

Capítulo 1

Descripción de biofilms, desarrollo e importancia de su estudio.

Impacto de las técnicas de micro-nanofabricación en sistemas biológicos.

1.1. Introducción.

Uno de los mayores avances en microbiología que se ha realizado en los últimos 50 años ha sido, sin lugar a dudas, el conocimiento del crecimiento y el desarrollo de microorganismos sobre diferentes superficies formando biopelículas o biofilms.

Vale la pena recordar que las bacterias pueden existir en la naturaleza bajo dos formas o estados:

- a) bacterias planctónicas, de libre flotación y suspendidas en el fluido,

b) bacterias sésiles (formadoras de biofilm), creciendo en colonias de microorganismos adheridas a superficies sólidas.

Se ha reportado que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilms, y tan sólo 1% vive en estado planctónico (1-3). Este singular comportamiento tiene profundas consecuencias en el modo de analizar la supervivencia de las células procariotas tanto en ambientes naturales o industriales como en el organismo humano.

En un principio, el estudio de los biofilms estuvo ligado al ensuciamiento biológico o *biofouling* que causaba problemas en la industria (4) definiéndose a los biofilms o biopelículas como una comunidad de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido (5-6). Estudios posteriores, con técnicas más avanzadas permitieron a Donlan (7) en 2002 efectuar una descripción ampliamente aceptada de un biofilm, estableciendo que es “una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y que exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica”.

Resulta interesante que, a pesar de que los biofilms pueden estar formados por una o más especies de diferentes géneros, los mismos presentan similitudes en relación a las características estructurales y al comportamiento resultante. Por ejemplo, el tipo de estructuras observada para las microcolonias de biofilms maduros es, sorprendentemente, similar para comunidades de una o más especies que crecen en diferentes tipos de hábitats (8-10).

1.2. Importancia de su estudio.

La adhesión microbiana a superficies y posteriormente el desarrollo del biofilm han sido reportados en gran variedad ambientes. Las biopelículas constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo que permite a los microorganismos sobrevivir en ambiente hostiles, siendo su comportamiento y fisiología significativamente diferentes de aquellos microorganismos que crecen en medio líquido.

Actualmente, la combinación de técnicas de observación tridimensionales de alta resolución, colorantes moleculares específicos fluorescentes y los equipos necesarios para el cultivo de biofilms han demostrado que las biopelículas no son simplemente agregados pasivos de células que están adheridos a una superficie, sino que son sistemas biológicos

complejos desde el punto de vista estructural y dinámico. La importancia de estas estructuras microbianas complejas reside en la existencia de un nivel de diferenciación que requiere un sofisticado sistema de señales célula-célula y un grado de especialización celular. El proceso de desarrollo del biofilm es único en biología debido a que involucra la actividad coordinada de varios genomas de procariotas relativamente pequeños, en comparación con los grandes genomas eucarióticos, para generar una comunidad funcional multicelular. Esta noción modifica el conocimiento que se tenía de las bacterias debido a que las células individuales que se han estudiado en cultivos planctónicos en realidad son miembros de una comunidad multicelular cuya complejidad y sofisticación recién ha sido apreciada en las últimas décadas (11).

Se pueden encontrar biofilms en todos los medios en donde existan microorganismos: en el medio natural, clínico o industrial. Sólo se requiere la presencia de un medio hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, ya que pueden desarrollarse en gran variedad de superficies. La presencia de biopelículas en una gran diversidad de ambientes trae como consecuencia una importante y variada cantidad de problemas relacionados tanto con la medicina (infecciones), la industria en general (biocorrosión, pérdida de rendimiento), la industria alimentaria en particular (contaminación microbiana de alimentos), el biodeterioro de patrimonios culturales, entre otros. Cabe aclarar también que los biofilms están relacionados con algunos procesos beneficiosos (biolixiviación, biorremediación, etc.). De allí, el significativo interés de su estudio.

Por su importancia en la salud humana la relación biofilm/infecciones merece una descripción detallada. La mayor parte de las enfermedades infecciosas del siglo pasado eran causadas por bacterias dotadas de mecanismos patogénicos específicos: difteria, tuberculosis, cólera, coqueluche, etc. Los antibióticos y vacunas desarrollados para estos gérmenes lograron una notable eficacia en su control. En la actualidad, la frecuencia y gravedad de las infecciones de estas bacterias han sido desplazadas del primer plano por microorganismos ubicuos, capaces de producir infecciones de tipo crónico, que responden pobremente a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización. Diversas publicaciones recientes señalan que por lo menos el 65% de todos los procesos infecciosos bacterianos humanos podrían involucrar la formación de biofilms (1-3, 12).

En los últimos 10 años, debido a su prevalencia abrumadora, los biofilms han sido reconocidos progresivamente como factores importantes en la patogenia de muchas infecciones humanas persistentes, incluyendo placa dental, caries, infección periodontal,

neumonía por *Pseudomonas*, fibrosis quística, cistitis crónica, endocarditis bacteriana, osteomielitis, y prostatitis crónica. También se ha demostrado que los biofilms se desarrollan en una variedad de dispositivos médicos implantables, provocando infecciones asociadas, destacándose entre ellas la sepsis por catéteres endovenosos y arteriales. Además se han descrito en catéteres urinarios, sigmoidoscopios y lentes de contacto. Constituyen también un problema serio en válvulas cardíacas artificiales, marcapasos y prótesis ortopédicas las cuales, una vez infectadas, generan infecciones excepcionalmente difíciles de resolver mediante antibióticos (1, 7, 12-16).

Por otra parte, desde los años '70 se ha documentado la acumulación bacteriana en tubos endotraqueales en unidades de cuidado intensivo. La presencia de biofilms Gram-negativos en estos tubos ha sido relacionada con neumonía intrahospitalaria, presumiblemente por diseminación mecánica durante la aspiración (17).

Vale la pena recordar que la placa dental es también un biofilm. La naturaleza de la placa dental comenzó a adquirir gran importancia a partir de los mediados de los '60, poniéndose énfasis en los factores contribuyentes a la diversidad de ecosistemas, incluyendo pH, potencial de oxido-reducción y requerimientos nutricionales.

En otorrinolaringología, aunque existe escasa literatura respecto a la participación de los biofilms en enfermedades localizadas en esta área, gradualmente se está evidenciando que los biofilms poseerían un rol importante en derrame crónico en oído medio, amigdalitis crónica, sinusitis crónica, colesteatoma, e infecciones asociadas a dispositivos, tales como tubos de timpanostomía, prótesis vocales y tubos endotraqueales (18-21). Los tubos de timpanostomía son quizás los dispositivos de material foráneo más frecuentemente implantados en humanos. Se ha estudiado con microscopía, tanto electrónica como láser confocal, la influencia que tienen la superficie y las propiedades físicas del material en la formación de biofilm en estos dispositivos (22-25).

1.3. Estructura de los biofilms.

Claude Zobell fue el primero en notar la marcada preferencia de las bacterias marinas por el crecimiento sobre superficies (26) y el grupo de Costerton extendió esta observación a una gran variedad de ecosistemas microbianos incluyendo también superficies vivas como, por ejemplo, los tejidos de los organismos eucariotas (14). Este

concepto inicial sobre el crecimiento preferencial sobre superficies no insinuaba, en un principio, ningún tipo de estructura compleja del biofilm (4), y hasta el año 1987, se creía que los biofilms eran simples cúmulos de material polimérico dentro del cual se encontraban embebidas aleatoriamente las células microbianas sin ningún tipo de organización (5). Durante esta primera etapa de estudio del biofilm, una pregunta permanecía inconclusa: ¿De qué manera las bacterias dentro de la matriz polimérica tenían acceso a los nutrientes, entre ellos, el oxígeno? Esta pregunta fundamental fue respondida cuando se obtuvieron las primeras imágenes de biofilms *in vivo* con el microscopio confocal de barrido (SCLM), demostrando que las bacterias sésiles crecen dentro de microcolonias embebidas en una matriz polimérica que incluye canales abiertos. Este tipo de estructura abierta permite que el agua, presente en el ambiente en donde se desarrolla el biofilm, pueda penetrar a través de los canales y por lo tanto los nutrientes lleguen a zonas profundas de la microcolonia dentro de la comunidad del biofilm. El intercambio de nutrientes, facilitado por la arquitectura del biofilm, permite que estas comunidades desarrollen un espesor y una complejidad considerable mientras que las células individuales que las componen se mantienen en óptimas condiciones nutricionales, en muchas ubicaciones dentro del biofilm.

La formación del biofilm puede ocurrir por al menos tres mecanismos. Uno de ellos es la división binaria de las células adheridas (27). El segundo mecanismo es la redistribución de las células adheridas mediante la movilidad superficial (28). Es decir que a medida que las células se dividen, las células hijas se desplazan sobre la superficie para formar cúmulos celulares, de manera similar a lo que ocurre en la formación de colonias en las placas de agar. Un tercer mecanismo de agregación es la captación de células planctónicas a partir del fluido hacia el biofilm desarrollado (29). La contribución relativa de estos tres mecanismos depende de los organismos involucrados, la naturaleza de la superficie colonizada y las condiciones físicas y químicas del medio ambiente e impacta sobre la estructura del biofilm.

1.4. Desarrollo del biofilm: Etapas.

En la mayor parte de la literatura, se describe la formación de biofilms sobre superficies a través de una serie de etapas (5, 9, 14, 30-32). Tradicionalmente, se aceptaba que la formación de la biopelícula comienza con el transporte de los microorganismos

hacia una superficie pero, en la mayoría de los ecosistemas estudiados, el transporte de masa está precedido por la adsorción de una fina película orgánica sobre dicho sustrato (33). Esta película puede cambiar drásticamente las características fisicoquímicas del sustrato dependiendo del tipo de moléculas adsorbidas sobre la superficie (Etapa 1 en la Figura 1.1). La segunda etapa corresponde a la adhesión reversible de microorganismos (Etapa 2 en la Figura 1.1). La repulsión neta entre la superficie celular y el sustrato puede ser superada por interacciones moleculares específicas mediadas por apéndices extracelulares (por ejemplo, pilis, fimbrias y flagelos). Muchas de estas células son capaces de moverse independientemente (34) mediante los apéndices celulares llamados pilis con movimientos del tipo *twitching* o *gliding* (del inglés movimiento con contracciones o deslizamiento, respectivamente). Estas células todavía no se encuentran en proceso de diferenciación y pueden abandonar la superficie para volver al estado planctónico. Durante esta etapa reversible (35) (Etapa 2 en la Figura 1.1), las bacterias presentan ciertos comportamientos específicos como, por ejemplo, rodar, reptar, formación de agregados e hileras bacterianas (36) antes de comenzar a exudar material polimérico extracelular (EPS) y adherirse irreversiblemente (Etapa 3 en la Figura 1.1).

Las células adheridas que inician la formación del biofilm sobre una superficie están rodeadas por pequeñas cantidades de EPS. Este material polimérico está compuesto por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Los autores Davies y Geesey (37) han demostrado que en *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), los genes responsables de la producción de alginatos comienza a regularse después de los 15 min del primer contacto celular con la superficie. A medida que el biofilm madura, se desarrolla la estructura típica de las microcolonias con los espacios intercelulares o canales (Etapa 4 en la Figura 1.1) y muchas células alteran sus procesos fisiológicos (por ejemplo crecer anaeróbicamente en las zonas profundas del biofilm) en respuesta a las condiciones particulares del ambiente dentro del biofilm. Posteriormente algunas microcolonias pueden desprenderse de la superficie o pueden liberarse células individuales revirtiendo su estado a bacterias planctónicas que se desprenden de la matriz extracelular dejando espacios entre las microcolonias que pueden actuar como canales dentro de la estructura del biofilm (Etapa 5 en la Figura 1.1). Estos procesos no necesariamente se encuentran sincronizados a través de todo el biofilm sino que generalmente ocurren de manera tal que en cualquier momento, una región de las colonias está ocupada por biofilm en distintos estadios del desarrollo.

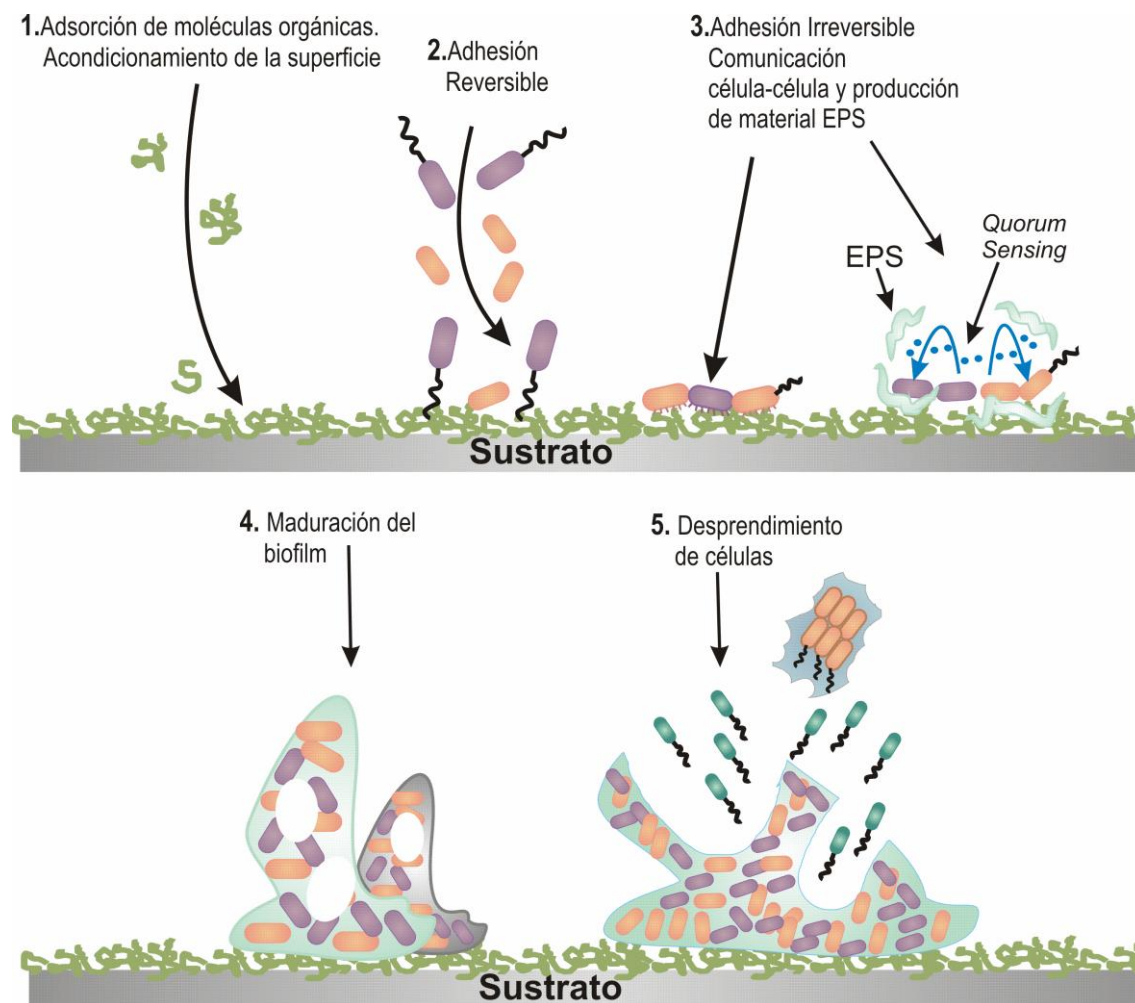


Figura 1.1. Esquema representando las etapas presentes durante el desarrollo de un biofilm sobre un sustrato

Las 5 fases en el desarrollo de una biopelícula (Figura 1.1) y los procesos involucrados en ellas se describen en detalle a continuación.

ETAPA 1. Acondicionamiento de la superficie.

Existen factores externos que afectan la adhesión de las bacterias desde un medio líquido sobre un sólido.

- Factores físicos: Los factores físicos más importantes son la tensión de corte, temperatura, rugosidad, topografía y carga superficial. Estos factores influyen en el transporte, los fenómenos interfaciales, el desprendimiento y las reacciones en la interfase (38).
- Factores químicos: Los factores químicos son numerosos, algunos de los más importantes son: la composición de la superficie del sustrato, la composición del medio en el que se desarrolla el biofilm, el pH, el oxígeno disuelto (38).

La materia orgánica presente en el agua se adsorbe sobre las superficies y forma lo que se conoce como “película acondicionante” (*conditioning film*), cambiando las propiedades químicas y físicas de la interfase sustrato/fluido y tornándola más amigable para la adhesión bacteriana.

ETAPA 2. Adhesión reversible.

La adhesión primaria (reversible) de bacterias a una superficie o a un sustrato puede ser de dos maneras:

- Activa: La motilidad, otorgada por flagelos, fimbrias y pilis tipo IV, ayudaría a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de la adhesión, siendo su función principal vencer las fuerzas de repulsión más que actuar como adherente. Sin embargo, la motilidad no parece ser un requisito esencial para el acercamiento al sustrato, puesto que bacterias Gram-positivas inmóviles, como estafilococos, estreptococos y micobacterias, también poseen la capacidad de formar biofilms. En el caso de las bacterias Gram-positivas se ha descrito, en esta primera etapa, la participación de proteínas de superficie. Una vez que llegan a la superficie pueden desplazarse sobre ella mediante movimientos individuales o grupales.
- Pasiva: Factores externos tales como la gravedad, difusión, precipitación de partículas y dinámica de fluidos pueden favorecer la adhesión de los microorganismos a cualquier superficie.

Las propiedades físicoquímicas de la superficie también pueden ejercer una fuerte influencia en el grado y extensión de la adhesión, que se analizará en particular en la Sección 1.4 del presente capítulo. En la adhesión bacteriana primaria pueden también influir, tal como se mencionó previamente, variaciones en la velocidad de flujo, temperatura del agua, y concentración de nutrientes. Así, por ejemplo, se ha encontrado que la variación en la concentración de diversos cationes (sodio, calcio, hierro) afecta la adhesión de *Pseudomonas spp* a superficies de vidrio (39).

Una vez que las bacterias se encuentran cerca de la interfase, interacciones de largo alcance entre las células y la superficie del sólido determinan si la célula será atraída o repelida desde la interfase (40-42).

Frecuentemente, se tiende a predecir o interpretar el mecanismo de adhesión microbiana mediante los conceptos desarrollados en la literatura de coloides (43-45). Al respecto debe tenerse en cuenta que generalmente, se considera que las fuerzas de largo

alcance gobiernan la velocidad de deposición de una partícula coloidal cargada sobre una superficie. Estas fuerzas incluyen las interacciones de van der Waals de largo alcance y las fuerzas electrostáticas de doble capa que constituyen la base de la teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verway y Overbeek (46)). Las fuerzas de van der Waals son generalmente atractivas y resultan de las interacciones entre dipolos inducidos entre moléculas de la partícula coloidal y moléculas de la superficie. Las fuerzas eléctricas de doble capa se generan a partir del solapamiento de las nubes electrónicas de los contraiones de las superficies cargadas y el cambio en la energía libre a medida que las superficies se alejan o se acercan. El resultado es una fuerza neta de atracción entre superficies cargadas opuestamente y una fuerza neta repulsiva entre superficies de cargas de igual signo.

Las expresiones basadas en la teoría DLVO para aproximar las interacciones y la energía potencial como función de la distancia de separación han sido desarrolladas y validadas para sistemas ideales en donde se asume que las superficies que interactúan son homogéneas, uniformemente cargadas y molecularmente planas. Evidentemente, estas aproximaciones claramente no se verifican para las bacterias reales, por lo que la naturaleza real de las fuerzas de largo alcance puede ser significativamente diferente. De hecho, debido a la estructura heterogénea macromolecular de las superficies celulares, existe un gran número de limitaciones al momento de aplicar la teoría DLVO en las predicciones cuantitativas de la adhesión microbiana. Entre ellas pueden mencionarse:

1. El concepto de distancia de separación requiere un límite definido entre la superficie y el medio; sin embargo, el punto de referencia para determinar la distancia de separación no es evidente en el caso de las bacterias. Por ejemplo, las cargas involucradas en cualquier interacción electrostática pueden estar difusamente dispersas en el glicocálix (material filamentoso que recubre a ciertos microorganismos) de la célula en vez de presentarse en una capa plana.
2. La longitud de la escala a partir de la cual las fuerzas ejercen su influencias (menor que 1 nm para las fuerzas electrostáticas en una solución fisiológica) es generalmente menor que el tamaño característico de las macromoléculas ubicadas en la interfase bacteria/sustrato.
3. Las interacciones estéricas o de enlace entre las macromoléculas de la interfase, particularmente las de los apéndices extracelulares (pilis, fimbrias y flagelos) pueden dominar sobre cualquier interacción tipo DLVO.

4. Las expresiones resultantes de la teoría DLVO que predicen las fuerzas *vs.* la distancia de separación asumen que las interacciones célula-sustrato se encuentran en un equilibrio termodinámico para cualquier distancia de separación. Sin embargo, a medida que la célula se acerca a la superficie, se requiere una significativa cantidad de tiempo para que las macromoléculas en la interfase se unan a la superficie del sustrato y se reorganicen durante dicho estado transitorio para obtener las configuraciones de menor energía (47-48).

Por todas las razones mencionadas anteriormente, no resulta sorprendente que la aplicación de la teoría DLVO a los estudios de adhesión microbiana haya dado resultados no coincidentes aún en el caso de la predicción de tendencias cualitativas. Por lo tanto, se necesitan teorías más detalladas y realistas que tengan en cuenta la estructura macromolecular de la superficie celular y las interacciones de enlace discretas o las repulsiones estéricas en la interfase así como otros factores biológicos. El avance hacia este tipo de teorías requiere técnicas sofisticadas de medidas de fuerzas entre las superficies, algunas de estas fuerzas podrían llegar a determinarse con un microscopio de fuerza atómica.

ETAPA 3. Adhesión irreversible.

El cambio desde la adhesión reversible a irreversible se produce por la transición desde una interacción débil de la célula con el sustrato hasta un enlace permanente, frecuentemente mediado por la presencia de polímeros y apéndices extracelulares. Investigaciones recientes han sugerido que la transición hasta la adhesión permanente a una superficie está acompañada por cambios fisiológicos profundos (49). En esta segunda fase de adhesión, predominan las reacciones moleculares entre las estructuras superficiales bacterianas y la superficie del sustrato. Estas reacciones implican una adhesión firme entre la bacteria y la superficie mediadas por estructuras poliméricas superficiales como, por ejemplo, cápsulas, fibrilas, fimbrias, pilis y EPS. La adhesión irreversible específica puede ser definida como la unión específica entre las adhesinas bacterianas (un componente específico molecular de la superficie bacteriana) y un receptor del sustrato (un componente específico de la superficie del material o tejido superficial) estando menos afectada por factores ambientales (pH, electrolitos y temperatura).

Debe tenerse en cuenta que la pared celular de una bacteria Gram-negativa como las *Pseudomonas* consta de tres regiones, una membrana exterior, una monocapa de

peptidoglicano y una membrana interior plasmática. Estas dos membranas pueden mostrar continuidad en varios puntos de adhesión y pueden también estar unidas por los cuerpos basales del flagelo.

Las cápsulas bacterianas son estructuras superficiales compuestas por polisacáridos y proteínas (50-51). En varios trabajos se ha sugerido que los polisacáridos y proteínas de la superficie celular pueden actuar como adhesinas bacterianas (50, 52).

El sello distintivo que diferencia a los biofilms de las bacterias simplemente adheridas a una superficie es que los biofilms contienen EPS que rodea a las bacterias residentes. El EPS microbiano consiste en polímeros biosintéticos que pueden variar su composición química y también polisacáridos sustituidos y no sustituidos, proteínas sustituidas y no sustituidas, ácidos nucleicos y fosfolípidos (53). La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *Salmonella typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *Vibrio cholerae* hasta poly-N-acetilglucosamina en *Staphylococcus aureus*. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula (5, 54-56).

El material extracelular exudado por las bacterias, es liberado por las células y luego se dispersa parcialmente en medio líquido (57). Las especies bacterianas que no producen EPS son menos adherentes y menos patogénicas (58-59). Se ha sugerido que la producción de EPS es importante durante la conexión intercelular durante la colonización superficial (60), protección contra fagocitosis e interferencia contra la respuesta inmune celular y la reducción de los efectos de los antibióticos.

Entre los componentes del EPS mejor caracterizados se encuentra el alginato, que está involucrado en la formación de biofilms por parte de *P. aeruginosa* en infecciones pulmonares y en sistemas de aguas industriales. La producción de alginatos está regulada en respuesta a una variedad de factores ambientales y puede activarse, por ejemplo, durante la limitación de nitrógeno, por perturbación de la membrana inducida por etanol, y en presencia de soluciones de alta osmolaridad (61-62). La producción de alginatos ocurre en la etapa inicial del desarrollo del biofilm de *P. aeruginosa*, y se supone que forma parte de la estructura necesaria para la maduración del mismo.

Las fimbrias (o pilis) son un grupo de apéndices rígidos, rectos y filamentosos sobre la superficie bacteriana. Estos pilis, pueden observarse generalmente mediante

microscopía electrónica de barrido. Sobre la superficie celular pueden encontrarse cientos de fimbrias (63-65). Se encuentran principalmente en las bacterias Gram-negativas y se cree que son estructuras adhesivas importantes sobre la superficie celular. Las fibrilas son apéndices celulares más amorfos que no presentan la estructura filamentosa regular de las fimbrias. Las estructuras fibrilares se han observado en la superficie de varios *Streptococos* y se ha reportado que contribuyen para una mejor adhesión en sustratos de hidroxiapatita. (66). Los pilis sexuales son apéndices proteináceos que se presentan en bacterias donoras y cuya presencia está determinada por la presencia de plásmidos conjugados. Los flagelos están compuestos por polipéptidos que forman parte del filamento (20 nm de diámetro) y un cuerpo basal complejo que interactúa tanto con la membrana interior como la exterior (67).

Uno de los mecanismos de transición de adhesión reversible a irreversible está mediado, en algunos microorganismos como las *Pseudomonas*, por los pilis tipo IV. El pili polar tipo IV puede extenderse y contraerse, impulsando al microorganismo a través de la superficie. La movilidad superficial tipo *twitching* es una forma de desplazamiento mediado por pilis utilizada por *P. aeruginosa*. Los autores O'Toole y Kolter (34) sugieren que este tipo de movilidad es uno de los factores responsables de la formación de microcolonias. Proponen, además, que las interacciones entre bacterias sobre la superficie, formando grupos ordenados de células, refuerzan el grado de adhesión a una superficie. En el caso del microorganismo *Staphylococcus epidermidis*, se ha demostrado que las células adherentes producen un polisacárido intercelular que une a las células entre sí y facilita la formación de microcolonias y la maduración del biofilm. Por lo tanto, durante estas primeras etapas de formación del biofilm es de suma importancia tanto la movilidad superficial como la organización de los microorganismos sobre la superficie del sustrato.

Los movimientos individuales y grupales de las bacterias se discutirán específicamente en las secciones siguientes del presente capítulo junto con las formas de comunicación célula-célula que intervienen tanto en los estadios iniciales de adhesión reversible como en la adhesión irreversible, durante el desarrollo de biofilm maduro y frente a cambios en el medio circundante.

ETAPA 4. Maduración del biofilm

La siguiente etapa del desarrollo del biofilm corresponde a la maduración que da como resultado una arquitectura compleja, con canales, poros y redistribución de bacterias

en el sustrato (37). La densidad global y la complejidad del biofilm aumenta a medida que los organismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares de las bacterias interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio ambiente circundante.

El potencial crecimiento de cualquier biofilm está limitado por la disponibilidad de nutrientes en el ambiente inmediato, la penetración de estos nutrientes dentro del biofilm y la eliminación de residuos. Otros factores que pueden controlar la maduración del biofilm son el pH interno, la penetración de oxígeno y fuentes de carbono y la osmolaridad.

ETAPA 5. Desprendimiento de bacterias

El término desprendimiento es un término que se utiliza para describir la liberación de células (ya sea individualmente o en grupos) de un biofilm o sustrato. El desprendimiento activo es un evento fisiológicamente regulado, pero sólo pocos estudios (68) han demostrado la base biológica para este proceso. Allison y colaboradores (69) han reportado que luego de una extensa incubación, los biofilms de *P. fluorescens* pueden desprenderse y al mismo tiempo reducir la producción de EPS. Se ha sugerido que la necesidad de nutrientes o la presencia de sustancias agresivas puede conducir al desprendimiento de células en busca de ambientes nutritivamente ricos o menos nocivos mediante un mecanismo aún desconocido (9). Las células del biofilm dispersadas pueden revertir su estado al crecimiento planctónico, por lo que, el desarrollo de vida del biofilm se transforma en un ciclo completo (10).

Otro punto a tener en cuenta es que una microcolonia en división continua libera residuos y nutrientes que podrán utilizarse para acondicionar las superficies desnudas y para alimentar a otras células. Si las condiciones de flujo hídrico lo permiten, se establece el equilibrio entre el crecimiento de la colonia y el flujo laminar del agua que favorece la liberación de pocas células, pero con un flujo intenso o turbulento se pueden desprender muchas más.

Los tres principales mecanismos para generar el desprendimiento serían: (a) erosión: remoción continua de pequeñas partes del biofilm; (b) separación: remoción rápida y masiva; y (c) abrasión: liberación por colisión de partículas suspendidas en el líquido circundante con el biofilm. La separación es menos frecuente que la erosión, y se piensa que derivaría de la disminución de nutrientes u oxígeno en el interior del biofilm. Se

observa preferentemente en biofilms voluminosos, que se han desarrollado en medioambientes ricos en nutrientes.

La separación y erosión proporcionarían los mecanismos para que las bacterias migren desde zonas densamente colonizadas a áreas desnudas que podrían favorecer mejor su desarrollo, logrando así formar nuevos biofilms en sitios distantes. Un ejemplo de este tipo de desprendimiento es la sepsis recurrente en un paciente con un catéter infectado.

La forma en que se produce la dispersión afectaría, aparentemente, las características fenotípicas de los microorganismos. Los conglomerados desprendidos desde el biofilm conservarían, probablemente, ciertas características de éste, tales como la resistencia antimicrobiana. En cambio, las células bacterianas liberadas aisladamente parecen volver rápidamente a su fenotipo planctónico, tornándose nuevamente susceptibles a las defensas del huésped y a los antimicrobianos.

1.5. Influencia de las características fisicoquímicas del sustrato en la adhesión microbiana.

Por su impacto en las etapas iniciales de crecimiento del biofilm es importante analizar en detalle la influencia de las características superficiales del sustrato sobre las mismas. Al momento de analizarlas surgen inevitablemente las siguientes preguntas: ¿Es posible que la película orgánica inicial actúe como amortiguador de las propiedades del material y enmascare sus características, produciéndose una adhesión muy similar independiente del sustrato?. ¿Es posible que el sustrato transmita sus características fisicoquímicas a la película modificando el proceso de adhesión?.

Existen estudios que apoyan estas preguntas en ambos sentidos. En los párrafos siguientes se analizarán características físicoquímicas tales como energía superficial, rugosidad y carga superficial y su relación con la adsorción de compuestos orgánicos sobre el sustrato y la adherencia bacteriana.

a. Energía superficial. Hidrofobicidad

Existen superficies con alta energía superficial como el acero inoxidable o el oro y otras, como las resinas, con baja energía superficial. Una alta energía superficial del sustrato favorecería condiciones de hidrofilia y una baja energía superficial, la hidrofobia. Si la energía superficial de la bacteria es superior

que la del medio, la adhesión se ve favorecida por la hidrofilia. Por el contrario, en condiciones de hidrofobia, la energía superficial de la bacteria debe ser menor que la del medio circundante para favorecer la adhesión. De forma general, las bacterias con mayor energía superficial tendrán mayor afinidad por sustratos con mayor energía superficial y viceversa. Sin embargo, cuando el sustrato es revestido por el film proteico, éste tiene la cualidad de bajar la energía superficial de aquellos sustratos con alta energía superficial y subir la de los sustratos con baja energía superficial. Es decir, tiene un efecto amortiguador que puede enmascarar los efectos del material.

Otros estudios confirman que sólo pequeñas diferencias en la películas, pero importantes, dependen de la cepa bacteriana. Por ejemplo, una rica capa de mucinas, favorece la adhesión de *Streptococcus mutants* y baja la adhesión de *Streptococcus sanguis* (70). Estas observaciones confirmarían que algunas propiedades físicoquímicas del sustrato pueden ser transferidas a la película condicionante alterando la composición, la densidad y la configuración de la película adquirida en cuanto al tipo de proteínas, y en consecuencia, tener una influencia en las etapas iniciales de adhesión.

b. Rugosidad

En general, una gran diversidad de trabajos reportan que aquellas superficies más rugosas tienen la capacidad de retener mayor cantidad de microorganismos. Por ejemplo, la microtopografía de sustratos de acero inoxidable examinada por técnicas como microscopía electrónica de barrido (SEM) (71) y microscopía de fuerza atómica (AFM) (72) ha revelado que la existencia de grietas superficiales podría proveer mayor área para la adhesión celular y, posiblemente, protección frente a la limpieza y la fuerza de corte del fluido. Los autores Verran y Whitehead (73) han determinado que las superficies con rayas y grietas de tamaño similar al tamaño de las bacterias adheridas retienen mayor cantidad de células que las superficies con características topográficas de dimensiones algo mayores. Varios grupos han observado una adhesión bacteriana superior en superficies rugosas y por lo tanto concluyeron que la rugosidad superficial es un factor importante durante la adhesión bacteriana (74-75). Por el contrario, los autores Mafu y

colaboradores (76), Vanhaecke (77) y Flint (78) han propuesto que no existe una correlación entre la rugosidad del sustrato y la adhesión microbiana sobre superficies inertes. Por lo tanto, no se ha encontrado aún, si existe, una clara correlación entre la rugosidad, topografía y la adhesión microbiana.

c. *Carga superficial.*

Las células bacterianas tienen, en general, una carga negativa neta en su pared celular a pH 7 (79). Sin embargo, la magnitud de esta carga varía entre especies y está influenciada generalmente por las condiciones de cultivo (80-81), la etapa del cultivo (82), la fuerza iónica (83) y el pH (84). La carga de la superficie celular se determina generalmente mediante la evaluación del potencial zeta, calculado a partir de la movilidad de la célula bacteriana en presencia de un campo eléctrico bajo concentraciones definidas de sales y pH. La mayoría de las bacterias tienen potenciales zeta negativos a un pH fisiológico (80, 85-86). Se han reportado explicaciones disímiles con respecto a la relación entre la carga superficial del microorganismo y la adherencia a un sustrato. Una justificación para este hecho podría ser que la carga superficial bacteriana viene dada por la disociación de los grupos ácidos como los carboxilos, fosfatos, y grupos aminos como también de los grupos básicos que se encuentran en la membrana celular. En consecuencia, el potencial zeta de la bacteria depende de la fuerza iónica del medio. A mayor fuerza iónica, la disponibilidad de iones para proteger y luego neutralizar la carga superficial es mayor. La carga superficial de los sustratos inertes sobre los que las bacterias se adhieren probablemente tenga también un rol en la adhesión microbiana.

Narenan y colaboradores (87) han reportado que la adhesión bacteriana no puede ser explicada sólo por la influencia de la carga superficial celular y sugieren que la adherencia de microorganismos es un mecanismo complejo con muchos factores involucrados.

La interacción entre una superficie y una célula bacteriana parece estar mediada por un arreglo complejo de interacciones físicas y químicas, y cada una de ellas se encuentra afectada por las características físicas y químicas del ambiente al cual están expuestos tanto el sustrato como la bacteria. Los múltiples factores involucrados en la

adhesión celular reversible e irreversible dificultan la caracterización del rol y la importancia que tiene cada factor en el proceso de adhesión.

1.6. Comunicación célula-célula durante la formación del biofilm.

La comunicación célula-célula ejerce también un marcado impacto sobre las distintas etapas del desarrollo del biofilm. Las bacterias utilizan una amplia variedad de mecanismos para comunicarse entre ellas y en los casos de infecciones, con sus huéspedes eucariotas. En algunos casos, las interacciones sociales permiten la sincronización del comportamiento de todos los miembros del grupo y por lo tanto actuar como organismos multicelulares. Por el contrario, algunas organizaciones sociales promueven la individualidad entre algunos de los miembros del grupo y por lo tanto la diversidad de los mismos. Existen varios tipos de mecanismos de comunicación: canales de señales químicas de largo y corto alcance; comunicación en un sentido, en ambos sentidos y en múltiples sentidos y señalización mediada por el contacto, que se describirán a continuación.

a. *Quorum sensing (QS)*

Los resultados observados por los autores Tomasz (88) y Hastings y colaboradores (89) sugieren que ciertas bacterias utilizan la producción, liberación, intercambio y detección de moléculas señalizadoras para medir la densidad poblacional y controlar su comportamiento en respuesta a las variaciones en el número de células. Durante aproximadamente 20 años se consideró que el fenómeno de señalización química entre células estaba limitado a un cierto grupo de especies. Actualmente, se sabe que la comunicación intercelular no es excepcional sino que es una norma en el ecosistema bacteriano y este proceso conocido como *quorum sensing (QS)* es fundamental en la formación de biofilms (90).

El desarrollo de interacciones célula-célula se facilita por la estrecha proximidad existente entre las bacterias del biofilm. Esta interrelación, vía pequeñas moléculas mensajeras beneficia a la bacteria al permitirle percibir la presencia de microorganismos vecinos, determinar la densidad de la población existente y responder a eventuales condiciones cambiantes. El proceso *QS* funciona debido a que cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señal, de manera tal que mientras más bacterias se

unen, se incrementa la concentración local de esta señal. Una vez logrado esto, se inducen diferentes fenómenos en la bacteria, para finalmente activar la diferenciación en el biofilm.

Los procesos que controla el mecanismo de *QS* son en general improductivos a nivel de las bacterias individuales pero efectivos cuando se llevan a cabo por el grupo celular. Su objetivo es coordinar determinados comportamientos o acciones entre microorganismos del mismo género, de acuerdo a su número. A menos que esté presente un número adecuado de células bacterianas en la vecindad, los costos de la producción de un biofilm para una bacteria individual superan los beneficios (7, 13, 91).

Las principales moléculas señalizadoras o auto-inductoras que son empleadas para comunicarse con las demás bacterias son las acil-homoserina-lactonas, que predominan en bacterias Gram-negativas, mientras que oligopéptidos modificados prevalecen en gérmenes Gram-positivos. Las bacterias también poseen un receptor que puede detectar específicamente el auto-inductor respectivo. Cuando éste se une al receptor, activa la transcripción de determinados genes, incluyendo aquellos para la síntesis del inductor (92).

Los primeros microorganismos en quienes se observó *QS* fueron especies de *Myxobacterias* y *Streptomyces*. Sin embargo, el ejemplo más conocido es la regulación de la producción de luz en el *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*), una bacteria bioluminiscente que vive como un simbiote en el órgano generador de luz del calamar hawaiano. Cuando el *V. fischeri* se encuentra en estado planctónico, el auto-inductor está en baja concentración y, de este modo, carece de luminiscencia. En cambio, en el órgano luminoso del calamar están muy concentrados (niveles mayores que 10^{11} células/ml), induciéndose la transcripción enzimática y generándose bioluminiscencia.

El estudio de esta relación simbiótica comenzó a revelar algunos de los misterios de señales célula-célula. En el *V. fischeri* se identificaron dos sistemas *QS*: *luxI* y *luxR*. Estos sistemas de señalización se han encontrado en casi todas las bacterias Gram-negativas, mientras que moléculas mensajeras célula-célula han sido detectados en más de 30 especies de bacterias Gram-positivas.

Los sistemas *lux* se han estudiado extensamente en *Pseudomonas spp* y *Escherichia coli* (*E. coli*), y se les considera necesarios para la maduración del biofilm y activación de numerosos genes de factores de virulencia. Davies (37) demostró que en la formación de biofilm en *P. aeruginosa* están implicados dos sistemas diferentes de señalización célula-célula: *lasR-lasI* y *rhlR-rhII* (reguladores globales de la expresión

genética en *P. aeruginosa*). Una vez conseguida una densidad suficiente de población, estas señales alcanzan las concentraciones requeridas para activar los genes implicados en la diferenciación del biofilm. Los mutantes incapaces de elaborar ambas señales producen biofilms notoriamente más delgados y sin su arquitectura típica. Además, pueden ser removidos mucho más fácilmente de superficies mediante uso de surfactantes. La adición de lactona homoserina al medio que contiene los biofilms mutantes da origen a biofilms similares a los de bacterias no mutantes confirmando la participación de este tipo de moléculas en el desarrollo y estructuración del biofilm.

b. Comunicación de corto alcance

En el extremo opuesto del *QS* se encuentran las señales de corto alcance que requieren el contacto directo entre las células individuales para el intercambio de información. Un ejemplo de este tipo de comunicación es la formación de una estructura multicelular por parte de *Myxococcus xanthus*. Este tipo de comunicación promueve un movimiento cooperativo celular de deslizamiento sobre la superficie (*gliding*) que finalmente culmina en un cúmulo de células en el cual se lleva a cabo el proceso de formación de esporas. Durante este tipo de comunicación es esencial el contacto y la alineación entre bacterias (93-94).

Uno de los primeros mecanismos de comunicación contacto-dependiente celular conocidos es la conjugación mediada por los pilis sexuales. Las células bacterianas también pueden producir una serie de pilis diferentes y moléculas adhesivas encargadas principalmente de las interacciones bacteria-huésped. Sin embargo, es posible que algunos de estos apéndices celulares también estén involucrados en la comunicación interbacteriana. Por ejemplo, investigaciones recientes han demostrado que algunas bacterias presentes en suelos y metalo-reductoras pueden expresar redes complejas de pilis eléctricamente conductivos conocidos como *nanowires* (64-65). Se ha propuesto que los *nanowires* podrían actuar en la transferencia de electrones desde el medio ambiente hacia y entre bacterias dentro de una población celular definida. También se ha sugerido que ese sistema podría ser capaz de transmitir señales entre bacterias como un posible mecanismo para coordinar el comportamiento bacteriano grupal. Los *nanowires*, como cualquier otro pili, podrían también facilitar la formación de biofilms, independientemente de la transferencia electrónica (95). Datos recientes sugieren que la expresión de estos apéndices celulares se encuentra extensamente difundida entre grupos bacterianos metabólica y

taxonómicamente diferentes (64-65). Esto plantea la posibilidad de que estas estructuras puedan impactar en muchos procesos bacterianos, incluyendo la patogenicidad.

1.7. Movimientos individuales y cooperativos de bacterias.

En la naturaleza, las bacterias deben enfrentarse generalmente a condiciones ambientales desfavorables. Para ello han desarrollado sofisticados mecanismos de cooperación. Henrichsen ha estudiado la movilidad superficial en más de 40 especies bacterianas perteneciendo a 18 géneros diferentes y consiguió identificar varios tipos de movimiento: *swimming*, *swarming*, *gliding*, *twitching*, *sliding* (96). Los modos *swimming* y *swarming* dependen de la presencia de flagelos; *twitching* es individual y requiere la presencia de pilis tipo IV y el movimiento tipo *gliding* es cooperativo y se produce a lo largo del eje mayor del microorganismo sin ayuda de flagelos ni de pilis. Este tipo de movimiento parece haber evolucionado independientemente en varias líneas celulares pero en general involucra el movimiento del cuerpo celular a través de complejos de adhesión focal que se unen a la superficie. La movilidad tipo *sliding* es una forma pasiva de desplazamiento sobre la superficie que no requiere un motor activo sin embargo se requiere la presencia de surfactantes que reduzcan la tensión superficial y permita la propagación de la colonia desde el origen mediante la presión ejercida por la duplicación celular. *Sliding* puede confundirse con *swarming* y puede ocurrir cuando se pierde el flagelo en bacterias que normalmente se desplazan mediante el movimiento tipo *swarming*.

Las bacterias que nadan en medio líquido (*swimming*) lo hacen en forma individual, pero durante el *swarming* los microorganismos se desplazan en grupos de células conectadas entre sí lateralmente conocidos como *rafts* (97). La formación de este tipo de *raft* es un proceso dinámico. Esto indica que ninguna sustancia o matriz mantiene la estabilidad del agregado microbiano sino que las bacterias sólo se mantendrían unidas mediante la utilización de los flagelos bacterianos.

Swarming es una manera eficiente de colonización rápida de superficies debido a la naturaleza cooperativa del movimiento (98). Los fenotipos asociados a este proceso incluyen la elongación de células, la producción de dos o más flagelos por célula y la formación de patrones de colonias. Además muchas de estas bacterias excretan surfactantes que permiten el desplazamiento sobre las superficies. Este tipo de movilidad requiere el contacto con una superficie sólida. Aún existen muchas preguntas asociadas a

este tipo de desplazamiento y cabe destacar además que todos los desplazamientos microbianos sobre superficies han sido estudiados principalmente sobre superficies de agar. El estudio del desplazamiento tipo *swarming* es muy importante ya que el mismo está asociado a la formación de biofilms sobre superficies y a ciertos mecanismos de resistencia bacteriana frente a antibióticos como así también para profundizar en el conocimiento de la fisiología del comportamiento multicelular de los microorganismos. Este tipo de comportamiento se describirá con mayor detalle en el Capítulo 8.

1.8. Intercambio génico.

Las bacterias de los biofilms poseen una expresión génica diferente respecto a sus contrapartes planctónicas, que da lugar a bacterias fenotípicamente distintas respecto a aquéllas. En los últimos años diversos grupos de investigadores han orientado sus esfuerzos intentando identificar, tanto los genes responsables de la transición biofilm/planctónica, al igual que aquellos que están expresados únicamente en biofilms y que son indispensables para mantener su particular estructura. Se ha encontrado que hasta el 30% de los genes puede expresarse de manera diferente entre la misma bacteria desarrollada en condiciones planctónicas o en un biofilm (1-3, 16).

Los biofilms hospedan un medioambiente muy dinámico, donde se intercambia material genético tal como plásmidos (ácido desoxirribonucleico extracromosómico), enzimas y otras moléculas. Estudios recientes postulan que la matriz de biofilms de *P. aeruginosa* contiene ácido desoxirribonucleico como constituyente principal (99-101). Estos estudios, combinados con otros que muestran una tasa de transferencia génica mediada por plásmidos, enormemente incrementada entre las bacterias de los biofilms (102), sugieren que la redistribución de genes entre éstas es un proceso continuo con importantes consecuencias en su adaptación evolutiva.

Se ha planteado que cepas bacterianas de importancia clínica unidas a plásmidos desarrollan biofilms más fácilmente (103-104). Se ha observado, además, que cepas portadoras de plásmidos transfieren éstos a organismos receptores, generando la formación del biofilm. Sin plásmidos asociados, estos mismos gérmenes producen únicamente microcolonias de escaso desarrollo. Debido a que los plásmidos pueden codificar resistencia a múltiples antimicrobianos, su asociación al biofilm proporciona también un mecanismo para selección e incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos.

1.9. Resistencia de los biofilms.

Para desarrollar estrategias capaces de erradicar los biofilms es necesario analizar previamente los mecanismos de resistencia que los caracteriza. Se ha podido demostrar que las células de las biopelículas pueden resultar entre 10 y 1000 veces más resistentes que las células planctónicas correspondientes a un gran número de antibióticos de amplio espectro (ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas, gentamicina, etc.) y de biocidas oxidantes del tipo del cloro, el yodo o el ozono (105-111). Se han descrito dos tipos de resistencia bacteriana, la correspondiente a las bacterias planctónicas que son resistentes a los medicamentos y que está asociada a alguna mutación de genes y la de las bacterias que crecen dentro de biopelículas presentando una mayor barrera frente a biocidas, desinfectantes o agentes antimicrobianos que las células que viven en forma planctónica (112-113).

En el caso de las bacterias planctónicas o pequeños grupos de cepas, la resistencia se entiende como la habilidad de los microorganismos para crecer en presencia de una elevada concentración de biocida ó al incremento de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de dicho agente antimicrobiano, necesaria para detener el crecimiento celular. Los biofilms en cambio, presentan diversos mecanismos de resistencia que se describen a continuación.

- *Penetración restringida y degradación de antibióticos.*

La penetración de los agentes antimicrobianos en el biofilm está restringida por la presencia de exopolisacáridos de la matriz que limitan la difusión de sustancias y por la unión del antimicrobiano a las bacterias externas proporcionando una efectiva resistencia a las células del interior de la biopelícula.

- *Baja tasa de crecimiento.*

Generalmente todos los antibióticos son más efectivos en el ataque rápido de las células en crecimiento, condición que es absolutamente requerida para que algunos antibióticos puedan atacar. Por ese motivo, la disminución de la tasa de crecimiento dentro de ciertos sectores del biofilm es una estrategia efectiva para la supervivencia de dichas células. Otro mecanismo que contribuye indirectamente a la disminución del crecimiento es el gradiente de concentración de oxígeno y pH que se establece dentro del biofilm. Así por ejemplo el oxígeno es conocido por modular la acción de los aminoglucósidos y los gradientes de pH pueden impactar negativamente sobre la eficiencia de ciertos antibióticos.

- *Cambios fenotípicos.*

Las bacterias expresan genes en respuesta a fluctuaciones ambientales como cambios de temperatura, oxidación, baja disponibilidad de oxígeno, daños de ADN, los cuales se transfieren entre ellas logrando un mecanismo de supervivencia específico y la resistencia al ataque de numerosos agentes. Entre ellos pueden mencionarse la galactocidasa, la cual es expresada en respuesta al Imipenen (114) y la Piperamicina, así como las bombas de difusión de multiresistencia a los medicamentos como la expresada por *E. coli* en respuesta al cloramfenicol (115).

- *Persistencia bacteriana.*

La persistencia, último factor considerado recientemente, se relaciona con la capacidad de un cierto número de células del biofilm de resistir al ambiente agresivo. Las bacterias de las biopelículas no solo evaden el ataque de los antibióticos, también resisten a los desinfectantes químicos.

Estos factores son usados tanto solos o en combinación para explicar la supervivencia de las bacterias dentro de estas comunidades.

1.10. Nuevas estrategias para erradicación de biofilms.

A través del conocimiento de las características y etapas de desarrollo de los biofilms se posibilita la búsqueda de enfoques novedosos para el tratamiento y prevención tanto en el ámbito médico como el industrial. Así por ejemplo, una posible alternativa química para disminuir la fijación de *Pseudomonas sp* a superficies incluye el uso de agentes quelantes, que limitan el hierro soluble, el cual es necesario para la adhesión de los pili (91). El xilitol, un alcohol natural del azúcar administrado bajo la forma de jarabe o goma de mascar, ha mostrado una efectividad clínica significativa en prevenir caries y disminuir la incidencia de otitis media en niños, posiblemente vía reducción de mecanismos de adhesión bacteriana.

Debido a que la persistencia que presenta el biofilm depende de la agregación de bacterias en comunidades multicelulares, una alternativa puede ser desarrollar estrategias para impedir la formación de su estructura compleja. Si la multicelularidad del biofilm es inhibida, es posible que las defensas del huésped sean capaces de resolver la infección logrando, de esta manera, restituir la eficacia de los antibióticos.

Otras terapias potenciales incluyen enzimas que disuelvan los polímeros de la matriz, reacciones químicas que bloqueen la síntesis de la matriz del biofilm y el empleo de análogos de proteínas y péptidos señalizadores que interfieran con la comunicación célula-célula, indispensables para la formación de un biofilm (105).

Se ha demostrado que los antibióticos macrólidos parecen inhibir la síntesis de polisacáridos y, de esta manera, reducirían la protección de la matriz del biofilm. Estos antimicrobianos podrían tener un efecto inmunomodulador logrando impedir señales bacterianas. El tratamiento de biofilms con claritromicina reduce la matriz que cubre el biofilm, tanto de *P. aeruginosa* como de *S. epidermidis*, aunque las bacterias mismas sean resistentes al antibiótico.

Finalmente, otras dos estrategias promisorias son cambios en el medioambiente a través de la inhibición competitiva por otras bacterias (116-117) (por ejemplo, microorganismos competidores como *Streptococcus gordonii* dificulta la formación de biofilm de *Streptococcus mutans* reduciendo su acción como agente productor de caries) o el incremento de la presión de oxígeno (118) (en pacientes con tubos de timpanostomía).

Se ha identificado una molécula denominada “furanona”, producida por el alga *Delisea pulchra*, con una estructura similar a las acil-homoserinalactonas. Estas moléculas bloquean el sistema *quorum sensing* y la consiguiente formación de biofilm. En la actualidad se intenta desarrollar inhibidores de la formación de biofilm basados en derivados de la furanona, ya que esta molécula es extremadamente tóxica (119).

La llamada biomedicina, así como otras nuevas disciplinas, como la biotecnología, la genómica o la proteómica, persiguen también la creación de nuevos materiales que puedan dar lugar al desarrollo, por ejemplo, de tejidos y órganos artificiales biocompatibles, células madre, contenedores de tamaño molecular e inteligentes para la dosificación controlada de fármacos, proteínas bioactivas y genes, chips de ADN, dispositivos de bombeo, válvulas altamente miniaturizadas, los polímeros, altamente biodegradables y medioambientalmente limpios, a partir de microorganismos para evitar la utilización de derivados del petróleo como materia prima, y un sinnúmero de posibilidades.

Por último, un campo muy promisorio para desarrollar materiales y planificar estrategias para la erradicación de biofilms es la micro y la nanotecnología.

1.11. Impacto de micro/nanofabricación en sistemas biológicos.

La micro/nanotecnología, es uno de los campos que promete cambios espectaculares en la fabricación de nuevos materiales. La nanotecnología y la microtecnología consisten en fabricar (nanofabricar o microfabricar, según la escala) y controlar estructuras y máquinas a nivel molecular.

La utilidad de la micro/nanotecnología en las ciencias biomédicas reside en la posibilidad de crear materiales y diseñar dispositivos capaces de interactuar con el cuerpo a escalas celular y sub-celular con un alto grado de especificidad. La nanotecnología ofrece muchas oportunidades revolucionarias en la lucha contra todo tipo de cáncer, trastornos cardíacos, enfermedades neurodegenerativas, infecciones y otras enfermedades. Otras aplicaciones que contemplan el desarrollo de pequeños laboratorios en forma de circuito integrado, en los cuales se realiza una secuencia de reacciones químicas y de pruebas analíticas, permitirían realizar análisis *in situ*, obtener los resultados inmediatamente y facilitar el diagnóstico y la terapia. Muchas sustancias biológicamente relevantes necesitan ser detectadas o actuar ellas mismas como sensores. Un biosensor es un sistema (no necesariamente microfabricado) que convierte una señal biológica en una señal eléctrica generalmente. Algunos ejemplos de biosensores pueden ser los sensores para moléculas pequeñas (oxígeno, pH y glucosa) o grandes moléculas (inmunosensores). El campo de los biosensores se encuentra ampliamente desarrollado y ha sido estudiado durante los últimos 30 años. Los nanotubos de carbono pueden ser utilizados para monitorear la actividad enzimática. Actualmente, algunos grupos ya han conseguido inmovilizar proteínas sobre las paredes de los nanotubos de carbono (120). Asimismo, durante los últimos años, ha sido muy importante la investigación en el desarrollo de materiales especialmente diseñados para que puedan ser implantados en el cuerpo humano y provocar respuestas biológicas específicas para la regeneración de los tejidos. Los materiales utilizados en el cuerpo humano deben poder adaptarse continuamente a los cambios dinámicos que ocurren dentro de él. Los materiales nanoestructurados y bioactivos tienen la habilidad de interactuar con el tejido vivo y son los más promisorios para la formación de una interfaz fuerte y perdurable entre el implante y el tejido vivo que lo rodea. Nuevos materiales nanoestructurados podrían ser empleados para fabricar huesos, cartílagos y pieles

artificiales que, además de no ser rechazados por el organismo, facilitarían la regeneración de ciertos tejidos (121-122).

En el futuro próximo, una de las aplicaciones clínicas más importante de la nanotecnología será probablemente el desarrollo farmacéutico. Estas aplicaciones aprovechan las propiedades de las nanopartículas o nanocápsulas para diseñar nuevas estrategias de liberación controlada, direccionalidad de fármacos, y resguardo de aquellas drogas con baja disponibilidad (123-124). Estas estructuras podrían ser utilizadas para almacenar y transportar medicinas al lugar exacto donde se necesite ya que de esta manera se podrían atenuar los efectos secundarios de los actuales medicamentos.

El desarrollo de bactericidas nuevos y más eficientes es muy importante debido al reciente aumento de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. En la actualidad las nanopartículas de plata se utilizan como agentes bactericidas en la instrumentación médica (125-126) (catéteres, implantes, etc). También como agente cicatrizante y bactericida en vendajes, cremas y geles o en la fabricación de productos textiles con propiedades antimicrobianas que reducen la proliferación de hongos y bacterias en la ropa (127-128).

1.11.1 Micro/nanofabricación en sistemas de células eucariotas.

Recientemente, una gran variedad de técnicas de microfabricación han sido utilizadas para el diseño superficial de materiales que permitan regular funciones celulares. Esta tecnología es una herramienta muy importante para estudiar diferentes factores como la adhesión y el crecimiento celular y para producir cultivos de células organizadas para su aplicación en ingeniería de tejidos. Aunque los sustratos con patrones topográficos definidos se utilizan principalmente en el cultivo celular, este tipo de estructuras ha despertado interés en áreas tecnológicas relacionadas con los implantes médicos, ya que la interacción entre las células y la superficie de los materiales es muy importante durante la integración o rechazo del implante.

Los factores topográficos de la superficie juegan un rol muy importante no sólo en la orientación de células y biocompatibilidad sino también en factores como la expresión de proteínas y diferenciación celular (129-131).

Existen numerosas técnicas que permiten crear patrones superficiales, tanto topográficos como químicos, en la micro/nanoescala (132). Entre estas técnicas se pueden mencionar:

- (i) Fotolitografía, que consiste en cubrir el sustrato de interés con un material sensible a la luz ultravioleta (UV); luego se coloca sobre éste una máscara perforada en la que se encuentra el diseño a transferir y se irradia con luz UV. Las zonas de interés se tratan con un revelador adecuado, que disuelve selectivamente ya sea las zonas irradiadas o las zonas enmascaradas.
- (ii) Impresión por microcontacto (*microcontact printing*), que consiste en la utilización de un sello o *stamp* elastomérico que contiene en relieve el patrón micrométrico a transferir. Luego se sumerge el sello en una solución conteniendo la molécula a transferir y se apoya sobre la superficie del sustrato. De esta manera las moléculas son transferidas a la superficie del sustrato siguiendo el patrón del sello.
- (iii) Moldeo y replicación, que consiste en generar un molde polimérico del patrón a transferir y luego depositar el material de interés sobre este molde, de modo de obtener una réplica de la estructura original. En este trabajo de Tesis se utilizaron técnicas de moldeo y replicación que serán descriptas en el Capítulo 3.

Se han realizado diversos estudios que involucran el análisis de la respuesta del organismo frente a materiales cuyas superficies han sido modificadas en la nano/microescala. Los autores Van Kooten y colaboradores han demostrado que el empleo de sustratos de polidimetilsiloxano (PDMS) microestructurados puede reducir significativamente el encapsulamiento de los materiales implantables (133). Un estudio *in vivo* realizado por Cheroundi y colaboradores con materiales microtexturados (134) ha demostrado que dichos materiales implantables inducen el crecimiento y la invaginación epitelial alrededor del implante. También, la respuesta de los fibroblastos se encuentra significativamente afectada por las dimensiones de la microestructura superficial del sustrato.

La migración celular (velocidad y orientación del movimiento) también se encuentra afectada por la topografía superficial. Tan y colaboradores han demostrado que la velocidad del movimiento de células neutrófilas depende de la microestructura y dimensiones de los canales superficiales diseñados sobre el sustrato (135). Los patrones topográficos superficiales tanto en la micro como en la nanoescala presentan una marcada influencia en las interacciones celulares con el sustrato. La regulación de diferentes

actividades celulares como la proliferación, adhesión y apoptosis podría ser muy útil para el diseño de dispositivos médicos, implantes y biomateriales.

Algunas técnicas de microfabricación permiten la modificación química de las superficies. Los patrones químicos han sido ampliamente utilizados para estudiar la interacción de las células con sustratos (136-138). Estas técnicas han sido aplicadas en la producción de patrones de biomoléculas para el estudio y la manipulación de las interacciones celulares con diferentes sustratos. Por ejemplo, el diseño de microestructuras con factores de crecimiento celular ha resultado muy interesante ya que se ha demostrado que las proteínas de factor de crecimiento inmovilizadas pueden regular funciones celulares sin la internalización de las células (139).

1.11.2 Micro/nanofabricación en sistemas de células procariotas.

La microtecnología también ha comenzado a impactar significativamente en la microbiología. Su escala de tamaños coincide perfectamente bien con las dimensiones de la mayoría de los microorganismos y las herramientas disponibles en la microescala hacen posible la manipulación y exploración de células individuales, su ambiente inmediato extracelular así como su forma y organización interna. Se cree que el desarrollo de técnicas físicas, incluyendo aquellas basadas en las microestructuras, serán un complemento esencial para la genética y la genómica, incluyendo nuevas técnicas para aislar, manipular, crecer y estudiar células aisladas y estructuras multicelulares como los biofilms.

Como ya se ha mencionado, varias técnicas de micro/nanofabricación permiten la fabricación de materiales biocompatibles con características topográficas coincidentes con las dimensiones celulares. Estas herramientas de microfabricación ofrecen nuevas capacidades para la microbiología y especialmente para el entendimiento de la fisiología y comportamiento de los microorganismos.

Algunas de las aplicaciones en microbiología se describen a continuación.

- *Inmovilización de bacterias sobre superficies*

La inmovilización y el diseño de patrones de bacterias sobre superficies ofrecen nuevas oportunidades para la detección de biomoléculas utilizando las células completas y para el estudio de las interacciones célula-célula y las interacciones entre las células y sus alrededores. Las monocapas autoensambladas (SAMs) han sido utilizadas para inmovilizar células sobre superficies en el estudio de interacciones huésped-patógeno. La unión

covalente de los ligandos biológicos a las regiones terminales de las SAMs permite controlar la densidad del ligando sobre la superficie y lo más importante es que estos ligandos mantienen su actividad biológica. Un ejemplo reciente describe la aplicación de las SAMs para medir las fuerzas de adhesión entre bacterias patógenas de *E. coli* con pilis tipo IV y SAMs con manosa como grupo terminal (140).

La combinación de técnicas de impresión por microcontacto y las SAMs han sido empleadas para inmovilizar células bacterianas selectivamente sobre superficies. Por ejemplo, los autores Rowan y colaboradores han utilizado sellos de PDMS para generar patrones de SAMs hidrofóbicos y reactivos sobre Au para generar sitios específicos que atrapen a las células de *E. coli* (141). Varios grupos han empleado la impresión por microcontacto para capturar y detectar organismos patógenos (142-144).

- *Patrones de bacterias utilizando hidrogeles.*

El agar y la agarosa forman hidrogeles. Este tipo de polímeros tiene dos características específicas que son particularmente útiles en microbiología. Por un lado, las células que crecen en estas superficies permanecen hidratadas y por otro lado, los nutrientes, gases y productos secundarios del metabolismo difunden a través de la red polimérica del gel. Existen también muchos otros hidrogeles con diversas aplicaciones en microbiología. Por ejemplo, los autores Heo y colaboradores han llenado canales de PDMS con una solución fotoreactiva de un prepolímero de polietilenglicol (PEG) que contiene células de *E. coli* y luego expuestos a luz UV (145). La exposición a la luz UV produce la fotopolimerización, haciendo que las células queden atrapadas dentro de los microcanales de PEG.

- *Microfluídica: movilidad, quimiotaxis, quorum sensing, y dinámica de población.*

La microfluídica (*microfluidics*) presenta muchas características interesantes para su empleo en el estudio de las células (146-147). La microfluídica trata con el diseño y la fabricación de dispositivos que puedan canalizar los flujos muy pequeños (nano/microlitros) de fluidos. Mao y colaboradores han empleado un flujo laminar de moléculas atractivas y repelentes dentro de microcanales como medio para estudiar la quimiotaxis bacteriana (148). Los autores encontraron que los sistemas microfluídicos son tres órdenes de magnitud más sensibles que los ensayos capilares de quimiotaxis tradicionales.

Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias pueden alterar colectivamente la expresión genética cuando la densidad de células alcanza un cierto nivel (*quorum sensing*). Como parte de este proceso, las células se comunican mediante la liberación de pequeñas moléculas dentro del medio circundante. Los autores Park y colaboradores estudiaron el crecimiento de *E. coli* en dispositivos microfluídicos de PDMS y encontraron que las células se acumulaban en áreas cerradas (149-150), concluyendo que la quimiotaxis entre células permite alcanzar la densidad de bacterias requerida para el proceso de *quorum sensing*.

Los sistemas microfluídicos también tienen aplicaciones en el estudio de la dinámica de poblaciones bacterianas. En un estudio reciente, se fabricó un ambiente microestructurado para generar heterogeneidades en los hábitats bacterianos y permitió estudiar cómo las bacterias se adaptan a distintas regiones del ambiente (151). También se han utilizado este tipo de dispositivos para el crecimiento de células con diferentes formas mediante el confinamiento de las bacterias en microcámaras de agarosa (152). Asimismo se ha utilizado la microfluídica para estudios genéticos y para la detección específica de células bacterianas (153-155). Las plataformas microfluídicas presentan varias características interesantes para la investigación genética como por ejemplo, el empleo de pequeños volúmenes de reactivos, la producción de pequeñas cantidades de residuos, bajo costo, cortos tiempos de reacción y la capacidad de análisis de células individuales.

Teniendo en cuenta los estudios descriptos arriba, la micro/nanofabricación presenta grandes posibilidades para el desarrollo de nuevas técnicas microbiológicas y materiales que faciliten el estudio de la fisiología y el comportamiento de los microorganismos.

En el presente trabajo de Tesis se estudió el impacto de las micro y nanoestructuras generadas en el Laboratorio sobre las primeras etapas de formación del biofilm. Se plantea entonces como objetivo analizar la influencia de la topografía y rugosidad de superficies micro y nanoestructuradas de distinta composición química sobre la adherencia y colonización bacteriana de dichos sustratos con el fin de poder seleccionar una estrategia adecuada para lograr inhibir la formación de biofilms sobre superficies sólidas y mejorar la eficacia de los antibióticos sobre los mismos.

Los sustratos empleados se obtuvieron a través de procesos de micro y nanofabricación que permitieron obtener superficies de Au, poliisobutilcianoacrilato

(PBCA) y Cu con micro y nanotopografías sobre los que se estudiaron las primeras etapas de formación de biofilms de *Pseudomonas fluorescens* tal como se describirá en los capítulos posteriores.

Referencias Bibliográficas.

1. Sanclement, J. A., Webster, P., Thomas, J., y Ramadan, H. H. (2005) Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis, *Laryngoscope* 115, 578-582.
2. Ramadan, H. H., Sanclement, J. A., y Thomas, J. G. (2005) Chronic rhinosinusitis and biofilms, *Otolaryngol Head Neck Surg* 132, 414-417.
3. Ramadan, H. H. (2006) Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms, *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 14, 183-186.
4. Characklis, W. G. (1973) Attached microbial growths--I. Attachment and growth, *Water Research* 7, 1113-1127.
5. Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., y Marrie, T. J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease, *Annu Rev Microbiol* 41, 435-464.
6. Characklis, W. G. (1973) Attached microbial growths--II. Frictional resistance due to microbial slimes, *Water Research* 7, 1249-1258.
7. Donlan, R. M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerg Infect Dis* 8, 881-890.
8. Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., y Caldwell, D. E. (1991) Optical sectioning of microbial biofilms, *J Bacteriol* 173, 6558-6567.
9. O'Toole, G., Kaplan, H. B., y Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development, *Annu Rev Microbiol* 54, 49-79.
10. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., y Davies, D. G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm, *J Bacteriol* 184, 1140-1154.
11. Monds, R. D., y O'Toole, G. A. (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review, *Trends Microbiol* 17, 73-87.
12. Sanderson, A. R., Leid, J. G., y Hunsaker, D. (2006) Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis, *Laryngoscope* 116, 1121-1126.
13. Post, J. C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., y Ehrlich, G. D. (2004) The role of biofilms in otolaryngologic infections, *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 12, 185-190.

14. Costerton, J. W., Stewart, P. S., y Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science* 284, 1318-1322.
15. Costerton, J. W. (2001) Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection, *Trends Microbiol* 9, 50-52.
16. Chole, R. A., y Faddis, B. T. (2003) Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129, 634-636.
17. Sottile, F. D., Marrie, T. J., Prough, D. S., Hobgood, C. D., Gower, D. J., Webb, L. X., Costerton, J. W., y Gristina, A. G. (1986) Nosocomial pulmonary infection: possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes, *Crit Care Med* 14, 265-270.
18. Rayner, M. G., Zhang, Y., Gorry, M. C., Chen, Y., Post, J. C., y Ehrlich, G. D. (1998) Evidence of bacterial metabolic activity in culture-negative otitis media with effusion, *JAMA* 279, 296-299.
19. Post, J. C. (2001) Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media, *Laryngoscope* 111, 2083-2094.
20. Ehrlich, G. D., Veeh, R., Wang, X., Costerton, J. W., Hayes, J. D., Hu, F. Z., Daigle, B. J., Ehrlich, M. D., y Post, J. C. (2002) Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media, *JAMA* 287, 1710-1715.
21. Chole, R. A., y Faddis, B. T. (2002) Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128, 1129-1133.
22. Jang, C. H., Cho, Y. B., y Choi, C. H. (2007) Structural features of tympanostomy tube biofilm formation in ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas otorrhea*, *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71, 591-595.
23. Saidi, I. S., Biedlingmaier, J. F., y Whelan, P. (1999) In vivo resistance to bacterial biofilm formation on tympanostomy tubes as a function of tube material, *Otolaryngol Head Neck Surg* 120, 621-627.
24. Jang, C. H., Park, H., Cho, Y. B., y Choi, C. H. (2010) Effect of vancomycin-coated tympanostomy tubes on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation: in vitro study, *J Laryngol Otol* 124, 594-598.
25. Psaltis, A. J., Ha, K. R., Beule, A. G., Tan, L. W., y Wormald, P. J. (2007) Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis, *Laryngoscope* 117, 1302-1306.

26. Zobel, C. E. (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity, *J Bacteriol* 46, 39-56.
27. Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B. K., y Molin, S. (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT, *Microbiology* 146 (Pt 10), 2395-2407.
28. Dalton, H. M., Goodman, A. E., y Marshall, K. C. (1996) Diversity in surface colonization behavior in marine bacteria, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17, 228-234.
29. Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S., y Molin, S. (2000) Development and dynamics of *Pseudomonas sp.* biofilms, *J Bacteriol* 182, 6482-6489.
30. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., y James, G. (1994) Biofilms, the customized microniche, *J Bacteriol* 176, 2137-2142.
31. Davey, M. E., y O'Toole G, A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847-867.
32. Dunne, W. M., Jr. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?, *Clin Microbiol Rev* 15, 155-166.
33. Schneider, R. P., y Marshall, K. C. (1994) Retention of the Gramnegative marine bacterium SW8 on surfaces -- effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2, 387-396.
34. O'Toole, G. A., y Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol Microbiol* 30, 295-304.
35. Marshall, K. C., Stout, R., y Mitchell, R. (1971) Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces, *J Gen Microbiol* 68, 337-348.
36. Lappin-Scott, H. M., y Costerton, J. W. (1995) *Microbial biofilms*, Cambridge University Press, Cambridge ; New York.
37. Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., y Greenberg, E. P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm, *Science* 280, 295-298.
38. Characklis, W. G. (1981) Bioengineering report: Fouling biofilm development: A process analysis, *Biotechnology and Bioengineering* 23, 1923-1960.

39. Fletcher, M. (1988) Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance, *J Bacteriol* 170, 2027-2030.
40. Lips, A., y Jessup, N. E., (Eds.) (1979) *Colloidal Aspects of Bacterial Adhesion*, Academic Press, London, New York.
41. Dolowy, K., (Ed.) (1980) *The theory of cell-cell and cell-substratum interactions*, Cambridge University Press, New York.
42. Rutter, P. R., (Ed.) (1980) *Physical chemistry of the adhesion of bacteria and other cells*, Cambridge University Press, New York.
43. Busscher, H. J., Cowan, M. M., y van der Mei, H. C. (1992) On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion, *FEMS Microbiol Rev* 8, 199-209.
44. Krekeler, C., Ziehr, H., y Klein, J. (1989) Physical methods for characterization of microbial surfaces, *Experientia* 45, 1047-1055.
45. van Loosdrecht, M. C., Norde, W., y Zehnder, A. J. (1990) Physical chemical description of bacterial adhesion, *J Biomater Appl* 5, 91-106.
46. Verwey, E. J. W. (1948) *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier, New York.
47. Klein, J., y Luckham, P. (1982) Forces between two adsorbed polyethylene oxide layers immersed in a good aqueous solvent, *Nature* 300, 429-431.
48. Klein, J. (1980) Forces between mica surfaces bearing layers of adsorbed polystyrene in cyclohexane, *Nature* 288, 248-250.
49. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., y Costerton, J. W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities, *Annu Rev Microbiol* 56, 187-209.
50. Kroncke, K. D., Orskov, I., Orskov, F., Jann, B., y Jann, K. (1990) Electron microscopic study of coexpression of adhesive protein capsules and polysaccharide capsules in *Escherichia coli*, *Infect Immun* 58, 2710-2714.
51. Troy, F. A., 2nd. (1979) The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers, *Annu Rev Microbiol* 33, 519-560.
52. Hogt, A. H., Dankert, J., Hulstaert, C. E., y Feijen, J. (1986) Cell surface characteristics of coagulase-negative *staphylococci* and their adherence to fluorinated poly(ethylenepropylene), *Infect Immun* 51, 294-301.

53. Wingender, J., Neu, T. R., y Flemming, H.-C. (1999) *Microbial extracellular polymeric substances : characterization, structure, and function*, Springer, New York.
54. Uhlinger, D. J., y White, D. C. (1983) Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*, *Appl Environ Microbiol* 45, 64-70.
55. Moller, S., Korber, D. R., Wolfaardt, G. M., Molin, S., y Caldwell, D. E. (1997) Impact of nutrient composition on a degradative biofilm community, *Appl Environ Microbiol* 63, 2432-2438.
56. Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., y Caldwell, D. E. (1998) In situ Characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics, *Microb Ecol* 35, 213-223.
57. Duguid, J. P. (1951) The demonstration of bacterial capsules and slime, *J Pathol Bacteriol* 63, 673-685.
58. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L., y Beachey, E. H. (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces, *Infect Immun* 37, 318-326.
59. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L., y Beachey, E. H. (1983) Experimental foreign body infections in mice challenged with slime-producing *Staphylococcus epidermidis*, *Infect Immun* 40, 407-410.
60. Hussain, M., Collins, C., Hastings, J. G., y White, P. J. (1992) Radiochemical assay to measure the biofilm produced by coagulase-negative *staphylococci* on solid surfaces and its use to quantitate the effects of various antibacterial compounds on the formation of the biofilm, *J Med Microbiol* 37, 62-69.
61. Berry, A., DeVault, J. D., y Chakrabarty, A. M. (1989) High osmolarity is a signal for enhanced algD transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains, *J Bacteriol* 171, 2312-2317.
62. May, T. B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J. D., Roychoudhury, S., Zielinski, N. A., Berry, A., Rothmel, R. K., y et al. (1991) Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients, *Clin Microbiol Rev* 4, 191-206.

63. Brinton, C. C., Jr. (1965) The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria, *Trans N Y Acad Sci* 27, 1003-1054.
64. Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B., Romine, M. F., Saffarini, D. A., Hill, E. A., Shi, L., Elias, D. A., Kennedy, D. W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealson, K. H., y Fredrickson, J. K. (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11358-11363.
65. Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., y Lovley, D. R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature* 435, 1098-1101.
66. Phillips, G. N., Jr., Flicker, P. F., Cohen, C., Manjula, B. N., y Fischetti, V. A. (1981) Streptococcal M protein: alpha-helical coiled-coil structure and arrangement on the cell surface, *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4689-4693.
67. Beveridge, T. J. (1981) Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall, *Int Rev Cytol* 72, 229-317.
68. Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M., y Costerton, J. W. (2001) Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms, *Appl Environ Microbiol* 67, 5608-5613.
69. Allison, D. G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A., y Gilbert, P. (1998) Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms, *FEMS Microbiol Lett* 167, 179-184.
70. Gibbons, R. J., Cohen, L., y Hay, D. I. (1986) Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors, *Infect Immun* 52, 555-561.
71. Zoltai, P. T., Zottola, E. A., y McKay, L. L. (1981) Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surface., *Journal of Food Protection* 44, 204-208.
72. Arnold, J. W., y Bailey, G. W. (2000) Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study, *Poult Sci* 79, 1839-1845.

73. Verran, J., y Whitehead, K. A. (2006) Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces, *Food and Bioproducts Processing* 84, 260-264.
74. Pedersen, K. (1990) Biofilm development on stainless steel and pvc surfaces in drinking water, *Water Research* 24, 239-243.
75. Leclercq-Perlat, M. N., y Lalande, M. (1994) Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries, *Journal of Food Engineering* 23, 501-517.
76. Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., Savoie, L., y Roy, R. (1990) Efficiency of sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on contaminated surfaces, *J Dairy Sci* 73, 3428-3432.
77. Vanhaecke, E., Remon, J. P., Moors, M., Raes, F., De Rudder, D., y Van Peteghem, A. (1990) Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity, *Appl Environ Microbiol* 56, 788-795.
78. Flint, S. H., Brooks, J. D., y Bremer, P. J. (2000) Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant *streptococci*, *Journal of Food Engineering* 43, 235-242.
79. Rijnaarts, H. H. M., Norde, W., Lyklema, J., y Zehnder, A. J. B. (1999) DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14, 179-195.
80. Gilbert, P., Evans, D. J., Evans, E., Duguid, I. G., y Brown, M. R. (1991) Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*, *J Appl Bacteriol* 71, 72-77.
81. Kim, K. Y., y Frank, J. F. (1995) Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel, *Journal of Food Protection* 58, 24-28.
82. Walker, S. L., Hill, J. E., Redman, J. A., y Elimelech, M. (2005) Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g, *Appl Environ Microbiol* 71, 3093-3099.
83. Dan, N. (2003) The effect of charge regulation on cell adhesion to substrates: salt-induced repulsion, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27, 41-47.

84. Husmark, U., y Ronner, U. (1990) Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions, *J Appl Bacteriol* 69, 557-562.
85. Millsap, K. W., Reid, G., van der Mei, H. C., y Busscher, H. J. (1997) Cluster analysis of genotypically characterized *Lactobacillus* species based on physicochemical cell surface properties and their relationship with adhesion to hexadecane., *Can J Microbiol* 43, 284-291.
86. Lerebour, G., Cupferman, S., y Bellon-Fontaine, M. N. (2004) Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin® reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate, *Journal of Applied Microbiology* 97, 7-16.
87. Narenan, V. (2003) Bacterial attachment to meat surfaces., In *Massey University*.
88. Tomasz, A. (1965) Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria, *Nature* 208, 155-159.
89. Neelson, K. H., Platt, T., y Hastings, J. W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system, *J Bacteriol* 104, 313-322.
90. Bassler, B. L., y Losick, R. (2006) Bacterially speaking, *Cell* 125, 237-246.
91. Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., y Welsh, M. J. (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development, *Nature* 417, 552-555.
92. Thomas, J. G., y Nakaishi, L. A. (2006) Managing the complexity of a dynamic biofilm, *J Am Dent Assoc* 137 Suppl, 10S-15S.
93. Kim, S. K., y Kaiser, D. (1990) Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*, *Science* 249, 926-928.
94. Kim, S. K., y Kaiser, D. (1990) C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *M. xanthus*, *Cell* 61, 19-26.
95. Reguera, G., Pollina, R. B., Nicoll, J. S., y Lovley, D. R. (2007) Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation, *J Bacteriol* 189, 2125-2127.
96. Henrichsen, J. (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification, *Bacteriol Rev* 36, 478-503.
97. Harshey, R. M. (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal, *Annu Rev Microbiol* 57, 249-273.

98. Allison, C., Emody, L., Coleman, N., y Hughes, C. (1994) The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*, *J Infect Dis* 169, 1155-1158.
99. Flemming, H. C., y Wingender, J. (2010) The biofilm matrix, *Nat Rev Microbiol* 8, 623-633.
100. Yang, L., Barken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Givskov, M., y Tolker-Nielsen, T. (2007) Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* 153, 1318-1328.
101. Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., y Lewenza, S. (2008) Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *PLoS Pathog* 4, e1000213.
102. Molin, S., y Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure, *Curr Opin Biotechnol* 14, 255-261.
103. Ghigo, J. M. (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development, *Nature* 412, 442-445.
104. Luo, H., Wan, K., y Wang, H. H. (2005) High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAMBeta1 transmission by *Lactococcus lactis*, *Appl Environ Microbiol* 71, 2970-2978.
105. Stewart, P. S., y Costerton, J. W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet* 358, 135-138.
106. Anderl, J. N., Franklin, M. J., y Stewart, P. S. (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1818-1824.
107. De Beer, D., Srinivasan, R., y Stewart, P. S. (1994) Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection, *Appl Environ Microbiol* 60, 4339-4344.
108. Suci, P. A., Mittelman, M. W., Yu, F. P., y Geesey, G. G. (1994) Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Antimicrob Agents Chemother* 38, 2125-2133.
109. Cochran, W. L., McFeters, G. A., y Stewart, P. S. (2000) Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine, *J Appl Microbiol* 88, 22-30.

110. Brown, M. L., Aldrich, H. C., y Gauthier, J. J. (1995) Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms, *Appl Environ Microbiol* 61, 187-193.
111. Muller, P., Guggenheim, B., y Schmidlin, P. R. (2007) Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro, *Eur J Oral Sci* 115, 77-80.
112. Mah, T. F., y O'Toole, G. A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends Microbiol* 9, 34-39.
113. Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., y Read, R. R. (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, *Can J Vet Res* 66, 86-92.
114. Kohler, T., van Delden, C., Curty, L. K., Hamzehpour, M. M., y Pechere, J. C. (2001) Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol* 183, 5213-5222.
115. Moreira, M. A., Oliveira, J. A., Teixeira, L. M., y Moraes, C. A. (2005) Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass, *Vet Microbiol* 109, 75-81.
116. Christopher, A. B., Arndt, A., Cugini, C., y Davey, M. E. (2010) A streptococcal effector protein that inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm development, *Microbiology* 156, 3469-3477.
117. Kreth, J., Zhang, Y., y Herzberg, M. C. (2008) Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*, *J Bacteriol* 190, 4632-4640.
118. Manning, S. C. (2003) Basics of biofilm in clinical otolaryngology, *Ear Nose Throat J* 82, 18-20.
119. Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., Rice, S. A., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S., y Givskov, M. (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound, *Microbiology* 148, 87-102.
120. Chen, R. J., Zhang, Y., Wang, D., y Dai, H. (2001) Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization, *J Am Chem Soc* 123, 3838-3839.

121. Zhang, L., Hemraz, U. D., Fenniri, H., y Webster, T. J. (2010) Tuning cell adhesion on titanium with osteogenic rosette nanotubes, *J Biomed Mater Res A* 95, 550-563.
122. Zhang, L., Ramsaywack, S., Fenniri, H., y Webster, T. J. (2008) Enhanced osteoblast adhesion on self-assembled nanostructured hydrogel scaffolds, *Tissue Eng Part A* 14, 1353-1364.
123. Roy, I., Ohulchansky, T. Y., Pudavar, H. E., Bergey, E. J., Oseroff, A. R., Morgan, J., Dougherty, T. J., y Prasad, P. N. (2003) Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy, *J Am Chem Soc* 125, 7860-7865.
124. Brigger, I., Dubernet, C., y Couvreur, P. (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv Drug Deliv Rev* 54, 631-651.
125. Juan, L., Zhimin, Z., Anchun, M., Lei, L., y Jingchao, Z. (2010) Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect, *Int J Nanomedicine* 5, 261-267.
126. Thomas, V., Yallapu, M. M., Sreedhar, B., y Bajpai, S. K. (2009) Fabrication, characterization of chitosan/nanosilver film and its potential antibacterial application, *J Biomater Sci Polym Ed* 20, 2129-2144.
127. Nair, A. S., Binoy, N. P., Ramakrishna, S., Kurup, T. R., Chan, L. W., Goh, C. H., Islam, M. R., Utschig, T., y Pradeep, T. (2009) Organic-soluble antimicrobial silver nanoparticle-polymer composites in gram scale by one-pot synthesis, *ACS Appl Mater Interfaces* 1, 2413-2419.
128. Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q. W., y Newton, E. (2006) Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles, *J Hosp Infect* 62, 58-63.
129. Charest, J. L., Garcia, A. J., y King, W. P. (2007) Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries, *Biomaterials* 28, 2202-2210.
130. Yim, E. K., Reano, R. M., Pang, S. W., Yee, A. F., Chen, C. S., y Leong, K. W. (2005) Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells, *Biomaterials* 26, 5405-5413.
131. Motlagh, D., Senyo, S. E., Desai, T. A., y Russell, B. (2003) Microtextured substrata alter gene expression, protein localization and the shape of cardiac myocytes, *Biomaterials* 24, 2463-2476.

132. Gates, B. D., Xu, Q., Stewart, M., Ryan, D., Willson, C. G., y Whitesides, G. M. (2005) New approaches to nanofabrication: molding, printing, and other techniques, *Chem Rev* 105, 1171-1196.
133. van Kooten, T. G., Whitesides, J. F., y von Recum, A. (1998) Influence of silicone (PDMS) surface texture on human skin fibroblast proliferation as determined by cell cycle analysis, *J Biomed Mater Res* 43, 1-14.
134. Chehroudi, B., McDonnell, D., y Brunette, D. M. (1997) The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing, *J Biomed Mater Res* 34, 279-290.
135. Tan, J., y Saltzman, W. M. (2002) Topographical control of human neutrophil motility on micropatterned materials with various surface chemistry, *Biomaterials* 23, 3215-3225.
136. Lu, L., Nyalakonda, K., Kam, L., Bizios, R., Gopferich, A., y Mikos, A. G. (2001) Retinal pigment epithelial cell adhesion on novel micropatterned surfaces fabricated from synthetic biodegradable polymers, *Biomaterials* 22, 291-297.
137. Chen, G., y Ito, Y. (2001) Gradient micropattern immobilization of EGF to investigate the effect of artificial juxtacrine stimulation, *Biomaterials* 22, 2453-2457.
138. Ito, Y., Chen, G., y Imanishi, Y. (1998) Micropatterned immobilization of epidermal growth factor to regulate cell function, *Bioconjug Chem* 9, 277-282.
139. Chen, G., Ito, Y., Imanishi, Y., Magnani, A., Lamponi, S., y Barbucci, R. (1997) Photoimmobilization of sulfated hyaluronic acid for antithrombogenicity, *Bioconjug Chem* 8, 730-734.
140. Liang, M. N., Smith, S. P., Metallo, S. J., Choi, I. S., Prentiss, M., y Whitesides, G. M. (2000) Measuring the forces involved in polyvalent adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* to mannose-presenting surfaces, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13092-13096.
141. Rowan, B., Wheeler, M. A., y Crooks, R. M. (2002) Patterning bacteria within hyperbranched polymer film templates, *Langmuir* 18, 9914-9917.
142. St John, P. M., Davis, R., Cady, N., Czajka, J., Batt, C. A., y Craighead, H. G. (1998) Diffraction-based cell detection using a microcontact printed antibody grating, *Anal Chem* 70, 1108-1111.

143. Morhard, F., Pipper, J., Dahint, R., y Grunze, M. (2000) Immobilization of antibodies in micropatterns for cell detection by optical diffraction, *Sensors and Actuators B: Chemical* 70, 232-242.
144. Howell, S. W., Inerowicz, H. D., Regnier, F. E., y Reifengerger, R. (2002) Patterned protein microarrays for bacterial detection, *Langmuir* 19, 436-439.
145. Heo, J., Thomas, K. J., Seong, G. H., y Crooks, R. M. (2003) A microfluidic bioreactor based on hydrogel-entrapped *E. coli*: cell viability, lysis, and intracellular enzyme reactions, *Anal Chem* 75, 22-26.
146. Whitesides, G. M. (2006) The origins and the future of microfluidics, *Nature* 442, 368-373.
147. Beebe, D. J., Mensing, G. A., y Walker, G. M. (2002) Physics and applications of microfluidics in biology, *Annu Rev Biomed Eng* 4, 261-286.
148. Mao, H., Cremer, P. S., y Manson, M. D. (2003) A sensitive, versatile microfluidic assay for bacterial chemotaxis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5449-5454.
149. Park, S., Wolanin, P. M., Yuzbashyan, E. A., Silberzan, P., Stock, J. B., y Austin, R. H. (2003) Motion to form a quorum, *Science* 301, 188.
150. Park, S., Wolanin, P. M., Yuzbashyan, E. A., Lin, H., Darnton, N. C., Stock, J. B., Silberzan, P., y Austin, R. (2003) Influence of topology on bacterial social interaction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13910-13915.
151. Keymer, J. E., Galajda, P., Muldoon, C., Park, S., y Austin, R. H. (2006) Bacterial metapopulations in nanofabricated landscapes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17290-17295.
152. Takeuchi, S., DiLuzio, W. R., Weibel, D. B., y Whitesides, G. M. (2005) Controlling the shape of filamentous cells of *Escherichia coli*, *Nano Lett* 5, 1819-1823.
153. Nagamine, K., Onodera, S., Torisawa, Y. S., Yasukawa, T., Shiku, H., y Matsue, T. (2005) On-chip transformation of bacteria, *Anal Chem* 77, 4278-4281.
154. Cady, N. C., Stelick, S., y Batt, C. A. (2003) Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures, *Biosens Bioelectron* 19, 59-66.
155. Jong Wook, H., y et al. (2006) Molecular biology on a microfluidic chip, *Journal of Physics: Condensed Matter* 18, S691.