresión de *agr* aumenta enormemente la masa de la biopelícula. A medida que aumenta la edad de la biopelícula, la expresión de *agr* es significativamente menor y muchas de las bacterias pierden su viabilidad, lo que confirma su acción en la regulación de la formación de biopelícula.

1.7.2.3 Gen regulador accesorio *Staphylococcico* (*sarA*)

El gen regulador accesorio *Staphylococcico* (*sarA*) es una familia de genes que pertenece a los TCRs, los cuales se componen de proteínas de unión al

ADN y regulan la expresión de genes de virulencia en especies del género *Staphylococcus spp.*; estas proteínas potencian la expresión durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento de proteínas de adhesión y toxinas de manera directa e indirecta, actuando como un interruptor que activa la transcripción de genes de virulencia mientras reprime la síntesis de proteínas de superficie de la pared celular en *S. aureus*.

Figura 1.8 Proceso de autoinducción de agr



Nota: Comienza cuando el péptido *agrD* es procesado, de manera que este autoinductor actúa en el dominio receptor de la proteína transmembranal de *agrC* e induce así la fosforilación del dominio citoplasmático; el fosfato es transferido a *agrA*, el cual activa la transcripción desde los dos promotores agr (P2 y P3). El promotor P2 dirige la autoactivación del circuito, mientras que el promotor P3 dirige la transcripción de RNAIII, al cual regula el efector del sistema.

La familia de proteínas *sarA* se puede clasificar en tres subfamilias:

- Proteínas con un único dominio de unión al ADN (*SarA*, *SarR*, *SarT*, *SarV*, *SarX* y *rot*);
- Proteínas de doble dominio de unión al ADN (*SarS*, *Sar U*, *SarY*), y
- Proteínas homólogas a la proteína *MarR* (la cual es una proteína de virulencia encontrada y caracterizada en bacterias gramnegativas) (*MGRA*, *SarZ*).

El gen *sarA* está involucrado en la regulación de las proteínas de la pared celular y extracelular, por tanto, su acción aumenta en la fase exponencial durante la formación de biopelícula. *SarA* se requiere para activar la transcripción del locus *agr*, de modo que se une a una secuencia consenso situada entre los promotores P2 y P3 que modulan la transcripción de las moléculas de RNAII y RNAIII.

El gen *SarA* posee funciones reguladoras independientes de su interacción con *agr* y reprime la expresión gen colágeno adhesina (*cna*) mediante la unión a elementos asociados con el promotor de *cna*. También se ha sugerido que *sarA* controla la expresión de una manera directa. Sin embargo, parece que *sarA* actúa como un activador, ya que, cuando se presenta una mutación en el locus *sarA*, se produce una reducción concomitante en la activación y expresión de *fnbA*; también modula la producción de varias proteasas de una manera independiente de *agr*.

La acción de *sarA* y la de *agr* son opuestas en la formación de biopelícula. La mutación de *sarA* puede estar relacionada con una mayor susceptibilidad a la acción de diversos antibióticos, como, por ejemplo, daptomicina, linezolid y vancomicina, específicamente en bacterias formadoras de biopelícula. En condiciones *in vitro*, este aumento en la susceptibilidad fue evidente incluso después de la reducción en la capacidad de un mutante *sarA* para formar una biopelícula. En contraste, la inducción en la expresión del locus *agr* se muestra con el desprendimiento de células de *S. aureus* aisladas de una biopelícula establecida, lo que resulta en el aumento de la susceptibilidad a diversos antibióticos, incluyendo rifampicina y levofloxacina. Otros informes han demostrado que los mutantes *agr* se acumulan dentro de una biopelícula y, finalmente, se convierten en la subpoblación predominante. También se ha establecido que la pérdida de la función *agr* puede conferir una ventaja selectiva *in vivo*, en particular bajo la presión de la terapia con vancomicina.

Estos resultados sugieren que las funciones opuestas de *sarA* y *agr* en la formación de biopelícula pueden correlacionarse de forma directa con la susceptibilidad a los antibióticos; con la expresión de *sarA* se conduce a la resistencia intrínseca de biopelícula, y la expresión de *agr* tiene el efecto contrario. En razón a lo anterior, es importante definir las relaciones epistáticas entre *sarA* y *agr* en el contexto de la formación de biopelícula. En concreto, la mutación de *agr* resulta en reducción de la producción de estas enzimas, mientras que la mutación de *sarA* tiene el efecto contrario. Además, el ADNe ha demostrado que contribuye a la formación de biopelícula en *S. aureus*.

1.7.3 Regulación por medio de la proteína ESP del *Staphylococcus epidermidis*

El *S. aureus* es el agente causal de infecciones severas, además de que posee cepas resistentes a la meticilina (MRSA) y a la vancomicina (VRSA) que aumentan el nivel de dificultad del tratamiento para estos pacientes, así como que se incrementa la tasa de mortalidad. En países industrializados, la tercera parte de su población tiene al *S. aureus* como uno de los mayores reservorios en cavidad nasal de manera asintomática, pero la colonización de esta bacteria incrementa el riesgo de sufrir infecciones. Esta población portadora es capaz de evadir la colonización del *S. aureus*, posiblemente, a causa de la ecología bacteriana y las interacciones entre microorganismos comensales y patógenos.

El *Staphylococcus epidermidis*, en cuanto bacteria comensal, tiene un papel inhibitorio sobre el patógeno *S. aureus*, cuando se realizan cocultivos de bacterias de *S. epidermidis* y *S. aureus*, o sobrenadante de cultivo de *S. epidermidis* con *S. aureus*; en estos cocultivos se produce la inhibición de la producción de biopelícula por parte de *S. aureus*, y con el sobrenadante su destrucción, lo cual clasifica al *S. epidermidis* en tipo inhibitorio o no inhibitorio de la formación de biopelícula. El sobrenadante de cultivo de *S. epidermidis* tipo inhibitorio destruye la biopelícula preexistente del *S. aureus*.

45

En los humanos existe un factor inhibitorio del *S. epidermidis* de cavidad nasal que no permite la colonización del *S. aureus*. Este factor es una proteína de PM de 27 kDa denominada serín proteasa (Esp), responsable de la destrucción de la biopelícula producida por el *S. aureus*.

Por otra parte, los queratinocitos (células del sistema inmune innato) producen péptidos antimicrobianos como la beta defensina 2 (hBD2). La Esp no tiene acción bactericida y el péptido hBD2 tiene baja acción bactericida sobre el *S. aureus* productor de biopelícula. Pero la acción combinada de Esp y hBD2 hace que la acción bactericida del péptido sea efectiva en el *S. aureus* productor de biopelícula. La acción de Esp está dada en inhibir el crecimiento bacteriano, tiene actividad bactericida y compite específicamente por las moléculas de adhesión bacteriana. Otras proteínas que degradan la matriz de la biopelícula son la DNasa bovina, la dispersina B y la lysostafina.

Referencias

1. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomater*. 2012;33:5967-
2. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LTT, Hamat RA, Karunanidhi A, et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Biotech*. 2012;12:972-976.
3. Banner MA, Cunniffe JG, Macintosh RL. Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J Bacteriol*. 2007;189:2793-804.
4. Beenken K. Epistatic relationships between *sarA* and *agr* in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS one*. 2010;5:12.
5. Boles B, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilm. *PLoS pathogens*. 2008;4:e1000052.
6. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilm in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;52:13-22.
7. Caetano L. MAARF. Biofilm and bacterial virulence. *Rev Med Microb*. 2011;22:5.
8. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Bacterial communications in implant infections: a target for an intelligence war. *Int J Artif Organs*. 2007;30:757-63.
9. Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in *Staphylococci*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:38.
10. Chagnot C, Listrat A, Astruc T, Desvaux M. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. *Cel Microbiol*. 2012;14:1687-96.

11. Cheung AL, Nishina KA, Trottonda MP, Tamber S. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int J Bioch Cell Biol*. 2008;40:355-61.
12. Divakar S, Misba L, Khan A. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimic Resis Inf Con*. 2019;8(76).
13. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8,623-33.
14. Forbes W. *Diagnostic microbiologic*. 12^a ed. Buenos Aires; 2009.
15. Ganesh VK, Barbu EM, Deivanayagam CC. Structural and biochemical characterization of *Staphylococcus aureus* clumping factor B/ligand interactions. *J Biol Chem*. 2011;286:25963-72.
16. García, L. Exopolisacáridos y otros factores de virulencia en cepas de *Staphylococcus* aisladas de leche bovina, Tesis docotral. Universidad de León, España; 2010.
17. Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK. The clinical impact of bacterial biofilm. *Int J Oral Sci*. 2011;3:55-65.
18. Hello M, Caroff N, Jacqueline C, Caillon J, Potel G, Batard E. Influence of the AtlE autolysin on the activity of cell wall-active agents against *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:204-6.
19. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*. 2010;465: 346-351.
20. Jayaraman A, Wood TK. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilm and disease. *Ann Rev Biomed Eng*. 2008;10:145-67.
21. Josefsson E, Higgins J, Foster TJ, Tarkowski A. Fibrinogen binding sites P336 and Y338 of clumping factor A are crucial for *Staphylococcus aureus* virulence. *PloS one*. 2008;3:e2206.
22. Karunakaran E, Mukherjee J, Ramalingam B, Biggs CA. "Biofilm": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilm. *App Microbiol Biotechnol*. 2011;90:1869-81.

23. Kirkpatrick CL, Viollier PH. Cell dispersal in biofilms: an extracellular DNA masks nature's strongest glue. *Mol Microbiol*. 2010;77:801-4.
24. Kogan G, Sadovskaya I, Chaignon P, Chokr A, Jabbouri S. Biofilm of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Letters*. 2006;255:6-11.
25. Koskela A, Nilsson-Augustinsson A, Persson L, Soderquist B. Prevalence of the *ica* operon and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. *Europ J Clin Microbiol & Infect Dis*. 2009;28:655-60.
26. Lauderdale KJ, Malone CL, Boles BR, Morcuende J, Horswill AR. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *J Orthop Res Soc*. 2010;28:55-61.
27. Liu L, Shen X, Yu J, Cao X, Zhan Q, Guo Y, et al. Subinhibitory concentrations of fusidic acid may reduce the virulence of *S. aureus* by down-regulating *sarA* and *saeRS* to reduce biofilm formation and α -toxin expression. *Front Microbiol*. 2020 Feb14;11:25. doi: 10.3389/fmicb.2020.00025. eCollection 2020.
28. Lopez D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilm. *Cold Spr Harr Persp Bio*. 2010;2,a000398.
29. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher, L, O'Neill, E, O'Gara, JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015;28:1.
30. McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10:39-50.
31. Menzies BE. The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;16:225-9.
32. Montanaro L, Poggi A, Visai L, Ravaioli S, Campoccia D, Speziale P, et al. Extracellular DNA in biofilm. *Int J Art Org*. 2011;34:824-31.

33. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *PLoS pathogens*. 2008;4:e1000213.
34. Murray P. *Microbiol Méd*. Madrid: Elsevier; 2009.
35. Nadell CD, Xavier JB, Levin SA, Foster KR. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilm. *PLoS biology*. 2008;6:e14.
36. Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in Staphylococci. *Ann Rev Gen*. 2009;42:541-64.
37. O’Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;270:179-88.
38. Oliveira AC. Bacterial biofilm with emphasis on coagulase negative staphylococci. *J Venou Anim Tox Inclu Trop Dis*. 2008;14:572-96.
39. Oliveira A, Cunha M. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Not*. 2010;3:260.
40. Otto, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Ann Review Med*. 2013;64:175-88.
41. Ranjit DK, Endres JL, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* CidA and LrgA proteins exhibit holin-like properties. *J Bacteriol*. 2011;193:2468-76.
42. Rohde H, Frankenberger S, Zahringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of bio-material-associated infections. *Euro J Cell Biol*. 2010;89:103-11.
43. Rowe SE, Mahon V, Smith SG, O’Gara JP. A novel role for SarX in *Staphylococcus epidermidis* biofilm regulation. *Microbiol*. 2011;157:1042-9.
44. Shinji H, Yosizawa Y, Tajim A. Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2011;79:2215-23.

45. Shukla S, Rao T. Staphylococcus aureus biofilm removal by targeting biofilm associated extracellular proteins. Indian J Med Res. 2017;146:S1-S8. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_410_15
46. Stevens NT, Greene CM, O’Gara JP, Humphreys H. Biofilm characteristics of *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with device-related meningitis. J Med Microbiol. 2009;58:855-62.
47. Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Tajima, A., Iwase, T., Mizunoe, Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. J Bacteriol. 2013;195:1645-1655.
48. Tetz VV, Tetz GV. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilm. DNA Cell Biol. 2010;29:399-405.
49. Tristan A, Ferry T, Durand G, Dauwalder O, Bes M, Lina G, et al. Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect. 2007;65:Suppl 2,105-9.
50. Wamel WJB van. *Staphylococcus aureus* infections, some second thoughts. Curr Opin Infect Dis. 2017 Jun;30:303-308.
51. Xia G, Kohler T, Peschel A. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. Inter J Med Microbiol. 2010;300:148-54.

2 Biopelícula: aspectos clínicos y de laboratorio

Jeannette Navarrete O.
Liliana Muñoz M.

Como se mencionó en el capítulo anterior, la biopelícula ha cobrado gran interés en la actualidad gracias a su participación en diferentes procesos infecciosos, ya que incrementa los mecanismos de resistencia bacteriana de manera que aunado a los factores de virulencia que poseen las bacterias, logran sobrevivir exitosamente a tratamientos con antibióticos o a la respuesta inmune del organismo infectado.

Los microorganismos productores de biopelícula requieren de una variedad de entornos que proporcionan límites de difusión para la bacteria y microgradientes ambientales que le permiten a su fisiología individual adaptarse. Además, la proximidad bacteriana dentro de la biopelícula lleva a que se originen comportamientos coordinados en los que se da comunicación celular por medio de señales, entre las cuales la más documentada es el *quorum sensing*.

53

2.1 Importancia clínica de la biopelícula

Aunque normalmente se asocian las biopelículas bacterianas a procesos infecciosos, es necesario señalar que algunas de estas tienen un papel protector. Es así como las biopelículas de lactobacilos presentes en la vagina fermentan el glucógeno producido por las células epiteliales al ser inducidas por los estrógenos, de modo que producen ácidos que disminuyen el pH vaginal y previenen de esa manera la colonización por microorganismos patógenos. La desaparición de esta biopelícula, con la consiguiente neutralización del pH, suele venir acompañada del desarrollo de microorganismos patógenos, como, por ejemplo, *Gardnerella vaginalis* y otros microorganismos anaerobios.

Otro ejemplo de biopelículas benéficas lo constituye la biopelícula formada sobre la superficie de los dientes, la cual los protege de la colonización por otros patógenos exógenos. Esta biopelícula suele estar compuesta por 20 a 30 especies bacterianas distintas, entre las que se destacan los *Streptococcus* y *Actinomyces spp.*

La infección de endodoncia causada por bacterias productoras de biopelícula en el sistema de conductos radiculares y en la superficie son de difícil erradicación y se hacen resistentes a una variedad de productos de higiene oral. Para evitar la producción de biopelícula es necesario prevenir la caries dental, la gingivitis y la periodontitis.

Actualmente, los microorganismos de la flora normal de los seres humanos son los que, a menudo, se han relacionado con la infección y la colonización de implantes médicos, muy comunes en la medicina moderna. En Estados Unidos se han reportado cerca de 100 millones de dispositivos utilizados por año en solo catéteres uretrales. La tasa de infección en sondas uretrales sin cobertura antibiótica es cerca del 28 %, y en catéteres puede llegar a ser hasta de un 100 %, lo que provoca una alta tasa de mortalidad.

Por otra parte, existen numerosas evidencias epidemiológicas que relacionan las biopelículas con distintos procesos infecciosos (véase la Tabla 2.1)

Entre estas se encuentran los procesos infecciosos con biomaterial colonizado con bacterias adhesivas y formadoras de biopelícula; resistencia mediada por la biopelícula bacteriana a los mecanismos de defensa del huésped y a la terapia antibiótica; infecciones persistentes y resistentes al tratamiento antimicrobiano causadas con mucha frecuencia por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*; así como presencia de inflamación, tejido celular dañado y necrosis en la interfase tejido-implante generado por partículas debridadas del biomaterial.

Además de los microorganismos mencionados que se relacionan con procesos infecciosos y la biopelícula, le sigue un cierto número de especies emergentes como, por ejemplo, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. warneri* y algunas especies de *Enterococcus spp.* También, ocasionalmente, algunas especies de levaduras del género *Candida spp.* La frecuencia relativa de la infección depende, en cierta medida, de la ubicación del dispositivo, pero *S. epidermidis* es el microorganismo aislado más frecuente.

Tabla 2.1 Lista parcial de infecciones humanas en las que están involucradas biopelículas bacterianas

Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora de biopelícula
Caries dental	Cocos grampositivos (p. ej., Streptococcus)
Periodontitis	Bacterias anaeróbicas orales gramnegativas

continúa (pág. 55)

Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora de biopelícula
Otitis media	Cepas no tipables de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones del músculo-esqueleto	Cocos grampositivos (p. ej., <i>Staphylococcus</i>)
Fascitis necrotizante	<i>Streptococcus</i> grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas
Prostatitis bacteriana	<i>Escherichia coli</i> y otras bacterias gramnegativas
Endocarditis de la válvula nativa	<i>Streptococcus</i> del grupo "viridans"
Neumonía por fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Infecciones asociadas a atención en salud (IAAS)	
Neumonía (cuidados intensivos)	Bacilos gramnegativos
Suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>aureus</i>
Dispositivos ortopédicos	
Prótesis del pene	
Orificios de salida	
Válvulas mecánicas del corazón	
Vías arteriovenosas	
Bucles esclerales	Cocos grampositivos
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y cocos grampositivos
Cistitis por catéteres urinarios	<i>Escherichia coli</i> y otros bacilos gramnegativos

continúa (pág. 56)

Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora de biopelícula
Peritonitis por diálisis peritoneal	Una variedad de bacterias y hongos
DIU	Actinomyces israeli y entre otros
Tubos endotraqueales	Una variedad de bacterias y hongos
Catéteres hickman	S. epidermidis y Candida albicans
Catéteres centrales venosos	S. epidermidis y otros
Injertos vasculares	Cocos grampositivos
Bloqueo del conducto biliar	Una variedad de bacterias entéricas y hongos

Fuente: Wolcott R, et al. 2013.

De los cocos grampositivos, los *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) son los patógenos aislados en un alto porcentaje en IAAS. Corresponden en un 80 % a *S. epidermidis* y se encuentran también en infecciones crónicas y aislados en pacientes inmunocomprometidos. La patogénesis de la infección por *S. epidermidis* parece estar vinculada a la capacidad de formar comunidades en multicapas en la superficie de los polímeros. En el 2002, Da Silva et al. (35) realizaron un estudio comparativo de los microorganismos de flora normal y los aislados de hemocultivo en el que reportaron que el 79 % de los aislados de hemocultivos fueron productores de biopelícula, en comparación con el 58 % de los aislados de la flora de la piel de infantes infectados y no infectados. Adicionalmente, reportaron que niños con bacteremia fueron colonizados con más frecuencia con *S. epidermidis*.

El *S. aureus* se relaciona con mayor frecuencia a infecciones de dispositivos biomédicos causa de la abundancia de las toxinas que elimina, moléculas adhesivas y otros factores de virulencia expresados por este microorganismo que contribuyen a la morbilidad por implantes biomédicos, a pesar de que coloniza en forma no patógena, boca, nariz y oídos en gran parte de la población sana.

Estos estudios permiten evidenciar las altas tasas de incidencia de infecciones nosocomiales a nivel mundial. Datos tomados por el sistema de

vigilancia m llr4445 Alemania desde enero de 1990 hasta mayo de 1999 muestran que los *Staphylococcus spp.* fueron los patógenos aislados de manera más frecuente con un 37 %, de los cuales el 12 % eran *Staphylococcus aureus* provenientes de infecciones del torrente sanguíneo de las unidades de cuidados intensivos; sin embargo, el reconocimiento de la infección se ve obstaculizada por la dificultad para distinguir la cepa infectante de la flora normal.

De acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Nosocomial, en el 2003 el 80 % de las infecciones nosocomiales en las unidades de cuidado intensivo fueron causadas por *S. aureus* resistente a la meticilina, lo que dificulta las opciones terapéuticas al reducirlas a antibióticos tales como la vancomicina y la teicoplanina. Sin embargo, el uso incrementado de este antibiótico resultó en *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). La tasa de prevalencia de MRSA en los hospitales de Estados Unidos ha alcanzado el 50 %, en trabajadores de la salud en el Reino Unido se ha aislado en un 44 %, mientras que en Japón se ha aislado en el 60-70 % de los pacientes hospitalizados.

En países desarrollados se ha reportado que entre el 5 % y el 10 % de los pacientes que ingresan a los centros de atención en salud tienen el riesgo de contraer una o más infecciones. Las infecciones asociadas a dispositivos invasivos, utilizados de manera especial en las UCI, constituyen una grave amenaza para la seguridad de los pacientes. Según un informe del Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, las tasas medias acumuladas de infecciones relacionadas con el uso de ventilación mecánica, catéteres centrales y catéteres urinarios fueron de 3,9, 4,0 y 5,4 por 1000 días de uso, respectivamente.

Por otra parte, la producción de biopelícula impone una limitación en el uso y diseño de dispositivos oculares tales como las lentes intraoculares, lentes de contacto posterior, hebillas esclerales, tapones conjuntivales, dispositivos de intubación lagrimal e implantes orbitales. En la ausencia de materiales abióticos, la biopelícula se produce en la cápsula y en el estroma corneal, por tanto, se ha convertido en una prioridad desarrollar nuevas estrategias orientadas a evitar o prevenir su formación o a erradicar la infección por el microorganismo productor de biopelícula.

En Colombia, según reportes del Boletín Epidemiológico Distrital del 2010 acerca de infecciones asociadas al cuidado de la salud de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, las infecciones asociadas a dispositivos invasivos en las UCI tienen una tasa de septicemia asociada a catéter central de 5,1 casos por cada 1000 días de uso de catéter, y en segundo lugar se encuentran las

infecciones urinarias asociadas a sonda vesical con una tasa de 3,9 casos por cada 100 días.

2.2 Biopelícula e implantes médicos

Las biopelículas sobre implantes médicos pueden estar compuestas por una única especie o por múltiples especies bacterianas tanto grampositivas o gramnegativas como de levaduras. Estos microorganismos proceden de la piel del propio paciente, del personal sanitario, del ambiente o de procesos infecciosos, especialmente de sepsis. Cuando un implante se contamina con bacterias, varios factores influyen en que se desarrolle una biopelícula sobre este. Inicialmente, los microorganismos deben adherirse a la superficie del implante el tiempo suficiente para que la adherencia sea irreversible.

Esta adherencia depende del flujo de líquido al que está sometido el implante, del número de bacterias que se adhieren y de sus características físico-químicas. En el caso de catéteres venosos centrales, la superficie del catéter acaba recubierta de proteínas del plasma y otras proteínas de los tejidos como, por ejemplo, fibronectina, fibrinógeno, laminina, etc., las cuales van a favorecer la unión de las bacterias que posean adhesinas para ellas. En el caso de sondas urinarias, la fuente de contaminación puede ascender desde la bolsa recolectora y entrar en el lumen del catéter a través del exudado en el punto de entrada del catéter. En este caso, las bacterias se unen directamente al material del catéter sin que intervengan proteínas del paciente.

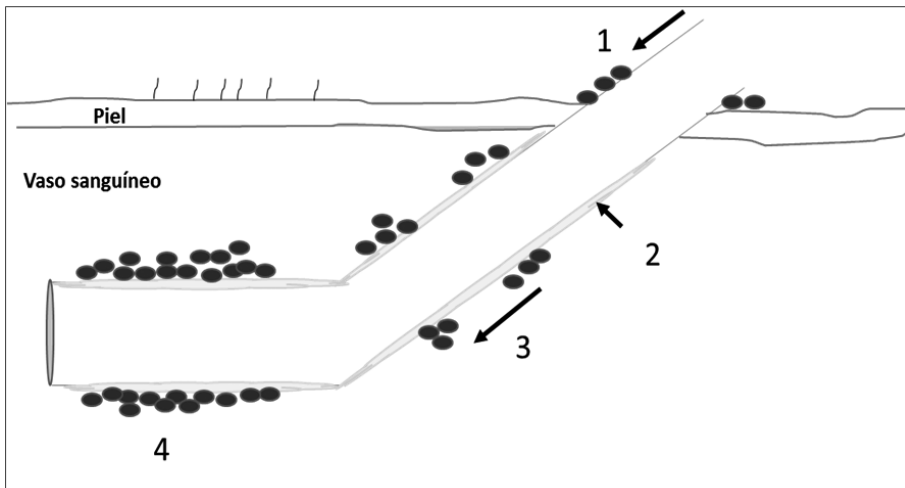
Otra característica importante es la hidrofobicidad de la superficie bacteriana frente al implante médico, las fuerzas de Van der Waals y la polaridad. La interacción directa entre la bacteria y la superficie del polímero juega un papel crítico en las primeras etapas de los procesos de adhesión *in vitro* y, probablemente, también *in vivo* (Figura 2.1). El crecimiento de la biopelícula sobre superficies sintéticas de los implantes médicos produce consecuencias clínicamente serias que llegan a ser persistentes y culminan en infecciones crónicas.

El *Staphylococcus spp.* es el género más común causante de la formación de biopelícula en implantes ortopédicos, incluyendo prótesis de articulaciones, alambres, fijadores externos, placas, tornillos y clavos, entre otros. Sin embargo, otros dispositivos médicos permanentes son propensos a la infección por *Staphylococcus spp.* formadores de biopelícula, e incluyen: ventiladores, catéteres intravenosos, las unidades de presión arterial invasiva, bombas de infusión, desfibriladores cardíacos, válvulas cardíacas mecánicas, marcapasos, aspiradores, materiales de puntadas, derivaciones del

sistema nervioso central, implantes quirúrgicos cosméticos e implantes de pene, entre otros.

Una vez adherida, la biopelícula actúa como una fuente de infección, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos. Los mecanismos por los que la biopelícula produce los síntomas de la enfermedad aumentan en razón a la alta susceptibilidad que se produce, puesto que activan las defensas del huésped y estimulan la liberación de mediadores inflamatorios, citoquinas, radicales de oxígeno y enzimas lisosomales; como consecuencia, ocurre daño proteico tisular e inflamación crónica, lo que, posteriormente, se agrava por actividades bacterianas y toxinas. A su vez, se liberan grupos de bacterias al torrente sanguíneo que se vuelven resistentes a la acción fagocitaria de las células del sistema inmune (tema que se trata a profundidad en el capítulo 3) y, por otra parte, constituyen un nicho para la aparición de cepas resistentes a los antibióticos.

Figura 2.1 Modelo esquemático de las fases que intervienen en la formación de biopelícula *S. epidermidis* y factores bacterianos implicados



Nota: 1) fijación de la superficie del polímero (fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, SSP-1/SSP-2: proteínas de superficie del *Staphylococcus*; Atle:autolisina; PS/A: polisacárido/adhesina); 2) acondicionamiento de la biopelícula (fibrina, fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, factor Von Willebrand); 3) fijación de la superficie del polímero cubierta con proteínas de la matriz extracelular (Atle, ácido teicoico, Fbe: fibrinógeno-proteína de unión, SdrG: proteínas G con repeticiones serina-aspartato); 4) proliferación bacteriana en múltiples capas: adhesina de polisacárido intercelular; acumulación de proteínas asociadas).

Fuente: modificado de Von Eiff, Peters y Heilmann.

2.3 Biopelícula e infecciones adquiridas en hospital (IAH)

Uno de los hábitats que usan los microorganismos para producir biopelícula es el cuerpo humano, donde se estima que más del 65 % de las infecciones producidas en él están relacionadas con la producción de biopelícula; en su mayoría, estas infecciones afectan el tracto urinario, los pulmones y la sangre, a través de catéteres o ventiladores.

Las infecciones adquiridas en hospital (IAH) o nosocomiales, según la Organización Mundial de la Salud, son las que se contraen durante una estancia en un centro de salud y si aparecen al menos 48 horas después del ingreso a dichas instalaciones. Este periodo puede extenderse hasta los 30 días si en el paciente se realizó una cirugía y se debe controlar por un año si se colocaron en prótesis, válvulas cardíacas etc. Los pacientes quirúrgicos igualmente están altamente relacionados con infecciones urinarias asociadas a catéteres de duración prolongada, producidas por gérmenes productores de biopelícula. Se estima que más del 60 % de las IAH están relacionadas con microorganismos productores de biopelícula, lo que conlleva a prolongar los días de hospitalización e incrementar los costos por paciente.

60

En los neonatos que se encuentran en unidades de cuidado intensivo se ha observado que el mayor agente causal de estas infecciones es el *Staphylococcus epidermidis*, debido a la propiedad que tiene de producir biopelícula. Se ha observado que esta bacteria produce biopelícula *in vivo* gracias a la influencia ambiental, así como a la concentración de glucosa en el sitio de persistencia bacteriana.

Los *Staphylococcus coagulasa negativa* son las bacterias que con mayor frecuencia causan infecciones asociadas a dispositivos médicos y bacteremias nosocomiales. Estos microorganismos están involucrados en el 57 % de las infecciones del sistema nervioso central, en el 60 % de las infecciones relacionadas con catéter, en el 45 % de las infecciones de prótesis de válvulas cardíacas y en el 35 % de las infecciones de prótesis articulares.

Las características generales de las infecciones agudas y crónicas, así como varios ejemplos relacionados con bacterias productoras de biopelícula se describen en la Tabla 2.2.

El *Staphylococcus aureus*, agente causal de infecciones nosocomiales de áreas quirúrgicas y adquiridas en la comunidad, son en la actualidad un grave problema de salud pública; este agente se adhiere a implantes médicos y a tejido del huésped, de modo que establece la biopelícula y esto permite la persistencia de las infecciones crónicas, la resistencia a antimicrobianos y

la evasión de la respuesta inmune del huésped, lo cual hace que estas infecciones sean de difícil erradicación.

Tabla 2.2 Ejemplos de infecciones crónicas o agudas relacionadas con microorganismos productores de biopelícula

		Modelos				
		Patología	Agente	Características	Curso	Tratamiento
Tipos de infección	Aguda	Tipos de infección	S. aureus	Resolución rápida con drenaje y antibióticos apropiados	Días	Antibiótico por corto tiempo
	Crónica	Tuberculosis	M. tuberculosis	El huésped fracasa en la eliminación del patógeno intracelular. Hay reactivación de la infección latente con compromiso inmunitario	Meses a años	Antibiótico por largo tiempo
	Por producción de biopelícula asociada a dispositivo	Infecciones en catéter urinario	P. mirabilis MRSA	Habilidad del organismo para migrar en el dispositivo enfermedad subyacente	Días	Remover dispositivo y antibiótico
		Infección en prótesis, válvulas cardíacas	S. epidermidis	Riesgo de infección secundaria y de embolia	Semanas	Antibiótico, remoción quirúrgica
	Por producción de biopelícula no asociada a dispositivo	Caries dental	S. mutans	Inicio incierto, desequilibrio ecológico	Años	Físico, preventivo (dieta/higiene)
		Pneumonía con fibrosis quística	P. aeruginosas	Deterioro de la función del hígado	Años	Antibiótico por largo tiempo, fisioterapia

Fuente: Modificado de Ebrej, Hamilton y Lappin-Scott.

Los enterococos, que colonizan el intestino y lo pueden lograr en torrente sanguíneo produciendo bacteremia, son resistentes a la vancomicina y no están asociado a hospitalizaciones ni tratamientos previos con antibiótico; los pacientes son colonizados en la comunidad y tienen un factor que predispone a la infección clínica.

2.4 Mecanismos de resistencia de la biopelícula

La biopelícula se considera un mecanismo de resistencia adaptativo en el que, debido a la proximidad espacial entre las células bacterianas, se puede llegar a incrementar la transferencia horizontal de genes por plásmidos o fagos. La infección por biopelícula es difícil de erradicar dada su resistencia, definida como la habilidad de un microorganismo para crecer en presencia de una elevada concentración de antimicrobiano o un pequeño grupo de cepas, en las cuales la concentración mínima inhibitoria (MIC) se ha incrementado. No obstante, en la biopelícula no es necesario que se cumplan estos criterios convencionales, pues en ella se entiende como un incremento de la resistencia de las células atacadas.

Los mecanismos por los cuales se hacen resistentes aún no son completamente claros, pero se han considerado los siguientes: la inactivación de antibióticos por polímeros extracelulares o modificaciones enzimáticas; la baja disponibilidad de nutrientes, lo que contribuye a una baja tasa de crecimiento; los cambios fenotípicos que adquiere la población bacteriana dentro de la biopelícula, y la persistencia bacteriana; solos o en combinación, estos factores se usan para explicar la supervivencia de las bacterias dentro de estas comunidades.

La biopelícula contiene en su interior una gran cantidad de agua y solutos del tamaño de los antibióticos, por lo cual estos podrían difundirse fácilmente dentro de la matriz. Sin embargo, la movilidad física de los antibióticos en la biopelícula no asegura que el antibiótico penetre dentro de este. La penetración es restringida debido a que la matriz de exopolisacáridos limita la difusión de sustancias y la unión del antimicrobiano, de modo que proporciona una efectiva resistencia a las células en su interior contra grandes moléculas tales como antimicrobianos, proteínas, lisozimas y componentes del sistema inmune del hospedero como lo son, por ejemplo, las proteínas del sistema de complemento.

Por otra parte, la carga negativa de los exopolisacáridos es muy efectiva en la protección celular contra antibióticos cargados positivamente como los aminoglucósidos, a causa de la restricción de la permeabilidad durante

toda la unión. En otros casos, como, por ejemplo, en biopelículas formadas por *pseudomonas*, se ha podido demostrar un sinergismo entre la difusión retardada del antibiótico y la degradación de este en el interior. La matriz de exopolisacáridos puede actuar como una barrera retardando la difusión del antimicrobiano, lo que disminuye la concentración del antibiótico que ingresa a la biopelícula a fin de que en su interior enzimas semejantes a las lactamasas lo destruyan y lograr así una resistencia efectiva.

Este sinergismo es análogo al que existe entre el interior de la membrana y la resistencia a fármacos por las bombas de exclusión que transportan antimicrobianos a través de esta barrera permeable, tales como los descritos para *E. coli* (AcrAB-TolC), localizados tras la membrana, que actúan como una bomba de multiresistencia semejante a la bomba de exclusión del cloramfenicol CmlA localizada en el citoplasma, la cual capta el cloramfenicol y se lo presenta a la bomba Mex, que se encarga de expulsarlo de la célula.

Un factor considerado responsable de la resistencia de la biopelícula es la disminución de la tasa de crecimiento; virtualmente, todos los antibióticos son muy efectivos en el ataque rápido de las células en crecimiento, condición que es absolutamente requerida por algunos antibióticos para estar en capacidad de atacar.

Otro mecanismo por el cual la disminución del crecimiento contribuye a la resistencia de la biopelícula es el gradiente químico que se establece adentro. El oxígeno es conocido por modular la acción de los aminoglucósidos y los gradientes de pH pueden impactar de forma negativa la eficiencia de los antibióticos.

El último factor considerado recientemente es la persistencia y la tolerancia, en los cuales las bacterias de la biopelícula no solo evaden el ataque de los antibióticos, sino que también resisten desinfectantes químicos tales como el hipoclorito y el glutaraldehído. Las células persistentes pueden constituir una pequeña fracción de la población total, pero estas pocas células son altamente protectoras, semejantes al estado de espora de los *Bacillus*.

2.5 Métodos de diagnóstico de biopelícula

2.5.1 Detección genotípica de la biopelícula: modelo de estudio *S. aureus*

2.5.1.1 Determinación genotípica del operón *icaADBC*

Como se analizó en el primer capítulo, mediante estudios moleculares se ha evidenciado que el operón *ica* es fundamental para la codificación del

exopolisacárido que envuelve las microcolonias bacterianas. Este operón lo conforman cuatro genes estructurales denominados *icaADBC* y un gen regulador conocido como *icaR*, el cual codifica un represor transcripcional para *icaADBC* que se encuentra limitando la región promotora del operón y el codón de inicio de *icaA*, de modo que actúa como un regulador negativo en la expresión.

Si se tiene en cuenta la importancia inherente a la función reguladora del *icaR* en la síntesis de la biopelícula bacteriana, así como la falta de estudios para usarse como blanco terapéutico alternativo a la terapia antimicrobiana en sepsis ocasionadas por *Staphylococcus spp*, el grupo REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca se ha propuesto como objetivo de investigación el análisis de producción de biopelícula, así como el diseño y el uso de péptidos antimicrobianos (PAM) dirigidos hacia la inactivación del *icaR*, con el fin de inhibir la formación de biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* y *aureus* en un modelo *in vitro*. Esta estrategia se presenta como una alternativa terapéutica frente al uso de antibióticos que en la actualidad son ineficaces debido a la resistencia bacteriana, lo cual se considera un problema de salud pública.

Para la detección genotípica del operon *icaADBC* e *icaR* se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN aislado, de acuerdo con el protocolo del fabricante (*Easy-DNA Kit* de Invitrogen, *Kit Wizard® Genomic DNA Purification A1123* PROMEGA), adicionando inicialmente 2 mg/mL de lisozima. Se utilizó como control negativo la cepa ATCC 12228 de *S. epidermidis* y como control positivo la cepa ATCC 35984. El protocolo de PCR se realizó tal como se describe a continuación.

2.5.1.1.1 Diseño de cebadores para la determinación del operón *icaADBC* e *icaR*

En la base de datos de Genbank se tuvo que realizar una búsqueda de cinco secuencias diferentes para cada uno de los genes descritos de los operones *icaADBC* e *icaR* en *Staphylococcus*; luego, en cada gen se ingresan las secuencias encontradas en el programa Clustal W, con el fin de someterlas a alineamiento múltiple y determinar la homología entre ellas. Luego de esto se diseñan los primers para los genes *icaC* e *icaB* en el programa Primer3 (véase la Tabla 2.3). Un modelo de este diseño se explica a continuación.

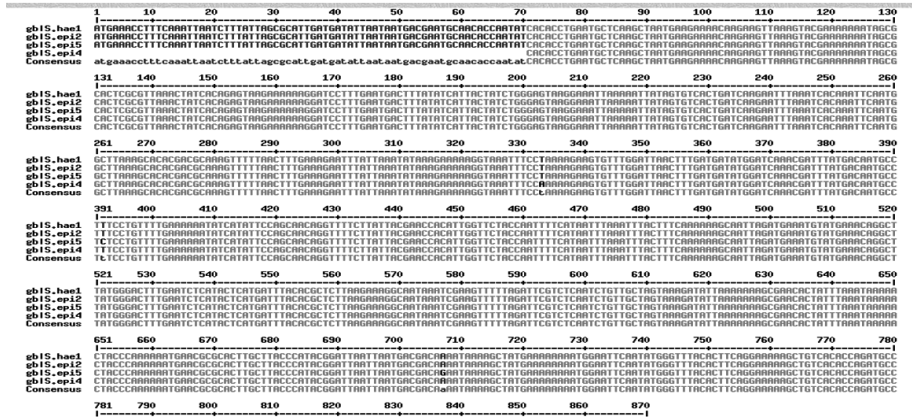
En la obtención de los primers para los genes *icaB* e *icaC* se utilizó la base de datos del NCBI; se toman cuatro reportes del gen completo para cada gen en bacterias grampositivas y se realizan los alineamientos respectivos mediante el programa MultAling con el fin de buscar la secuencia consenso (véanse las figuras 2.2 y 2.4).

Tabla 2.3 Secuencia de primer par para la detección del operon icaA_{DBC}, elemento regulador icaR e IS256

Gen	Secuencia del primer	Localización en el locus ica	Tamaño de amplificación en pb
icaR	Forward 5`- TAA TCG CGA ATT TTT GTG AA -3`.	107	469
	Reverse: 5`- AAC GCA ATA ACC TTA TTT TCG-3`	575	
icaA	Forward 5`- ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA -3`	1824	103
	Reverse 5`- GGA AAT GCC ATA ATG ACA AC-3`	1926	
icaD	Forward 5`- ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG -3`	1963	198
	Reverse 5`- CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA -3`	2160	
icaB	Forward 5`- CTG ATC AAG AAT TTA AAT CAC AAA-3`	2494	302
	Reverse 5`- AAA GTC CCA TAA GCC TGT TT-3`	2795	
icaC	Forward: 5`- CTT ATC ACC GCT TCT TCT TTT-3`	3131	403
	Reverse: 5`- CGG AAA CAG CGA TAA ATA AA -3`	4120	
IS256	Forward: 5`- TGA AAA GCG AAG AGA TTC AAA GC-3`	124	1102
	Reverse: 5`- ATG TAG GTC CAT AAG AAC GGC-3`	1226	

icaB

Figura 2.2 Alineamiento de secuencias de *Staphylococcus spp.* Para el gen *icaB*



Fuente: Elaboración propia.

Una vez se obtiene la secuencia consenso, se determina el tamaño del primer mediante el programa Primer 3.

LEFT PRIMER GCGCACTCGCGTTAAACTAT
 RIGHT PRIMER ACTTTGCGTCTGTGCTTTA
 PRODUCT SIZE: 156

Luego se confirma el primer realizando un Blast, tal como se muestra en las figuras 2.3 y 2.5.

Primer Primer 1

Figura 2.3 Confirmación de primers para el gen *icaB* mediante el programa Blast

	Secuencia (5'>3')	Longitud	Tm	GC%	Autocomplementariedad	Autocomplementariedad 3'
Primer avance	GCGCACTCGCGTTAAACTAT	20	59,36	50,00	5,00	2,00
Primer reverso	ACTTTGCGTCTGTGCTTTA	20	58,71	45,00	3,00	2,00

continúa (pág. 67)

Producto sobre plantillas

>NC_002976.3 Staphylococcus epidermidis RP62A genoma completo

Longitud de producto = 156

Características asociadas con este producto: proteína B de adhesión intercelular

Primer de avance 1. GCGACTCGCGTTAAACTAT. 20

Modelo. 2335851..... 2335870

Primer reversa. 1. ACTTTGGTGTGTGTGCTTA. 20

Modelo. 2336006..... 2335987

Nota: Primer Izquierdo ATCGCTGTTCCGGTAGTGA. Primer derecho TGAAATCGC-CAAGAAAACAA. Tamaño del producto 249.

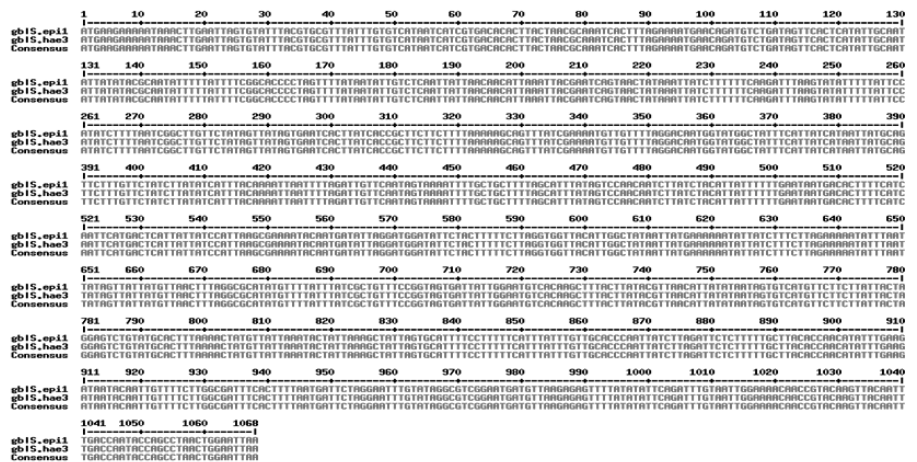
Fuente: Elaboración propia.

Luego se confirma el primer realizando un Blast como se muestra en la

Figura 2.5.

icaC: Alineamiento mediante programa MultAling

Figura 2.4 Alineamiento de secuencias de Staphylococcus spp. para el gen icaC



Fuente: Elaboración propia.

Primer 3

Figura 2.5 Confirmación de primers para el gen *icaC* mediante el programa Blast

	Secuencia (5'>3')	Longitud	Tm	GC%	Autocomple- mentariedad	Autocomple- mentariedad 3'
Primer avance	ATCGCTGTTTCCGGTAGTGA	20	59,11	50,00	4,00	1,00
Primer reverso	TGAAATCGCCAAGAAAACAA	20	54,31	35,00	2,00	0,00
Producto sobre plantillas						
<p>>NC_002976.3 Staphylococcus epidermidis RP62A genoma completo Longitud de producto = 249 Características asociadas con este producto: proteína C de adhesión intercelular Primer de avance 1. ATCGCTGTTTCCGGTAGTGA. 20 Modelo. 2337270 2337289 Primer reversa. 1. TGAAATCGCCAAGAAAACAA. 20 Modelo. 2337518 2337499</p> <p>>NC_007350.1 Staphylococcus saprophyticus subsp. Saprophyticus ATCC 15305, complete genome Longitud del producto = 4676 Características asociadas con este producto: proteína hipotética Reglador transcripcional Primer de avance. 1. ATCGCTGTTTCCGGTAGTGA. 20 Modelo. 2506931 C....A.....A.....G..... 2506950 Primer de reversa. 1. TGAAATCGCCAAGAAAACAA. 20 Modelo 2511606. A.....AT.....T.....C. 2511587</p> <p>>NZ_KE150417.1 Staphylococcus spp. HGB0015 genomic scaffold acztz-super-cont1.1. whole genome shotgun sequence Longitud del producto = 2923 Primer de avance 1. ATCGCTGTTTCCGGTAGTGA. 20 Modelo. 1378235. . . . TT.T.....A.....C. 1378254</p>						

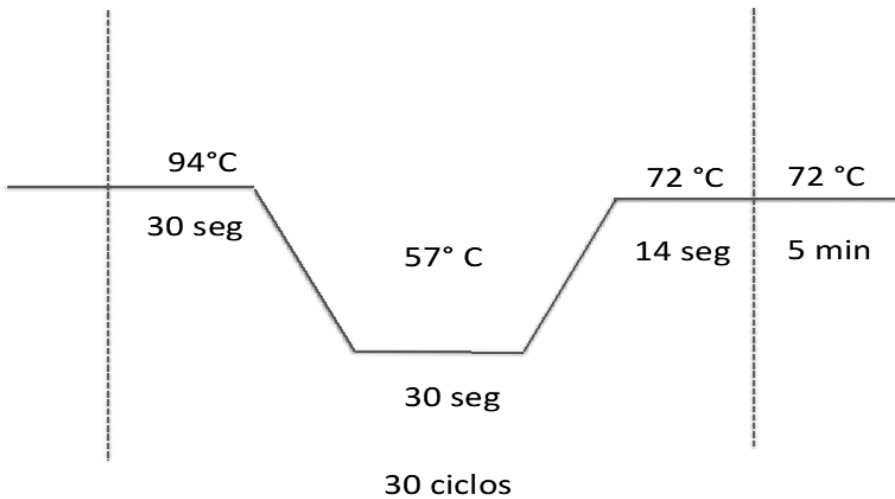
Fuente: Elaboración propia.

2.5.1.1.2 Condiciones de PCR para la determinación de los genes *icaADBC* e *icaR*

El grupo REMA, en sus estudios realizados para la detección genotípica del operón determinó que para la normalización de la PCR se debe utilizar una cepa control (p. ej., la cepa USA 300), la cual contiene los cinco genes de estudio importantes en el análisis de los genes responsables de la producción de biopelícula. La cantidad de DNA utilizada en estas investigaciones para la amplificación de *icaADBC* e *icaR* fue de 150 ng/unidades en un volumen final de 20 μ L.

La mezcla debe contener buffer 1X, Taq polimerasa 1U, oligonucleótidos 0,6 μ M dNTPs 200 μ M, DNA 200 ng, $MgCl_2$ 3 mM para un volumen final de 20 μ L. Las condiciones de ciclado de amplificación sugeridas son de 30 ciclos de 30 segundos de denaturación a 94 °C, hibridización por 30 segundos a 57 °C y elongación por 14 segundos a 72 °C y una elongación final por cinco minutos. Se utilizó como control positivo una cepa ATTC 35984.

Figura 2.6 Condiciones de PCR para la amplificación de los genes *icaADBC* e *icaR*



Fuente: Elaboración propia.

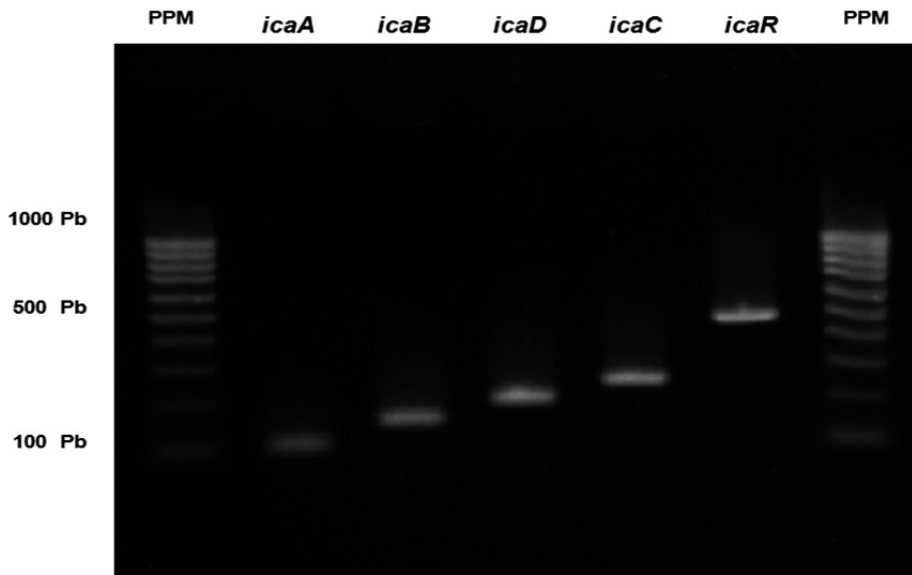
2.5.1.1.3 Condiciones de PCR para la determinación de IS256

Los diseños y experimentos realizados por el grupo de investigación REMA permitieron estandarizar la PCR de IS256, bajo las siguientes condiciones:

la mezcla debe contener buffer 1X, Taq polimerasa 2,5 U, oligonucleótidos 0,6 μM dNTPs 200 μM , DNA 200 ng, MgCl_2 3 mM en un volumen final de 20 μL . Las condiciones de amplificación para este gen son 29 ciclos de un minuto de denaturación a 95 $^\circ\text{C}$, hibridización por un minuto a 52 $^\circ\text{C}$ y elongación por un minuto a 68 $^\circ\text{C}$. El control positivo usado es la cepa de *S. epidermidis* ATCC 35984 y como control negativo la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228. La amplificación de los fragmentos se llevó a cabo en el termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc).

Para lograr la visualización de los fragmentos se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,8 % con buffer de corrido al 1X (0,9 M Tris-Borato, 0,002 M EDTA pH 8,0). Se siembran 10 ul de cada amplicón y 5 ul de PPM (HyperLadder IV) en el gel y se corre a un voltaje de 100 V durante 50 minutos. La tinción del gel se hizo con bromuro de etidio 0,5 mg/ml durante 20 minutos (véase la Figura 2.7).

Figura 2.7 Corrido electroforético de los genes del operón *icaADBC* e *icaR* de 103 pb, 156 pb, 198 pb, 259 pb y 469 pb, respectivamente, para la cepa USA 300. Carril 1: PPM; carril 2: *icaA*; carril 3: *icaB*; carril 4: *icaD*; carril 5: *icaC*; carril 6: *icaR*



Fuente: Elaboración propia.

En los estudios realizados por el grupo REMA se ha encontrado el gen *icaR* en el 74 % de las cepas estudiadas; aunque el papel del *icaR* en la formación de biopelícula aún no ha sido determinado, la secuencia de aminoácidos sugiere que es un regulador transcripcional y que, potencialmente, la respuesta del represor es controlar el nivel de susceptibilidad a antibióticos hidrofóbicos y detergentes. Se sabe que en presencia de estas sustancias y condiciones ambientales adversas, como, por ejemplo, la limitación de nutrientes, las bacterias promueven la formación de biopelícula.

Para el grupo REMA ha sido de gran interés estudiar la sepsis neonatal causada por *Staphylococcus coagulasa negativa* y su capacidad de adherencia a cuerpos extraños, por lo cual realizó un estudio a partir de hemocultivos y cultivos de puntas de catéter provenientes de recién nacidos de una unidad neonatal en un hospital de tercer nivel en Bogotá, Colombia, en busca de la determinación genotípica y fenotípica de bacterias formadoras de biopelícula. Así, se determinó en cepas clínicamente productoras de sepsis de aislamientos clínicos la presencia del operón *icaADBC*, *icaR*, el elemento de *IS256* y la formación fenotípica de biopelícula por el método de rojo congo y la técnica de microplaca.

2.5.1.2 Diseño y evaluación de PCR múltiples para detectar los genes que codifican factores de adhesión en aislamientos de *Staphylococcus spp*

71

Investigaciones realizadas por el Grupo REMA determinaron en cada aislamiento *Staphylococcus spp.* la presencia de los genes que codificaban para los factores de adhesión *clfA*, *clfB*, *fib* y *fnbB*. Como se indicó en el capítulo anterior, las proteínas de unión a fibronectina A y B codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*, proteína de unión a fibrinógeno, factor cumpling A y B, codificadas por los genes *fib*, *clfA* y *clfB*, respectivamente, se encuentran implicados en el proceso de infección valvular e invasión tisular, lo que permite a los microorganismos iniciar y mantener una infección adhiriéndose a sitios específicos en tejidos humanos o implantes biomédicos, los cuales persisten de manera indefinida al formar estructuras conocidas como biopelícula.

2.5.1.2.1 Primers utilizados para la determinación de los factores de adhesión (*clfA*, *clfB*, *fib* y *fnbB*)

El diseño de los primers para determinar estos factores se realizó por medio del programa Primer 3, teniendo en cuenta algunos criterios, como, por ejemplo, el tamaño de los primers entre 18 a 22 base (véase la Tabla 2.4).

Tabla 2.4 Secuencias y tamaños de primers utilizados para factores de adhesión

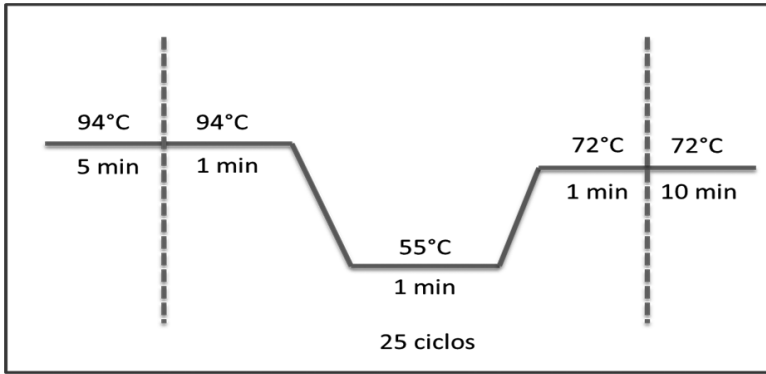
Gen	Secuencia del primer	Tamaño de amplificación en pb
clfA	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	292
	CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG	
clfB	ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC	205
	TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC	
Fib	CTACAAC TACAATTGCCGTCAACAG	404
	GCTCTTGTAAGACCATTTCTTCAC	
fnbB	GTGAAGTTTTAGAAGGTGGAAAGATTAG	524
	GCTCTTGTAAGACCATTTCTTCAC	
fnbA	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT	643
	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	

Fuente: Elaboración propia.

2.5.1.2.2 Condiciones de PCR múltiples para la amplificación genes de factores de adhesión

A fin de emplear la técnica de PCR múltiples se usaron las cepas USA 300 y la ATCC 12228 como controles positivo y negativo. Las condiciones de la PCR están en T_m (temperatura melting) entre 58 °C y 64 °C, y porcentaje de guanina-citosina de 40 -60 % (véase la Figura 2.8). También se verificó que las secuencias de los primers no formen estructuras secundarias tales como corrimientos, harpin o dímeros que puedan interferir en la realización de las PCR múltiples.

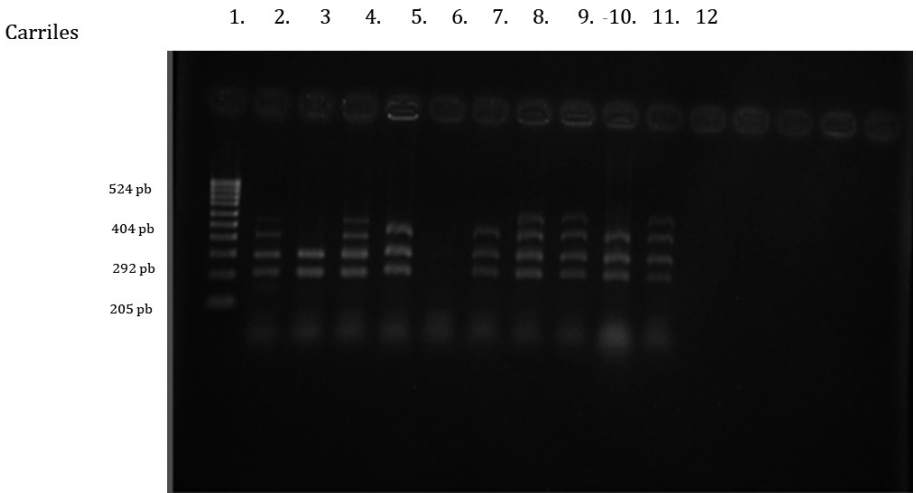
Figura 2.8 Condiciones de PCR múltiple para la amplificación de los genes de los factores de adhesión



Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente, se visualizan los productos por medio de una electroforesis teñida con bromuro de etidio, tal como se mencionó (véase la Figura 2.9).

Figura 2.9 Amplificación por PCR de los genes que conforman en cepas de *Staphylococcus aureus*. Carril



Nota: 1) marcador de peso molecular hiperlader IV Bioline; 2) control positivo cepa USA 300 *S. aureus*, con cuatro factores de adhesión buscados (*clfA*, *clfB*, *fib* y *fnbB*); 3) *S. epidermidis* con dos factores de adhesión *clfA*, *clfB*; 4) *S. epidermidis*, con cuatro factores *clfA*, *clfB*, *fib* y *fnbB*; 5) *S. aureus* posee los factores *clfA*, *clfB* y *fib*; 7) *S. epidermidis* con *clfA*, *clfB* y *fib*; 8) *S. aureus* con *clfA*, *clfB*, *fib* y *fnbB*; 9) *S. epidermidis* posee los factores *clfA*, *clfB*, *fib* y *fnbB*; 10) *S. aureus* posee los factores *clfA*, *clfB*, *fib*; 11) *S. epidermidis* posee los factores *clfA*, *clfB*, *fib* y *fnbB*; 12) control ne-gativo H₂O ultrapura.

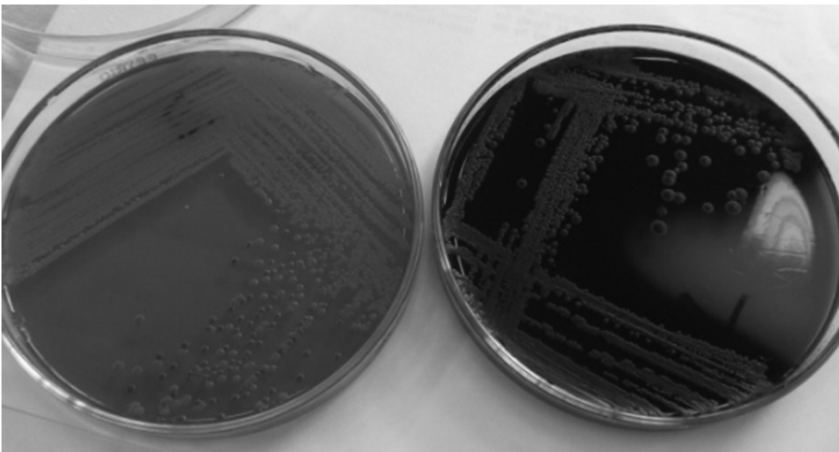
2.5.2 Determinación fenotípica de la biopelícula

2.5.2.1 Determinación cualitativa de la biopelícula por el método agar rojo congo (ARC)

Según Freeman, Falkiner y Keane (16), quienes estandarizaron una técnica en la que cepas se siembran por agotamiento en un medio de cultivo compuesto por agar BHI (agar infusión cerebro corazón), colorante rojo congo y sacarosa o glucosa al 0,5-1 %, usada para la detección de la producción de glucano, estos unidos intensifican la producción de exopolisacáridos bacterianos en microorganismos productores de biopelícula que, en el caso de *Staphylococcus epidermidis*, se denomina PIA. El colorante tiene la función de teñir el exopolisacárido originando un color en la colonia según se produzca o no PIA.

Luego de incubar las bacterias en el agar rojo congo a 37 °C durante 24 y 48 horas, se observa el crecimiento de las bacterias que no producen biopelícula, las cuales adsorben el colorante y toman un color rosa, mientras que las bacterias que la producen no adsorben el colorante debido a la producción de exopolisacáridos, por lo cual el color de la colonia es negro brillante de consistencia seca. En los cultivos se puede observar un resultado indeterminado para la producción de biopelícula cuando las colonias tienen un pequeño pigmento oscuro en el centro conocido como “ojo de buey”. Cuando es positivo en este medio se observan colonias negras circulares de consistencia seca árida de aspecto cristalino y bordes filamentosos (véase la Figura 2.10).

Figura 2.10 Agar rojo congo



Nota: La muestra de la derecha presenta el color característico negro intenso de cepas formadoras de biopelícula. La de la izquierda el color característico rosado de cepas no formadoras de biopelícula .

En un estudio realizado por el Grupo REMA en Colombia, se analizaron las características genotípicas y fenotípicas de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa negativa* provenientes de pacientes con bacteremia y de cultivos de punta de catéter. Los resultados de la prueba fenotípica estudiados por el método de rojo congo se muestran en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5 Características genotípicas y fenotípicas de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa negativa* provenientes de bacteremias y puntas de catéter

Ensayos genotípicos n (%)							Ensayos fenotípicos n (%)		
icaR	icaA	icaD	icaB	icaC	IS256	Aac6-aph2'	Rojo congo	Microplaca	Microplaca + glucosa
Pos 8 (16 %)	Pos 8 (16 %)	Pos 8	Pos 8	Pos 8	Pos 7	Pos 5	F 5 (10 %) I 3 (6 %)	F 6 (12 %) I 2 (4 %)	F 6 (12 %) I 2 (4 %)
Pos 18 (36 %)					Pos 23 (46 %)	Pos 25 (50 %)	F 14 (28 %)	F 15	F 16
Neg 9 (18 %)	Neg 27 (54 %)	Neg 27 (54 %)	Neg 27 (54 %)	Neg 27 (54 %)	Neg 4 (8 %)	Neg 4 (8 %)	I 7 (14 %) NF 6 (12 %)	I 6 (12 %) NF 6 (12 %)	I 5 (10 %) F 6 (12 %)

Nota: Gen *icaR*, *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* presentes en el operón *nica*, elemento de inserción 256 (IS256), gen de resistencia a aminoglucósidos (*aac6-aph2'*), formador de biopelícula (F), indeterminado (I), no formador de biopelícula (NF). Aminoglucósidos.
Fuente: elaboración propia.

2.5.2.2 Determinación cuantitativa de la biopelícula por el método de titulación en microplacas de poliestireno

La producción de biopelícula valorada cuantitativamente por investigaciones realizadas por el Grupo REMA en cepas productoras de biopelícula se desarrolló mediante la técnica de adherencia descrita por Freeman et al. (16). En estos estudios se tomó como control negativo la cepa ATCC12228 y como control positivo la cepa ATCC 35984; las cepas bacterianas estudiadas fueron colocadas en caldo infusión cerebro corazón (BHI) sin glucosa y con glucosa al 0,1 %, en diluciones seriadas 1/25,1/50,1/100 por duplicado agregando 0,2 mL

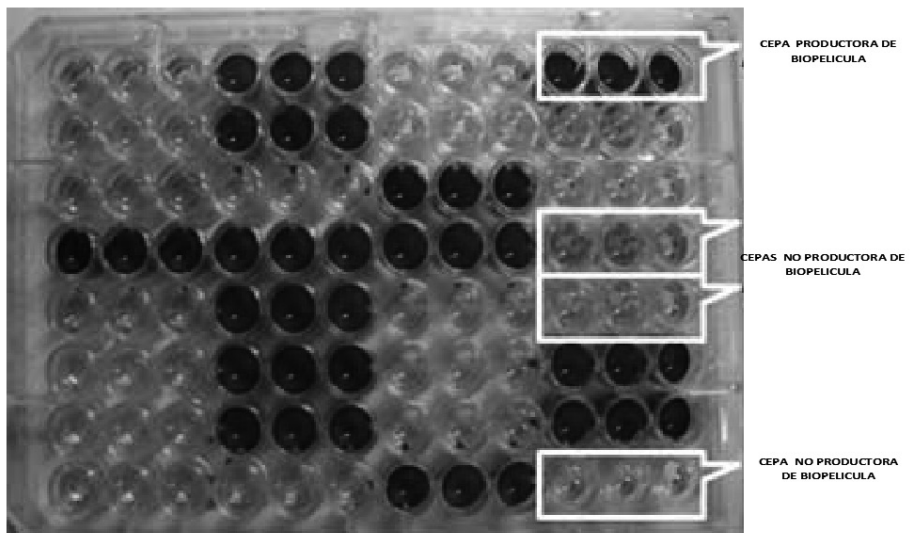
de cada una en microplacas para Elisa (Microtest III, Falcon N.º 3072; Becton Dickinson Labware, Oxnard, Calif.) e incubadas durante 24 horas a 37 °C.

Posteriormente, el contenido de cada pozo fue aspirado y lavado tres veces con agua destilada. La adherencia de los microorganismos se fijó con paraformaldehído y se coloreó con 200 µL de cristal violeta a una concentración de 0,04 %; el exceso de colorante fue retirado por inversión y se lavó tres veces con agua destilada. Luego las placas fueron leídas por absorbancia a una densidad óptica de 490 nm en un lector Elisa (Awareness Technology Stat Fax® 2100 Microplate Reader, Palm City, Florida); el valor que se obtuvo en las lecturas en cada una de las cepas estudiadas se clasificó de acuerdo con su densidad óptica como formadoras, no formadoras e intermedias.

La habilidad de las cepas para adherirse y formar biopelícula fue cuantitativamente probado por microtitulación con medio de cultivo BHI y BHI al 1 % con glucosa. Teniendo en cuenta los criterios propuestos por Freeman, si la absorbancia de cada lectura era $> 0,240$ nm se clasificó como cepa formadora de biopelícula; si se encontraba dentro del rango de $0,239$ a $0,120$ nm se consideró indeterminada; si su lectura fue $< 0,119$, se valoró como cepa no formadora de biopelícula, tal como lo confirmaron Costerton JW., et. al. en el año 2005.

76

Figura 2.11 Prueba de cristal violeta. Representación de la detección de biopelícula en placa de poliestireno teñida con cristal violeta



Fuente: Modificado de Peña y Uffo.

Referencias

1. Arteaga H, Escobar J, Leal A, Vanegas N. Análisis “in vitro” de la formación de biopelícula y sus características moleculares en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), provenientes de punta de catéter y bacteremia. *Med.* 2010;9:12-20.
2. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilm: properties, regulation, and roles in human disease. *Virul.* 2011;2:445-59.
3. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biopelícula-resistant materials. *Biomater.* 2012;33:5967-82.
4. Bispo PJ, Haas W, Gilmore MS. Biofilms in infections of the eye. *Pathogens.* 2015;4:111-36.
5. Caetano, L. Biofilm and bacterial virulence. *Rev Med Microbiol.* 2011;22:5.
6. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Sc.* 1999;284:1318-22.
7. Costerton JW, Norris P, Francolini I, et.al. Ultrasonically Controlled Release of Ciprofloxacin from self assembled coatings on Poly (2 Hydroxyethyl Methacrylate) Hydrogels for *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm prevention. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10):4272-4279.
8. Chokr A, Watier D, Eleaume H, Pangon B, Ghnassia JC, Mack D, et al. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Inter J Med Microbiol.* 2006;296:381-8.

9. Ebrey R, Hamilton M S, Lappin-Scott H. Microbial Biofilms. Washington D.C: Ed ASM Pres; 2004.
10. Eftekhari F, Speert DP. Biofilm formation by persistent and non-persistent isolates of *Staphylococcus epidermidis* from a neonatal intensive care unit. J Hospital Infect. 2009;71:112-116.
11. Eiff C von, Arciola CR, Montanaro L, Becker K, Campoccia D. Emerging *Staphylococcus* species as new pathogens in implant infections. Internat J Artif Organs. 2006;29: 360-7.
12. Eiff C von, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. The Lancet Infect Dis. 2002;2:677-85.
13. Eiff C von, Arciola CR, Montanaro L, Becker K, Campoccia D. Emerging *Staphylococcus* species as new pathogens in implant infections. Intern J Art Organs. 2006;29:360-7.
14. Fitzpatrick F, Humphreys H, Smyth E, Kennedy CA, O’Gara JP. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. J Hosp Infect. 2007;52:212-8.
15. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. J Bacteriol. 2007;189:7945-7.
16. Forbes, W. Diagnostic microbiologic. Editorial Elsevier. 12^a ed. Buenos Aires; 2009.
17. Freeman DJ, Falkiner F, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol. 1989; 42:872-874.
18. Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song, Z. The clinical impact of bacterial biofilm. Intern J Oral Sci. 2011;3:55-65.
19. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Nature. 2010;465:346-351.

20. Jhahharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: a review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015;5:1-12.
21. Koskela A, Nilsson-Augustinsson A, Persson L, Soderquist B. Prevalence of the ica operon and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. *Europ J Clin Microbiol & Infect Dis.* 2009;28:65-60.
22. Lasa I, Del Pozo JL, Penades JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra,* 2005;28(2):163-75.
23. Lauderdale KJ, Malone CL, Boles BR, Morcuende J, Horswill AR. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. *J Orthopa Res.* 2010;28:55-61.
24. Lister JL, Horswill AR. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;23:178.
25. McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10:39-50.
26. Nadell CD, Xavier JB, Levin SA, Foster KR. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilm. *PLoS Biol.* 2008;6:e14.
27. Oliveira A, Cunha M. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Not.* 2010;3:260.
28. Ordas CB. Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Tesis doctoral, Universidad de Barcelona, España; 2006.
29. Pautt HA. Análisis “in vitro” de la formación de biopelícula y sus características moleculares en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes en meticiclina (SARM), provenientes de punta de catéter y bacteremia. *Rev Med.* 2010;9:9.

30. Pavlovsky L, Sturtevant RA, Younger JG, Solomon MJ. Effects of temperature on the morphological, polymeric, and mechanical properties of *Staphylococcus epidermidis*. *Bact Biof Langmuir*. 2015;17:2036-42.
31. Peña J, Uffo O. Producción de biofilme en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. *Rev. Salud Anim*. 2013;35:189-196.
32. Rohde, H, Burandt, EC, Siemssen, Frommelt, L, Burdelski C, Wurster S, et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomater*. 2007;28:1711-20.
33. Rohde, H., Frankenberger, S., Zahringer, U., Mack, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Europ J Cell Biol*. 2010;89:103-11.
34. Salud IND. Protocolo de vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a dispositivos en unidades de cuidado intensivo. *Vigilancia y Control En Salud Pública*; 2012.
35. Shadi, A. Prevalence of methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus* nasal colonization among medical students in Jeddah, Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2015;36:807-812.
36. Silva GD da, Kantzanou M, Justice A, Massey AR, Wilkinson NPJ, Day SJ, et al. The ica operon and biofilm production in coagulase-negative *Staphylococci* associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*. 2002;40:82-8.
37. Stevens NT, Greene CM, O’Gara JP, Humphreys H. Biofilm characteristics of *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with device-related meningitis. *J Med Microbiol*. 2009;58:855-62.
38. Vilaa J, Sorianob 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.* 2008;26:48-55.

39. Wolcott R, Attinger C. Clinically Addressing Biofilm in Chronic Wounds. *Adv Wound Care.* 2012; 1(3):127-132.

40. Xia G, Kohler T, Peschel A. (2010). The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *Inter J Med Microbiol.* 2010;300:148-54.

3 Estrategias antibiopelícula: respuesta inmune del huesped y péptidos antimicrobianos

*Jeannette Navarrete O.
Gladys Pinilla B.
Luz Mary Salazar P.*

3.1 Respuesta inmune en la biopelícula

Las bacterias formadoras de biopelícula causantes de procesos infecciosos, por lo general, activan de manera continua la reacción inflamatoria del huésped, lo cual favorece la producción y acumulación de plasma y exudados que contienen componentes importantes para la nutrición de las células bacterianas que se encuentran en estas comunidades. Sin embargo, son pocos los estudios que existen sobre la respuesta inmune en presencia de infecciones en las que se produce biopelícula.

Las infecciones agudas son causadas por agentes plantónicos que pueden ser diagnosticados y tratados de manera rápida y eficiente. Caso contrario sucede con las bacterias productoras de biopelícula, las cuales usan como nutriente los exudados plasmáticos y causan una inflamación aguda en el hospedero.

La respuesta del huésped a la infección involucra componentes inmunológicos innatos, inflamatorios y adaptativos, cuyo papel debe proporcionar la respuesta adecuada en contra de los microorganismos agresores. En algunos casos, la función inmunológica tendrá poca o ninguna respuesta frente a la infección, la cual depende de la propia naturaleza del huésped y del agente agresor. En algunos individuos y con microorganismos específicos se activará únicamente la respuesta inmune innata; en otros casos se requerirá de la respuesta inflamatoria, mientras que otros requerirán la respuesta inmune adaptativa celular o humoral, o ambos, para eliminar el agente infeccioso.

Sin embargo, la eficiencia de este tipo de respuestas se hace más compleja debido a la presencia de biopelícula.

En infecciones nosocomiales se ha observado que el agente causal de estas infecciones que con mayor frecuencia se encuentra es el *Staphylococcus epidermidis*. Como factor de virulencia central y mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria del hospedero frente al *S. epidermidis* está la formación de biopelícula, cuyo componente principal es el polisacárido de adhesina intercelular (PIA) que constituye la matriz principal de la biopelícula. Si bien se ha observado un efecto proinflamatorio potente a causa de la activación del complemento por parte del PIA, existe una disminución en la activación de granulocitos y de la producción de citoquinas por acción del PIA, lo que puede contribuir a la permanencia del agente infeccioso.

Un mecanismo de resistencia contra la biopelícula es la acción de los leucocitos, los cuales se creía que eran deficientes en la penetración de esta. Este concepto es refutado en la actualidad, ya que se ha comprobado que los leucocitos se agrupan, penetran y producen citoquinas en respuesta a la maduración de la biopelícula del *S. aureus*.

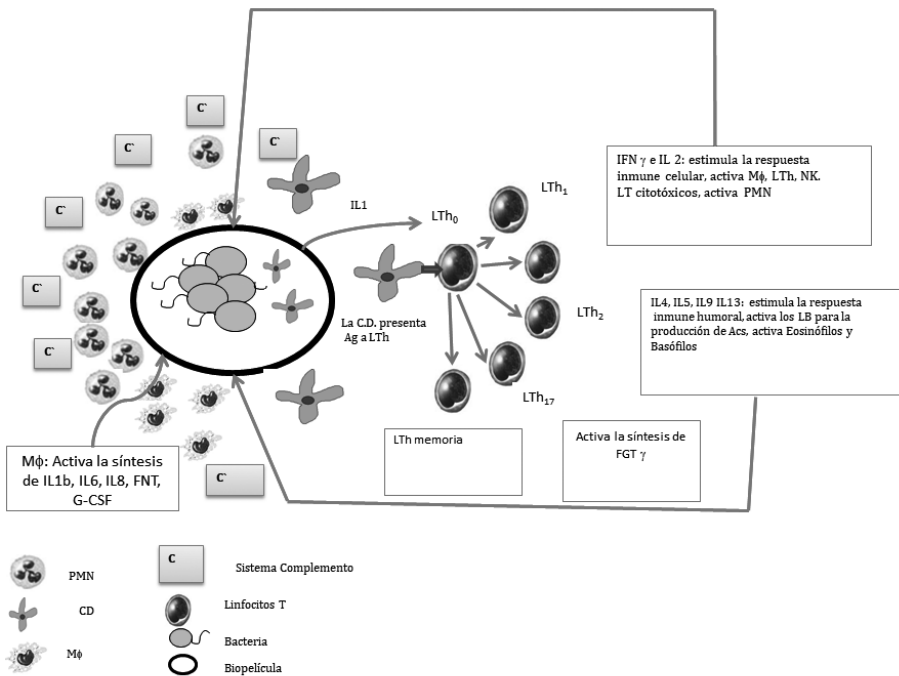
84

Se ha observado que, en la respuesta inmune contra bacterias productoras de biopelícula, como, por ejemplo, en el caso de la *Pseudomona aeruginosa*, los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y los macrófagos se encuentran disminuidos en funciones tales como la penetración, la acumulación, la fagocitosis, el estallido respiratorio y la muerte de la bacteria. En varios estudios in vitro e in vivo de bacterias causantes de infecciones clínicas se ha demostrado que se activa la respuesta innata y adaptativa contra el agente productor de biopelícula (véase la Figura 3.1).

En la respuesta inmune innata es importante la acción del sistema de complemento, así como de las células que pertenecen a este tipo de respuesta como son los PMN, los macrófagos y las células dendríticas, entre otras.

Es el caso de las infecciones respiratorias causadas por *Pseudomona aeruginosa* productora de biopelícula, en las que, a pesar de la limitada respuesta inmune, se ha observado procesos inflamatorios causantes de daño tisular. En estas infecciones, en los alveolos donde se encuentra este patógeno, el daño se encuentra rodeado de PMN, macrófagos y células dendríticas (CD) (véase la Figura 3.1).

Figura 3.1 Respuesta inmune innata y adaptativa en infecciones causadas por bacterias productoras de biopelícula



Fuente: Modificado de Jensen et al., 2010.

Los macrófagos alveolares inician la respuesta inmune innata produciendo citoquinas tales como la interleuquina (IL) IL1, IL 6, el factor de necrosis tumoral (FNT α) IL8 y el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) (véase la Figura 3.1).

Por otra parte, las CD toman el antígeno, maduran y migran hacia tejidos linfoides secundarios con el fin de realizar la presentación del antígeno a linfocitos T ayudadores para activar la respuesta inmune adaptativa. Los linfocitos T ayudadores hacen mitosis y generan poblaciones Th1, Th2 y Th17, entre otras. En la respuesta frente a estos agentes se observa mayor predominancia de clones Th1, los cuales activan la respuesta inmune celular por acción del interferón gamma (IFN γ), en el cual se observa una mayor activación de los macrófagos; este tipo de respuesta reduce la enfermedad por complejos inmunes, incrementa la fagocitosis de PMN, reduce la inflamación y el daño tisular. Por otra parte, la respuesta inmune humoral es estimulada por acción de las citoquinas que producen los linfocitos Th2, como, por ejemplo,

la IL4, IL5, IL9 e IL13, de lo que resulta la activación de los mastocitos y eosinófilos, la producción de los anticuerpos por los linfocitos B y la activación persistente de los PMN (Figura 3.1).

Los microorganismos como bacterias y hongos sobreviven en la naturaleza gracias a la formación de la biopelícula. Este consorcio estructurado e integrado por una matriz de polímero que el mismo microorganismo produce consiste en polisacárido, proteína y el ADN extracelular. Esta biopelícula es un eficiente mecanismo de resistencia que tiene el agente para evadir la acción de los antibióticos, productos químicos desinfectantes y mecanismos de la inmunidad innata tales como la fagocitosis, la respuesta inflamatoria y la acción de otros componentes del sistema de defensa del organismo hospedero.

3.1.1 Respuesta inmune innata y biopelícula

3.1.1.1 Fagocitosis

Un mecanismo de la respuesta inmune innata afectado por la presencia de biopelícula es la fagocitosis. Cuando un microorganismo sobrepasa las barreras naturales (piel y mucosas), la fagocitosis entra en acción como un segundo mecanismo de defensa. La fagocitosis se define como el proceso mediante el cual las células especializadas del sistema inmune identifican e ingieren microorganismos o partículas extrañas a su citoplasma para destruirlos. Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y los macrófagos ($M\phi$) son conocidos como fagocitos profesionales, ya que poseen una alta capacidad fagocítica y son indispensables para controlar las infecciones.

Ahora bien, la fagocitosis se considera una de las primeras líneas de defensa y, asimismo, es un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa realizado por las células presentadoras de antígeno. Es así como al terminar de cumplir su función fagocitaria, el PMN maduro muere por lisis o por apoptosis; sin embargo, ocurre algo diferente con el $M\phi$, que no muere al fagocitar y presentar los péptidos al linfocito T y activar la respuesta inmune específica.

La fagocitosis de los PMN puede valorarse en el laboratorio por medio de varias técnicas, como, por ejemplo, la de fagocitosis y muerte intracelular de *Candida*, por la que se puede observar cómo el PMN fagocita y usa la vía NADPH oxidasa para matar las *Candidas*, las cuales se visualizan en la prueba mediante la tinción con azul de metileno, de manera que colorea las *Candidas* muertas de color azul, mientras que las *Candidas* que fueron fagocitadas pero permanecen vivas se observan refringentes (véase la Figura 3.2).

Por medio de esta prueba se puede valorar en los PMN la función fagocítica y la efectividad de la muerte intracelular mediante el siguiente cálculo:

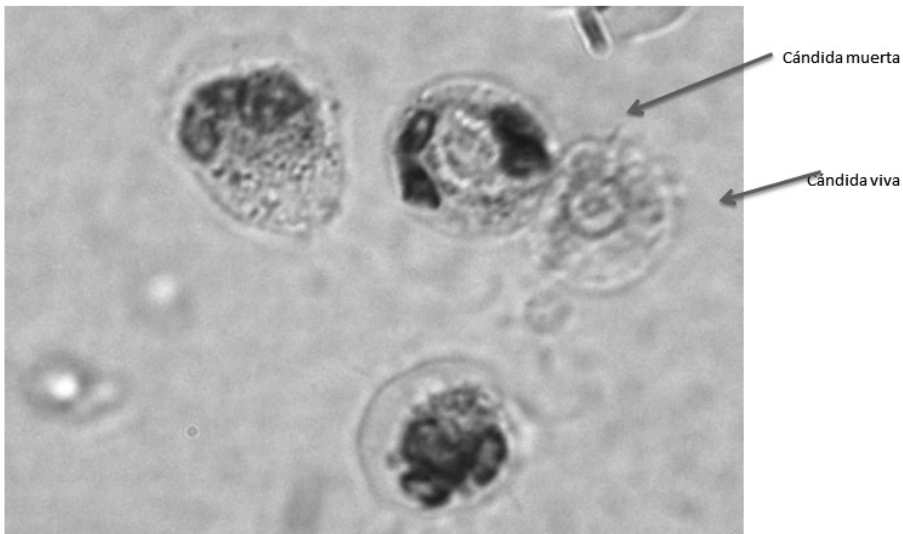
$$\text{Índice de fagocitosis} = \frac{1 \text{ PMN} \times \text{n.º total de cándidas fagocitadas (vivas y muertas)}}{100 \text{ PMN}}$$

100 PMN

$$\% \text{ de muerte intracelular} = \frac{\text{n.º de cándidas muertas} \times 100 \%}{\text{N.º total de cándidas fagocitadas (vivas y muertas)}}$$

N.º total de cándidas fagocitadas (vivas y muertas)

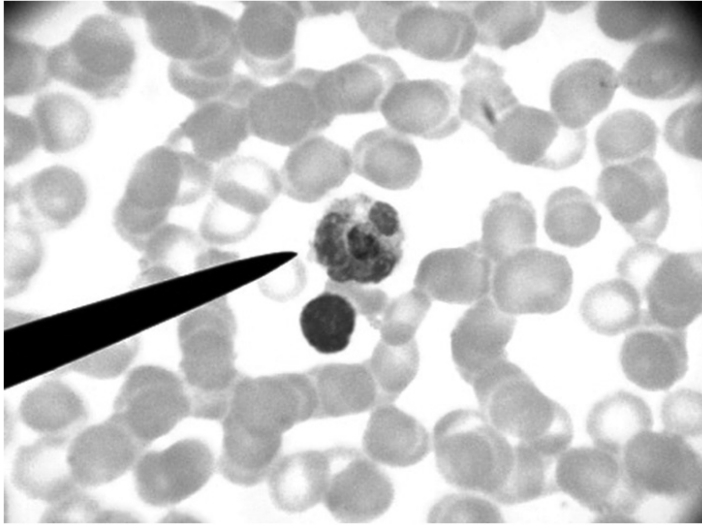
Figura 3.2 Microtécnica de fagocitosis y muerte intracelular de cándida: polimorfonucleares neutrófilos (PMN) que han fagocitado cándidas. Se observa la muerte celular de las levaduras cuando son teñidas con el azul de metileno



Fuente: Tomado de Ossa, 2011.

Otra prueba que permite valorar la función fagocítica de los PMN es la reducción de azul de tetrazolium o NBT. En esta prueba se valora la vía hexosa monofosfato que utiliza el PMN para realizar la digestión del microorganismo fagocitado. Mediante el uso del colorante azul de tetrazolium el PMN lo fagocita y reduce produciendo precipitados de color azul.

Figura 3.3 Prueba de fagocitosis NBT (reducción de nitroazul de tetrazolium)



Fuente: Tomado de Ossa, 2011.

Esta función de eliminación del agente por medio de la fagocitosis se encuentra disminuida por la presencia de biopelícula, sin embargo, estudios han demostrado que el PMN reconoce la biopelícula y activa reacciones asociadas al ataque contra el microorganismo, como, por ejemplo, la degranulación con la liberación de lactoferrina y elastasas.

Se ha observado en *Staphylococcus aureus* productor de biopelícula que los PMN se mueven a través de esta y toman las bacterias, mientras que con el *Staphylococcus epidermidis* los PMN fueron bastante inmóviles y la función fagocítica se limita a bacterias que están estrechamente asociadas con la membrana del neutrófilo, concluyendo que los *S. aureus* productores de biopelícula son más sensibles al ataque de los PMN comparados con los *S. epidermidis*, y que estos tipos de biopelícula no son protectores absolutos del ataque de las células fagocíticas.

En modelos *in vitro* en los que se genera biopelícula de *S. aureus*, usando videos mediante microscopía en lapso de tiempo y microscopía laser confocal, se observó la migración de los PMN a través y dentro de la biopelícula, así como la eliminación de la biopelícula por acción de la fagocitosis. Esta función inmune es más eficiente en biopelículas jóvenes en comparación con las biopelículas maduras, es decir, la biopelícula del *S. aureus* no está totalmente protegida de la respuesta inmune del huésped. Los PMN reconocen la

biopelícula y activan la respuesta inmune por medio de la fagocitosis, la granulación de lactoferrina y elastasas, y el incremento de ADN bacteriano.

Las biopelículas producidas por *S. epidermidis* inician con una respuesta local inflamatoria con infiltrados de PMN que se adhieren a la biopelícula, fagocitan y degranulan productos como la lactoferrina. A diferencia de este proceso, con las células plantónicas la opsonización de la biopelícula con anticuerpos y moléculas de complemento no es necesaria para la activación de los PMN, lo cual indica que la biopelícula contiene componentes proteicos que activan la acción de los PMN *in vitro*.

Los macrófagos ($M\phi$ s) son células del sistema inmunológico de infiltración primaria que responden rápidamente en la herida, así como en la implantación de biomateriales y están directamente implicados en la respuesta inflamatoria del huésped infectado. Los $M\phi$ s se adhieren a superficies del dispositivo y permanecen en la interface de tejido de implantación durante varios días para realizar sus funciones. De ahí que la interacción entre $M\phi$ s y biomaterial contaminado con bacterias es crucial en el desarrollo de infecciones asociadas a biomaterial. Una biopelícula madura se forma con menor probabilidad si los macrófagos son capaces de eliminar y destruir microorganismos que se adhieren sobre un dispositivo implantado.

Una de las evidencias más sólidas de la activación de la respuesta inmune innata la realizaron Jesaitis et al. en el 2003, cuando evaluaron la actividad de macrófagos y polimorfonucleares sobre *Pseudomonas aeruginosa* productoras de biopelícula. Este modelo tiene la capacidad de ocasionar infecciones clínicas de gran severidad, es resistente a los antibióticos de primera elección y la biopelícula puede ser resistente a productos de oxígeno tóxico, como, por ejemplo, H_2O_2 que rápidamente es convertido en O_2 por la acción de la catalasa y la superóxido dismutasa.

En pacientes con fibrosis quística puede causar infecciones respiratorias con gran producción de moco espeso, que contiene alginato de calcio y células inflamatorias. Allí los neutrófilos son probablemente el componente más significativo de la defensa del huésped, a causa de su actividad fagocítica y la secreción de componentes tóxicos de oxígeno, enzimas de degradación, defensinas y lípidos mediadores de la inflamación, aunque a menudo su acción es ineficaz para combatir la infección. De hecho, los neutrófilos en muchos casos contribuyen a la severidad de la patología pulmonar por acción de estos componentes de la respuesta celular, los cuales proporcionan una fuente de ADN extracelular y proteínas que contribuyen a la formación y viscosidad del moco. Este proceso justifica también la presencia de leucocitosis e inflamación aguda de los tejidos en los que se está formando la biopelícula.

En biopelícula producida por *P. aeruginosa* mucoide se encuentra una alta concentración de alginato, el cual se considera un potente factor de virulencia de la *Pseudomona*. Sin embargo, los PMN pueden responder a este efecto por la elevada acción del estallido respiratorio; además, el alginato contribuye también a activar los monocitos para la producción de citoquinas.

Experimentos *in vivo* e *in vitro* han podido comprobar que en procesos infecciosos causados por *Pseudomona aeruginosa* se observa un gran agregado de bacterias productoras de biopelícula rodeadas por un elevado número de neutrófilos, pocas bacterias plantónicas que son fagocitadas por los PMN, disminución de oxígeno intracelular causado por activación del estallido respiratorio en el que las moléculas de oxígeno son reducidas a anión superóxido, lo que demuestra la respuesta efectora de los neutrófilos frente a bacterias productoras de biopelícula.

También se ha observado que la respuesta de los PMN que rodean la superficie de la biopelícula degranula parcialmente, hay un incremento en el consumo de oxígeno y poca concentración de factores microbicidas como el H_2O_2 . Por otra parte, se ha observado que el IFN gama puede activar la fagocitosis de macrófagos contra *P. aeruginosa* productora de biopelícula, sin embargo, elevadas concentraciones de alginato pueden incrementar la muerte de macrófagos activados por IFN gama.

Investigadores han observado, además, que los neutrófilos pueden ser activados por contacto directo con la bacteria, por anticuerpos unidos a lipopolisacáridos, por presencia de alginatos, por endotoxinas bacterianas, por la acción de moléculas solubles de la inmunidad innata tales como las citoquinas proinflamatorias (p. ej., el factor de necrosis tumoral alfa [FNT α], la interleuquina 8 [IL 8]) y mediadores de la inflamación (leucotrieno B4 y factor activador de plaquetas).

Ahora bien, la biopelícula de hongos como, por ejemplo, la *Candida albicans*, está constituida por un complejo de ultraestructuras tridimensionales que consiste en una red densa de levaduras, hifas y pseudohifas integradas en una matriz de polisacáridos, proteínas y otros componentes aún no definidos. Una de las características principales de la biopelícula es que proporciona resistencia a agentes antifúngicos como, por ejemplo, los azoles y la B amfotericina. Las interacciones fagocitosis-biopelícula en hongos son aún desconocidas; se ha observado que existe una interacción entre antifúngicos y células fagocíticas, las cuales actúan de manera recíproca contra la cándida con la producción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (FNT) α y quimioquinas como la interleuquina-8 (IL-8).

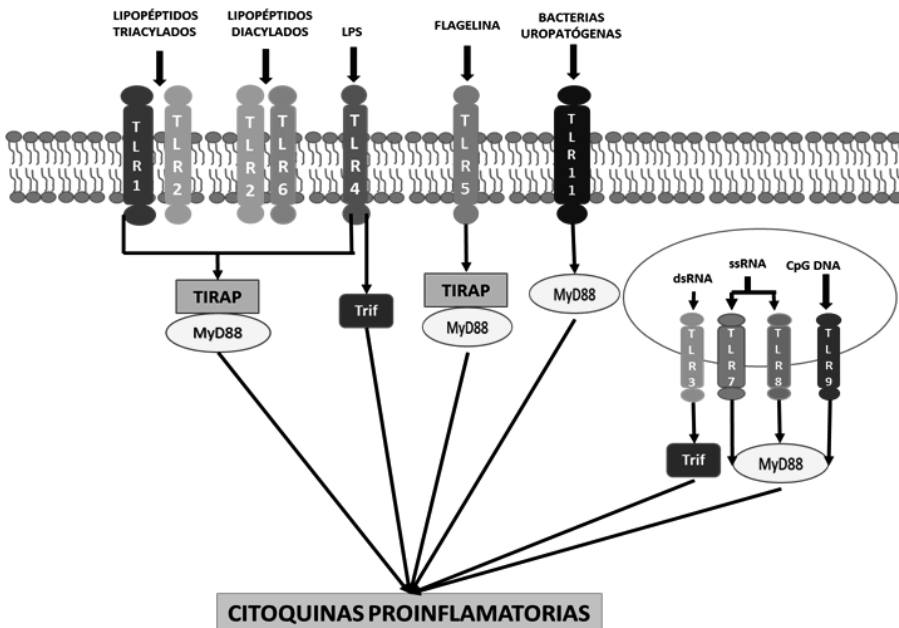
3.1.1.2 Toll like receptor (TLR)

Otro mecanismo que usa la inmunidad innata para reconocer los microorganismos son los receptores de reconocimiento de patrones (RRP), los

cuales reconocen patrones moleculares conservados de la estructura celular de patógeno (patrón molecular asociado al patógeno PAMP). Estos activan la respuesta inmune innata de manera constante al ser reconocidos por los receptores Toll (TLR), lo que arroja como resultado la producción de citoquinas proinflamatorias y favorece el reconocimiento del patógeno por parte de los neutrófilos.

Los TLR pueden producir respuesta cuando entran en contacto con los componentes de la biopelícula y/o con los componentes producidos por la bacteria. Sin embargo, estudios realizados en pacientes con fibrosis quística causada por bacterias productoras de biopelícula han evidenciado incremento de la expresión de TLR 5 en la membrana de los PMN, posiblemente por acción de la IL-8, del FNT α , del factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) y por la acción conjunta del TLR1 y el TLR2, los cuales reconocen lipoproteínas bacterianas (véase la Figura 3.4).

Figura 3.4 Reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por los TLR sobre la membrana de las células de la inmunidad innata para la producción de citoquinas proinflamatorias



Fuente: Modificado de O'Neill.

Por otra parte, cuando se encuentran los PMN con biopelícula no mucoide *in vitro*, la ausencia funcional del flagelo induce la muerte bacteriana por elevadas concentraciones de lactoferrina, lo cual favorece la inhibición de la formación de biopelícula y el ADN de la bacteria productora de biopelícula puede activar los PMN, ya que estos poseen el TLR9, lo que lleva a la producción de IL8.

En investigaciones realizadas en bacterias productoras de biopelícula — como el *Staphylococcus aureus*— mediante catéteres en modelos murinos, se analizó la importancia funcional de los receptores TLR2 y TLR9 como activadores de la respuesta inmune en la formación de biopelícula. Las citoquinas producidas no afectan la densidad bacteriana, es decir, el *S. aureus* usa la biopelícula como mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria. Igualmente, en estos modelos se da una reducción significativa de citoquinas tales como IL-1 β , TNF- α y quimioquinas como CXCL2, así como la expresión CCL2 durante la infección con biopelícula comparada con la respuesta obtenida por catéteres estériles.

Adicionalmente, se ha encontrado que la biopelícula contribuye en limitar la invasión por parte de los macrófagos, así como de los mecanismos microbicidas dados por el óxido nítrico sintetasa. Al atenuar la respuesta proinflamatoria el microorganismo persiste en el huésped inmunocompetente. Sin embargo, otros estudios han encontrado que el TLR2 y TLR4 participan en la activación de los monocitos al reconocer el ácido polimérico manurónico componente del alginato producido por la *P. aeruginosa*.

3.1.1.3 Sistema de complemento

El sistema de complemento tiene como objetivo producir la lisis del microorganismo que lo estimuló y activar el proceso de inflamación, pero, en razón a la presencia de biopelícula, esta función se ve limitada y no contribuye en la eliminación del agente.

En algunos modelos analizados con *P. aeruginosa* se ha observado que hay activación del sistema de complemento con las formas plantónicas de las bacterias, más que con la biopelícula del microorganismo, lo que permite desarrollar mecanismos de resistencia contra el sistema del complemento; sin embargo, se ha encontrado que la secreción de la proteasa alcalina y elastasa bacteriana inactivan este sistema.

Otro mecanismo de evasión de la acción del complemento se da en respuesta a la elevada concentración de alginato que no permite la opsonización

mediada por los componentes del sistema, mecanismo observado igualmente en infecciones por *S. epidermidis* productor de biopelícula. En la formación de biopelícula se inhibe el depósito de anticuerpos, lo que conlleva a una disminución en la activación de la vía clásica del complemento.

3.1.1.4 Citoquinas

Investigaciones recientes han demostrado que bacterias productoras de biopelícula, en diferentes escenarios experimentales *in vitro*, pueden inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina (IL) IL12 o el factor de necrosis tumoral (FNT) α , producidas por los linfocitos, las células dendríticas y los macrófagos.

En pacientes con fibrosis quística producida por *P. Aeruginosa* se ha observado una marcada disminución del interferón gamma (IFN γ), lo que conlleva a una disminución de la activación de los linfocitos T ayudadores 1 (LTh1). Por otra parte, se ha observado el incremento de la IL 4, activador de los linfocitos Th2, es decir, en estos pacientes existe una mayor proporción de linfocitos Th2 que Th1 activados.

La biopelícula producida por *Pseudomona aeruginosa* induce una elevada producción de FNT α e IL 1 β , lo que aumenta la infiltración de PMN causando daño tisular, la cual está determinada por la concentración de malondialdehído, lactato deshidrogenasa y el contenido de glutatión, lo que contribuyen a la persistencia bacteriana en comparación con sus homólogos planctónicos.

En modelos experimentales murinos en los que se induce pielonefritis causada por *P. aeruginosa* productora de biopelícula se encontró significativamente disminuida la producción de IL10 comparada con las células plantónicas; este hallazgo sugiere que la producción de IL 10 es una nueva estrategia usada por las células productoras de biopelícula para causar daño tisular y persistencia bacteriana, ya que mantiene regulada la respuesta inmune del hospedero.

Leucocitos peritoneales de ratón estimulados con toxinas de *S. aureus* plantónicas o de biopelícula demostraron la producción y la función inmunomoduladora de las citoquinas FNT α , IL6, IL10, MCP1 y MCP1 α , lo que indica que la alteración en la producción de las citoquinas no podían ser la única razón para que la función de la fagocitosis no se realice de manera adecuada por la presencia de biopelícula.

Estudios realizados *in vitro* con biopelícula dental y células epiteliales gingivales humanas observaron que las citoquinas IL1b, IL6 y las quemoquinas CXCL8 fueron degradadas por la biopelícula después de cuatro horas de exposición. Después de 24 horas de exposición con biopelícula de *S. aureus* se observó una reducción en la producción de citoquinas por parte de los queratinocitos. Los resultados de este estudio revelan que la producción de citoquinas proinflamatorias es diferente en el estímulo dado por la biopelícula al del estímulo de las células plantónicas, y esto podría tener implicaciones para la formación y la persistencia de las heridas crónicas.

Especies de *Streptococcus* orales, cuando son productores de biopelícula o como formas plantónicas, expresan perfiles diferentes de respuesta inmune comparados con otras especies. Por lo general, estos microorganismos inhiben la producción de quemoquinas, mientras que otras estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL1 α , IL6 e IL 8, entre otras. En el caso de la biopelícula producida por *P. aeruginosa*, ésta induce una elevada producción de FNT α e IL 6 más que en forma plantónica.

Por otra parte, se ha encontrado que los lipopolisacáridos (LPS) aislados de bacterias productoras de biopelícula inducen la producción de citoquinas proinflamatorias más que los LPS aislados de bacterias plantónicas.

3.1.2 Respuesta inmune adaptativa y biopelícula

La respuesta inmune adaptativa contra un agente productor de biopelícula y uno no productor radica en la alteración de la función de la respuesta inmune y la colaboración de sus componentes para eliminar el agente agresor. Un ejemplo de esto han sido los resultados de estudios que han reportado disminución de la blastogénesis de los linfocitos T y B por la presencia del exopolisacárido del *Staphylococcus epidermidis*.

3.1.2.1 Linfocitos B y anticuerpos

En las bacterias productoras de biopelícula se ha observado deficiencia en la acción de los anticuerpos en su función opsonizante y promotora del movimiento dirigido o quimiotaxis, lo cual repercute en la actividad fagocítica de los leucocitos.

Los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra un gran número de factores de virulencia de los patógenos productores de biopelícula son los mayores causantes de daño tisular en el huésped infectado.

En pacientes con fibrosis quística se producen anticuerpos contra la elastasa, lipopolisacáridos, flagelos, etc., lo cual indica que estos antígenos son neutralizados en una infección crónica y en infecciones pulmonares causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, en las que se ha observado una acción deficiente de la IgG2 e IgG3.

Otros estudios relacionados con *Staphylococcus aureus* productores de biopelícula han demostrado el efecto opsónico de la IgG frente a esta bacteria, de manera que resulta de esta interacción la activación del sistema de complemento, sin afectar la adhesión de los PMN a la biopelícula o incrementar la degranulación o la fagocitosis. No obstante, se ha observado un aumento en la producción de radicales de oxígeno, la cual dependía del revestimiento de la biopelícula por los anticuerpos IgG.

En otros estudios se ha observado que datos preclínicos y clínicos sugieren que los anticuerpos juegan un papel importante en contra de *S. aureus*, por tanto, pacientes hipogamaglobulinémicos tienen un alto riesgo de padecer infecciones por estafilococos. Este estudio generó una hipótesis según la cual la proliferación de linfocitos B, inducida por la proteína A del *Staphylococcus* y por la continua exposición al antígeno sin la participación de los LT ayudadores mediante el estímulo dado por las citoquinas lleva a la delección de LB activados por el antígeno y a la anergia.

3.1.2.2 Linfocitos T

Se ha observado una disminución de la actividad de las células dendríticas para estimular la señalización de los linfocitos T. En el caso de biopelícula producida por *Staphylococcus aureus* existe un incremento de las citoquinas inductoras de la respuesta de los linfocitos T ayudadores 1 (LTh1) como la IL12, IFN gama, FNT e IL8.

Pacientes con infecciones causadas por agentes productores de biopelícula demostraron que la respuesta inmune inflamatoria es dependiente de los linfocitos Th1 con concentraciones elevadas de PMN, IFN γ , G-CSF y proteína de macrófago estimuladora de la inflamación 1beta en mucosas nasales.

En la enfermedad periodontal se ha observado la producción de biopelícula y la respuesta inmune en la periodontitis; está relacionada, predominantemente, por los linfocitos B, mientras que en las lesiones por gingivitis la respuesta inmune esta mediada por los linfocitos T. En el caso de la periodontitis, existe una señalización por parte de los linfocitos T con un predominio

de la activación de los linfocitos Th2 para que se dé la respuesta inmune humoral por parte de los LB. Por otra parte, en el tejido periodontal se han observado células T reguladoras (T reg) y linfocitos Th17, los cuales son importantes en la inmunorregulación de la enfermedad periodontal causada por gérmenes productores de biopelícula.

Los productos de las células LTh17 incluyen IL-17, IL-22 e IL-26, los cuales actúan en defensa de infecciones con bacterias plantónicas, de modo que producen la migración de los PMN al tejido infectado y la producción de estas células en la médula ósea por estímulo del G-CSF, mientras que en infecciones crónicas producidas por bacterias productoras de biopelícula las Th17 contribuyen al incremento de la lesión del tejido afectado.

3.2 Estrategias antibiopelícula

3.2.1 Estrategias para combatir infecciones por implantes médicos y agentes que degradan la biopelícula

Los microorganismos pueden colonizar la prótesis en el momento de su colocación por inoculación directa durante la manipulación del implante o por contaminación aérea de la herida, después del implante por diseminación hematogena y durante una bacteriemia o por extensión directa o partir de un foco adyacente de infección. Las estrategias utilizadas para combatir la formación de biopelícula consisten en evitar la adherencia (manejo de materiales, uso de antibióticos o anticoagulantes), evitar la diferenciación y congregación bacteriana (antagonistas del *quorum sensing* o uso de lactoferrina), la eliminación de la matriz (uso de enzimas) y, lo que supone una novedad, la administración de bacteriófagos específicos.

La contaminación del implante en el momento de la intervención quirúrgica se puede evitar mediante quimioprofilaxis quirúrgica y/o la utilización de quirófanos dotados de flujo laminar. La posible contaminación posterior se puede evitar mediante el diagnóstico y el tratamiento precoz de las infecciones y mediante el uso de quimioprofilaxis en intervenciones y procedimientos médicos que pueden llevar a bacteriemia.

El tratamiento antibiótico sistémico, en general, no consigue la erradicación de la biopelícula, pero disminuye la posibilidad de colonización que, en general, se debe implantar para destruir las bacterias que pasan al torrente circulatorio. El tratamiento antibiótico sistémico debe ser, inicialmente,

de amplio espectro, así como debe sustituirse por antibióticos específicos cuando se informe la identificación y la susceptibilidad del microorganismo causante de la infección. Dado que un número muy elevado de infecciones asociadas a implantes están causadas por bacterias grampositivas del género *Staphylococcus* spp., la vancomicina y teicoplanina son los antibióticos de primera elección para el tratamiento de estas infecciones.

Asimismo, la producción endógena de enzimas permite la degradación de exopolisacáridos de la biopelícula para lograr la dispersión de microorganismos y dar lugar a la generación de una nueva colonia. Una vez que la biopelícula está madura, se produce un nuevo ciclo de desarrollo, el cual permite deducir que es viable el uso de diferentes enzimas para la degradación de biopelícula y, subsecuentemente, combatir la infección; sin embargo, debido a la heterogeneidad del exopolisacárido, es necesario utilizar una mezcla de enzimas para su degradación. Entre las más utilizadas se encuentran proteasas, glucosidasas y pectinasas, entre otras.

En los últimos años se ha destacado una propuesta diferente para el tratamiento de biopelícula: el uso de bacteriófagos, virus específicos para las bacterias que al replicarse en su interior producen lisis celular. Estudios realizados con el bacteriófago T4 han mostrado que este puede infectar y replicarse en *Escherichia coli*, disgregando la morfología de la biopelícula y lisando las bacterias. Las ventajas del uso de bacteriófagos radican en que se elimina la necesidad de expresar, purificar y entregar grandes dosis de enzimas a sitios específicos de infección que dificultan su acceso por la presencia de la matriz extracelular.

Otras estrategias antibiopelícula incluyen:

- **Proteínas DNABII.** A estas proteínas se les ha atribuido la capacidad de facilitar la formación de estructuras en forma de tejido o malla conformadas por el DNA extracromosomal proveniente de la biopelícula producida por *Haemophilus influenzae* durante el transcurso de una infección. Las proteínas que hacen parte de esta estructura se dividen en dos subtipos, la HU y la HIF, y han sido postuladas como blanco para crear una vacuna, ya que las proteínas DNABII juegan un papel importante en el mantenimiento estructural de la biopelícula. Adicionalmente, la utilización de una vacuna anti-HIF en conjunto con amoxicilina ha mostrado una clara acción bactericida.

- **Degradación de PIA.** Algunas bacterias producen una enzima denominada dispersin B que degrada el enlace beta de la N-acetilglucosamina del PIA. Esta enzima ha sido encontrada en *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y se le

ha atribuido un efecto potencial antibiopelícula, mediante su desensamblaje en muchas cepas de *S. epidermidis* y *S. aureus*.

- *Lisostafina*. Esta enzima degrada el peptidoglicano de los estafilococos. La forma de acción no es bien conocida, pero se cree que la matriz extracelular producida por cocos grampositivos puede tener moléculas que hacen parte de la pared celular, sobre los cuales actúa la lisostafina.

- *Proteínasa K, Tripsina y DNAsa*. La proteínasa K y la tripsina fácilmente pueden alterar la biopelícula en el *S. epidermidis*, destruyendo proteínas de la biopelícula en superficies inertes. Además, la DNAsa I también ha tenido éxito en el desamblaje de la biopelícula en *S. aureus*, destruyendo el DNA extracelular presente en las biopelículas. Este hallazgo contribuye como evidencia de que las proteínas DNABII y el eDNA son importantes componentes estructurales de la matriz de la biopelícula.

- *Recubrimiento de la superficie de dispositivos médicos*. Se ha propuesto cubrir los dispositivos médicos con antibióticos u otras sustancias antibacterianas como estrategia para alterar la superficie del dispositivo. Estos enfoques han tenido un éxito limitado, a causa de los diversos mecanismos de resistencia bacteriana. Por esta razón, los esfuerzos deben enfocarse tanto en los estudios básicos moleculares de formación de biopelícula como en las diferentes estrategias para su control.

- *Vacuna antiPIA y antiproteínas de unión a la fibronectina (LPXTG)*. Se han producido sueros antiPIA que utilizan anticuerpos tipo IgG1 y varias proteínas de la superficie tales como proteínas de unión a la fibronectina (LPXTG) A y B, pero solo se ha demostrado su eficacia en modelos de infección animal.

- *Vacuna anti-ácido lipoteicoico*. Consiste en un anticuerpo tipo IgG dirigido contra el ácido lipoteicoico de los estafilococos. El ácido lipoteicoico interviene en la adherencia de la bacteria a la fibronectina. Esta vacuna ha mostrado una buena actividad en neonatos y se encuentra en fase de validación para su utilización generalizada.

- *Alginato liasa*. Es una enzima producida por la *P. auriginosa* utilizada para degradar polímeros de la matriz de la biopelícula durante la etapa de maduración. Se ha demostrado que al utilizar esta enzima junto con DNAsa y con medicamentos como la amikacina aumenta notablemente la acción del antimicrobiano sobre las bacterias que conviven en la biopelícula. También puede ser útil para el tratamiento de la fibrosis quística, en la que se acumula

polisacárido alginato en los pulmones de las personas infectadas por la *Pseudomona auriginosa*.

- **Óxido nítrico.** Es resultado del metabolismo anaerobio bacteriano y se ha demostrado que sirve como señal de dispersión de las bacterias que conviven en la biopelícula. El nitroprusiato de sodio, cuando se metaboliza, produce óxido nítrico. La utilización del nitroprusiato interviene en el desprendimiento de las colonias formadas en la biopelícula y potencia los tratamientos de los antibióticos.

- **Quorum sensing.** En cuanto mecanismo de producción de factores de virulencia, lo que implica la producción de biopelícula como respuesta a la poca actividad de agar en su efecto regulador de biopelícula. Se ha evidenciado en superficies abióticas la capacidad de inducir el sistema agar para la inhibición de la formación de la biopelícula. Del mismo modo, se conoce que los factores de virulencia agar-dependientes tienen su verdadera importancia en superficies bióticas, al momento de inducir infección, lo que conlleva a realizar más estudios *in vivo*.

- **A101.** Es un polisacárido capsular que está presente en *Vibrio sp*; este exopolisacárido, compuesto por galacturónico, ácido glucurónico, ramnosa y glucosamina, inhibe la formación de biopelículas en una amplia gama de bacterias gramnegativas y grampositivas sin poseer actividad antibacteriana. A101 tiene la capacidad de afectar la biopelícula ya producida por la *Pseudomona aeruginosa* e inhibe la interacción de la superficie celular de *S. aureus*. Esta molécula se está probando para el recubrimiento de dispositivos médicos.

- **Exoproducto bacterianos.** Las *Pseudoalteromonas spp.* son conocidas como productoras de varios compuestos extracelulares biológicamente activos, lo que incluye agentes antibacterianos. Un ejemplo es la proteína ABPP, que juega un papel importante en la última etapa de formación de biopelícula en medios marinos. ABPP ha demostrado que induce la alteración en la biopelícula producida por bacterias gramnegativas, además de afectar la viabilidad celular de las bacterias que conviven en esta.

Las cepas de *E. coli* productoras de cápsulas del grupo II liberan un polisacárido que previene la formación de biopelículas en bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas. Este polisacárido actúa tanto en la adhesión inicial al debilitar los contactos de la superficie celular y en la posterior formación de biopelícula, mediante la reducción de interacciones célula-célula.

Un lipopéptido obtenido a partir de una cepa de *Bacillus circulans* de origen marino demostró propiedades antiadhesivas contra diversas bacterias, pero su efecto sobre la formación de biopelículas no se ha investigado.

Por otra parte, se encontró que los extractos de *Kingella kingae* inhiben la biopelícula de los siguientes microorganismos: *Aggregatibacter actinomycetem comitans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* y *K. kingae*. En estos casos, la biopelícula se pudo inhibir gracias a la modificación de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de la célula, específicamente a nivel de la matriz de la biopelícula y el sustrato, mediante la actividad de un polisacárido. En la estructura del extracto se encuentran dos polisacáridos: un polisacárido lineal con la estructura $\rightarrow 6)-\alpha-D-GlcNAc p - (1 \rightarrow 5)-\beta-D-Ocl p - (2 \rightarrow$, idéntico a un polisacárido capsular producido por *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 5; adicionalmente, un polisacárido lineal, designado PAM galactano, el cual muestra propiedades de surfactante que inhibe la formación de biopelículas en diversas bacterias y hongos.

3.2.2 Péptidos antimicrobianos

100

Una de las estrategias antimicrobianas que los organismos vivos han utilizado es la de los péptidos antimicrobianos (PAM) que conforman una serie de moléculas del sistema inmune innato que permite la defensa contra diversos agentes al agredir su membrana y afectar funcionalmente al microorganismo, como, por ejemplo, en la síntesis de proteínas o al inhibir su replicación. Los péptidos antimicrobianos son producidos por células como los polimorfonucleares neutrófilos y los macrófagos, entre otros, los cuales producen PAM de menos de 200 aminoácidos con un alto potencial para uso clínico, ya que ejercen múltiples mecanismos de acción sobre el agente infeccioso, con amplio espectro de actividad y bajo potencial de resistencia.

Según su estructura y su composición, los PAM se clasifican en lineales (posiblemente con láminas beta), alfa hélice y algunos tienen giros y bucles. Según su carga se clasifican en aniónicos o catiónicos (véase la Tabla 3.1). Los PAM catiónicos, según su estructura, su tamaño y el tipo de aminoácidos que lo componen se clasifican en: péptidos con predominio de un aminoácido (prolina, triptófano, arginina, histidina); péptidos con predominio alfa helicales con regiones anfipáticas (cecropina, maganina, LL-37); péptidos con estructura β -plegada con predominio de puentes disulfuro intramoleculares; y péptidos con estructura extendida; péptidos con estructura de bucle (loop) por un puente disulfuro en la mayoría de los casos.

La manera en la que los PAM actúan sobre los microorganismos es deformando la membrana celular, de modo que inhiben la síntesis de ADN y ARN, así como la síntesis de proteínas de la pared y la función ribosomal, y bloquean la función de las chaperonas y las mitocondrias.

Para que los PAM tengan la capacidad antibacteriana deben poseer una carga neta positiva que les permite interactuar con los fosfolípidos aniónicos de la membrana del microorganismo; igualmente, deben tener regiones apolares con aminoácidos hidrófobos (anfipaticidad) y regiones con cargas positivas que contengan aminoácidos catiónicos tales como la arginina, lisina e histidina, características que favorecen la interacción entre el péptido antimicrobiano y la membrana del microorganismo.

Tabla 3.1 Clasificación de los PAM

Tipo de péptido antimicrobiano PAM	Ejemplo y origen
Péptidos aniónicos	<ul style="list-style-type: none"> • Maximin de anfibios. • Pequeños péptidos aniónicos ricos en ácido glutámico y aspártico, provenientes de ovejas, ganado y humanos.
Péptidos catiónicos lineales alfa hélice	<ul style="list-style-type: none"> • Cecropinas (A), andropín, moricín, ceratotoxina y mellitín de insectos. • Cecropín P1 de nematodos <i>Ascaris</i> spp. • Magainín, dermaseptín, bombinín, brevinín-1, esculentinas y buforín II de anfibios. • Pleurocidín de la secreción mucosa de la piel de peces. • Plasmína seminal, BMAP, SMAP (SMAP29, ovispirín), PMAP del ganado, ovejas y cerdos. • LL37 de humanos.
Péptidos catiónicos enriquecidos con aminoácidos específicos	<ul style="list-style-type: none"> • Péptidos que contienen prolina, incluyendo la abaecina de las abejas. • Péptidos que contienen prolina y arginina, incluyendo apidaecinas de las abejas, drosocín de <i>Drosophila</i> spp., picrocoricín del chupasavia europeo, bactenicinas del ganado (Bac7), ovejas y cabras, y PR-39 de cerdos. • Péptidos que contiene prolina y fenilalanina, incluyendo profenina del cerdo. • Péptidos que contienen glicina, incluyendo a himenoptaecina de las abejas.

continúa (pág. 102)

Tipo de péptido antimicrobiano PAM	Ejemplo y origen
Péptidos catiónicos enriquecidos con aminoácidos específicos	<ul style="list-style-type: none"> • Péptidos que contienen glicina y prolina, incluyendo coleopterín y holotripcina de escarabajos. • Polipéptidos salivales pequeños ricos en histidina, incluyendo histatinas del hombre y algunos primates mayores.
Péptidos aniónicos y catiónicos que contienen cisteína y forman puentes disulfuro	<ul style="list-style-type: none"> • Péptidos que contienen un puente disulfuro, incluyendo brevinina. • Péptidos con dos puentes disulfuro, incluyendo protegrinas del cerdo y taquiplesinas del cangrejo cacerola. • Péptidos con tres puentes disulfuro incluyendo alfa defensinas de humanos (HBD1, DEFB118), ganado, ratón, rata, cabra y aves de corral; y la 0-defensina rhesus del mono rhesus.
Péptidos aniónicos catiónicos que son fragmentos de proteínas mayores	<ul style="list-style-type: none"> • Lactoferricina de la lactoferrina I. • Casodicina I de la caseína humana. • Dominios antimicrobianos de la alfa lactoalbúmina bovina, hemoglobina humana, lisosima y ovoalbúmina.

Fuente: Tomado de Tellez y Castaño (42).

102

El péptido puede ejercer su acción sobre la membrana del microorganismo mediante la atracción entre ellos por uniones electrostáticas y, posteriormente, se da el anclaje formando poros transmembranales.

Algunos de los efectos de los PAM sobre las bacterias se encuentran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Ejemplos de PAM y su efecto sobre la bacteria

PAM	Efecto sobre la bacteria
Polimixina	Neutralización o disgregación de los lipopolisacáridos (LPS): afecta la permeabilidad de la membrana de Gram (-) por unión al lípido A de los LPS.
Lantibióticos Tipo A (nisina, subtilina, epidermina y Pep5) Tipo B (mersacidina and cinnamicina)	Inhibición de la síntesis de la pared celular: se produce daño membranar e inhibición de la producción de enzimas.

continúa (pág. 103)

PAM	Efecto sobre la bacteria
Alameticina, ceratotoxina magainina, catelicidina, HPA3 C, cecropina P1, caerina 1.1 y LL37.	Alteración o permeabilización de la membrana.
Pirrocoricina	Inhibición de proteínas involucradas en la división celular por acción de péptidos ricos en prolina para inhibir la ATPasa DnaK, esencial para iniciar la replicación del ADN cromosomal.
Buforina II, PR-39, indolicidina y el tPMP	Inhibición en la síntesis de macromoléculas por la interacción con ácidos nucleicos: interactúan directamente con el material genético para inhibir su función.

3.2.3 Péptidos antibiopelícula contra *Staphylococcus spp.*

Los materiales inertes, como, por ejemplo, catéteres o cualquier dispositivo médico, en contacto con el flujo sanguíneo y dependiendo del tiempo que duren implantados y el estado inmune del paciente, sirven de vehículo en la formación de la biopelícula, lo cual va a limitar la actividad de los antibióticos tanto en bacterias gramnegativas como grampositivas. El *Staphylococcus epidermidis*, especie mayormente aislada en neonatos con sepsis, puede producir un polisacárido de adhesión intercelular (PIA) que, en presencia de glucosa, va a favorecer la formación de biopelícula; su síntesis es mediada por el operón *icaADBC*, con un gen regulador represor negativo *icaR*, tal como se describió ampliamente en el primer capítulo.

Este regulador negativo (*icaR*) pertenece a la familia de proteínas represoras de tetraciclina (TetR) que actúan como sensores químicos citosólicos y responden a señales en ambientes específicos. Es un homodímero predominantemente alfa helical (cada monómero posee dos cadenas alfa), en el cual las alfa hélices 2 y 3 conforman su dominio N-terminal y corresponde a un dominio de unión a ADN con estructura hélice-giro-hélice (HTH), que ha sido encontrada en varios reguladores transcripcionales de bacterias y arqueobacterias tales como el represor de resistencia a tetraciclina.

A partir de la correlación entre el mecanismo de acción actualmente conocido de *icaR* y los péptidos antimicrobianos catiónicos y/o aniónicos se pretende diseñar péptidos análogos a *icaR*, es decir, con especificidad

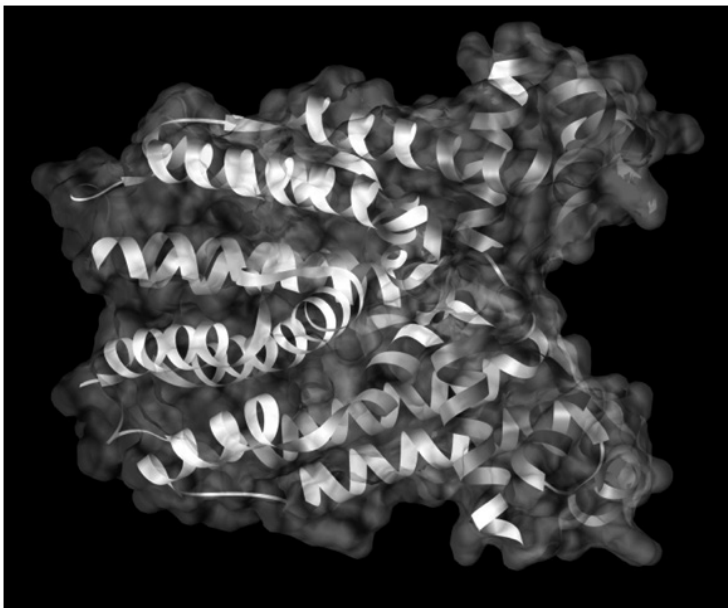
antibiopelícula, los cuales podrían tener la capacidad de desestabilizar tanto las biopelículas como las membranas de las células por la generación de polarizaciones en estas. Esta podría llegar a convertirse en una nueva estrategia de tratamiento, ya que, como es conocido, la biopelícula hace que el antibiótico sea 1000 veces menos efectivo.

A continuación, se describe cómo se ha aplicado esta iniciativa de uso de péptidos antibiopelícula en el grupo de investigación REMA de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, en alianza estratégica con el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

3.2.3.1 Péptido nativo de la secuencia proteica de *icaR*

Se obtuvieron imágenes moleculares de la proteína *icaR* mediante el programa UCSF Chimera y se buscaron los dominios funcionales en la proteína empleando la herramienta informática Smart, tal como se observa en la Figura 3.5.

Figura 3.5 Representación esquemática en superficie de Conolli de un dímero de la proteína *icaR* que actúa como represor de la familia TetR. El dominio TetRN (rojo) muestra el sitio de unión al ADN



Se identificó el dominio del represor de resistencia a tetraciclina (TetRN) basándose en su similitud a nivel de secuencia con IcaR en el extremo amino-terminal entre los residuos 5 y 51, cuya secuencia corresponde a IIDNAITLF-SEKGYDGTTLDDISKSVNIKKASLYYHYDNKEEIYRKS.

Tras la búsqueda del fragmento con mejor carácter antimicrobiano derivado de IcaR para ser sintetizado, se presentan las diez mejores secuencias halladas mediante el servidor AntiBP, ordenadas a partir del score indicativo de su potencial antimicrobiano (véase la Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Lista de los diez fragmentos con mejor potencial antimicrobiano obtenidos del servidor AntiBP derivados de la secuencia de icaR

N.º	Posición de inicio	Secuencia de 15 aa	Score
1	21	TLDDISKSVNIKKAS	0,930
2	161	GIIEDSKNRFKDQVY	0,868
3	20	TTLDDISKSVNIKKA	0,827
4	159	KFGIIEDSKNRFKDQ	0,702
5	29	VNIKKASLYYHYDNK	0,599
6	25	ISKSVNIKKASLYYH	0,585
7	169	RFKDQVYSLLNVLK	0,574
8	156	FSQKFGIIEDSKNRF	0,568
9	170	FKDQVYSLLNVLK	0,530
10	120	HDELIKYYDPHTIAL	0,502

De la tabla anterior se seleccionó el fragmento n.º 1 de 15 residuos (denominado IR1), el cual presentó mejor score antimicrobiano (0,930), y se tomó como la secuencia patrón nativa de la cadena A de IcaR. A partir de esta se diseñaron péptidos alternos mediante el reemplazo de aminoácidos, tratando de optimizar las características requeridas a fin de potenciar el carácter antimicrobiano y antibiopelícula. Para esto se tuvo en cuenta la preferencia

registrada de todos los aminoácidos naturales para cada posición de acuerdo con el análisis propuesto por Sneh Lata para péptidos de 15 residuos examinados desde el *N-terminal* del péptido nativo derivado de la proteína. Además, con el fin de mejorar la estructura secundaria de IR1, se tuvo en cuenta el registro *Chou-Fasman* que evidencia la predisposición de cada uno de los aminoácidos naturales para formar α -hélices, favorables para la interacción con membranas bacterianas, tal como se sustentó (véase la Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Aminoácidos naturales con predisposición para formar α -hélices

Aminoácido	Afinidad hacia alfa hélices	Aminoácido	Afinidad hacia alfa hélices
Alanina	1,29	Lisina	1,23
Leucina	1,30	Fenilalanina	1,07
Metionina	1,47	Ácido aspártico	1,04
Ácido Glutámico	1,44	Arginina	0,96
Histidina	1,22	Isoleucina	0,97

Fuente: Tomado de Chu, Mei y Chia (9).

Según el análisis de los resultados mostrados en la Tabla 3.4 se pueden retomar nuevos y mayores cambios que, combinados entre sí, dan como resultado las mejores modificaciones, a fin de concentrar en la menor cantidad de secuencias las correcciones más efectivas para elevar el score antimicrobiano. Tales fragmentos de 15 residuos decisivos para la elección final se muestran en la Tabla 3.5, acompañados de los respectivos datos de carga neta, predicción de estructura secundaria y anfipaticidad revelada mediante el diagrama de *helical wheel*.

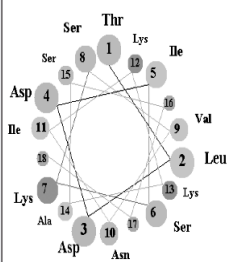
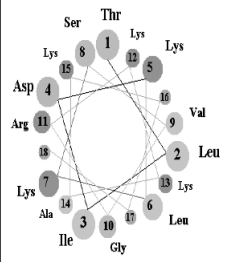
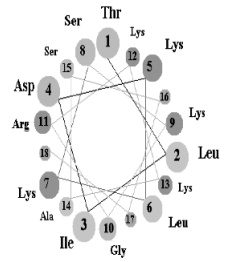
En este modelo, de todas las secuencias que podían reunir una buena carga, una predicción de estructura secundaria helicoidal completa y los puntajes más altos posibles de alcanzar en una anfipaticidad bien distribuida se escogieron solo dos péptidos para continuar junto con IR1, denominados a partir de ahora como IR2 e IR3 (dos y tres atribuidos a la segunda y tercera secuencia, respectivamente, seleccionadas para llevar a término la investigación).

En la Tabla 3.5 se muestran las tres secuencias escogidas (modificaciones resaltadas en amarillo) para ser sintetizadas y sus correspondientes propiedades. Las convenciones de los colores que aparecen en las gráficas de *helical wheel* son:

- Anaranjado: residuo no polar;
- Verde: residuo polar, sin carga;
- Rosa: residuo ácido, y
- Azul: residuo básico.

Tabla 3.5 Tablas de los péptidos escogidos para ser sintetizados (IR1, IR2 e IR3) con sus respectivas características

Datos	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3
Nombre	IR1	IR2	IR3
Secuencia	TLDDISKSVNIKKAS	TLIDKLKSVGRKKAK	TLIDKLKSKGRKKAS
Origen	Nativo de la secuencia de la cadena A de IcaR, desde el residuo 21 al 35	Derivado a partir de IR1	Derivado a partir de IR1
Score antimicrobiano	0,930	3,057	3,426
Estructura secundaria	C H H H H H H H H H E E C C	C H H H H H H H H H H H C	C H H H H H H H H H H H C C

Datos	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3
Peso molecular (PM)	1618,85	1685,09	1637,03
Punto isoelectrico	9,86	11,00	11,00
Carga	+1	+5	+5
Helical wheel			

Fuente: Tomado de Botero (6).

3.2.3.2 Síntesis de péptidos en fase sólida (estrategia Fmoc)

El péptido nativo de la secuencia proteica de IcaR y los dos péptidos análogos diseñados y mejorados a partir de este se sintetizaron mediante síntesis química en fase sólida, por la estrategia $N\alpha$ -Fmoc, descrita previamente por Merrifield y modificada por Houghten. Se utilizaron como disolventes diclorometano (DCM), isopropanol (IPA) y N,N' -dimetilformamida (DMF); también se usa ácido trifluoracético (TFA), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), N,N' diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1,2-etanoditiol (EDT) como reactivos de síntesis. Como soporte sólido se usó resina Rink Amida (sustitución: 0,46 mmol/g); de igual manera, se usan los diferentes L - α -aminoácidos (Fmoc-aminoácidos) de elevada pureza. El protector del grupo α -amino terminal de cada uno de los aminoácidos es el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). El protector de la cadena lateral para la lisina (K) usada es el tertbutoxicarbonilo (Boc), para la Serina (S) es el grupo tertbutilo (tBu), y el resto de aminoácidos usados no poseen protección en su cadena lateral.

Las reacciones de acoplamiento se realizan a temperatura ambiente, por activación del grupo carboxilo de cada aminoácido con DCC y HOBt (1:1) en DMF con excesos. En los acoplos que tengan alguna dificultad se puede realizar una segunda activación con DCC y HOBt (1:1) en DMF-DCM (1:1) con siete excesos, usando en todos los casos ensayo de la ninhidrina para

verificación. La desprotección del péptido se realiza con solución de ácido trifluoroacético (95 %), triisopropilsilano TIS (2,5 %) (Merck) y agua desionizada (2,5 %).

3.2.3.3 Purificación de los péptidos

Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) se realizó la purificación de los péptidos, a través de una columna analítica RP18 (marca Waters), en la que se colocaron 20 μ L (2mg/mL) de la muestra y como solventes grado HPLC utilizados fueron acetonitrilo, agua, metanol y ácido trifluoroacético; la muestra fue eludida por un sistema de gradiente A/B de 0 a 70 % B (A: agua desionizada TFA 0,05 %, B: acetonitrilo TFA 0,05 %) durante 45 minutos con un flujo de solvente de 1,0 mL/min a temperatura ambiente.

A partir de esta primera corrida en la columna analítica se identificaron los tiempos de retención de los péptidos crudos, a fin de llevar a cabo el resto de la purificación en columnas de Sepak C-18 con 40 μ g de cada péptido, eluidos en la solución manual del gradiente de acetonitrilo con el correspondiente porcentaje, determinado con anterioridad mediante la columna HPLC-RP. La detección de las señales se logra mediante un detector UV-VIS (ultravioleta visible) con un seguimiento a 220 nm de acuerdo con el protocolo establecido previamente (datos no mostrados).

3.2.3.4 Caracterización de los péptidos

Mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) se logra la caracterización del peso molecular de los péptidos IR1, IR2 e IR3 aplicando pulsos de 3 ns con un láser de N₂ a 337 nm sobre la mezcla sólida péptido-matriz (DHB). El voltaje de aceleración y del reflector que se debe aplicar es, respectivamente, +17,5 kV y 20 kV. El espectro se obtiene sumando 20 pulsos de láser para lograr condiciones comparables.

Por medio de la técnica de dicroísmo circular se obtienen los espectros de los péptidos y se analizan mediante el programa Jasco. Las condiciones para la captura del espectro deben ser: corrimientos de 0,2 nm, ancho de banda 1 nm, respuesta 2 s, sensibilidad estándar, rango de 160-190 nm, el barrido de 20 nm/min y, previo al registro, tres acumulaciones del espectro. Para cada péptido se prepara una solución stock de 2 mm, de la cual se parte para preparar una solución acuosa de 200 μ M en TFE al 30 %. Se registra el espectro para cada muestra y su polímero en las mismas condiciones.

3.2.3.4 Evaluación de la toxicidad de los péptidos

Para que los PAM tengan aplicaciones farmacológicas se requiere que posean actividad antimicrobiana, pero que no muestren actividad citotóxica contra las células normales del huésped. Los péptidos evaluados muestran, en general, una baja toxicidad, siendo el péptido IR3 el más seguro, evidenciado por el ensayo de hemólisis que demostró poca capacidad de los péptidos para lisar glóbulos rojos, lo que significa que no causaría una respuesta significativa de tipo inmune; asimismo, en el ensayo de citotoxicidad los péptidos presentan una CL_{50} por encima de 1000 $\mu\text{g/mL}$, lo que facilita su uso inocuo, siendo menos tóxicos que la gentamicina, aminoglucósido de referencia para el control bacteriano.

Al tener en cuenta la secuencia, el score antimicrobiano de los péptidos obtenidos y el bajo grado de toxicidad, estos podrían postularse como moléculas candidatas en el diseño de nuevos fármacos antimicrobianos y/o antibiopelícula, por su posible actividad análoga a la regulación negativa del represor nativo *icaR*, responsable de la formación de biopelícula en *Staphylococcus spp.*

Referencias

1. Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro I. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2015;5-7.
2. Agarwal S, Sharma G, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Antimicrobial peptides as anti-infectives against *Staphylococcus epidermidis*. *Med Princ Pract.* 2015 dic;18.
3. Amblard M, Fehrentz JA, Martinez J, Subra G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol Biotechnol.* 2006;33:239-254.
4. Batoni G, Maisetta G, Esin S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 2015;pii:S0005-2736(15):00352-1.
5. Bantoni G, Maisetta G, Brancatisano F, Esin S, Campa M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. 2011;18:256-279.
6. Botero, S. Síntesis de péptidos derivados del represor *icaR* de *Staphylococcus epidermidis* con posible actividad anti biopelícula y baja actividad hemolítica (trabajo de pregrado). 2013; Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia
7. Buchan DW, Minneci F, Nugent TC, Bryson K, Jones DT. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucl Ac Res.* 2013;41:349-57.
8. Cabrera R, Morelos R, Galicia AN, Meléndez E. Antibiotic resistance and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* strains, isolated from a tertiary care Hospital in Mexico City. *ISRN Microbiol.* 2013;1-5.
9. Chu D, Mei G, Chia Y. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in *staphylococci*. *Front Cell Inf Microbiol.* 2012;2:1-13.

10. Cheng H, Sen TZ, Jernigan RL, Kloczkowski A. Consensus data mining (CDM) protein secondary structure prediction server: combining GOR V and Fragment database mining (FDM). *Bioinf.* 2007;23:2628-30
11. Cheng H, Sen TZ, Kloczkowski A, Margaritis D, Jernigan RL. Prediction of protein secondary structure by mining structural fragment database Pol (Guildf). 2005;4314-4321.
12. Dean S, Bishop B, Hoek M van. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 2011;11:114.
13. Diamond-Hernández B, Solórzano F, Leaños B, Peregrino L, Miranda G. Production of icaADBC-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infec Dis.* 2010;10:68.
14. Donlan RM, Costerton JW. Biofilm: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002.15:167-193.
15. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *NIH Public Acces. Future Microbiol.* 2010;5:917-933.
16. Fitzpatrick F, Humphreys H, O’Gara JP. The genetics of staphylococcal biofilm formation—will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clin Microbiol Infect.* 2005:967-973.
17. Fuente-Núñez C de la, Cardoso MH, de Souza Cândido E, Franco OL, Hancock RE. Synthetic antibiofilm peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2015;pii:S0005-2736:00413-7.
18. Giacometti A, Cirioni O, Gov Y, Ghiselli R, Simona del Prete M, Mocchegiani F, et al. RNA III Inhibiting peptide inhibits in vivo biofilm formation by drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimic Ag Chemothe.* 2003;1979-1983.
19. Guzmán F. Diseño, síntesis y aplicaciones de los péptidos sintéticos —guía de laboratorio—. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Química; 2009.

20. Haisma EM, Breij A de, Chan H, Dissel JT van, Drijfhout JW, Hiemstra PS, et al. LL-37-derived peptides eradicate multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from thermally wounded human skin equivalents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58:4411-9.
21. Jeng WY, Ko TP, Liu CI, Guo RT, Liu CL, Shr, HL, et al. Crystal structure of IcaR, a repressor of the TetR family implicated in biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Nuc Ac.* 2008;36:1567-1577.
22. Jefferson K, Cramton S, Gotz F, Pier G. Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the ica locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol. Microbiol.* 2003;48:889-899.
23. Jensen P, Givskov M, Bjarnsholt, Moser C. The immune system vs *Pseudomona aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;59: 292-305.
24. Jesaitis AJ, Franklin MJ, Berglund D, Sasaki M, Lord CI, Bleazard JB, et al. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilminteractions. *J Immunol.* 2003;171:4329-39.
25. Lata S, Sharma BK, Raghava GP. Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinf.* 2007;8:263.
26. Liduma I, Trcevska T, Uis B, Zilevica A. Phenotypic and genetic analysis of biofilm. Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Med (Kaunas).* 2012;48:305-309.
27. Liu L, Fang Y, Wu J. Flexibility is a mechanical determinant of antimicrobial activity for amphipathic cationic α -helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828:2479-86.
28. McCann MT, Gilmore BF, Gorman SP. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J Pharm Pharmacol.* 2008;1551-1571.
29. Mishra B, Golla RM, Lau K, Lushnikova T, Wang G. Anti-staphylococcal biofilm effects of human cathelicidin peptides. *ACS Med Chem Lett.* 2015;7:117-21.

30. Monds RD, O'Tood GA. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiol.* 2008;17:73-85.
31. Muñoz L, Salazar L, Botero S, Navarrete J, Pinilla G. Possible antibiofilm effect of peptides derived from *IcaR* repressor of *Staphylococcus epidermidis* responsible for hospital-acquired sepsis. *Advan Comput Biol.* 2013;232:92-95.
32. Navarrete J, Pinilla G, Muñoz L, Ruiz A. Fagocitosis en neonatos: determinación de valores normales para la micro técnica de fagocitosis y muerte intracelular de *Candida albicans*. *Nova.* 2012;10:25-32.
33. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors—redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:453-460.
34. Ossa S, Parra N, Muñoz L, Navarrete J, Pinilla G. Fagocitosis de neutrofilos: estudio comparativo de la prueba de muerte Intracelular de Cándida y reducción de nitroazul de tetrazolium. Trabajo de grado. UCMC. 2011.
34. Park S, Park Y, Hahm K. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *Inter J Mol Science.* 2011;12;5971-5992.
35. Pérez-Cordero J, Lozano JM, Cortes J, Delgado G. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides.* 2011.32:683-690.
36. Peters B, Shirliff M, Jabra-Rizk M. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Path.* 2010;6:1553-7374.
37. Pettersen E, Goddard T, Huang C, Couch, G, Greenblatt D, Meng, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004;25:1605-1612.
38. Pinilla G, Muñoz LC, Salazar LM, Navarrete J, Guevara A. Diseño de péptidos basado en la secuencia análoga al represor negativo *icaR* de *Staphylococcus spp.* *Rev Col Quím.* 2015;44:5-9.

39. Resende JM, Moraes CM, Prates MV, Cesar A, Almeida FC, Mundim NC, et al. Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, and -3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. *Pep.* 2008;29:1633-1644.
40. Richards J, Melander C. Small molecule approaches toward the non-microbicidal modulation of bacterial biofilm growth and maintenance. *Anti-Inf Agi Med Chem.* 2009;8:295-314.
41. Routh M, Su C, Zhang Q, Yu E. Structures of AcrR and CmeR: insight into the mechanisms of transcriptional repression and multi-drug recognition in the TetR family of regulators. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794:844-851.
42. Tellez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos. *Infectio.* 2010;14:55-67.
43. Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, et al. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* 2004;6:269-275.
44. Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nuc Ac Res.* 2009;37:933-937.
45. Wojtyczka R.D, Orlewska K, Kępa M, Idzik D, Dziedzic A, Mularz T, et al. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11:4619-33.
46. Xu L, Li H, Vuong C, Vadyvaloo V, Wang J, Yao Y, Otto M, et al. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 2006;74:488-496.
47. Zhao G, Zhong H, Zhang M, Hong Y. Effects of antimicrobial peptides on *Staphylococcus aureus* growth and biofilm formation in vitro following isolation from implant-associated infections. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:1546-51



**UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE CUNDINAMARCA**

SELLO EDITORIAL



FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA COMO MECANISMO DE PERSISTENCIA Y RESISTENCIA BACTERIANA

En esta publicación se describen las características para la formación de biopelícula, así como los componentes y los mecanismos tanto genéticos como moleculares que utilizan los microorganismos para la formación y regulación, además de factores de adhesión de la biopelícula. En especial, se profundiza sobre la formación de biopelículas en el género *Staphylococcus* spp., el cual es un importante patógeno en infecciones nosocomiales que utiliza este mecanismo de persistencia, virulencia y resistencia bacteriana, y la intervención del quorum sensing que actúa como un lenguaje a través de señales químicas en la regulación de las biopelículas.

Finalmente, se describen las implicaciones clínicas de la formación de biopelículas en pacientes que usan dispositivos médicos y la evaluación de la respuesta inmune del huésped frente a la biopelícula. Además, este texto incluye nuevas estrategias terapéuticas tales como péptidos antimicrobianos con especificidad antibiopelícula.

