

## Biofilms

Por años, cuando un catéter, una cánula de Scribner, una válvula cardíaca protésica mecánica, un marcapasos o una prótesis articular eran un foco infeccioso, buscábamos las evidencias en los tejidos de los sitios de contacto entre el dispositivo y el huésped, porque en las superficies de materiales biológicamente inertes, metales y plásticos compactos no crecen los gérmenes: "Los biomateriales sintéticos de prótesis valvulares mecánicas no pueden mantener el desarrollo de microorganismos; por lo tanto las endocarditis relacionadas con el implante usualmente surgen en la unión de los tejidos naturales y la prótesis"<sup>1</sup>. La búsqueda resultaba a menudo infructuosa, aun cuando el dispositivo estuviera ocupado en parte por tejidos del huésped y, en el estudio histológico de la interfaz organismo/dispositivo, encontrábamos tejidos con cambios inflamatorios pero no gérmenes. Inútil buscar con el microscopio óptico los gérmenes sobre las superficies del dispositivo. Inútil el consejo de insistir con el estudio bacteriológico, era imposible recuperar gérmenes. "Aflojamiento aséptico" de alguna prótesis articular, se determinaba. Pero, extraído el dispositivo, se curaba la infección, resistente a los antibióticos, y se dañaba la confianza en bacteriólogos y patólogos.

¿Cómo iban a crecer gérmenes sobre material biológicamente inerte y, en más de un caso, en un sistema líquido con flujo veloz? Craso error. No se nos ocurría que esto pudiera suceder, y los métodos de examen no eran los adecuados. No sabíamos que la mayoría de los gérmenes, bacterias y hongos, pueden adherirse y crecer sobre superficies inertes y formar colonias donde la suma de los individuos y la matriz extracelular que éstos fabrican adquiere propiedades que no tienen las partes<sup>2</sup>. Son los biofilms o biopelículas bacterianas, comunidades sésiles o tapetes bacterianos, la forma de vida de los microbios más extendida en la naturaleza. Los biofilms se encuentran en ecosistemas naturales y artificiales, ocurren sobre las rocas, las ruinas mayas, en los caños de cualquier metal que conducen agua u otros líquidos, en el forraje que consumen las vacas, los cálculos renales, el hueso infectado, las placas dentales, los lentes de contacto y hasta son culpables del mal aliento.

El padre de la idea de que los biofilms podrían formarse en los catéteres y tener importancia en las enfermedades humanas fue J.W. Costerton. En 1978, en un trabajo sobre las estructuras que formaban las *Pseudomonas* sobre las rocas de arroyos alpinos y que las hacía muy resistentes a la eliminación conjeturó que probablemente hacían lo mismo en los catéteres. La conjetura fue resistida: ¿por qué extrapolar de un sistema ecológico a otro?<sup>3</sup>. Han pasado 27 años. En *PubMed*, si se busca *biofilms*, se encuentran 4 066 referencias; si se busca *bacterial biofilms* son 2 682. En *Scholar Google beta* son 25 600 en *biofilms* y 92 800 en *bacterial biofilms* (el día 4-5-05). Y J.W. Costerton fue, desde 1993, Director del *Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Montana, U.S.A.* (<http://www.erc.montana.edu/default.htm>).

Seguiremos, con alguna excepción, las más recientes revisiones de Costerton<sup>4-7</sup>. El lector puede consultar el número de enero de 2005 de *Trends in Microbiology* dedicado por entero al tema en el de marzo hay otro artículo con Costerton.

El núcleo de la idea es que la mayoría de las bacterias (y algunos hongos) cuando en un medio no cuentan con suficientes nutrientes crecen como biofilms, incluidas en una matriz y adheridas a superficies. En los biofilms las bacterias difieren profundamente de las bacterias planctónicas o flotantes libres, las que producen las infecciones agudas, las que conocemos con los métodos tradicionales de la

microbiología y combatimos con fagocitos, anticuerpos, vacunas y antibióticos. Costerton los define así: "Un biofilm es una comunidad sésil derivada de microbios caracterizada por células irreversiblemente unidas a un sustrato o interfaz o entre sí, embebidas en una matriz extracelular de sustancias polimerizadas por ellas producidas y que exhiben un fenotipo alterado con respecto al índice de crecimiento y transcripción de genes". Las colonias de microbios que crecen en un medio sólido como el agar forman matriz extracelular pero no son biofilms porque conservan el fenotipo de las planctónicas, son planctónicas encalladas y no tienen, en la colonia o libres, la resistencia característica en la comunidad sésil<sup>7</sup>. Los biofilms son formas de vida adaptadas para sobrevivir en medios hostiles y los medios de cultivo, a menos que elijamos lo contrario, son ricos en nutrientes.

¿Dónde se forman? En sitios de flujo rápido y turbulento, de gran fricción; las formas planctónicas de bacterias no se adhieren en sitios de flujo laminar, no inciden sobre la superficie, se deslizan. También en ecosistemas acuáticos relativamente quietos como una prótesis articular, espacios aéreos. Ocurren tanto en superficies lisas como rugosas, son muy visco-elásticas, resistentes a la tensión y difíciles de desprender, "gomosos", en particular en sitios de gran fricción. Dijimos que era inútil buscarlos con microscopía óptica de luz común, se comenzaron a ver con el microscopio electrónico de barrido y, mejor aun, *in situ* e intactos, con la microscopía confocal láser de barrido. Tienen la forma de un bosque de torres o de hongos con el sombrero deformado donde la fricción es grande, atravesados por canales que permiten el paso de nutrientes y la salida de desechos.

La masa de estas estructuras está formada por un 15% de células y un 85% de matriz extracelular, generalmente polisacáridos, puede contener también proteínas, ácidos nucleicos, restos de plaquetas, fibrina y calcio. En esa comunidad heterogénea, de estructura compleja, los microorganismos conviven, cooperan, se comunican por sistemas de señales (*quorum sensing*) que dirigen el fenotipo y regulan la expresión de genes que nunca se expresan en las formas planctónicas y resisten a los antibióticos, al estrés ambiental y a las defensas del huésped.

¿Cómo estudiarlos? Extraídos los dispositivos los films se tiñen *in situ* con colorantes comunes o fluorescentes, se desprenden de las superficies rodando el extremo de un catéter sobre una placa de agar (poco efectivo), con ultrasonido o con agitadora vorticial, luego se dispersan y cultivan. De los catéteres todavía insertos se extraen con un cepillo o hisopo, se dispersan y cultivan. Para cultivarlos se debió idear una variedad de aparatos y métodos<sup>7</sup>.

Cuatro criterios se han propuesto para calificar a un biofilm como agente etiológico de una infección: la bacteria patógena está asociada a una superficie o adherida a un sustrato; el examen directo muestra las bacterias en cúmulos, incrustadas en una matriz propia o formada por componentes del huésped; la infección es localizada y, finalmente, la infección es resistente a los antibióticos pese a la sensibilidad de las formas planctónicas de la infección<sup>5</sup>.

Los biofilms están implicados en infecciones crónicas, lentas, resistentes a los tratamientos, se forman en superficies de tejidos naturales e implantes artificiales y explican características de las infecciones de válvulas cardíacas nativas o protésicas, prótesis articulares, catéteres diversos, cánulas de Scribner, derivaciones ventrículo-peritoneales, DIUs, tubos endotraqueales, etc., colonizados por *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* y otros oportunistas<sup>5, 8, 9</sup>. Nos detendremos en unas pocas.

Las endocarditis infecciosas de las válvulas cardíacas nativas están causadas, en su mayoría, por estreptococos y estafilococos comensales de la piel y de la boca. Las favorecen el daño mecánico del endotelio por turbulencia y el consecutivo depósito de plaquetas y fibrina, las vegetaciones; allí se implantan luego los microbios aglutinados por los anticuerpos. Lesiones valvulares anteriores y una bacteria poco virulenta definen las sub-agudas o lentas, la falta de lesiones anteriores y la virulencia bacteriana definen las agudas. Los biofilms ayudan a entender puntos oscuros de su desarrollo. ¿Es imprescindible esa secuencia de lesiones? La endocarditis puede ocurrir, en experimentos, aun previ-

niendo la formación de vegetaciones con anti-coagulantes, y la endocarditis resulta fulminante. ¿Por qué es común encontrar calcificaciones en lesiones recientes? ¿Son signos de esterilización y reparación “*ineffectual efforts at healing*” (MacCallum)? Los biofilms se calcifican.

El *S. epidermidis*, predominante en la flora normal de la piel, se convirtió en una pesadilla y peligroso patógeno oportunista cuando se comenzaron a utilizar implantes médicos. Con frecuencia es resistente a los antibióticos, y es característico de los biofilms que forman la gran cantidad de matriz extracelular. El *S. epidermidis* segrega ácido poli  $\gamma$  DL-glutámico (*poly- $\gamma$ -DL-glutamic acid* [PGA]), polímero de la matriz del film, que los protege del alto contenido en sal de su ambiente natural, la piel, y que facilita el crecimiento, la supervivencia en el huésped, porque lo aísla de sus defensas (péptidos anti-microbianos y fagocitosis por los polimorfonucleares) y es indispensable para persistir como agente infeccioso en los dispositivos. El PGA lo segregan distintos estafilococos coagulasa negativos y otros Gram positivos como el *Bacillus anthracis* que lo tiene en la cápsula y lo protege de la fagocitosis<sup>10</sup>. Un péptido de siete aminoácidos llamado *RNA III-inhibiting peptide* (RIP) parece suprimir las infecciones causadas por *S. aureus* y *S. epidermidis*. El RIP no destruye las bacterias, pero les desbarata el sistema de señales y así no pueden formar biofilms ni producir toxinas, les quita capacidad patógena<sup>11,12</sup>. El PGA de la matriz puede ser blanco de drogas o vacunas y el RIP los haría descansar en paz.

La *P. aeruginosa* se establece en los pulmones de enfermos de fibrosis quística en la adolescencia o juventud temprana, crece como biofilms, en los espacios aéreos, y las bacterias recuperadas del esputo no son las planctónicas, tienen otro fenotipo, producen gran cantidad de alginato y son resistentes a los antibióticos<sup>5</sup>. Un alga roja, *Delisea pulchra*, crece en *Botany Bay* (Australia), aguas donde prosperan miles de especies de bacterias, produce una variedad de las furanonas que la mantiene pulcra. La furanona bloquea el sistema de señales de las bacterias e impide la formación de biofilms<sup>2</sup>. Un trabajoso artículo con 18 autores (Costerton está en esa comunidad) informa que un derivado sintético de compuestos naturales de furanona altera el sistema de señales de una cepa de *P. aeruginosa* (PAO1) y suprime, total o parcialmente, la expresión de genes controlados por el sistema de señales que codifican factores de virulencia (proteasa, pioverdina y quitinasa). Si esa furanona se aplica a biofilms de estas bacterias aumenta la sensibilidad a la tobramicina, que las mata, y al SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*, el detergente lauril sulfato de sodio) que los dispersa. El tratamiento con esta furanona a ratones infectados con PAO1 promueve la remoción de las bacterias de los pulmones por los mecanismos naturales<sup>13</sup>.

En la Tierra no vivimos en la Era del Hombre o de los humanos, sostiene Stephen Jay Gould (1941-2002). Vivimos hoy, y siempre, en la Era de las Bacterias. Los procariontes son, y siempre han sido, la forma de vida predominante en la Tierra, los animales pluricelulares apenas ocupamos la sexta parte de la historia de la vida; los procariontes son indestructibles por su número y variedad; en el árbol evolutivo son dos grandes troncos: bacterias y arqueas; los animales, plantas y hongos, apenas ramitas; los procariontes son ubicuos, “la piel humana da cobijo a unos 100 000 microbios por cm<sup>2</sup>”, unos viven a 250°C, otros a un pH entre 1 y 2, el del ácido sulfúrico concentrado, otros a una profundidad entre 4.8 y 9.6 km de la superficie terrestre; son y fueron útiles para el planeta porque fabrican y mantienen la composición de la atmósfera y del suelo y, finalmente, parecen formar la mayor biomasa<sup>14</sup>. El pasado, el presente y el futuro les pertenecen, tanto en la Tierra como en los astros.

Juan Antonio Barcat

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari  
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires  
jabarcat@topmail.com.ar

1. Schen FJ, Hobson CE. Anatomic Analysis of Removed Prosthetic Heart Valves: Causes of failure of 33 Mechanical valves and 58 Bioprosthesis, 1980-1983. *Human Path* 1985; 16: 549-59.
2. Costerton JW, Stewart PS. Battling Biofilms. *Sci Am* 2001; 285: 60-7.
3. McCarthy M. Breaking up the bacterial happy home. *Lancet* 2001; 357: 2032.
4. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Passmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; 112: 1466-77.
5. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial Biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 95-108.
6. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005; 13: 35-40.
7. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-93.
8. Darouiche RO. Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *N Engl J Med* 2004; 350: 1422-9.
9. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-Joint Infections. *N Engl J Med* 2004; 351: 1645-54.
10. Kocianova S, Vuong C, Yao Y, Voyich JM, Fischer ER, DeLeo FR., Otto M. Key role of poly- $\gamma$ -DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Invest* 2004; 115: 688-94.
11. Balaban N, Dell'Acqua G. Barriers on the Road to New Antibiotics. *The Scientist* 2005; 19: 42-3.
12. Dell'Acqua G, Giacometti A, Cirioni O, et al. Suppression of Drug-Resistant Staphylococcal Infections by the Quorum-Sensing Inhibitor RNAIII-Inhibiting Peptide. *J Infect Dis* 2004; 190: 318-20.
13. Hentzer M, Wu H, Andersen JB, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 2003; 22: 3803-15.
14. Gould SJ. La grandeza de la vida. La expansión de la excelencia de Platón a Darwin. Barcelona: Crítica, 1997. Capítulo 14, p. 178-229. (Traducción castellana de Oriol Canals de: *Full House. The Spread of Excellence from Plato to Darwin*. New York: Harmony, 1996).

- - - -

Lo que sí sabemos es que la memorización de datos inconexos, tales como palabras, fechas, nombres, fórmulas químicas y hechos sueltos, agota la imaginación y no deja tiempo ni ganas para concebir ideas nuevas, en particular hipótesis, experimentos y diseños técnicos. Al fin y al cabo, el trabajo del científico no es acumular datos, ni el del técnico aplicar ciegamente las reglas de los manuales. Uno y otro inventan, el uno hipótesis y experimentos, el otro diseños de artefactos o procesos. Siendo así, ¿por qué las escuelas de todo nivel exigen más memoria que fantasía? ¿Por qué creen que es preciso optar entre la fantasía y la disciplina, cuando lo que más vale es la fantasía disciplinada?

Mario Bunge

*Borges y Einstein, en la fantasía y en ciencia*. En: Borges científico. *Cuatro estudios*.

Mario Bunge, Leonardo Moledo, Alberto G. Rojo, Oscar Sbarra Mitre.

Buenos Aires: Biblioteca Nacional/Página 12, 1999.