



I N S T I T U T O   D E   E S P A Ñ A

---

REAL ACADEMIA DE MEDICINA  
DE ZARAGOZA

## SESIÓN INAUGURAL 2025

DEL CURSO ACADÉMICO CELEBRADA EL DÍA 23 DE ENERO  
CON UN DISCURSO QUE VERSA SOBRE

### **LAS BIOPELÍCULAS MICROBIANAS Y SU PAPEL EN PATOLOGÍA HUMANA**

POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO  
ILMO. SR. D. FRANCISCO JAVIER CASTILLO GARCÍA

PRECEDIDO DE LA  
MEMORIA REGLAMENTARIA  
COMPENDIANDO LOS TRABAJOS DE LA CORPORACIÓN  
DURANTE EL AÑO 2024  
POR EL SECRETARIO GENERAL  
ILMO. SR. D. MARIANO MATEO ARRIZABALAGA



Vol. CXXV  
ZARAGOZA  
23 DE ENERO DE 2025



I N S T I T U T O   D E   E S P A Ñ A

---

REAL ACADEMIA DE MEDICINA  
DE ZARAGOZA

## SESIÓN INAUGURAL 2025

DEL CURSO ACADÉMICO CELEBRADA EL DÍA 23 DE ENERO  
CON UN DISCURSO QUE VERSA SOBRE

### **LAS BIOPELÍCULAS MICROBIANAS Y SU PAPEL EN PATOLOGÍA HUMANA**

POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO  
ILMO. SR. D. FRANCISCO JAVIER CASTILLO GARCÍA

PRECEDIDO DE LA  
MEMORIA REGLAMENTARIA  
COMPENDIANDO LOS TRABAJOS DE LA CORPORACIÓN  
DURANTE EL AÑO 2024  
POR EL SECRETARIO GENERAL  
ILMO. SR. D. MARIANO MATEO ARRIZABALAGA



Vol. CXXV  
ZARAGOZA  
23 DE ENERO DE 2025

La Real Academia de Medicina de Zaragoza no se hace solidaria, ni asume ninguna responsabilidad relativa al contenido y a las opiniones en materia científica de los trabajos objetos de la presente publicación

I.S.S.N.: 1134-1750 – Inaugural Vol. CXXV

Depósito legal: Z-80-2025

Edita y distribuye:

Real Academia de Medicina de Zaragoza  
Plaza Basilio Paraíso, 4 – 50005 Zaragoza

Composición e impresión:

Imprenta Provincial de Zaragoza

## SUMARIO

Composición de la Academia. Relación de Académicos. Secciones .....	7
Memoria Reglamentaria del curso 2024 por el Ilmo. Sr. D. Mariano Mateo Arrizabalaga, Secretario General de la Corporación .....	21
Conferencia Inaugural, por el Académico de Número Ilmo. Sr. D. Francisco Javier Castillo García .....	35
Obras recibidas para la Biblioteca en el año 2024 .....	83
Discursos Inaugurales desde el año 1831 al 2025 .....	89
Ingresos desde el año 1832 al 2024. Contiene: el nombre del Académico que ingresó, del que le contestó y el título del discurso de ingreso .....	99

CONFERENCIA INAUGURAL

LAS BIOPELÍCULAS MICROBIANAS  
Y SU PAPEL EN PATOLOGÍA HUMANA

POR EL  
ILMO. SR. D. FRANCISCO JAVIER CASTILLO GARCÍA  
ACADÉMICO DE NÚMERO



## SUMARIO

Palabras de salutación y agradecimientos .....	41
Orígenes del conocimiento de las biopelículas microbianas (BPM) .....	41
Qué son las biopelículas microbianas (BPM) .....	42
Agregados microbianos no adheridos a superficies: también son biopelículas .....	43
Importancia de las biopelículas microbianas .....	44
Cómo se forman las biopelículas.....	45
Etapas de la formación de la biopelícula.....	45
Adhesión inespecífica o absorción	
Adherencia específica	
Crecimiento y acumulación	
Microcolonias y canales de agua	
La matriz extracelular (MEC)	
La naturaleza de los biomateriales	
Las características del huésped	
Comunicación celular (Quorum Sensing)	
Qué moléculas intervienen en la génesis del quorum sensing	
Desarrollo de diversidad estructural	
Reclutamiento polimicrobiano y cooperación genética	
Maduración y estabilización	
Liberación, dispersión y formación de una nueva biopelícula	
Mecanismos implicados en la dispersión	
Cómo es la vida en un biofilm .....	53
El ciclo vital.....	53
Resistencia a condiciones adversas.....	53
Interacciones simbióticas o competitivas .....	53
Qué diferencia a las bacterias planctónicas de las que forman biofilm .....	54
Forma de vida	
Localización	
Comportamiento y movilidad	
Respuestas a factores ambientales	
Ciclo de vida	

Cambios estructurales y metabólicos asociados a la formación del biofilm .....	55
Repercusiones dañinas de las biopelículas.....	56
Deterioro medioambiental y biopelículas.....	56
Origen y patogenia de procesos clínicos en los que participan bacterias formadoras de biofilms.....	57
Procesos patológicos en los que participan bacterias formadoras de biofilms .....	59
Infecciones en implantes médicos	
Infecciones bucales	
Infecciones respiratorias crónicas	
Infecciones de heridas crónicas	
Infecciones del tracto urinario	
Endocarditis infecciosa	
Infecciones en la mucosa intestinal	
Clones bacterianos específicos vinculados a la formación de biopelículas.....	60
El carácter polimicrobiano de la biopelícula acentúa la gravedad de las infecciones .....	61
Cómo contribuyen las biopelículas a la resistencia bacteriana a los antibióticos .....	61
Mecanismos que contribuyen a la resistencia antibiótica en las biopelículas.....	62
Barrera física	
Difusión limitada	
Resistencia adaptativa	
Resistencia pasiva	
Cambios en la expresión génica	
Naturaleza del biomaterial	
Variación genética	
Presencia de células durmientes o criptobióticas	
Persistencia	
Tolerancia	
Respuesta al estrés y mecanismos implicados	



Qué estrategias podemos oponer para combatir o eliminar las biopelículas .....	67
Agentes antimicrobianos	
Tratamientos físicos	
Superficies antimicrobianas y nuevos biomateriales	
Inhibidores de la formación de biopelículas	
Interferencia con la dispersión	
Enzimas disgregadores de la matriz extracelular	
Compuestos naturales bioactivos con propiedades antibiopelículas	
Nanopartículas antimicrobianas	
Compuestos que interfieren con la comunicación celular en las biopelículas	
Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a biopelículas.....	73
Obtención y procesamiento de la muestra adecuada .....	73
Diagnóstico microbiológico de infecciones polimicrobianas en biofilms.....	74
Ensayos de sensibilidad a antimicrobianos de bacterias que forman biopelículas .....	75
Ensayos de microdilución en placa	
Ensayos de viabilidad celular	
Microscopía	
Medición de biomasa y actividad metabólica	
Ensayos de dispersión de biopelículas	
Ensayos de quorum sensing (QS)	
Bibliografía .....	77



Excelentísimo Sr. Presidente de la Real Academia de Medicina de Zaragoza,  
Excmas e Ilmas Autoridades

Excmos e Ilmos Académicas y Académicos. Compañeros y amigos

Querida familia

Señoras y señores

Comparezco aquí a instancias de la Junta Directiva que, en cumplimiento de los Estatutos de las Reales Academias de Medicina y del Reglamento de Régimen Interior, “siguiendo el turno riguroso de antigüedad” me invitaron a redactar y presentar el discurso correspondiente a esta Solemne Sesión Inaugural del año 2025.

Quiero expresar en primer lugar mi gratitud hacia esta Ilustre Institución, de la que me honro en formar parte desde 2016, por la confianza y el cariño con que he sido acogido por los miembros de esta casa. Es un honor y una responsabilidad cumplir la tarea encomendada, que confío desarrollar con el suficiente acierto para conseguir de todos ustedes su benevolente atención, en un tema que siendo muy atractivo para quien les habla, espero sea, al menos interesante, para quienes lo van a escuchar.

El título elegido *Las biopelículas microbianas y su papel en patología humana* resume el objetivo de mi presentación, exponer la importancia que este mecanismo adaptativo de organización poblacional tiene sobre la capacidad patógena microbiana y su repercusión en el tratamiento de las infecciones en las que adquiere protagonismo.

### **Orígenes del conocimiento de las biopelículas microbianas (BPM)**

Gracias a las observaciones de Anton van Leeuwenhoek sabemos desde el siglo XVII de la existencia del mundo microbiano. Durante mucho tiempo solo reparamos en la existencia de los microorganismos en su forma aislada, planctónica, y así nos acostumbramos a estudiar las bacterias, a describirlas y clasificarlas según las características que tienen cuando se aíslan y se cultivan en el laboratorio, pero en la naturaleza se encuentran en ambientes complejos que han de colonizar para lograr su supervivencia y para ello exhiben un fenotipo distinto que guarda relación con su tasa de crecimiento y su expresión génica: las biopelículas.

Las primeras descripciones de estas estructuras se producen en los años 70 del siglo XX pues hubo que esperar la llegada del microscopio electrónico para examinar en detalle la biopelícula, con alta resolución, en comparación con la microscopía óptica. El empleo de microscopía electrónica de barrido y de transmisión permitió identificar biopelículas en filtros de una planta de

tratamiento de aguas residuales y permitió comprender que la morfología celular del biofilm es consecuencia de la agrupación de una variedad de microorganismos.

Del avance experimentado desde entonces y de la relevancia y actualidad que tienen las biopelículas microbianas es testimonio la concesión en 2023 del Premio Princesa de Asturias de Investigación Científica y Técnica a los estadounidenses Jeffrey Gordon, Everett Peter Greenberg y Bonnie Lynn Bassler, por sus contribuciones a nuevos enfoques que reconocen el papel imprescindible de las comunidades de microorganismos en la vida sobre la Tierra, incluyendo la de los seres humanos, y su relación con la salud.

Jeffrey Gordon ha sido pionero en el descubrimiento y comprensión del decisivo papel que desempeña el microbioma humano en el mantenimiento de la salud.

Peter Greenberg y Bonnie Bassler han desentrañado, según destacó el jurado, la existencia de mecanismos inéditos de comunicación entre bacterias, que emiten señales químicas que modulan su comportamiento colectivo, papel que resulta decisivo para la formación de las biocapas y se revela como una diana esencial sobre la que actuar para interferir en su génesis.

### **Qué son las biopelículas microbianas (BPM)**

Dependiendo del ambiente en que se encuentran, los microorganismos pueden expresar una serie de genes que sintetizan los materiales que posibilitan su adaptación al nuevo entorno.

Conseguir sobrevivir y colonizar ambientes naturales complejos exige de los microorganismos capacidad para colonizar sustratos sólidos de lo más diverso, albergar mecanismos específicos para su unión inicial a superficies, para desarrollar una estructura de ecosistema y comunidad, y para separarse del mismo. En definitiva, habilidad para formar lo que denominamos biopelículas microbianas.

Las biopelículas microbianas son comunidades de microorganismos, que pueden estar integradas por bacterias, hongos, algas y otros microorganismos, que se adhieren a una superficie, que puede ser un material inerte o tejidos vivos, y están incrustadas en una matriz de sustancias extracelulares producidas por ellos mismos. Estas sustancias extracelulares, conocidas también como matriz extracelular o matriz polimérica, están compuestas principalmente de polisacáridos, proteínas y otros compuestos orgánicos.

La capacidad de formar comunidades complejas constituye un mecanismo adaptativo que permite a las bacterias sobrevivir y colonizar con éxito entornos muy diferentes y a menudo muy hostiles, en los que no lograrían anidar de forma planctónica.

Sorprende la existencia de vida y crecimiento microbiano en ambientes y circunstancias tan inhóspitas que se antojan incapaces de soportar la vida. Sin embargo, hay bacterias extremófilas que prosperan en rocas ubicadas a varios kilómetros de profundidad, bajo cientos de metros de hielo en la Antártida; se encuentran bacterias en las calderas de volcanes en actividad, en el agua hirviente de geiseres, en estanques con ácido sulfúrico o en el desierto de Atacama el lugar más cálido y seco de la Tierra, varios metros por debajo de los suelos desérticos más áridos, donde obtienen agua posiblemente a partir del yeso, lo que abre a la especulación la posibilidad de que exista vida microbiana en los desiertos de Marte, en los que también hay depósitos de yeso.

### **Agregados microbianos no adheridos a superficies: también son biopelículas**

Como ya hemos indicado, hoy sabemos que las bacterias pueden adoptar dos formas de vida en la naturaleza. En su forma planctónica aparecen como células individuales, independientes y flotantes. En la otra, las bacterias se organizan en agregados microbianos formando biopelículas.

Conviene señalar que los modelos más universalmente utilizados para describir la estructura de las biopelículas no reflejan toda la complejidad que pueden desarrollar estas estructuras cuando se desarrollan en entornos del mundo real, tanto industriales, como naturales o clínicos.

Las biopelículas suelen representarse con una estructura clásica en forma de hongo, que es característica de *Pseudomonas aeruginosa*, porque los estudios más numerosos y detallados se han realizado sobre esta especie. Sin embargo, parece evidente que no es así como se desarrollan todas las biopelículas, especialmente *in vivo*, en entornos naturales, donde las biopelículas pueden observarse también como agregados no adheridos a superficies.

El término biopelícula hace referencia a la formación de biomaterial en una superficie. Más recientemente, hemos admitido que hay bacterias agregadas, que aunque no están adheridas a superficies, también han de considerarse como biopelículas. Estos agregados bacterianos no asociados a superficies se observaron inicialmente en entornos medioambientales pero hoy también se reconoce su presencia en entornos clínicos.

Aunque se puede distinguir entre agregados bacterianos adheridos a superficies y no adheridos a superficies, hay evidencias de que comparten fenotipos similares. En ambos fenotipos, las bacterias crean microambientes que influyen en la comunidad y en el comportamiento microbiano de manera interdependiente y dinámica.

Estos hechos justifican que podamos definir los agregados bacterianos como biopelículas, independientemente de su unión a una superficie biótica

o abiótica, lo que ha llevado a algunos autores a considerar la agregación de bacterias como el núcleo central de las biopelículas bacterianas.

### **Importancia de las biopelículas microbianas**

La visión planctónica de las infecciones nos ha servido para explicar la mayoría de las infecciones agudas, que suelen ser monomicrobianas y protagonizadas por patógenos primarios. Este modelo resulta inadecuado para explorar y entender las infecciones de evolución crónica, que suelen ser polimicrobianas y con protagonistas más oportunistas en su capacidad patógena.

Estudios de metagenómica han demostrado que las bacterias formadoras de biofilm albergan numerosos mecanismos destinados a promover la diversidad. La inclusión en una misma comunidad de múltiples especies bacterianas y/o fúngicas proporciona numerosas ventajas: resistencia pasiva, cooperación metabólica, sistemas de quórum sensing, incremento del conjunto génico y mejores posibilidades para el intercambio y adquisición de material genético entre sus integrantes. En definitiva, numerosas sinergias que mejoran su capacidad competitiva.

La capacidad de formar biopelícula no es sólo un rasgo común de varios microorganismos, sino que también ha sido reconocida como el modo dominante de crecimiento bacteriano en la naturaleza.

El desarrollo de biopelículas se relaciona con graves problemas de salud ligados a la producción de infecciones graves y de evolución lenta. Así, intervienen de modo decisivo en la formación de la placa dental, pueden contribuir a la colonización tanto de tejidos vivos como de los más diversos materiales que integran biodispositivos implantables o removibles e, incluso, influyen en la resistencia a los antimicrobianos. Su predominio en el campo de la patología clínica se ve corroborado en diferentes informes publicados por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) que indican que en torno al 65% de todas las infecciones microbianas y hasta el 80% de las infecciones crónicas están relacionadas con la formación de biofilms. La repercusión de estas infecciones sobre la salud es muy relevante en términos de morbilidad, costes asociados a cuidados sanitarios, e incluso, contribuyen a la aparición y diseminación de resistencia a antimicrobianos, especialmente en el entorno hospitalario.

La formación de biopelículas puede tener importantes implicaciones en otros ámbitos muy diversos, ya que su presencia en la naturaleza, en ambientes terrestres o acuáticos, es muy abundante. Se encuentran en los fondos marinos, en las piedras de los lechos de los ríos, en la tierra o en la superficie de las plantas. También son comunes en entornos industriales, en los depósitos y conducciones de agua, por lo que pueden afectar a la calidad del agua, la eficiencia de los intercambiadores de calor, la corrosión de superficies, la contaminación de alimentos, etc...

Además de tener consecuencias indeseables o perniciosas, la formación de biopelículas puede ser beneficiosa en algunos casos, como en la depuración de aguas residuales o en la promoción de la salubridad del suelo.

Su amplia distribución en la naturaleza, en los más variados hábitats, explica el interés que despierta el estudio de las biopelículas microbianas en campos muy diversos: microbiología, biotecnología, medicina, ingeniería ambiental y otras disciplinas relacionadas, que intentan comprender mejor su naturaleza y repercusiones a fin de desarrollar estrategias de control y modificación que puedan repercutir en diferentes ámbitos sanitarios y tecnológicos, tanto favorables como perniciosos.

### **Cómo se forman las biopelículas**

La formación de biopelículas es un proceso de desarrollo que se inicia cuando los organismos planctónicos de vida libre se agregan y/o hacen la transición a un estilo de vida asociado a la colonización de superficies. El ciclo se completa cuando las células escapan de la estructura de la biopelícula, en un proceso conocido como dispersión, para regresar al modo de crecimiento unicelular. Se trata, por tanto, de un proceso complejo en el que interaccionan muchos factores, entre ellos la temperatura, la humedad, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de sustancias químicas específicas.

Este proceso de desarrollo ha sido descrito como un proceso secuencial y altamente regulado, que involucra varias etapas fenotípicamente distintas. Además, en cada etapa del desarrollo de la biopelícula se producen patrones exclusivos y característicos de producción de proteínas y expresión génica.

Las características clave relacionadas con el modo de crecimiento sésil incluyen la pérdida de expresión del gen que rige la síntesis de los flagelos, la producción de componentes que forman parte de la matriz de la biopelícula, la inducción de mecanismos de resistencia a los antibióticos, incluidas bombas de eflujo que se activan incluso cuando las biopelículas se cultivan en ausencia de antibióticos, acompañado de una mayor producción de determinantes de patogenicidad con el consiguiente incremento de la virulencia.

Como resultado, las células de la biopelícula muestran características y comportamientos distintos de sus contrapartes planctónicas, con rasgos distintivos que incluyen mayor resistencia a las defensas del sistema inmune del huésped y mayor tolerancia al estrés, incluida la restricción de nutrientes, la deshidratación y los antimicrobianos.

### **Etapas de la formación de la biopelícula**

Las biocapas se desarrollan en diferentes etapas, que se suceden en un orden establecido.

### **Adhesión inespecífica o absorción**

El primer paso en la colonización de cualquier superficie es la adherencia, que inicialmente depende de la naturaleza del biomaterial. El contacto inicial entre la bacteria y la superficie está mediado por fenómenos de naturaleza físico-química, como las fuerzas de Van der Waals, las interacciones electrostáticas y las hidrofóbicas.

Muchas bacterias tienen en su superficie componentes de naturaleza hidrofóbica. Si la superficie a colonizar también es hidrofóbica, como sucede con muchos biomateriales, cuando se acercan los microorganismos, en un medio acuoso, tienden a adherirse expulsando las moléculas de agua que haya entre ellos. Los microorganismos se adhieren más probablemente a superficies hidrofóbicas y no polares como el teflón y otros plásticos, que a superficies hidrofílicas y polares como metales y vidrio.

### **Adherencia específica**

Si la asociación entre la bacteria y su sustrato persiste el tiempo necesario, que pueden ser apenas unos segundos, intervienen otras estructuras que transforman la adhesión inicial, que es inespecífica y reversible, en un proceso más específico, mediado por sistemas adhesina-receptor, que fijan al microorganismo de manera permanente e irreversible a la superficie. Como receptores pueden actuar diferentes proteínas y glucoproteínas plasmáticas y tisulares, como fibronectina, fibrinógeno, fibrina, colágeno, elastina y otros.

### **Crecimiento y acumulación**

Una vez adheridos, se produce una fase de crecimiento y acumulación que les permite colonizar la superficie del material, vivo o abiótico, y formar una biocapa produciendo grandes cantidades de polímeros extracelulares de moléculas largas y ramificadas que forman una madeja o maraña de estructura tridimensional con la que recubren y engloban a las células microbianas para mantenerlas unidas y protegerlas del medio circundante.

Se forman así microcolonias en la biopelícula que generalmente constan de muchos tipos de microcomunidades que se coordinan entre sí en múltiples aspectos. Esta coordinación juega un papel crucial en el intercambio de sustratos, la distribución de importantes productos metabólicos y la excreción de catabolitos finales. Por ejemplo, durante la digestión anaeróbica, cuando la materia orgánica compleja se convierte en amoníaco y anhídrido carbónico, se requiere la participación de al menos tres tipos de poblaciones bacterianas: (1) primero intervienen bacterias fermentativas que producen ácido y alcohol a partir del catabolismo de compuestos orgánicos complejos, (2) a continuación actúan bacterias acetogénicas que consumen los sustratos anteriores para generar acetato como catabolito, (3) y por último, las bacterias metanógenas obtienen energía al convertir el acetato, el dióxido de carbono y el hidrógeno en metano.



El biofilm proporciona un entorno idóneo para el desarrollo de asociaciones sintróficas, es decir, relaciones entre dos o más bacterias metabólicamente diferentes que dependen y cooperan entre sí para utilizar determinados sustratos con fines energéticos.

### **Microcolonias y canales de agua**

Las biopelículas tienen como unidad estructural básica las microcolonias, separadas unas de otras por vacíos intersticiales llenos de agua, llamados canales de agua, que actúan como un sistema circulatorio que usan para distribuir nutrientes y eliminar productos de desecho que generan las comunidades microbianas imbuidas en el biofilm. Así, junto a microcolonias compactas se ordenan zonas más laxas que permiten el flujo de oxígeno, nutrientes, solutos, enzimas, mensajeros y la excreción de catabolitos.

Esta disposición se produce tanto en los biofilms mixtos como en los formados por una sola especie. La proximidad entre sus células crea un ambiente idóneo para generar un entorno que permite el acceso a los nutrientes, facilita el intercambio de genes y promueve la comunicación intercelular o quorum sensing.

### **La matriz extracelular (MEC)**

La matriz extracelular producida se conoce también como slime, limo o sustancia mucoide y actúa como una especie de argamasa que mantiene unidas a las células en la biopelícula.

Entre el 5% y el 35% del volumen de la biopelícula está constituido por microorganismos, mientras que el volumen restante es matriz extracelular. Por lo general, la matriz de exopolisacáridos tiene un espesor de entre 0,2 y 1,0  $\mu\text{m}$ ; sin embargo, el tamaño de la biopelícula oscila entre 10 y 30 nm.

La matriz extracelular tiene una composición compleja que consta principalmente de polisacáridos, proteínas, ADN extracelular, proteínas amiloidogénicas y otros componentes orgánicos. No obstante, la mayoría de los exopolímeros que la integran contiene azúcares, como glucosa, galactosa, manosa, fructosa, ramnosa, N- acetilglucosamina y otros. Por ejemplo, en *Staphylococcus epidermidis* se distinguen 2 fracciones polisacáridas, denominadas PIA I y II, cuya expresión está controlada por el gen *ica*. Las cepas que expresan el gen *ica* tienen de 3 a 10 veces más capacidad para formar biocapas en superficies plásticas.

### **La naturaleza de los biomateriales**

Desempeña un papel importante en la génesis inicial del biofilm, de modo que la adherencia varía mucho según sus características. Sabemos que algunas bacterias son capaces de usar componentes del material al que se unen para su nutrición y multiplicación en ausencia de otra fuente de energía, mientras que para otras bacterias, estos mismos componentes pueden ser muy tóxicos.

También la actividad fagocítica y bactericida de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y el complemento se ven afectados por el tipo de biomaterial. Algunos plásticos inducen la activación del complemento por la vía alternativa, que a su vez, activa de modo inespecífico a los PMN, que también se activan por su contacto con el biomaterial. Como consecuencia de estos procesos, los leucocitos pueden agotarse funcionalmente y entrar en una fase refractaria, de modo que son incapaces de activarse ante otros estímulos, como la presencia de microorganismos.

### **Las características del huésped**

La mayoría de las biopelículas que asientan en organismos vivos están sujetas a una fuerte selección determinada por características propias del huésped en el que se desarrollan.

En el intestino, humano o animal, la diversidad de las biopelículas que podemos observar está mediatizada por compuestos excretados por las células del epitelio intestinal.

Sucede lo mismo en otras biopelículas asociadas al huésped, como las que se forman en las raíces de las plantas que son moldeadas por exudados de las propias plantas que atraen a bacterias promotoras del crecimiento o capturasoras de nutrientes. También se observa en biopelículas formadas en algas que seleccionan específicamente un conjunto central estable de genes funcionales.

### **Comunicación celular (Quorum Sensing)**

El término quorum sensing fue utilizado por primera vez por Greenberg en un artículo publicado en 1994. Podemos definir el QS (Quorum Sensing) como un sistema de comunicación intercelular, que a modo de lenguaje, utilizan algunas bacterias para coordinar el comportamiento colectivo de la población en función de la densidad celular, con el fin de modular diferentes procesos, entre ellos, la formación de biocapas, la síntesis de factores de virulencia y otras respuestas coordinadas.

Cada especie bacteriana tiene una molécula propia, que podríamos asimilar a un idioma propio, que secretan y que reconocen solo las bacterias de su especie. De esta manera saben cuándo hay otras iguales alrededor y, al acumularse, tienden a formar una comunidad suficientemente grande para activar la expresión de algunos genes: lo que sería el quórum necesario.

Los microorganismos de la biopelícula se comunican entre sí a través de moléculas señaladoras específicas, que actúan como autoinductores, y se unen a receptores intracelulares que, a su vez, actúan como factores de transcripción. Cuando la colonia bacteriana se multiplica, produce constantemente una señal indicadora que va aumentando en su entorno, lo que permite a las bacterias apreciar ("sentir") la densidad de población existente y actuar en consecuencia.

Una vez que las moléculas señaladoras alcanzan una concentración umbral crítica (quórum), se unen al receptor y provocan su activación, lo que se traduce en la modificación de la transcripción de un cierto número de genes (regulón QS) que pueden activarse o desactivarse. Es en esta etapa, que llamamos de maduración, cuando se expresan ciertos productos genéticos importantes para la formación del exopolisacárido.

En síntesis, el sistema de respuesta QS permite a las bacterias coordinar sus actividades y regular la expresión génica en respuesta a la densidad celular, en un comportamiento que es específico del biofilm, e influye en la unión y el despegamiento de las células de la biopelícula, la expresión de factores de virulencia y otros comportamientos colectivos. Este proceso desempeña un papel fundamental en la adaptación de las bacterias a su entorno y en su capacidad para responder de manera eficiente a cambios en las condiciones ambientales.

### **Qué moléculas intervienen en la génesis del quorum sensing**

Los dos tipos más conocidos de moléculas señaladoras son:

**N-acil homoserina lactona (AHL):** Interviene en el sistema de quorum sensing más comúnmente encontrado en bacterias gramnegativas. Las bacterias que utilizan este sistema QS producen y detectan moléculas de AHL. Cuando la densidad celular alcanza un nivel suficientemente alto, las moléculas autoinductoras se acumulan y activan la expresión de genes específicos.

**Péptidos autoinductores:** El sistema de QS más común en bacterias grampositivas, en lugar de moléculas de AHL, utiliza péptidos como moléculas señaladoras. Los péptidos son secretados y, a medida que la densidad celular aumenta, se acumulan en el entorno. Cuando la concentración de péptidos alcanza un umbral, se activan respuestas específicas.

Las especies capaces de formar biofilms poseen moléculas de quórum sensing especie-específicas capaces de dirigir la organización de biopelículas monoclonales. En el caso de los biofilms polimicrobianos, algunas moléculas de quórum sensing actuarían regulando vías en múltiples especies que son necesarias para la cooperación de las especies bacterianas individuales dentro de la comunidad.

La molécula de señalización intercelular autoinductor-2 (AI-2) es una pequeña molécula de quórum sensing que contiene boro y puede ser reconocida por muchas especies distintas, incluyendo bacterias gram-positivas, gram-negativas y anaerobios. Su presencia se ha constatado en biofilms formados en heridas y en los de otras infecciones crónicas.

De modo similar, se ha demostrado que las bacterias responden a algunas moléculas propias del huésped, como la adrenalina, y algunas evidencias sugieren que hay señales de reconocimiento bidireccional entre reinos diferentes. De modo que microorganismos involucrados en infecciones protagonizadas

por biopelículas poseerían capacidad para reconocer (sentir) y responder a sus vecinos y a su huésped por medio de múltiples vías de quórum sensing.

### **Desarrollo de diversidad estructural**

Formada la matriz de exopolisacáridos, se puede producir un atrapamiento de partículas de diferentes materiales, con lo que aumenta el volumen y la variedad del hábitat del biofilm. Así la biopelícula en crecimiento puede servir entonces como foco o sustrato para la unión y la multiplicación de otros organismos, aumentando la diversidad biológica de la comunidad.

La diversidad y el equilibrio que se mantiene entre los integrantes de biopelículas complejas influyen en su formación y desarrollo. Esta apreciación tiene sustento en algunas observaciones, así se ha comprobado como en una biopelícula mixta compuesta por cuatro especies bacterianas del suelo, la eliminación de un miembro de la biopelícula cambió completamente la morfología de la biocapa, la organización estructural de las especies que la integraban y su abundancia relativa, incluso cuando la especie eliminada inicialmente era poco abundante e intrínsecamente débil en su capacidad de formación de biopelículas.

La diversidad estructural también puede proporcionar nichos específicos para diferentes tipos de microorganismos dentro del mismo biofilm, facilitando la diversidad y la cooperación de sus integrantes. Con el tiempo, la biopelícula puede desarrollar una estructura compleja, diversa y bien organizada, con canales y espacios que, como se ha señalado, permiten la circulación de líquidos y nutrientes dentro de la biopelícula.

### **Reclutamiento polimicrobiano y cooperación genética**

Las bacterias formadoras de biofilm ponen en marcha mecanismos moleculares destinados a reclutar a otras bacterias. Parece que las biopelículas intentan activamente hacerse polimicrobianas con el fin de mejorar su supervivencia. Hay una corriente de opinión que considera a los biofilms como sistemas que ejercen una regulación global sobre un conjunto de genes proporcionados por las diversas especies que los constituyen.

En este modelo, el biofilm ejercería un control centralizado sobre los miembros individuales que lo forman para que ejecuten las actividades necesarias para la supervivencia de la colonia. Así, los biofilms regularían la expresión de los genes que permiten su desarrollo y supervivencia, combinando sus recursos genéticos globales para satisfacer sus requerimientos, de modo que cada integrante individual del biofilm no necesita poseer todos los genes precisos para cumplir con cada una de las funciones que precisa el conjunto.

En resumen, el biofilm sería una entidad única que posee múltiples recursos o fuentes de genes que le permiten adaptarse y superar mejor las circunstancias

adversas que pueda enfrentar. Podríamos decir que cuanto mayor es la diversidad más grande es el conjunto de genes y más fuerte es el biofilm en términos de supervivencia.

### **Maduración y estabilización**

La biopelícula evoluciona para alcanzar un estado de madurez y estabilidad. Además de integrar diferentes comunidades microbianas, según donde se formen, pueden incluir partículas de la corrosión, cristales minerales, arcilla, materiales orgánicos, células sanguíneas, células muertas...

Las biopelículas son heterogéneas, de modo que las bacterias que residen en diferentes lugares dentro de la estructura de la biopelícula experimentan diferencias importantes en la concentración de recursos disponibles, nutrientes, oxígeno y productos de desecho, como los ácidos producidos por la fermentación en zonas sin oxígeno, así como de metabolitos y moléculas de señalización extracelular.

Algunos modelos que reproducen biopelículas polimicrobianas *in vivo* han arrojado luz sobre el papel que desempeñan la hipoxia, el pH o las interacciones entre especies. La forma más habitual de agotamiento de los nutrientes disponibles dentro del biofilm es el desarrollo de zonas anóxicas en su región central. Todo ello tiene repercusión en la modulación de las tasas metabólicas, la latencia, las respuestas al estrés y las tasas de mutación.

Una vez alcanzado un punto apropiado de madurez y equilibrio, las células pueden liberarse de la biopelícula para colonizar nuevas áreas o pueden permanecer en la biocapa, continuando el ciclo de crecimiento y formación.

### **Liberación, dispersión y formación de una nueva biopelícula**

El ciclo de vida de las biopelículas se completa cuando las biopelículas se dispersan. Tras alcanzar la fase madura, de homeostasis, se produce la liberación de algunas células que integran el biofilm para desprenderse, pasando de su forma sésil a móvil, para migrar, originando luego una nueva biopelícula.

En esta fase, las bacterias regulan positivamente la expresión de proteínas necesarias para la formación de flagelos, que permiten que las bacterias se muevan. Esta etapa se caracteriza porque las células evacúan las porciones interiores de las agrupaciones celulares, formando espacios vacíos. Así durante la dispersión, el interior de la biopelícula se vuelve fluido y las células situadas dentro de esta zona comienzan a mostrar signos de agitación y movimiento. Posteriormente, las células salen de la biopelícula a través de una ruptura en la pared de la microcolonia por la que las células escapan y entran al líquido en masa como bacterias individuales. Esto deja en la biopelícula huecos centrales. Si la respuesta de dispersión es extensa, la estructura de la biopelícula puede erosionarse todavía más.

Estudios recientes describen la formación de agregados que exhiben características similares a biopelículas, pero no ligados a superficies de adhesión. Según observaciones *in vivo*, estos agregados pueden adherirse a superficies o dispersarse. Sin embargo, no está claro si la formación de estos agregados requiere las mismas vías que intervienen en la formación de las biopelículas y en los eventos de su dispersión.

### **Mecanismos implicados en la dispersión**

Las bacterias de algunas especies dejan de producir polisacárido extracelular y se dispersan directamente en el medio circundante, si bien, el estrés mecánico también puede estar involucrado en este proceso.

En *Staphylococcus aureus* se ha descrito un mecanismo de variación de fase causada por la inserción reversible de una secuencia de inserción (IS256) en el interior del operon (*ica*ADBC) del gen responsable de la síntesis del exopolisacárido del biofilm. La inserción es aleatoria y ocurre con una frecuencia aproximada de  $1 \times 10^{-4}$ , dando lugar a bacterias que no pueden formar la matriz extracelular (MEC). Este fenómeno permite mantener un pequeño porcentaje de la población que es incapaz de formar exopolisacárido y que puede escapar del biofilm. Como la inserción de las IS es un proceso reversible, el salto de la IS desde el operón *ica* provoca una nueva variación de fase.

También se ha descrito en *Staphylococcus aureus* la formación de variantes deficientes en la formación de biopelículas por la eliminación de una isla de patogenicidad que contiene genes esenciales para la formación del biofilm.

En algunos casos, durante el proceso de desprendimiento, las comunidades microbianas que integran la biopelícula pueden producir diferentes enzimas sacarolíticas que ayudan a liberar células que alcancen nuevas áreas donde colonizar. En *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se ha encontrado una molécula con actividad enzimática, llamada dispersina, que degrada específicamente el exopolisacárido de la matriz del biofilm.

La presencia de enzimas similares, conocidas como endogluconasas, codificadas por distintos genomas, sugiere que la degradación regulada del exopolisacárido puede ser un mecanismo controlado de liberación de bacterias del biofilm. Por ejemplo, *Escherichia coli* produce N-acetil-heparosano-liasa, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* producen alginato-liasa y *Streptococcus equi* produce hialuronidasa, enzimas que lisan la matriz de exopolisacáridos y promueven su posterior desprendimiento.

Sin duda, el desprendimiento y liberación de células microbianas y su transferencia a un nuevo sitio son procesos que ayudan decisivamente a la propagación a distancia de nuevos focos de infección.

## **Cómo es la vida en un biofilm**

La vida en un biofilm es dinámica y compleja, muy diferente de la vida que llevan los microorganismos en estado planctónico, cuando se hallan libres, en suspensión. Como hemos señalado, un biofilm es una comunidad microbiana compleja y bien organizada, adherida a una superficie que proporciona un entorno único y altamente estructurado para la vida microbiana.

## **El ciclo vital**

En los biofilms se produce un ciclo de vida dinámico que incluye la adhesión inicial, la formación de la matriz extracelular, el crecimiento, la maduración, y eventualmente la dispersión de células para colonizar nuevos lugares.

Este ciclo puede ser influenciado por factores ambientales y señales químicas. De hecho, la propia arquitectura de la biopelícula puede variar dependiendo de las condiciones de crecimiento y el medio de crecimiento, lo que demuestra la notable capacidad de las biopelículas para adaptarse a las condiciones en las que crecen.

## **Resistencia a condiciones adversas**

Los microorganismos integrados en un biofilm a menudo muestran mayor resistencia a condiciones ambientales adversas, incluyendo la acción nociva de los agentes físicos y químicos, en comparación con sus congéneres que viven en suspensión. La matriz extracelular y la estructura del biofilm pueden proteger a las células de la desecación, variaciones de pH y osmolaridad, compuestos tóxicos, radiación ultravioleta, bloquean el acceso de los antibióticos y las células inmunes del huésped y limitan la repercusión de otros factores estresantes.

## **Interacciones simbióticas o competitivas**

La proximidad física de diferentes especies microbianas incluidas en un biofilm está en el origen de interacciones, que pueden ser simbióticas o competitivas. De modo que pueden compartir recursos, cooperar en funciones metabólicas, o también, competir por nutrientes y espacio.

La retención de enzimas en la matriz de la biopelícula puede mejorar la eficiencia y la diversidad que caracteriza el proceso de descomposición de la materia orgánica. La formación de biopelículas en las raíces de las plantas y en los micelios fúngicos puede facilitar la adquisición y el transporte de nutrientes, pero también hay biopelículas patógenas que se forman en las plantas y que causan procesos patológicos graves.

La nutrición cruzada a través de metabolitos bacterianos entre especies genéticamente diferentes está bien establecida y la cooperación metabólica se ha

identificado en numerosos modelos polimicrobianos. Por ejemplo, *Streptococcus gordonii* produce peróxido que puede inducir en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* la producción de un factor que reduce la capacidad del huésped para destruirlo por medio de la lisis mediada por el complemento y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* puede usar el ácido láctico originado por el metabolismo de los estreptococos para aumentar su virulencia.

La capacidad de los biofilms para crear un ambiente anóxico que permite el crecimiento anaeróbico parece ser un factor que incrementa la gravedad de las infecciones asociadas. Al entorno del biofilm se liberan productos de desecho que surgen del catabolismo microbiano. Muchos de estos catabolitos, como amoníaco, ácido láctico o dióxido de carbono, ejercen una influencia significativa sobre los microorganismos del entorno. Por ejemplo, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia* generan amonio que eleva el pH y lo hace adecuado para el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*. Por otra parte, *Fusobacterium nucleatum* incrementa la concentración de dióxido de carbono contribuyendo a aumentar la virulencia de *Porphyromonas gingivalis*. También se ha evidenciado que algunos productos de desecho de *Pseudomonas aeruginosa* pueden proteger a *Staphylococcus aureus* de la acción de algunos aminoglucósidos.

### **Qué diferencia a las bacterias planctónicas de las que forman biofilm**

Las bacterias planctónicas y las que forman biofilms protagonizan dos modos de vida microbiana distintos que se diferencian sobre todo en su ubicación y comportamiento. La capacidad de las bacterias para adoptar estos diferentes modos de vida es esencial para su supervivencia y contribuye a su adaptabilidad a una variedad de entornos cambiantes que arrojan retos distintos para su supervivencia. A continuación, señalaremos algunas diferencias clave:

#### **Forma de vida**

Las bacterias planctónicas son microorganismos que flotan y se mueven libremente en un medio acuoso. No están adheridos a superficies y se desplazan con corrientes o movimientos del agua. Pueden existir de manera individual o en grupos dispersos.

Las bacterias que forman biofilm se adhieren a superficies y secretan una matriz extracelular que las mantiene unidas formando comunidades estructuradas. A diferencia de las bacterias planctónicas, las que forman biofilm están inmovilizadas en la superficie que colonizan.

#### **Localización**

Las bacterias planctónicas pueden encontrarse en ríos, lagos, océanos u otros entornos acuosos donde se mueven con el flujo del agua.



Las bacterias que forman biofilm se encuentran en superficies sólidas, como rocas, tuberías, dispositivos médicos, tejidos vivos, etc... También pueden formar biofilms en zonas de interfase líquido-aire y líquido-sólido.

### **Comportamiento y movilidad**

Las bacterias planctónicas tienen una mayor movilidad y pueden desplazarse activamente en el agua utilizando flagelos u otros mecanismos de locomoción.

Las bacterias que forman biopelículas, una vez adheridas a una superficie, tienden a ser menos móviles. La matriz extracelular puede actuar como un “pegamento” que las mantiene en su lugar.

### **Respuestas a factores ambientales**

Las bacterias planctónicas responden rápidamente a cambios en la composición química del agua o a diferentes factores ambientales, ya que pueden moverse libremente para buscar condiciones más favorables.

Las bacterias que forman un biofilm muestran mayor resistencia a numerosos factores estresantes, como presencia de antibióticos o cambios en la disponibilidad de nutrientes, debido a la protección proporcionada por la matriz extracelular.

### **Ciclo de vida**

Las bacterias planctónicas no tienen un ciclo de vida específico relacionado con la formación y disolución de estructuras adheridas a superficies.

Las bacterias que forman biofilm desarrollan un ciclo vital que implica la adhesión a la superficie, la formación de la matriz extracelular, el crecimiento y la maduración, y eventualmente la dispersión para colonizar nuevos lugares.

### **Cambios estructurales y metabólicos asociados a la formación del biofilm**

La formación de biopelículas es un proceso de desarrollo regulado biológicamente.

Los microorganismos experimentan cambios profundos durante su transición de organismos planctónicos a células que forman parte de una comunidad compleja adherida a una superficie. Por tanto, no es sorprendente que la transición del modo de crecimiento planctónico al modo de crecimiento en biopelícula sea un proceso de desarrollo complejo y altamente regulado. Al menos en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, los estudios indican que durante la formación del biofilm, las bacterias muestran múltiples fenotipos con características fisiológicas distintas, incluyendo cambios estructurales y metabólicos, que pueden correlacionarse con distintas etapas del desarrollo de la biopelícula. De modo que cada etapa del desarrollo de la biopelícula se corresponde con patrones únicos de producción de proteínas y expresión génica.

Así, cuando se produce la unión irreversible de las células a la superficie de adhesión, se inicia una cascada de cambios que incluyen el cese de la motilidad mediada por flagelos, la activación de diferentes genes implicados en la biosíntesis de componentes necesarios como el lipopolisacárido, el alginato que forma parte del exopolisacárido, el polímero de matriz Psl, así como algunos genes relacionados con la resistencia a los antibióticos, incluidos los que producen la  $\beta$ -lactamasa cromosómica. Estos hallazgos sugieren que los cambios para crecer formando biocapa no sólo coinciden con la producción de componentes de la matriz, que permiten a las células cementarse más firmemente a la superficie, sino también con la tolerancia antimicrobiana de las biopelículas, que es una característica distintiva de los biofilms.

Una vez adheridas, las células crecen hasta convertirse en una forma madura multicelular más compleja con microcolonias diferenciadas que se intercalan con canales llenos de líquido. Esta arquitectura se desarrolla guiada por pequeñas moléculas mensajeras, como la acil-homoserina-lactona (AHL) que se utilizan para la comunicación bacteriana, ramnolípidos y proteínas reguladoras.

A medida que la biopelícula desarrolla una estructura tridimensional, las células que la forman se ven inmersas en un microambiente en constante cambio. Las bacterias residentes cerca de la base se distancian progresivamente de la interfaz líquida y de las fuentes de energía y nutrientes. Los cambios, impulsados por el hacinamiento celular, los gradientes químicos y la competencia por los nutrientes, inducen la estratificación en el seno de la biopelícula y la creación de subpoblaciones. Se ha observado que las células residentes de la biopelícula expresan genes relacionados con la falta de oxígeno, el estrés general y las condiciones de fase estacionaria, el estrés por nutrientes y el crecimiento lento.

Por último, las células pueden abandonar la estructura de la biopelícula y regresar al modo de crecimiento planctónico mediante un proceso activo, denominado dispersión, en el que las células sésiles de la biopelícula, envueltas en matriz, escapan de la biocapa, dejando zonas erosionadas y huecos centrales. La dispersión conduce a la diseminación bacteriana y la colonización de nuevas ubicaciones.

### **Repercusiones dañinas de las biopelículas. Deterioro medioambiental y biopelículas**

Algunos sistemas industriales en los que se forman biofilms son tan grandes y complejos que es probable que todas las etapas de adhesión, crecimiento y dispersión ocurran simultáneamente en varios puntos del sistema. La descripción clara de cómo se forma la biopelícula en un modelo de laboratorio relativamente simple y rico en medios de cultivo no necesariamente refleja la complejidad de la biopelícula en muchos sistemas industriales o ambientales, en los que las características de la superficie, como las incrustaciones o la

corrosión, las propiedades químicas del fluido disponible y su dinámica, influirán en cómo se adhiere, crece y se desprende la biopelícula.

La incrustación biológica producida por biopelículas microbianas está asociada con el deterioro de materiales e interviene en la corrosión, la pérdida de eficiencia de transferencia de calor y la obstrucción mecánica en los sistemas de transporte de fluidos.

La bioincrustación marina está asociada con un aumento de más del 30% en el consumo de combustible por parte de los grandes buques marítimos para superar la resistencia al desplazamiento impuesta por los organismos incrustantes en los cascos de los barcos. También afecta a las tuberías de los campos petrolíferos, causa la obstrucción de tuberías de distribución de agua, la reducción de la transferencia de calor en las torres de enfriamiento y la contaminación de las líneas de fabricación, que da como resultado la contaminación del producto generado. En todos estos casos, el sistema industrial no es estéril, ni necesita serlo, por lo que no es necesariamente un problema que haya microorganismos presentes, sino más bien, que la formación bacteriana de biopelículas comprometa el rendimiento del producto o del sistema industrial.

Para combatir este deterioro, los fabricantes de biocidas desarrollan procedimientos de limpieza *in situ* destinados a controlar el crecimiento de biopelículas, si bien desafortunadamente, la biocapa nunca se elimina por completo y, por lo tanto, al igual que sucede con las biopelículas dentales, se requiere limpieza y mantenimiento programado y rutinario para mantener la bioincrustación bajo control.

El conocimiento del papel que desempeñan las biopelículas en algunos procesos de deterioro medioambiental tiene un amplio campo de desarrollo en aplicaciones microbianas industriales, como la limpieza de aguas residuales y la biorremediación de suelos y agua. Algunas estimaciones sugieren que los gobiernos y las empresas gastan más de 6 mil millones de dólares al año en reparaciones y actividades de mantenimiento preventivo para combatir la bioincrustación, lo que pone de relieve el desafío económico causado por las biopelículas en el ámbito industrial.

### **Origen y patogenia de procesos clínicos en los que participan bacterias formadoras de biofilms**

En cuanto a su origen y patogenia, la infección de la mayoría de los dispositivos implantados se produce generalmente durante el acto quirúrgico de su implantación y tiene como origen la microbiota cutánea, o de alguna mucosa próxima al sitio quirúrgico, del propio paciente. Otros mecanismos patogénicos menos frecuentes incluyen, la colocación de un dispositivo contaminado, la contaminación ambiental durante la cirugía, las infecciones que se propagan

por contigüidad y las que alcanzan el dispositivo por diseminación hematógica desde un foco distante.

Como hemos indicado anteriormente, la palabra “biopelícula” originalmente designaba la presencia de biomaterial de origen microbiano unido a una superficie; sin embargo, más recientemente, las bacterias agregadas que no están adheridas a superficies también han sido reconocidas como biopelículas e intervienen en algunos procesos clínicos.

Con esta base, las infecciones crónicas por biopelículas se pueden dividir en dos grupos, según estén relacionadas, o no, con superficies. Las primeras se observan comúnmente en pacientes con implantes o dispositivos médicos, mientras que las infecciones no asociadas a superficies incluyen infecciones del tracto respiratorio en pacientes que tienen alteración del aclaramiento mucociliar, como los que sufren fibrosis quística, y también pacientes con infecciones persistentes de tejidos blandos relacionadas con comorbilidades como diabetes y alteraciones vasculares de las extremidades inferiores que predisponen a sufrir heridas que no cicatrizan y son un sustrato idóneo para la infección.

Ambos grupos de bacterias formadoras de biopelículas desempeñan un papel importante en diversos procesos patológicos, ya que la formación de estas estructuras contribuye a la producción de infecciones con características peculiares:

- 1) Se originan a partir de sustratos inertes, entre los que encontramos todo tipo de implantes y dispositivos biomédicos.
- 2) También se forman en tejidos vivos, en particular si se encuentran traumatizados, desvitalizados o isquémicos.
- 3) Con frecuencia son polimicrobianas.
- 4) Ofrecen mayor resistencia frente al sistema inmune y frente a los antimicrobianos.
- 5) Tienden a la cronicidad, persistiendo si no se eliminan las superficies primarias de adhesión, como biomateriales, cuerpos extraños, secuestros óseos, etc.

Es destacable que incluso los agregados discretos de biopelículas pueden inducir el suficiente grado de inflamación y destrucción tisular para que se desarrolle una infección crónica, que se mantiene porque se asocia con tolerancia al tratamiento antibiótico y puede persistir en el huésped a pesar de una respuesta inmune innata normal.

## **Procesos patológicos en los que participan bacterias formadoras de biofilms**

### **Infecciones en implantes médicos**

Las infecciones asociadas a biodispositivos médicos son el más claro ejemplo de las infecciones dependientes de la formación de biopelículas. Entre los agentes causales más frecuentes figuran *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y diferentes especies de enterobacteriales. Las biopelículas pueden formarse en superficies abióticas incluyendo cualquiera de los dispositivos médicos implantados, como sondas, catéteres, válvulas cardíacas, marcapasos, prótesis articulares, prótesis mamarias, mallas quirúrgicas, dispositivos intrauterinos, lentes de contacto..., en ellos se desarrollan infecciones crónicas que son difíciles de tratar, hasta el punto de requerir en muchos casos la remoción del implante para su curación.

### **Infecciones bucales**

Las bacterias formadoras de biofilm están implicadas en las enfermedades bucales más prevalentes: la caries dental y la enfermedad periodontal. Las biopelículas en los dientes, la formación de la placa dental, es esencial para promover la desmineralización del esmalte y la inflamación de las encías.

### **Infecciones respiratorias crónicas**

*Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, entre otras, pueden formar biopelículas en las vías respiratorias, especialmente en pacientes con fibrosis quística o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Estas biopelículas contribuyen a la persistencia de la infección y dificultan su tratamiento.

### **Infecciones de heridas crónicas**

En las heridas crónicas, como las úlceras diabéticas o las úlceras por presión, las bacterias formadoras de biofilm influyen en la persistencia de la infección e interfieren en la cicatrización de la herida.

### **Infecciones del tracto urinario**

*Escherichia coli* y otras bacterias pueden formar biopelículas en las superficies de las vías urinarias. Estas biopelículas pueden proteger a las bacterias del sistema inmunológico y de los efectos de los antibióticos, contribuyendo a la recurrencia de las infecciones del tracto urinario.

### **Endocarditis infecciosa**

En la endocarditis, se pueden formar biopelículas en las válvulas cardíacas o en otras áreas del endocardio, causando daño al tejido cardíaco y aumentando la resistencia a los tratamientos antibióticos.

### Infecciones en la mucosa intestinal

Algunas bacterias de hábitat intestinal pueden formar biopelículas en la mucosa intestinal, lo que se ha asociado con enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn.

### Clones bacterianos específicos vinculados a la formación de biopelículas

Las características genéticas específicas y los mecanismos moleculares involucrados en la formación de biopelículas pueden diferir entre diferentes tipos de bacterias. Además, es importante destacar que la capacidad de formar biopelículas puede variar incluso entre cepas de la misma especie bacteriana.

Existen grupos concretos de bacterias, o clones bacterianos, que están asociados específicamente con la formación de biopelículas. Estos clones suelen tener características genéticas particulares que les confieren la capacidad de adherirse a superficies, producir la matriz extracelular necesaria y participar en la formación de biopelículas. A continuación, se mencionan algunos ejemplos de bacterias que tienen un notable protagonismo en la formación de biopelículas:

*Staphylococcus epidermidis*: Es una bacteria comúnmente asociada con infecciones relacionadas con dispositivos médicos, como catéteres y prótesis. La capacidad de algunas cepas para formar biopelículas en superficies de distintos biomateriales promueve el desarrollo de la infección y complica su tratamiento.

*Pseudomonas aeruginosa*: Esta especie es conocida por formar biopelículas en los pulmones de personas con fibrosis quística y protagonizar infecciones respiratorias crónicas. Las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* pueden ser particularmente resistentes a los tratamientos antibióticos, empeorando el pronóstico de las infecciones producidas por esta especie que alberga diferentes mecanismos de resistencia de forma natural y que suele acoger y expresar mecanismos de resistencia adquirida que la hacen especialmente refractaria a numerosos antimicrobianos.

*Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*: Son las especies que producen con más frecuencia infecciones en las vías urinarias, que se ven facilitadas por la formación de biopelículas en catéteres urinarios y otros dispositivos médicos. Las cepas productoras de biofilm contribuyen a la persistencia de las infecciones del tracto urinario.

*Vibrio cholerae*: Este patógeno primario, agente causal del cólera, puede formar biopelículas en superficies abióticas y bióticas, que tienen influencia en la transmisión de la enfermedad, en la supervivencia del microorganismo en diferentes reservorios que garantizan su mantenimiento y en la resistencia a los tratamientos.

## **El carácter polimicrobiano de la biopelícula acentúa la gravedad de las infecciones**

Las sinergias que se establecen entre algunos integrantes de biopelículas polimicrobianas acentúan la gravedad de las infecciones y las hacen más difíciles de tratar. Conocemos numerosos casos que evidencian esta afirmación. En modelos experimentales, la coinfección por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* requiere dosis infectantes más bajas para iniciar una infección clínica. De modo parecido, la participación de *Prevotella* incrementa la capacidad patógena de *Staphylococcus aureus* en ratones. *Escherichia coli* produce un considerable aumento de los abscesos formados en un modelo de ratón diabético cuando se asocia a *Bacteroides fragilis*. Estos modelos experimentales vienen a corroborar la evidencia clínica que sugiere mayor gravedad para las infecciones polimicrobianas.

## **Cómo contribuyen las biopelículas a la resistencia bacteriana a los antibióticos**

Las biopelículas bacterianas contribuyen significativamente a la resistencia bacteriana a los antibióticos y representan un desafío muy relevante en la práctica clínica, porque a nivel fenotípico las bacterias integradas en el biofilm muestran tolerancia frente a numerosos antibióticos y desinfectantes que mantiene actividad frente a estos microorganismos una vez que el biofilm se dispersa y adoptan el estado planctónico.

La matriz extracelular que compone las biopelículas actúa como una barrera física y química que protege a las bacterias del entorno circundante, incluidos los antimicrobianos. Diferentes estudios *in vitro* sugieren que las bacterias encastradas en estas estructuras pueden llegar a ser entre 10 y 1.000 veces más resistentes a la quimioterapia antimicrobiana que las bacterias planctónicas de la misma especie. De hecho, la mayoría, si no todos, los antimicrobianos disponibles son incapaces de eliminar la totalidad de los microorganismos que se integran en las biopelículas bacterianas o fúngicas constituidas. En definitiva, la presencia de biopelículas puede hacer que las infecciones sean más difíciles de tratar, a la par que aumentan la probabilidad de recaídas.

Un grave problema que enfrenta el estudio de la actividad de los antimicrobianos sobre biofilms radica en la diversidad de procedimientos que se han usado, a falta de métodos de estudio normalizados de uso universal. Es muy difícil comparar resultados de diferentes autores, incluso con los mismos microorganismos y antibióticos porque las condiciones de los experimentos utilizados varían mucho. Hay algunos dispositivos ideados con el propósito de homogeneizar la metodología (Robbins, Calgary) pero su complejidad les resta utilidad y dificulta generalizar su aplicación.

## **Mecanismos que contribuyen a la resistencia antibiótica en las biopelículas**

Los mecanismos de que se valen las bacterias formadoras de biopelículas para contribuir a la resistencia bacteriana son diversos y concomitantes:

### **Barrera física**

La matriz extracelular de las biopelículas forma una barrera física que dificulta la penetración de los antibióticos. Esta estructura tridimensional actúa como un escudo que limita el acceso directo de los antimicrobianos a las células bacterianas. Este impedimento interviene decisivamente en la inoperancia de algunos antibióticos, como los aminoglucósidos, e incluso algunos desinfectantes.

### **Difusión limitada**

La matriz extracelular puede limitar la difusión de los antibióticos en el interior de la biopelícula. Esto implica que las bacterias albergadas en las capas internas del biofilm pueden estar expuestas a concentraciones más bajas de antimicrobianos que las bacterias situadas en las capas externas, lo que favorece la supervivencia de las poblaciones internas. Con ello, se puede facilitar la emergencia de mutantes resistentes, ya que las concentraciones subinhibitorias propician su selección y supervivencia.

### **Resistencia adaptativa**

La exposición continua a bajos niveles de antibióticos dentro de la biopelícula puede inducir la selección de cepas bacterianas resistentes, contribuyendo al desarrollo de resistencia adaptativa. Esta capacidad puede traducirse en la activación de sistemas de desintoxicación o en la disminución de la permeabilidad de la membrana celular. Algunos autores han postulado que se produce una sobreexpresión de bombas de expulsión en algunas especies, como *Pseudomonas aeruginosa*, cuando forman parte de biocapas.

### **Resistencia pasiva**

Se produce cuando alguno de los miembros que integran el biofilm posee un mecanismo de resistencia que puede proteger a otros integrantes de la biocapa que no poseen el mecanismo protector. En este sentido son numerosos los factores de resistencia que pueden limitar la efectividad de los antibióticos sobre el biofilm, pero sin duda, adquieren más relevancia aquellos mecanismos de resistencia que al estar codificados por genes albergados en elementos genéticos móviles pueden ser adquiridos por microorganismos sensibles que participan en estas infecciones polimicrobianas asociadas al biofilm. Es conocido que cuando se cultivan conjuntamente *Streptococcus pneumoniae* sensible a aminopenicilinas con *Haemophilus influenzae* productor de betalactamasa, se produce un incremento de las concentraciones inhibitoria y bactericida mínimas de *Streptococcus pneumoniae*.



## **Cambios en la expresión génica**

La formación de biopelículas puede inducir cambios en la expresión génica de las bacterias. Algunos genes involucrados en la resistencia a los antibióticos pueden activarse o desactivarse en presencia de la matriz extracelular, lo que puede conferir una mayor resistencia a los tratamientos.

## **Naturaleza del biomaterial**

El material a que se adhieren los microorganismos formadores de biofilm puede influir en el desarrollo de resistencia antibiótica. El látex siliconizado, usado en algunas sondas urinarias, induce en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* el desarrollo de resistencia *in vitro* a carbapenémicos. La resistencia no es consecuencia de la inactivación del antibiótico por el biomaterial, sino que se debe a la inducción de modificaciones en el patrón normal de proteínas de membrana externa con pérdida de la porina OprD que constituye un canal de paso que usan algunos carbapenémicos para atravesar la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* y alcanzar su diana.

## **Variación genética**

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos a través de cambios genéticos permanentes en su material genético. A diferencia de la tolerancia, que implica resistencia temporal sin cambios genéticos, la variación genética implica la adquisición de mutaciones o la transferencia horizontal de genes que confieren una resistencia heredable a los antibióticos.

Este tipo de resistencia puede surgir a través de mutaciones espontáneas, que se dan de forma natural y que, en algunos casos, pueden conferir resistencia a algunos antibióticos, como cuando afectan a genes que codifican enzimas, proteínas de transporte de eflujo, o factores de regulación, que están implicados en procesos celulares que son interferidos por la acción de algún antimicrobiano frente al que surge la resistencia.

También puede adquirirse la resistencia mediante transferencia horizontal de genes. En el biofilm se dan condiciones facilitadoras como la alta densidad celular, mayor competencia y acumulación de elementos genéticos. Las bacterias pueden intercambiar material genético con otras bacterias de la misma especie o de especies diferentes a través de procesos como la conjugación, la transformación o la transducción. Si un gen de resistencia está presente en un plásmido o en un elemento genético móvil, puede transferirse a otras bacterias, permitiendo la propagación rápida de la resistencia a los antibióticos.

## **Presencia de células durmientes o criptobióticas**

Dentro de las biopelículas, algunas bacterias pueden adoptar un estado metabólicamente inactivo, de semilatenencia o “durmiente”, que las hace menos susceptibles a la acción de los antimicrobianos, ya que la mayoría de los

antibióticos normalmente actúan sobre células en fase de crecimiento exponencial o, al menos, metabólicamente activas.

### **Persistencia**

La persistencia bacteriana se refiere a la capacidad de algunas bacterias para sobrevivir a tratamientos antimicrobianos, incluso cuando la mayoría de la población es susceptible a dichos tratamientos. Algunas bacterias albergadas dentro del biofilm exhiben un fenómeno conocido como persistencia, caracterizado por la existencia de una subpoblación de células que muestra resistencia a los antibióticos, incluso en ausencia de cambios genéticos.

La teoría de las “bacterias persistentes” defiende que la mayoría de las bacterias de una biocapa no son más resistentes que las bacterias planctónicas, y por tanto, mueren cuando se enfrentan a antibióticos bactericidas. Solo una pequeña subpoblación, las bacterias persistentes, sobreviven y se hacen problemáticas cuando no funcionan bien los mecanismos defensivos del huésped. Esta persistencia puede contribuir decisivamente a la recurrencia de infecciones después de la interrupción del tratamiento, pues reconstruyen la biocapa y cronifican la infección.

La persistencia bacteriana es un fenómeno complejo y multifacético que puede depender de la especie microbiana, incluso del clon involucrado, del entorno y la presión selectiva ejercida por los antibióticos. Los mecanismos que regulan la aparición de estas subpoblaciones no se conocen bien, lo que dificulta desarrollar estrategias más efectivas para combatir las infecciones bacterianas y prevenir recaídas tras la aplicación de tratamientos antibióticos aparentemente bien dirigidos.

### **Tolerancia**

La tolerancia bacteriana se refiere a la capacidad de algunas bacterias para desarrollar mecanismos que les permiten sobrevivir temporalmente a la exposición a concentraciones letales de antibióticos, incluso cuando la población bacteriana no ha desarrollado resistencia genética permanente a esos antibióticos. A diferencia de la resistencia, que implica cambios genéticos heredables, la tolerancia se caracteriza por la capacidad temporal de las bacterias para resistir la acción de los antibióticos sin cambios permanentes en su material genético.

Se manejan diferentes posibilidades, no necesariamente incompatibles, que podrían intervenir en la génesis de la tolerancia bacteriana

Entrada en un estado de criptobiosis: Algunas bacterias pueden entrar en un estado de dormancia o baja actividad metabólica cuando se enfrentan a altas concentraciones de antibióticos. Este estado reduce la susceptibilidad a los antibióticos que actúan sobre procesos metabólicos activos.

Cambios en la permeabilidad de la membrana: Las bacterias pueden ajustar la permeabilidad de su membrana celular para limitar la entrada de antibióticos. Esto puede reducir la cantidad de antibiótico que llega al interior de la célula, disminuyendo su impacto.

Expulsión activa de antibióticos: Las bacterias pueden utilizar sistemas de bombeo, de eflujo, para expulsar activamente antibióticos fuera de la célula antes de que puedan tener un efecto letal. Estos sistemas de transporte de salida son proteínas que actúan como bombas para eliminar los antibióticos de la célula bacteriana.

Inactivación de antibióticos: Algunas bacterias pueden producir enzimas que inactivan o modifican químicamente los antibióticos, reduciendo así su efectividad. Estas enzimas pueden descomponer o modificar las moléculas de antibióticos antes de que alcancen su objetivo, impidiendo que pueda producirse la unión a su diana.

Respuesta al estrés: Las bacterias pueden activar respuestas al estrés que les permiten tolerar temporalmente la presencia de antibióticos. Estas respuestas pueden implicar cambios en la expresión génica y la activación de rutas de señalización celular que ayudan a la bacteria a adaptarse al estrés antimicrobiano.

Es importante destacar que la tolerancia bacteriana no implica cambios genéticos permanentes en la población bacteriana. No obstante, la exposición continuada a dosis subletales de antibióticos puede favorecer la selección de subpoblaciones tolerantes. La tolerancia puede contribuir a la persistencia de infecciones bacterianas y complicar la erradicación completa de las bacterias patógenas durante los tratamientos antibióticos.

### **Respuesta al estrés y mecanismos implicados**

La supervivencia bacteriana está, al menos parcialmente, asociada con la capacidad de los microorganismos para detectar y reaccionar a los cambios que se producen en las condiciones ambientales a que pueden estar sometidos. La maquinaria requerida para responder a las modificaciones ambientales está presente en todas las células, tanto procarióticas como eucarióticas. En las bacterias se activan varios mecanismos de respuesta cuando son sometidas a condiciones de estrés, que se controlan mediante proteínas cuya expresión está asociada a la intervención de genes reguladores. Es destacable que las interacciones entre estos mecanismos permiten una respuesta coordinada y eficiente frente a múltiples agentes estresantes.

Los análisis de transcriptomas de biopelículas cultivadas *in vitro* confirmaron que las células que forman biopelículas experimentan diversos tipos de estrés, que incluyen hipoxia o privación de oxígeno, estrés por nutrientes y crecimiento lento, que aumentan a medida que la biopelícula crece en tamaño

Las bacterias pueden activar mecanismos de respuesta al estrés que les permiten adaptarse y sobrevivir. Estos mecanismos son esenciales para la supervivencia bacteriana en entornos cambiantes. La respuesta puede incluir la expresión de genes de reparación del ADN y la regulación de diferentes vías metabólicas.

Mecanismos más comúnmente implicados en la respuesta al estrés bacteriano.

Regulación génica: Las bacterias pueden regular la expresión de sus genes en respuesta al estrés. Esto implica la activación o represión de genes específicos que codifican proteínas involucradas en la adaptación al estrés. Los reguladores transcripcionales, como proteínas sigma alternativas, pueden desempeñar un papel clave en la modulación de la expresión génica en respuesta al estrés.

Producción de proteínas de choque térmico (heat shock proteins): Las proteínas de choque térmico, o chaperonas, ayudan a las bacterias a mantener la correcta conformación y funcionalidad de sus proteínas bajo condiciones de estrés. Estas proteínas pueden ayudar en la reparación de proteínas desnaturalizadas e intervenir en la prevención de la agregación de proteínas.

Activación de sistemas de respuesta a señales: Las bacterias pueden activar sistemas de respuesta a señales que les permiten detectar y responder a factores de estrés específicos. Un ejemplo común es el sistema de dos componentes, que consta de una proteína sensora en la membrana y un regulador transcripcional en el citoplasma.

Acumulación de solutos osmoprotectores: Para hacer frente al estrés osmótico, las bacterias pueden acumular solutos osmoprotectores, como glicina betaína y prolina, para mantener la homeostasis osmótica y proteger las estructuras celulares.

Reparación del ADN: La exposición al estrés puede dañar el material genético de las bacterias. Para contrarrestar este daño, las bacterias activan sistemas de reparación del ADN, como la reparación por escisión de nucleótidos o la recombinación homóloga.

Cambio en la composición de la membrana: Las bacterias pueden ajustar la composición de sus membranas para resistir el estrés, por ejemplo, alterando la relación de ácidos grasos saturados e insaturados para mantener la integridad de la membrana.

Cambios en el metabolismo: Las bacterias pueden modificar su metabolismo en respuesta al estrés. Por ejemplo, pueden cambiar a rutas metabólicas alternativas o ajustar la expresión de genes relacionados con la producción de energía y metabolismo.

Formación de endosporas: Algunas bacterias forman endosporas, estructuras resistentes que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales

extremadamente desfavorables. La formación de endosporas es un mecanismo de resistencia a largo plazo que no conlleva cambios en el genoma sino modificaciones en la expresión que implican la represión de algunos genes innecesarios en el nuevo estado celular y la activación de otros genes que codifican componentes imprescindibles para el desarrollo de la endospora.

Estos mecanismos permiten a las bacterias adaptarse a condiciones adversas y sobrevivir a situaciones de estrés, lo que es esencial para su supervivencia en entornos cambiantes y desafiantes. La comprensión de estos mecanismos proporciona conocimientos valiosos para el desarrollo de estrategias dirigidas a combatir patógenos bacterianos y a mejorar la eficacia de los tratamientos antimicrobianos.

### **Qué estrategias podemos oponer para combatir o eliminar las biopelículas**

El control y la eliminación de biopelículas son áreas muy activas de investigación, ya que los biofilms microbianos suelen ser más resistentes a los tratamientos habituales debido a la matriz extracelular que protege a las poblaciones imbuidas en su seno y a los diferentes mecanismos que se producen en ellas para contribuir a su persistencia y difusión. Entre las numerosas estrategias desarrolladas o propuestas para combatir o eliminar biopelículas destacamos las siguientes:

#### **Agentes antimicrobianos**

Se han explorado diversos agentes antimicrobianos para valorar su eficacia contra bacterias o levaduras organizadas en biopelículas. En la elección del tratamiento son determinantes la especie o especies bacterianas involucradas, la ubicación de la infección y la naturaleza específica de la biopelícula.

Carecemos de estudios que resuelvan de manera clara si existen diferencias sistemáticas en la actividad terapéutica de antibióticos bacteriostáticos o bactericidas usados en el tratamiento de las infecciones producidas por bacterias integradas en biopelículas. En modelos experimentales de biofilms formados por *Staphylococcus aureus* que son altamente resistentes a antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular, mantienen sensibilidad frente a antimicrobianos que interfieren la síntesis proteica a nivel ribosomal, lo que podría reflejar el papel preponderante de la transcripción en el establecimiento, maduración y propagación del biofilm.

La capacidad erradicadora de los antibióticos es diferente y pueden distinguirse algunos más activos o con mayor capacidad para eliminar bacterias organizadas en biopelículas. Entre los que se han utilizado o investigado para el tratamiento de infecciones asociadas a biopelículas destacan daptomicina, rifampicina y vancomicina, que se han mostrado útiles en infecciones por gram-positivos, en particular las causadas por *Staphylococcus aureus*. Como antibióticos

de amplio espectro que han mostrado mayor actividad frente a gramnegativos figuran, tigeciclina y ciprofloxacina.

No obstante, la resistencia, la tolerancia y la persistencia que se concitan en las biopelículas vienen a dificultar la erradicación completa cuando se usan los antibióticos convencionales, de modo que es necesario mantener la búsqueda de compuestos antimicrobianos más activos y nuevas estrategias para lograr mayor eficacia, como la combinación de antibióticos, la administración localizada para alcanzar concentraciones más elevadas en el foco de infección o el uso de tratamientos dirigidos contra la matriz extracelular.

En esta última aproximación ha mostrado actividad sinérgica la combinación de un agente sin actividad antimicrobiana, la N-acetilcisteína, con linezolid para reducir sensiblemente el número de células viables en un biofilm de *Staphylococcus epidermidis*. Diferentes estudios han evidenciado que la N-acetilcisteína reduce la formación de biofilm en varias especies que, además de *Staphylococcus epidermidis*, incluyen *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Su efecto abarca la inhibición de la adherencia bacteriana, la reducción en la producción de la matriz de exopolisacárido extracelular, la promoción de la desintegración de biopelículas maduras y la reducción de la viabilidad de células sésiles. Por tanto, es posible que algunos antimicrobianos puedan incrementar su eficacia si se usan en combinación con N-acetilcisteína.

### **Tratamientos físicos**

Diferentes métodos físicos, como la terapia fotodinámica, la terapia con ultrasonidos y la aplicación de corriente eléctrica, se han evaluado para la erradicación de biopelículas. Estos enfoques parecen tener efectos, tanto reductores de la colonización de los dispositivos en los que se aplican, como disruptivos de la estructura de la biopelícula formada, que permitirían aumentar la eficacia del tratamiento con antimicrobianos de uso tópico.

La terapia fotodinámica ofrece ventajas relevantes sobre el tratamiento convencional debido a su capacidad de unión selectiva a las membranas de las células y la posibilidad de administrar luz con precisión al tejido afectado para lograr el máximo daño a los microorganismos y el mínimo daño al huésped.

### **Nuevos biomateriales e implantes inteligentes**

La modificación de superficies para dotarlas de propiedades antimicrobianas ha sido una estrategia utilizada para prevenir la formación de biopelículas, tanto en dispositivos médicos como en superficies ambientales. Para conseguir este propósito las superficies pueden liberar sustancias antimicrobianas o pueden exhibir propiedades que inhiben o interfieren la adhesión bacteriana.

En este campo está experimentado un notable crecimiento el desarrollo de polímeros bioinspirados que usan biomateriales naturales como aminoácidos,

vitaminas, polifenoles, polisacáridos,... que mediante nuevas tecnologías permiten sintetizar polímeros incluyendo celulosa, ácido hialurónico, alginato, gelatina,... que muestran propiedades terapéuticas, facilitan la liberación de fármacos dentro de sistemas biológicos y ofrecen mejoras en biocompatibilidad, biodegradabilidad, hemocompatibilidad y tienen reducida citotoxicidad.

Se trabaja en el diseño de implantes denominados inteligentes porque son capaces de detectar la colonización bacteriana del biodispositivo y, solo entonces, liberar antimicrobianos en el foco de la infección naciente.

### **Inhibidores de la formación de biopelículas**

Se investigan compuestos que interfieren con la formación de biopelículas.

En su etapa más inicial, como los inhibidores de la adhesión bacteriana a las superficies. Por ejemplo, la desactivación del gen *fimH* asociado a fimbrias mediante tecnología CRISPRi es una estrategia que trata de interferir la adhesión de las biopelículas.

En la etapa crucial de la síntesis de la matriz extracelular se actúa mediante bloqueadores o mediante compuestos que interfieren o interrumpen la comunicación celular (quorum sensing), esencial para poner en marcha la síntesis coordinada de la biopelícula. Se ha probado la desactivación del gen *luxS* de señalización QS aplicando tecnología CRISPRi. La furanona halogenada aislada del alga marina *Delisea pulchra* interrumpe la cascada de señalización bacteriana QS. Se están investigando numerosos compuestos como la diamina cíclica ADM 3, extractos de ginseng o de ajo, ácido úsnico o azitromicina con actividad interruptora o atenuadora del QS en biopelículas bacterianas y fúngicas.

### **Interferencia con la dispersión**

Durante la dispersión, el paso final del ciclo de vida de la biopelícula, las células individuales salen de la biopelícula para reanudar un estilo de vida planctónico. Como se considera que el estado planctónico es más vulnerable a los agentes antimicrobianos y las respuestas inmunes, la dispersión se considera una vía prometedora para el control de biopelículas. El atractivo de esta estrategia radica en que su actividad se ejercería sobre la infección ya establecida y no precisaría de una administración profiláctica.

### **Enzimas disgregadores de la matriz extracelular**

Puesto que la matriz del biofilm está compuesta por ADN, proteínas y polisacárido extracelular, la ruptura de la estructura de las biopelículas podría alcanzarse a través de la degradación de los componentes individuales que lo forman, mediante la acción de varias enzimas.

Algunas enzimas, como la N-acetilcisteína, la dispersina B (DspB), la  $\alpha$ -amilasa, la proteinasa K y las desoxirribonucleasas (DNasa-I), han mostrado

capacidad para descomponer la matriz extracelular de las biopelículas, facilitando la dispersión de las células y una mayor penetración de los antibióticos, lo que aumenta la sensibilidad a los tratamientos antimicrobianos. Esta degradación de biofilms maduros se ha observado en diferentes especies, como *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

También es prometedor el empleo de lisostafina y estafilolisina, endopeptidasas de origen microbiano capaces de romper los puentes de pentaglicina que establecen enlaces cruzados entre los aminoácidos 3 y 4 de las cadenas laterales tetrapeptídicas del peptidoglicano que es el componente esencial de la pared celular de los estafilococos.

La molécula de señalización de óxido nítrico (NO) dispersa las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante la estimulación de las fosfodiesterasas que degradan c-di-GMP, que inducen un cambio al crecimiento planctónico, lo que mejora la actividad de los antimicrobianos.

Pequeñas moléculas de origen bacteriano como D-aminoácidos y poliamina norespermidina inducen la dispersión de biopelículas maduras e interfieren en la formación de biopelículas en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Estas moléculas podrían usarse como agentes antibiopelículas en la estrategia de dispersión de biopelículas.

### **Compuestos naturales bioactivos con propiedades antibiopelículas**

Algunas bacterias y actinomicetos producen compuestos naturales con propiedades antibiopelículas. El extracto metanólico de un actinomiceto asociado a los corales ayuda a reducir la formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus*. Otro producto natural, el ácido 4-fenilbutanoico, muestra una alta actividad antibiopelícula contra especies bacterianas grampositivas y gramnegativas. Extractos de *Azadiracta indica* (Neem) y *Acacia* han mostrado efecto antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*.

Péptidos antimicrobianos de respuesta inmune innata: Diferentes organismos multicelulares producen péptidos antimicrobianos como parte de la respuesta inmune innata o natural que interviene en la defensa inespecífica del huésped frente a las infecciones. Algunas características de estos péptidos antimicrobianos los hacen muy atractivos para el abordaje de nuevas estrategias terapéuticas frente a los biofilms. Entre ellas, destacan, su capacidad para destruir bacterias de crecimiento lento o células criptobióticas que son predominantes en los biofilms, tienen una tasa baja de resistencia espontánea y su actividad es sinérgica con la de algunos antibióticos. De hecho, ya hay algunos compuestos autorizados para uso tópico e investigaciones conducentes al desarrollo de otras aplicaciones. El desarrollo de nuevas vacunas podría conducir a la generación de vacunas que protejan frente a bacterias patógenas formadoras de biofilm, como *Staphylococcus aureus*.



## Nanopartículas antimicrobianas

Es un campo muy activo y prometedor que utiliza nanopartículas con propiedades antimicrobianas para atacar biopelículas. Estos nanomateriales pueden interferir con la integridad de la membrana celular bacteriana, mejorar la penetración de los agentes antimicrobianos en la biopelícula, incluso potenciar su actividad y facilitar su liberación, que además, puede dirigirse de forma más precisa.

Los nanomateriales pueden ser metálicos u orgánicos y su actividad antimicrobiana suele involucrar un triple mecanismo de acción: estrés oxidativo y no oxidativo y liberación de iones metálicos. Este mecanismo de acción múltiple dificulta la emergencia de resistencia.

Las nanopartículas admiten la combinación con antibióticos (vancomicina, colistina), bacteriocinas, péptidos antibacterianos (catelicidinas, cerageninas) con los que alcanzan efectos sinérgicos.

Las nanopartículas  $\text{CaF}_2$  ejercen un efecto supresor en los genes asociados con los principales factores de virulencia de *Streptococcus mutans* (*vicR*, *gtfC*, *ftf*, *spaP*, *comDE*) provocando la supresión de la actividad enzimática asociada con la síntesis de glucanos, la adhesión celular, producción de ácido, tolerancia al ácido e interferencia en la detección del quórum sensing, lo que conduce a la inhibición de la biopelícula.

## Compuestos que interfieren con la comunicación celular en las biopelículas

Los compuestos que interfieren con la comunicación celular en las biopelículas a través del proceso de quorum sensing (QS) son conocidos como inhibidores de QS. Como ya hemos indicado, el quorum sensing es un mecanismo de regulación de la expresión génica mediante el que las bacterias coordinan su comportamiento en función de la densidad celular.

El quorum sensing juega un papel crucial en la formación, el mantenimiento y la dispersión de la biopelícula. Al inhibir el quorum sensing, se pueden afectar las actividades coordinadas de las bacterias en la biopelícula, como la producción de matriz extracelular y la expresión de genes relacionados con la virulencia.

Algunos compuestos conocidos por su capacidad para interferir con la comunicación celular en biopelículas incluyen:

Bromuro de acilhomoserina lactona (AHL): Las AHL son moléculas de señalización utilizadas por muchas bacterias gramnegativas para el quorum sensing. Los inhibidores de AHL pueden interferir con la unión de las AHL a sus receptores, evitando así la activación de las vías de señalización.

Furanonas: Compuestos como las furanonas sintéticas han demostrado tener actividad como inhibidores de QS. Estos compuestos pueden interferir con la señalización de las AHL y reducir la formación de biopelículas.

Ácido cis-2-decenoico: Este ácido graso ha mostrado actividad como inhibidor de QS, de modo que puede afectar la comunicación celular y reducir la virulencia en ciertas bacterias formadoras de biofilm.

Peptoides: Algunos peptoides han demostrado ser inhibidores de QS. Estos compuestos pueden imitar las moléculas de señalización bacterianas y competir con ellas, interfiriendo así con la comunicación celular.

Ésteres de furano: Compuestos derivados de furano han mostrado capacidad para inhibir el QS y reducir la formación de biopelículas.

Extractos naturales: Algunos extractos naturales de plantas, como aceites esenciales y compuestos polifenólicos, han demostrado actividad como inhibidores de QS, con propiedades antimicrobianas y anti-biofilm.

Enzimas: Algunas enzimas, como las oxidorreductasas, pueden interferir con la señalización de las moléculas de QS y reducir la formación de biopelículas.

Es importante destacar que la investigación en este campo está en curso, y se están descubriendo continuamente nuevos compuestos con propiedades inhibidoras de QS. La identificación de estos compuestos ofrece la posibilidad de desarrollar estrategias terapéuticas que no solo actúen directamente contra las bacterias, sino que también interfieran con la coordinación y la comunicación dentro de las biopelículas.

**Terapias combinadas**: Se han propuesto estrategias que combinan diferentes enfoques para abordar la resistencia que oponen las biopelículas a los tratamientos más convencionales. Aquí se puede incluir la combinación de agentes antimicrobianos con enzimas desintegradoras de la matriz extracelular o la administración de terapias dirigidas a múltiples objetivos. También se ha propuesto la utilización de bacteriófagos para el tratamiento de infecciones relacionadas con la formación de biopelículas.

Diferentes terapias antibiofilm tienen el potencial de actuar sinérgicamente con antibióticos, en particular, cuando actúan sobre dianas moleculares diferentes que intervienen en la génesis de componentes del biofilm.

En definitiva, los progresos en el conocimiento de los mecanismos genéticos y moleculares que dirigen la formación del biofilm resultan esenciales para el desarrollo de modelos que permitan analizar la utilidad de estrategias innovadoras destinadas a mejorar el tratamiento de las infecciones asociadas a la formación de biofilms, incluyendo terapias personalizadas.

## **Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a biopelículas. Obtención y procesamiento de la muestra adecuada**

El diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a biopelículas presenta dificultades derivadas de la resistencia de estas estructuras a los métodos de detección convencionales.

Un aspecto crucial en el éxito del diagnóstico microbiológico de este tipo de infecciones es la obtención de una muestra apropiada, lo que puede ser complejo y en muchas ocasiones solo puede realizarse tras la retirada del dispositivo.

El cultivo tras sonicación o agitación es una técnica que se viene utilizando en los últimos años como herramienta diagnóstica de especial utilidad para el estudio de la infección asociada a prótesis articular y ha demostrado en esta indicación una mayor sensibilidad que el cultivo de los tejidos peri-implante, especialmente en aquellos pacientes que están recibiendo tratamiento antibiótico. En el caso de las infecciones asociadas a otros dispositivos hay muy poca experiencia en el uso de estas técnicas, pero podrían ser una herramienta útil ya que facilitan la disgregación de la biocapa de la superficie del dispositivo. También, la aplicación de técnicas moleculares, especialmente las basadas en PCR, aplicadas a las muestras y al material obtenido tras sonicación, han demostrado para algunos tipos de dispositivos una alta sensibilidad y especificidad.

Entre los métodos aplicables a las muestras obtenidas se incluyen:

Microscopía de contraste de fase y microscopía de campo oscuro: Estas técnicas permiten la observación de biopelículas sin necesidad de usar tinciones específicas y proporcionan información sobre la morfología y la distribución de las biopelículas.

Tinciones especiales: Algunas tinciones habituales como la de Gram y las tinciones argénticas, pueden ayudar a visualizar las biopelículas en muestras clínicas, revelar su estructura general y la presencia de microorganismos.

Microscopía de fluorescencia: La microscopía de fluorescencia permite visualizar las biopelículas utilizando tintes fluorescentes específicos que se unen a los componentes de la matriz extracelular. Se obtiene así una imagen detallada de la estructura de la biopelícula y puede orientar en la identificación de las bacterias presentes.

Cultivo bacteriano: Aunque algunas biopelículas pueden ser difíciles de cultivar en los medios convencionales y la naturaleza polimicrobiana puede complicar el aislamiento e identificación de las especies implicadas, el cultivo sigue siendo una herramienta fundamental en el diagnóstico microbiológico.

Técnicas de hibridación in situ: Las sondas de ácidos nucleicos marcadas con fluorescencia pueden utilizarse para detectar de manera específica secuencias de ácidos nucleicos de bacterias presentes en biopelículas. Se obtiene información sobre la identidad de las especies y su distribución en la biopelícula.

Análisis molecular: Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, muy especialmente, la secuenciación masiva del ADN pueden utilizarse para identificar y caracterizar genéticamente las bacterias presentes en las biopelículas. Estos métodos pueden proporcionar información exacta sobre la diversidad bacteriana y la presencia de genes específicos de resistencia.

Técnicas de diagnóstico por imagen: La resonancia magnética (RM) y la tomografía computarizada (TC), pueden ser utilizadas para detectar la presencia de biopelículas en tejidos y dispositivos médicos. Estas técnicas son útiles para precisar la localización y la extensión de las infecciones.

El diagnóstico de las infecciones asociadas a biopelículas a menudo exige la combinación de varios métodos para obtener una evaluación completa. En la elección de las técnicas específicas influyen la ubicación de la infección, la naturaleza del material involucrado en la infección, la disponibilidad de las diferentes técnicas en el laboratorio clínico y la experiencia del personal.

### **Diagnóstico microbiológico de infecciones polimicrobianas en biofilms**

La metodología clásica aplicada al diagnóstico clínico se centra en la identificación de los microorganismos más abundantes y los mejor dotados de determinantes de patogenicidad, minusvalorando el papel de acompañantes menos abundantes y, generalmente, menos virulentos. Sin embargo, la repercusión clínica que puede tener la etiología polimicrobiana que, como hemos indicado, puede facilitar el intercambio de información genética, promover sinergias del metabolismo y crear simbiosis resultantes de distintas combinaciones de los microorganismos participantes, puede llevarnos a desarrollar o potenciar el uso de nuevos métodos de diagnóstico que permitan identificar y cuantificar a todos los integrantes de estas comunidades polimicrobianas.

Estos procedimientos podrían contribuir a definir mejor los objetivos terapéuticos, al no desdeñar las ventajas que los miembros menos representados pueden aportar a sus compañeros, incluyendo mayor virulencia.

Los métodos moleculares emergen con fuerza en este panorama, ya que han demostrado capacidad para identificar y cuantificar de forma precisa, sensible y específica, las distintas especies que participan en las infecciones asociadas a biopelículas polimicrobianas.

Concretar las especies participantes en el biofilm y su contribución relativa al desarrollo y persistencia de la infección, ayudará a explorar y comprender mejor su relevancia clínica, aportando criterios sólidos sobre los que asentar actitudes diagnósticas y terapéuticas más eficientes.

## **Ensayos de sensibilidad a antimicrobianos de bacterias que forman biopelículas**

Como se ha señalado, la actividad de los antimicrobianos sobre los microorganismos integrados en biofilms difiere considerablemente de la que puedan exhibir cuando se enfrentan a bacterias planctónicas, de ahí que su estudio requiera de enfoques específicos que se aproximen mejor a lo que acontece en el seno de estas infecciones.

Algunos métodos comúnmente utilizados para evaluar la eficacia de los antibióticos contra bacterias formadoras de biofilm son:

### **Ensayos de microdilución en placa**

Se trata de una variante del método de microdilución estándar, pero adaptado para biopelículas. Se expone la biopelícula a diferentes concentraciones de antibiótico en placas de microtitulación y se evalúa la inhibición del crecimiento bacteriano.

### **Ensayos de viabilidad celular**

Ensayos de reducción de colorante (como resazurina): Se utiliza un indicador redox de viabilidad celular que cambia de color en función de la actividad metabólica de las células. Después del tratamiento con antibióticos, se evalúa la reducción del indicador como un indicativo de la viabilidad celular.

Ensayos de viabilidad con recuento de UFC (Unidades Formadoras de Colonias): Después del tratamiento con antibióticos, se extraen las células de la biopelícula, se diluyen y se siembran en placas de agar para contar las colonias viables.

### **Microscopía**

Microscopía de epifluorescencia: Permite visualizar las biopelículas y evaluar la viabilidad celular mediante tintes fluorescentes que indican la actividad metabólica o la presencia de células vivas y muertas.

Microscopía confocal de barrido láser (CLSM): Proporciona imágenes tridimensionales de biopelículas vivas, permitiendo observar la estructura y la viabilidad celular.

### **Medición de biomasa y actividad metabólica**

Ensayos de cristal violeta: Evalúa la cantidad de biomasa presente en la biopelícula mediante la tinción con cristal violeta.

Ensayos de actividad metabólica con tetrazolio (por ejemplo, MTT o XTT): Miden la actividad metabólica de las células en la biopelícula, indicando la viabilidad celular.

### **Ensayos de dispersión de biopelículas**

Tratamiento con agentes dispersantes: Se pueden probar compuestos que promuevan la dispersión de las biopelículas, lo que facilitaría la acción de los antibióticos. La evaluación se realiza midiendo la cantidad de células dispersas.

### **Ensayos de quorum sensing (QS)**

Inhibidores de QS: Algunos compuestos que interfieren con la comunicación celular en biopelículas, conocida como quorum sensing, pueden ser evaluados para medir su capacidad para disminuir la formación de biopelículas o aumentar la sensibilidad a los antibióticos.

La combinación de múltiples métodos puede brindar una evaluación más completa que permita un diagnóstico más afinado y ayude a precisar la eficacia de los tratamientos antimicrobianos contra biopelículas.

En resumen, la amplia distribución en la naturaleza, en los más variados hábitats, explica el interés que despierta el estudio de las biopelículas microbianas en campos muy diversos: microbiología, biotecnología, medicina, ingeniería ambiental y otras disciplinas relacionadas, que intentan comprender mejor su naturaleza y repercusiones a fin de desarrollar estrategias de control y modificación que puedan aplicarse en diferentes ámbitos sanitarios y tecnológicos, tanto favorables como perniciosos. Queda un camino por recorrer, sin duda apasionante y prometedor, que requiere recursos, dedicación y constancia para desentrañar su esencia y desarrollar medidas eficientes que permitan superar el desafío que plantea esta forma de vida microbiana.

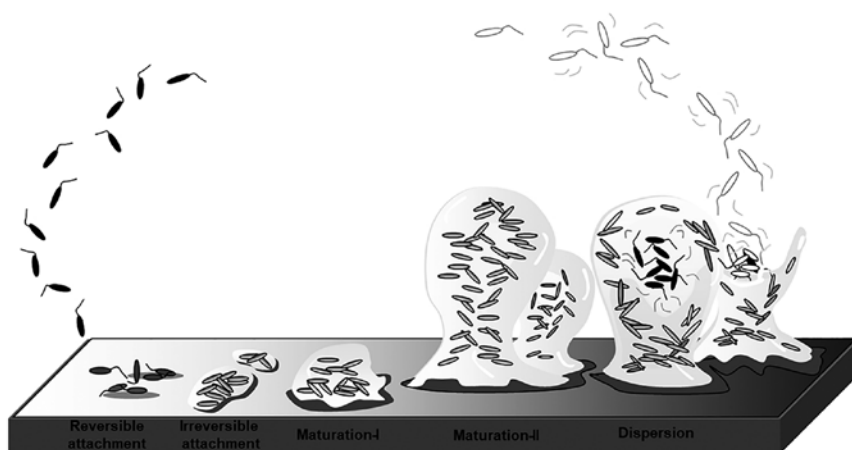
## Bibliografía

1. Arshad R, Razlansari M, Hosseinikhah SM, Pandey A T, Ajalli N, Ezra Manicum A L, Thorat N, Rahdar, A, Zhu Y, Tabish T A. Antimicrobial and anti-biofilm activities of bio-inspired nanomaterials for wound healing applications. *Drug Discovery Today*. 2023. 28 (9): 1-10.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103673>
2. Cherny K E, Sauer K. Untethering and degradation of the polysaccharide matrix are essential steps in the dispersion response of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology* 2020. 202, e00575–00519.  
<https://doi.org/10.1128/jb.00575-19>
3. de Carvalho CCCR. Marine Biofilms: a successful microbial strategy with economic implications. *Frontiers in Marine Science*. 2018. 5.  
<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00126>
4. de Cueto López M, del Pozo León JL, Franco Álvarez de Luna F, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos. 52. De Cueto López M. (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2015.
5. del Pozo JL, Patel R. Are antibiotics and surgery sufficient to treat biofilm-associated infections? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 31(10): 641–642. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.10.001>
6. del Pozo JL, Rouse MS, Euba G, Kang CI, Mandrekar JN, Steckelberg JM, et al. The electrical effect is active in an experimental model of *Staphylococcus epidermidis* chronic foreign body osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 4064–8.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00432-09>
7. Ehrlich GD, Ahmed A, Earl J, Hiller NL, Costerton JW, Stoodley P, Post JC, DeMeo P, Hu FZ. The distributed genome hypothesis as a rubric for understanding evolution in situ during chronic bacterial biofilm infectious processes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59: 269–279.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00704.x>
8. Fitridge I, Dempster T, Guenther J, de Nys R. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling*. 2012. 28: 649–669.  
<https://doi.org/10.1080/08927014.2012.700478>
9. Fleming D, Rumbaugh K. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms* 2017. 5: 15.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015>

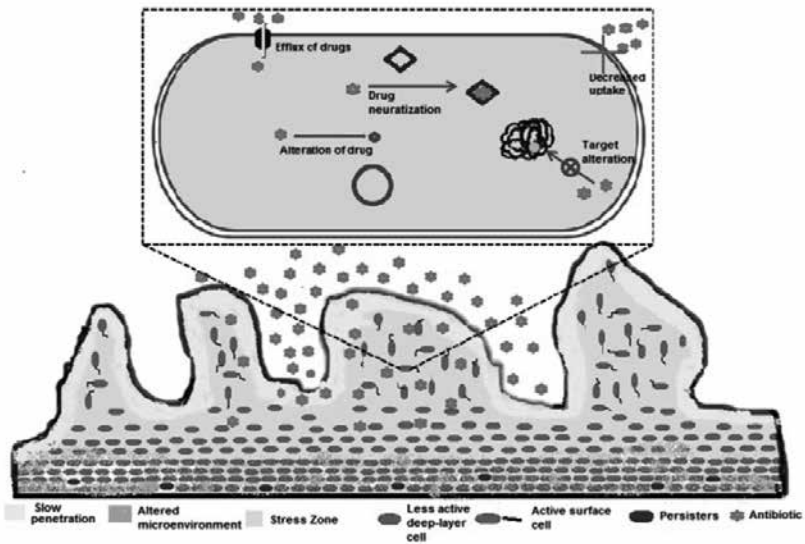
10. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 2010. 8: 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
11. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S A, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 2016. 14: 563. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
12. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005 Jan; 13 (1): 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>
13. Hauser A R, Jain M, Bar-Meir M, McColley S A. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev* 2011. 24: 29–70. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-10>
14. Karin S, Camper A K, Ehrlich G D, Costerton J W, Davies D G. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology*. 2002 Feb; 184 (4): 1140–1154. <https://doi.org/10.1128/JB.184.4.1140-1154.2002>
15. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y & Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett* . 2004. 230: 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00856-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00856-5)
16. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 322: 107–31. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3-6>
17. Madsen JS, Burmolle M, Hansen LH, Sorensen SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012. 65: 183–195. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x>
18. Mah T-F. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012. 7 (9):1061- 1072. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>
19. Petrova O E, Sauer K. A Novel Signaling Network Essential for Regulating *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *PLoS Pathog*. 2009. 5 (11): e1000668. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000668>
20. Petrova OE, Sauer K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current Opinion in Microbiology*. 2016. 30: 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.004>
21. Reichhardt C, Parsek MR. Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Frontiers in Microbiology*. 2019. 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00677>



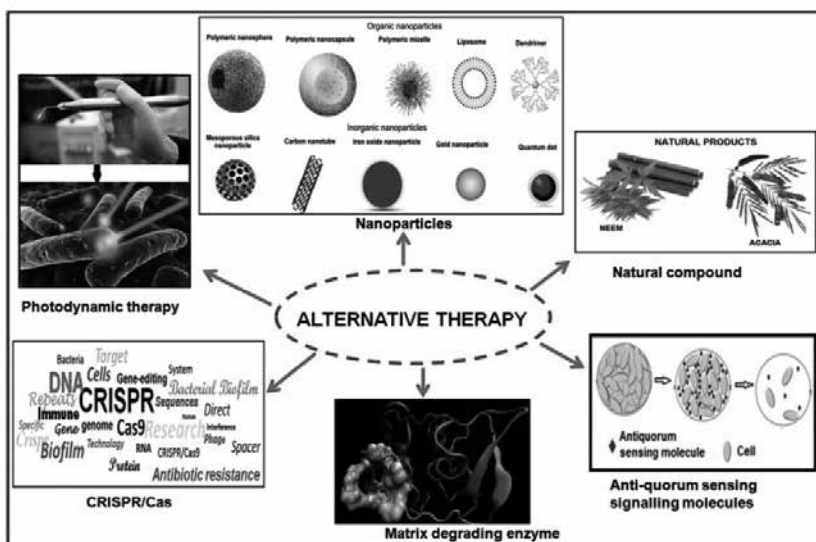
22. Rickard AH, Colacino KR, Manton KM, Morton III RI, Pulcini E, Pfeil J, Rhoads D, Wolcott RD, James G. Production of cell–cell signalling molecules by bacteria isolated from human chronic wounds. *J Appl Microbiol* 2010; 108: 1509–1522.  
*<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04554.x>*
23. Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol.* 2020 Oct; 18 (10):571-586. *<https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>*
24. Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Hall-Stoodley L, Burmølle M, Stewart PS, Bjarnsholt T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol.* 2022 Oct; 20 (10): 608-620.  
*<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>*
25. Sharma D, Misba L, Khan A U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019. 8:76. *<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>*
26. Trastoy R, Manso T, Fernández-García L, Blasco L, Ambroa A, Pérez del Molino ML, Bou G, García-Contreras R, Wood TK, Tomás M. Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. *Clin Microbiol Rev.* 2018. 31: e00023-18.  
*<https://doi.org/10.1128/CMR.00023-18>*
27. Vivas R, Teixeira Barbosa A A, Dolabela S, Jain S. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. *Microbial Drug Resistance.* 2019. 25 (6).  
*<https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0319>*
28. Wolcott1 R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical Microbiology and Infection.* 2013 19 (2): 107-112. *<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x>*
29. Zhu P, Li M. Recent progresses on AI-2 bacterial quorum sensing inhibitors. *Curr Med Chem* 2012; 19: 174–186.  
*<https://doi.org/10.2174/092986712803414187>*



*Representación gráfica de las etapas del desarrollo de biopelículas. Tomado de: Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. Nat Rev Microbiol. 2020 Oct; 18 (10):571- 586.*



*Representación gráfica de mecanismos potenciales de Resistencia a antibióticos en biofilms. Tomado de: Sharma D, Misra L, Khan A U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. Antimicrob Resist Infect Control. 2019. 8:76.*



Representación esquemática de los enfoques alternativos contra las comunidades de biope-  
lículas resistentes a los antibióticos. Tomado de: Sharma D, Misba L, Khan A U. *Antibio-  
tics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities.*  
*Antimicrob Resist Infect Control.* 2019. 8:76.