



Biofilms: actualización y revisión de su rol en las vías respiratorias superiores

M.E. Zernotti¹, M. Gabriela Paraje² y C.E. Baena-Cagnani³

RESUMEN

Los biofilms son estructuras de microorganismos altamente organizadas que crecen unidas irreversiblemente a una superficie cubiertas por una matriz extracelular polisacárida que ellas mismas secretan. Actualmente los biofilms son considerados factores de virulencia que constituyen un modo de crecimiento protegido, que permite la supervivencia en un medio hostil, facilitando la unión de las bacterias a distintas superficies, ayudando al mantenimiento de las bacterias y protegiéndolas de distintos factores, como los cambios en las condiciones ambientales, la posibilidad de ser fagocitadas por células macrofágicas del huésped o por el efecto de los agentes antimicrobianos. Los cuadros clínicos crónicos de la vía aérea superior pueden tener relación directa con la presencia de microorganismos en forma de biofilms. Las bacterias, protegidas de las defensas del huésped, en forma de biofilms, continúan con su metabolismo y la producción de exotoxinas locales, lo que favorecería la cronicidad de la respuesta inflamatoria evidenciable por los cambios en la mucosa respiratoria y la persistencia de infecciones que no responden a los tratamientos antibióticos.

Palabras clave: Biofilms. Rinosinusitis crónica. Poliposis nasal. Resistencia bacteriana. Infección respiratoria.

ABSTRACT

Biofilms are highly organized structures of microorganisms growing on and irreversibly bound to a surface covered by an extracellular matrix secreted polysaccharide. Biofilms are currently considered as virulence factors, which are a protected growth mode, allowing survival in hostile environments, facilitating the binding of bacteria to different surfaces, helping to maintain and protect bacteria on various factors, such as changes in environmental conditions, the possibility of being phagocytosed by macrophages of the host or by the effect of antimicrobial agents. Chronic infections of the upper airway can be directly related to the presence of microorganisms in the form of biofilms. Bacteria, protected from host defenses, in the form of biofilms, continue their metabolism and the production of local exotoxins, which would favor the chronicity of the inflammatory response evidenced by changes in the respiratory mucosa and persistent infections that do not respond to antibiotic treatments. (Rev Rinol.

2014;14(1):37-42)

Corresponding author: Mario E. Zernotti,
mario.zernotti@gmail.com

Key words: Biofilm. Chronic rhinosinusitis. Nasal polyp. Bacterial resistant. Respiratory infection.

¹Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba, Argentina; Servicio de Otorrinolaringología, Sanatorio Allende, Córdoba, Argentina; ²Departamento de Farmacia, IMBIV-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; ³Centro de Investigación en Medicina Respiratoria (CIMER), Universidad Católica de Córdoba, Argentina



Introducción

El estudio de los biofilms o biopelículas es un campo en continuo crecimiento e investigación desde que estas comunidades bacterianas sésiles fueran definidas por primera vez en 1978. El advenimiento de nuevas herramientas de diagnóstico y detección permite hoy comprender mejor los secretos de estas comunidades microbianas y su interacción con el organismo humano, en ocasiones de forma benéfica, pero muchas otras veces no.

El biofilm representa una comunidad de microorganismos derivados de células sésiles que crecen unidas irreversiblemente a una superficie sólida, viva o inerte, embebida en una matriz extracelular producida por ellas mismas (Fig. 1¹), exhibiendo un fenotipo alterado con respecto al índice de crecimiento y transcripción de genes². Los biofilms son la muestra más acabada de una estrategia vital de supervivencia en medios hostiles. Así, los biofilms son estructuras altamente organizadas donde las bacterias se autoprotegen formando una comunidad revestida de una matriz extracelular polisacárida que les permite la supervivencia, la multiplicación y persistencia de la especie. Los biofilms pueden ser considerados verdaderos ecosistemas capaces de soportar condiciones medioambientales hostiles, como la disminución de oxígeno y nutrientes. Actualmente se considera que el 99% de las bacterias viven agrupadas en estas comunidades microbianas, y no parecen estar restringidas a un grupo específico de microorganismos, pudiendo estar constituidas por una o más especies bacterianas. Los biofilms tienen una gran heterogeneidad estructural, diversidad genética y complejas

interacciones, todo esto dentro de la matriz extracelular³. Actualmente, el biofilm se considera un factor de virulencia, puesto que constituye un modo de crecimiento protegido que permite la supervivencia en un medio hostil, facilitando la unión de las bacterias a distintas superficies, ayudando al mantenimiento de las colonias y protegiéndolas de distintos factores, como los cambios en las condiciones ambientales, la posibilidad de ser fagocitadas por células del huésped, depredadas por otros protozoos o por el efecto de los agentes antimicrobianos⁴. Los biofilms están implicados en infecciones crónicas, lentas, resistentes a los tratamientos, asociadas a la adhesión a dispositivos médicos y tejidos naturales, como se ha descrito en la literatura⁵. En los últimos años, la investigación clínica ha demostrado que la mayoría de las bacterias viven en biofilms y son las responsables de la cronicidad de las infecciones bacterianas. Por ello hoy el vínculo entre las biopelículas y las enfermedades infecciosas e inflamatorias crónicas continúa siendo motivo de estudio e investigación.

La presencia de biofilms ha sido descrita y detectada en los últimos años en casi todas las estructuras de la vía respiratoria superior. Así, desde la presencia periodontal, pasando por la colonización de amígdalas palatinas, hasta la mucosa de oído medio y adenoides, los biofilms están presentes en personas sin enfermedad infecciosa activa^{6,7}. Por otra parte, también se ha comenzado a investigar su presencia en la enfermedad crónica de la vía respiratoria superior, siendo detectados en amigdalitis crónica, adenoiditis e hipertrofia de adenoides y últimamente en los casos más recalcitrantes de rinosinusitis crónica, sus exacerbaciones, y en poliposis nasal⁸⁻¹⁰. Finalmente, este gran

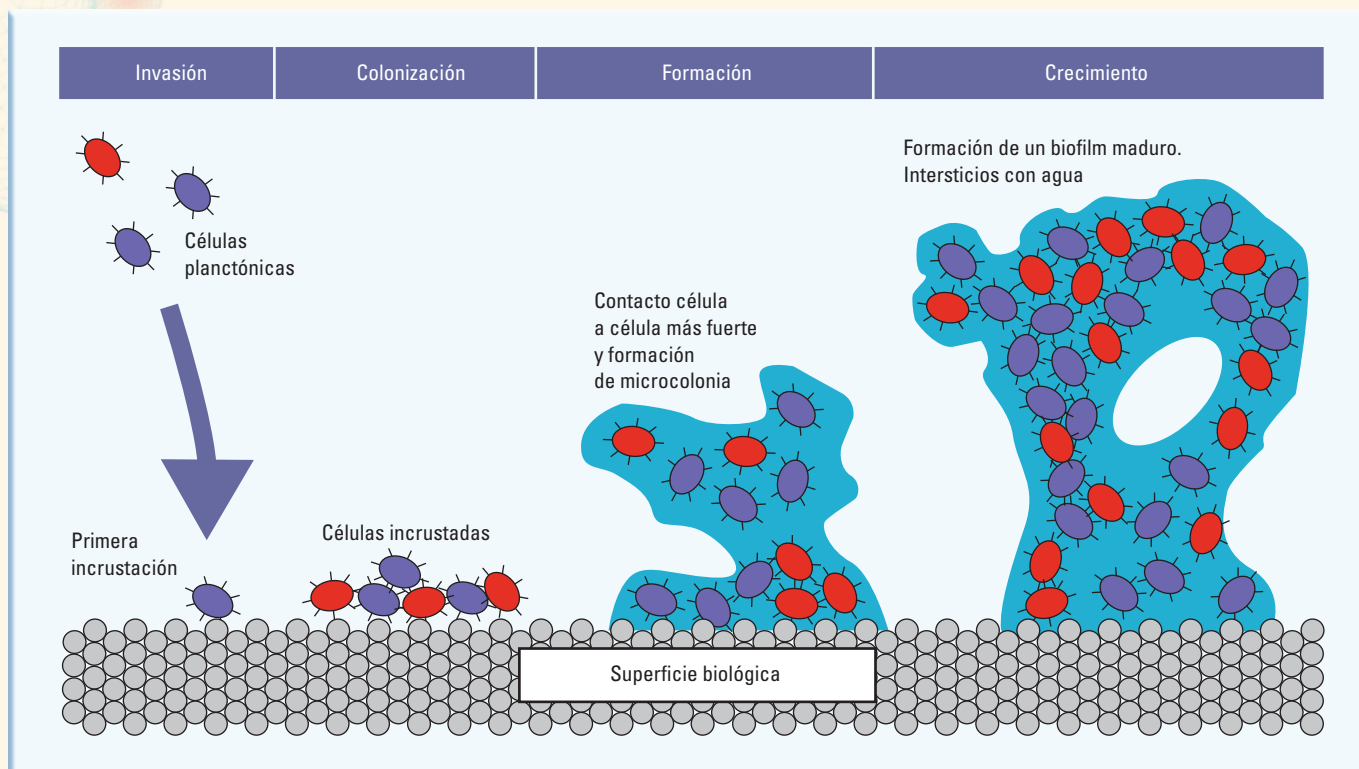


FIGURA 1. Se observan en el esquema las distintas fases desde que la bacteria en forma libre se adhiere a una superficie, posteriormente se incrusta y forma el biofilm, y finalmente la etapa donde se produce el crecimiento del biofilm para comenzar a liberar células planctónicas nuevamente (*adaptado de Kilty, et al.¹*).

capítulo que se abre sobre las enfermedades relacionadas con los biofilms nos pone en la necesidad de conocer y definir estrategias de diagnóstico y tratamiento¹¹.

Biofilms en vías respiratorias superiores

Como se ha mencionado, la presencia de biofilms en la mucosa y los órganos linfoides de la vía respiratoria superior ha sido demostrada en numerosos trabajos. Se especula que los problemas y defectos en las primeras barreras de defensa facilitarían la formación y adherencia de los biofilms¹². El daño epitelial provoca una disfunción en las defensas de barrera mucosa, lo que tiene como resultado una colonización con biofilms, que provoca

en el huésped la aparición de una respuesta inmune. Células como leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos inducen una respuesta celular, con alteraciones morfológicas, liberación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, o de enzimas lisosomales. Esto frecuentemente contribuye a la cronicidad de la infección por el daño causado en el tejido circundante, favoreciendo el crecimiento del biofilms. La secreción de toxinas superantigénicas desde el biofilm provoca efectos inmediatos inflamatorios sobre un numeroso grupo de células, que incluyen las células epiteliales, los linfocitos, los eosinófilos, los fibroblastos y los mastocitos. Esto ocasiona una evasión de los mecanismos inmunes del huésped, desviando la respuesta a un patrón Th2, con inflamación eosinofílica, degranulación de los mismos y

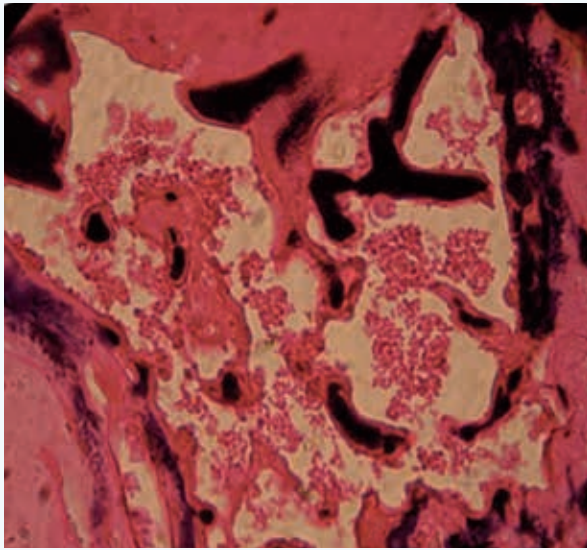


FIGURA 2. Se observa la presencia de biofilms en pliegues de pólipos nasales (adaptado de Zernotti, et al.⁹).

alteración del metabolismo de los eicosanoides¹³. Finalmente presentan actividad de proteasas, las cuales degradan las uniones celulares provocando también compromiso en las barreras de defensas del huésped¹⁴.

En rinosinusitis crónica la bibliografía actual habla de hallazgos de biofilms en el 30-100% de los pacientes^{15,16}. Esto se puede estudiar con metodología específica de detección de los biofilms¹⁷, entre la que destacan la hibridación *in situ* (*fluorescent in situ hybridization* [FISH])¹⁸ y la microscopía confocal de exploración láser (MCEL)¹⁹. La MCEL permite el estudio no destructivo del biofilm, haciendo un barrido del mismo en todo su espesor y posibilitando la obtención de planos a distintas profundidades con los cuales es posible reconstruir su estructura tridimensional^{9,20}.

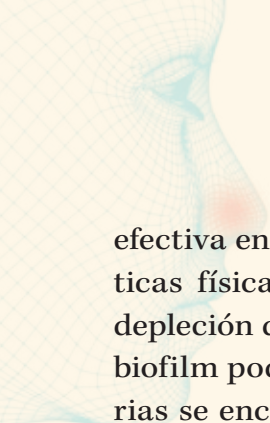
Numerosas especies bacterianas han sido detectadas formando biofilms en sinusitis

crónica, incluyendo: *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Moraxella catarrhalis*⁹. La presencia de biofilms de *S. aureus* y *P. aeruginosa* también es mencionada no solo en la persistencia y las reagudizaciones de la sinusitis crónica, sino también y especialmente en las recidivas y fallos en la cirugía endoscópica.

La presencia de biofilms de *S. aureus* se asocia con un mal pronóstico, ya que podría desencadenar una respuesta de inmunidad adaptativa tipo Th2. Bachert, et al.²¹ investigaron 70 pacientes y demostraron que el patrón en la inflamación en poliposis nasal corresponde al perfil de citocinas Th2 amplificadas o desencadenadas por la enterotoxina del *S. aureus*, aumentando la inflamación liderada por eosinófilos y predisponiendo a la formación de anticuerpos antiinmunoglobulina E (anti-IgE). Zernotti, et al. demostraron, sobre 12 pacientes con poliposis nasal recidivante, la presencia de un 41% de biofilms de *Staphylococcus*. Estos datos podrían aportar evidencias que explicarían el cuadro de inflamación crónica que existe tanto en la rinosinusitis crónica como en la poliposis nasal⁹ (Fig. 2).

Profilaxis y tratamiento

La primera consideración a tener en cuenta es la alta resistencia bacteriana para poder abordar el tema de la terapéutica. La resistencia a antibióticos en los biofilms se debe en principio a la estructura de los mismos, ya que impide el contacto del ATB con las bacterias de las capas más profundas de los mismos²² y no alcanzarían una concentración



efectiva en algunos sitios por las características físicas y/o químicas de la matriz. La depleción de nutrientes y oxígeno dentro del biofilm podría ser la causa de que las bacterias se encuentren en un estado de latencia presentando mayor resistencia a antibióticos, en comparación con las células planctónicas. También se ha descrito la existencia de microambientes que antagonizan la acción del antibiótico y mecanismos de degradación activa en algunas partes del biofilm. Este mecanismo, como la producción de β -lactamasas, requiere factores genéticos específicos de las propias bacterias²³. Debido a la naturaleza heterogénea del biofilm, es probable que existan múltiples mecanismos de resistencia microbiana en comparación con las células planctónicas.

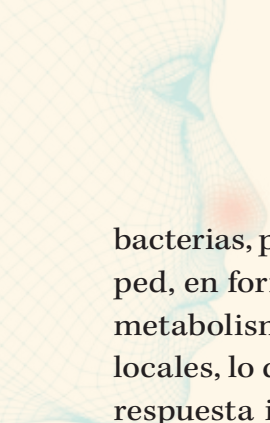
Las bacterias de vida libre (planctónicas) son más susceptibles a los mecanismos de defensa del huésped, siendo mayoritariamente responsables de las infecciones agudas o, en su defecto, del tratamiento antibacteriano por antibiótico. Sin embargo, la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de antibiótico para las bacterias en biofilms son de 10 a 1.000 veces más altas que para las bacterias planctónicas, y posiblemente de 150 a 3.000 veces más resistentes a los desinfectantes^{24,25}. A pesar de los importantes avances en el estudio de las biopelículas, poco sabemos de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en el biofilm. Actualmente se dividen en mecanismo intrínseco o innato y extrínseco o inducido²⁶. La frecuencia de mutación de las bacterias en el biofilm es significativa. Estas condiciones pueden explicar por qué las bacterias de los biofilms rápidamente se convierten en multirresistentes²⁷.

Las bacterias expresan un alto nivel de β -lactamasas en biofilms que podrían reducir la concentración de antibiótico β -lactámicos. La característica de estratificación en capas de los biofilms permitiría que solo las capas más superficiales puedan ser atacadas por altas concentraciones de antibióticos.

Finalmente, existe un gran campo de investigación con respecto al tratamiento de los biofilms. Se conoce que su remoción debe ser mecánica para su erradicación completa, pero también sabemos que existen muchos tejidos profundos donde los biofilms no pueden ser alcanzados por un barrido mecánico que los elimine. Así, todavía estamos en los inicios de estos tratamientos; no obstante, el tratamiento combinado de ultrasonido y microburbujas más la asociación con un antibiótico (vancomicina) ha demostrado que mientras el ultrasonido con las burbujas barre la superficie del biofilm, permite al antibiótico alcanzar concentraciones bactericidas medias que permiten una acción antibiótica eficaz²⁸.

Conclusiones

En la última década, se ha averiguado que el 99% de las bacterias existen en la naturaleza agrupadas como biofilms. Investigaciones recientes describen que al menos el 65% de todas las infecciones humanas son causadas por biofilms bacterianos. Además, existe un porcentaje cada vez mayor de pacientes con cuadros clínicos recurrentes de vía aérea superior con episodios de rinitis, otitis y otras manifestaciones clínicas como hipertrofia del tejido linfoide. Estos cuadros clínicos pueden tener relación directa con la presencia de bacterias en forma de biofilms. Las



bacterias, protegidas de las defensas del huésped, en forma de biofilms, continúan con su metabolismo y la producción de exotoxinas locales, lo que favorecería la cronicidad de la respuesta inflamatoria evidenciable por los cambios en la mucosa respiratoria. Los recientes avances en este campo de la medicina han aportado evidencias claves para entender la infección y colonización microbiana de los biofilms en la vía aérea superior y la resistencia que muchas veces presentan a los antibióticos de uso clínico.

Agradecimientos

María Gabriela Paraje es miembro de la carrera de Investigador Científico del Consejo Nacional de Ciencia y Técnica (CONICET).

Bibliografía

1. Kilty SJ, Desrosiers MY. Are biofilms the answer in the pathophysiology and treatment of chronic rhinosinusitis? *Immunol Allergy Clin North Am.* 2009;29(4):645-56.
2. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Passmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* 2003;112(10):1466-77.
3. Flemming HC, New TR, Wozmak DJ. The EPS matrix: the house of Biofilm cells. *J Bacteriol.* 2007;189:7945-7.
4. Stoodley P, Costerton J. Biofilm as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
5. Potera C. Forging a link between biofilm and disease. *Science.* 1999;283:1837-9.
6. Vlastarakos PV, Nikolopoulos TP, Maragoudakis P, Tzagaroulakis A, Ferekidis E. Biofilm in ear, nose and throat infections: how important are they? *Laryngoscope.* 2007;117:668-73.
7. Mladina R, Poje G, Vuković K, Ristić M, Musić S. Biofilm in nasal polyps. *Rhinology.* 2008;46(4):302-7.
8. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;12(3):185-90.
9. Zernotti ME, Angel Villegas N, Roques Revol M, et al. Bacterial biofilm evidence in nasal polyposis. *J Invest Allerg Clin Immunol.* 2010;20:380-5.
10. Sanclement JA, Webster P, Thomas J, et al. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2005; 115(4):578-82.
11. Angel Villegas N, Arce Miranda J, Becerra MC, et al. How different culture conditions affect cellular stresses in the biofilms. *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges.* Mendez-Vilas A, ed. World Scientific Publishing.
12. Chole RA, Faddis BT. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissue: a possible mechanism to explain chronicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(6):634-6.
13. Cheng W, Zheng C, Tian J, Shi G. T helper cell population and eosinophilia in nasal polyps. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2007;17(5):297-301.
14. Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem.* 2004;279(52):54881-6.
15. Chole RA, Faddis BT. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissue. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;124: 634-6.
16. Palmer JN. Bacterial Biofilms: Do they play a role in chronic sinusitis? *Otolaryngol Clin North Am.* 2005;38(6):1193-201.
17. Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A.* 2009;75(2):90-103.
18. Bendouah Z, Barbeau J, Hamad WA, Desrosiers M. Use of an in vitro assay for determination of biofilmforming capacity of bacteria in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol.* 2006;20:434-8.
19. Psaltis AJ, Ha KR, Beule AG, Tan LW, Wormald PJ. Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2007;117(7):1302-6.
20. Paraje MG. Confocal scanning laser microscopy for the study of biofilms in tissues of the upper airway in otolaryngologic diseases. En: Méndez-Vilas A, Díaz Álvarez J. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education.* Vol. 1. Badajoz: Formatex Research Center; 2010. p. 590-6.
21. Bachert C, Zhang N, Holtappels G, et al. Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(5):962-8, 968.e1-6.
22. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35:322-32.
23. Szomolay B, Klapper I, Dockery J, Stewart PS. Adaptive responses to antimicrobial agents in biofilms. *Environ Microbiol.* 2005;7:1186-91.
24. Ha KR, Psaltis AJ, Butcher AR, Wormald PJ, Tan LW. In vitro activity of mupirocin on clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and its potential implications in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2008;118(3):535-40.
25. Ceri H, Olson ME, Morck DW, et al. The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. *Methods Enzymol.* 2001;337:377-84.
26. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms. En: Romeo T, ed. *Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology* 322. Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg; 2008. p. 85-105.
27. Paraje MG. Antimicrobial resistance in biofilms. En: Méndez-Vilas A, ed. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* Volu 2. *Microbiology Book Series, number # 3.* Formatex Research Center; 2011. p. 736-44.
28. Dong Y, Chen S, Wang Z, Peng N, Yu J. Synergy of ultrasound microbubbles and vancomycin against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(4):816-26.