

Constanza Muñoz, Liliana*
Pinilla, Gladys*
Navarrete, Jeannette*

Biopelícula en *Staphylococcus* spp.: estructura, genética y control

Staphylococcus spp biofilm:
structure, genetics and control

Fecha de aceptación: octubre 2016

Resumen

Los *Staphylococcus* sp. son comensales humanos, algunas especies son patógenas, que tienen incrementada la expresión de una serie de factores de virulencia. Mediante un mecanismo de comunicación célula-célula denominada *quorum sensing*, favorece la regulación y formación de una biopelícula mediante tres pasos: en el primero la bacteria secreta una gran variedad de proteínas de superficie de adhesión celular; en la segunda los microorganismos se organizan en pequeños agregados hasta llegar a formar una matriz extracelular cuyo principal componente son los polisacáridos de adhesión intracelular (PIA); y por último, la diseminación y colonización del patógeno en nuevas superficies durante los procesos infecciosos. Esta estructura limita la difusión del antibiótico e incrementa la resistencia bacteriana de diez a mil veces más, por lo que se requieren altas dosis y durante tiempos prolongados de terapia antimicrobiana; en algunas ocasiones, el tratamiento falla por la persistencia de las infecciones asociadas a ésta. Nuevos compuestos tanto naturales, sintéticos o biológicos han sido enfocados para inhibir o impedir la formación de biopelícula.

Palabras clave: biopelícula, *Staphylococcus* spp., *quorum sensing*, proteínas de adhesión, nanotecnología, péptidos sintéticos.

Abstract

Staphylococcus sp. are human commensals, some species are pathogens, with increased expression of a series of virulence factors by means of a cell-cell communication mechanism called quorum sensing. Biofilm formation is facilitated through three steps: first, the bacteria secretes a wide variety of surface proteins of cell adhesion; second, the microorganisms organize themselves in small aggregates until an extracellular matrix is formed, whose principal component is the polysaccharide intercellular adhesin (PIA); and lastly, there is a dissemination and colonization of pathogens in new surfaces during the infectious processes. This structure limits the diffusion of antibiotics and increases bacterial resistance ten to one thousand times more. Therefore, the antimicrobial therapy usually requires high doses for prolonged periods, and in some circumstances, the treatment is unsuccessful. New compounds of a natural, synthetic, or biological origin have been produced to inhibit or impede biofilm formation.

Keywords: biofilm, *Staphylococcus* spp., *quorum sensing*, adhesion proteins, nanotechnology, synthetic peptides.

Introducción

Staphylococcus aureus y *Staphylococcus epidermidis* normalmente colonizan la superficie del tejido epitelial. *S. epidermidis* forma parte de la flora microbiana y es la principal fuente de infección en catéteres médicos y prótesis,¹ mientras que *S. aureus* se considera un microorganismo transitorio, con una alta incidencia en enfermedades invasivas tanto de la comunidad como de hospitales, lo que incrementa una alta tasa de morbilidad y mortalidad.^{2,3}

Estos microorganismos son agentes causales de una variedad de infecciones en piel, tejidos blandos, sistema sanguíneo, sistema respiratorio, sistema esquelético y colonización en dispositivos médicos, como catéteres, válvulas, prótesis, entre otras.^{4,5}

Para causar estas infecciones se requiere la expresión de un grupo de moléculas que determinen su patogenicidad, conocidas colectivamente como factores de virulencia, específicos

* Docentes, Grupo de Investigación REMA, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Correspondencia: Dra. Liliana Constanza Muñoz
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Facultad de Ciencias de la Salud.

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.

Calle 28, núm. 5B 02, Bogotá, Colombia.

Dirección electrónica: lilimunozm@gmail.com

Teléfono: 57-1-3362519

de especie; incluyen proteínas de adhesión a superficies, secreción de inmunomoduladores, toxinas, enzimas degradativas y genes de resistencia antimicrobiana, entre otros. Una delicada coordinación de éstos es fundamental para la supervivencia del patógeno y la invasión al huésped.¹

Quorum sensing

Los patógenos ocupan numerosos nichos dentro del huésped para adaptar la expresión de los genes de virulencia, controlar el comportamiento dentro de la población bacteriana y el estado de densidad o crecimiento del microorganismo mediante un mecanismo de señalización célula-célula o comunicación bacteriana llamado *quorum sensing* (qs), a través de señales peptídicas conocidas como feromonas, que pueden pertenecer a la misma especie o a una diferente, son sintetizadas a través del ribosoma bacteriano, y requeridas para la supervivencia y propagación de la bacteria en medios ambientes naturales u hostiles.⁶⁻⁸

Las feromonas en bacterias Gram negativas son moléculas basadas en quinolonas y los péptidos sintetizados enzimáticamente por el gen *luxI* pueden difundirse libremente a través de las membranas biológicas, y son responsables de la biosíntesis de N-acyl homoserina lactona, conocida como autoinductor, que la incrementa y se difunde dentro o fuera de la célula, dependiendo de la densidad celular bacteriana, especialmente en la fase estacionaria tardía de crecimiento.⁹

Cuando la señal del autoinductor alcanza una alta concentración, se une a la proteína *LuxR* que se encuentra en el citoplasma de la bacteria y la activa mediante la exposición de un dominio al ADN, una vez activado *LuxR*, se une a la región promotora del operon *luxCDABE* para sobreregular, entre otros, la transcripción de luciferasa y de las moléculas homologas *LuxI* y *LuxR*, cuya función es la síntesis y reconocimiento del autoinductor. Éstas se han identificado en algunas bacterias

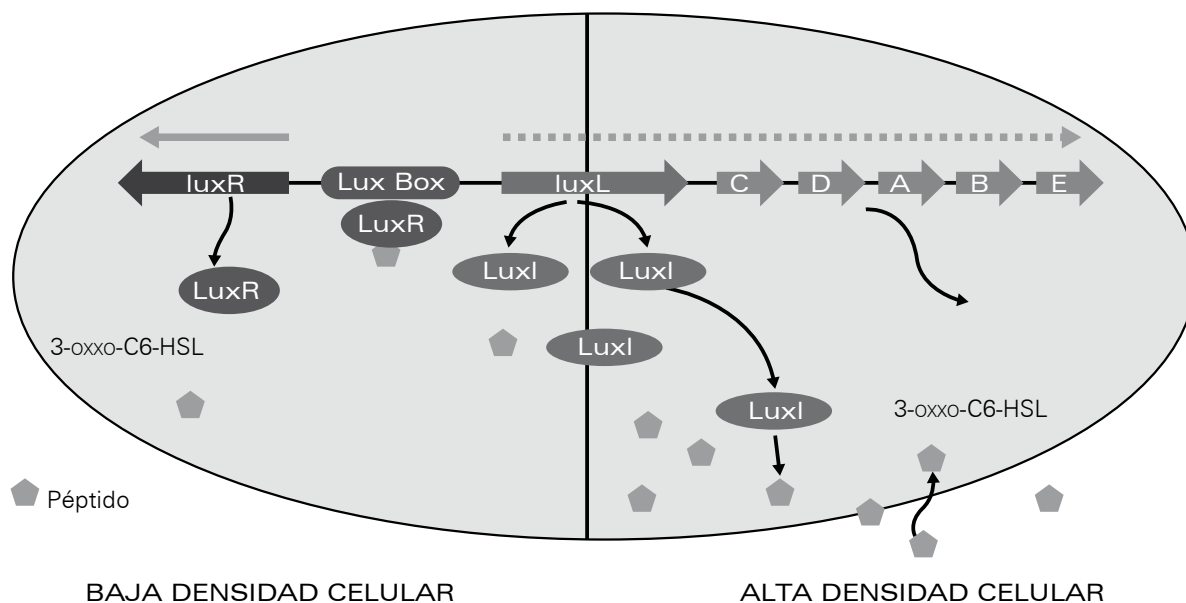
Gram positivas, como *S. aureus* y *S. epidermidis*, sugiriendo que el sistema *LuxS* puede poseer funciones de dispersión en el sistema de señalización bacteriana (figura 1).¹⁰⁻¹¹

En bacterias Gram positivas el uso de autoinductores en el qs se regula mediante dos sistemas: en el primer paso, un sensor transmembranal de histidina kinasa se une específicamente a las moléculas señal en la superficie externa, e interactúa con proteínas reguladoras intracelulares para iniciar la cascada de fosforilación, mediante difusión pasiva a través de la membrana o por un sistema de transporte activo dentro de la célula bacteriana.¹² El segundo sistema es un regulador que se encuentra en el citoplasma, contiene un dominio de unión al ADN, por lo tanto modula la expresión de ciertos genes necesarios para generar una respuesta fisiológica al percibir señales. Se encuentran clasificadas dentro de cuatro familias: *NarL*, *LytTR*, *AmiR* y *OmpR*, siendo esta última la que media un amplio rango de funciones biológicas, como osmolaridad, asimilación al fosfato, resistencia bacteriana, virulencia y toxicidad.¹³

En *S. aureus* y *S. epidermidis* el autoinductor (AIP) es un péptido cíclico modificado postranscripcionalmente, e incrementa su concentración de acuerdo con la masa de densidad celular mediante un sistema regulatorio que facilita la respuesta a las señales peptídicas extracelulares codificadas por el operon *agr*, el cual se describe como un mecanismo de control de secreción de algunas exoproteínas.¹⁴

Posteriormente se ha demostrado que el gen regulador *agr* facilita la respuesta de las señales de traducción peptídicas en cascada, el cual controla un amplio rango de funciones como: 1) en altas concentraciones celulares inicia la síntesis de factores de virulencia; 2) estimula la producción de proteasas requeridas presumiblemente para la diseminación y transición de la fase exponencial tardía a la fase estacionaria; y 3) *in vitro* promueve el ataque y colonización de estructuras sétiles multicelulares denominadas biopelícula, que le permite soportar las condiciones ambientales durante la infección.^{15,16}

Figura 1
Operon *lux CDABE* en bacterias Gram positivas



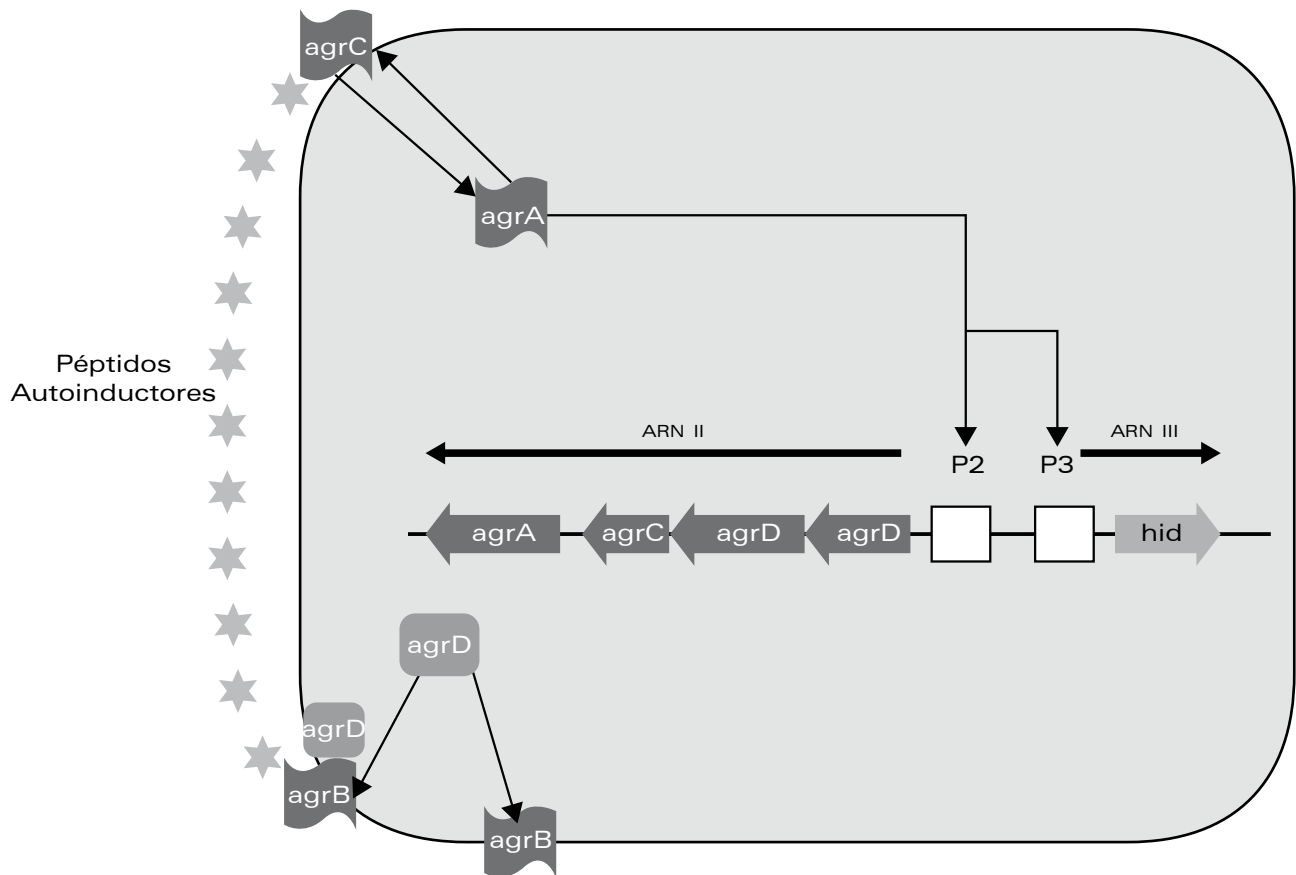
El gen regulador *agr* está compuesto por dos unidades transcripcionales divergentes, *RNAII* y *RNAIII*, así como sus respectivos promotores *P2* y *P3*. El *locus* *RNAII* comprende cuatro genes que forman parte del mecanismo de señalización del *agr* denominados *agrB*, que actúa como una endopeptidasa transmembranal de asociación a la membrana, y se requiere para la activación de los dos promotores de *agr*, *agrD* es el péptido de señalización extracelular, *agrC* se encuentra

asociado a la membrana como un sensor de quinasa, *agrA* se encuentra en el citoplasma y permite la unión al ADN,^{17,18} induce la transcripción de *RNAII* y *RNAIII* y se une al promotor *P2* de la región *RNAII*.¹⁵ La transcripción del operon *P3* resulta en un dramático aumento de las concentraciones intracelulares de *RNAIII*, el cual se ve reflejado en el incremento de secreción de factores de virulencia y de proteínas de adhesión celular (figura 2).¹⁹

Figura 2

Ilustración esquemática del sistema *agr* de *S. aureus*, incluye la organización molecular para la producción de péptidos autoinductores y activación de la respuesta *agr*.

1: regulador de la respuesta, 2: sensor, 3: autoinductor y 4: procesamiento de *agrD*



Características en la formación de biopelícula en *Staphylococcus*

Por lo anteriormente mencionado, podemos concluir que la regulación del *os* involucra moléculas de señalización producidas en el interior de las bacterias, y muchas de éstas se difunden hacia el exterior, para unirse en la superficie de la célula y algunas ser liberadas debido a la actividad enzimática producida por la bacteria. Esto se ha demostrado con el incremento de la expresión del gen *agr* y su asociación a la colonización bacteriana, alterando tanto el genotipo como el fenotipo bacteriano, lo que favorece la persistencia de la infección debido a la formación de la biopelícula.^{15,20,21}

Se han observado casos de infecciones estafilocócicas causadas que no se encuentran en estado libre, sino por bacterias que interactúan célula a célula formando biopelícula, definida como una comunidad de células que se unen mediante un ataque directo a superficies bióticas y/o abióticas embebida en una matriz extracelular polimérica, caracterizada por una estructura tridimensional específica, que media la unión a los componentes del tejido, probablemente por alteración en el pH, disponibilidad de oxígeno, disminución de nutrientes y acumulación de agua dentro de la biopelícula.²²⁻²⁶

Las bacterias formadoras de biopelícula generalmente exhiben un crecimiento alterado y un perfil de expresión de genes diferente al de la bacteria planktónica, o bacteria en vida libre. Es el caso de los *Staphylococcus* sp., en el que se ha demostrado una disminución en los procesos celulares básicos, alteración en su metabolismo respiratorio con bajas concentraciones de oxígeno, producción de energía que favorece la fermentación, la adaptación a los factores ambientales hostiles, la inducción de factores protectores e incrementa la transcripción de genes que se encuentran involucrados en la resistencia bacteriana. Por otra parte, debido al estado de quiescencia en el crecimiento bacteriano y a la formación de la biopelícula, le permite a la bacteria evadir los mecanismos de defensa del huésped, como la fagocitosis, y persistir en el huésped infectado.²⁷⁻²⁹

Se han descrito tres estados en la formación de biopelícula, los cuales se detallan a continuación.

Primera fase: adhesión

La fase de inicio de la formación de biopelícula incluye la adhesión de la bacteria sobre superficies bióticas o abióticas, como plásticos, metales o catéteres médicos, entre otros, donde dependiendo de las características físico-químicas del material, las proteínas de adhesión presentes en la superficie de las bacterias asociadas a la acumulación (Aap),³⁰ autolisinas (AtlA),³¹ los componentes de la pared celular como ácido teicoico y ácidos lipoteicoicos, debido a sus cargas catiónicas promueven la incorporación de d-alaninas y es determinante para el ataque de los *Staphylococcus* a los biomateriales.^{32,33}

Las proteínas de asociación a la pared celular (PC) varían de acuerdo con los microorganismos. Por ejemplo, en *S. aureus* hay aproximadamente 24 proteínas, mientras que en *S. epidermidis* y *S. lugdunensis* se hallan en menor cantidad, se encuentran unidas al peptidoglicano, su expresión depende de la disminución de hierro o de la fase de crecimiento bacteriano exponencial o estacionaria. Esta familia de proteínas se clasifican de acuerdo con su estructura y se denominan por sus siglas en inglés: MSCRAMM (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules).³⁴

Dentro de las MSCRAMM están el factor clumping A (ClfA) y clumping B (ClfB), proteínas repetidas serin-aspartato que comprenden SdrC, SdrD, SdrE, SdrF, SasG, proteínas de unión al colágeno (CNA), proteínas bifuncionales constituidas por las proteínas de unión fibrinógeno/fibronectina (FNBPA y FNBPB para *S. aureus* y para *S. epidermidis* SdrG/Fbe); proteínas de superficie reguladoras de hierro, entre las que tenemos IsdA, IsdB, IsdC, IsdH, proteína A.^{35,36}

Entre las funciones de las proteínas de adhesión MSCRAMM están:

- Factor clumping ClfA y ClfB son proteínas de unión al fibrinógeno en *S. aureus*, contribuyen a la colonización, a la agregación de plaquetas, inhiben la fagocitosis, no participan en la formación de abscesos; ClfA se expresa en todos los estados del crecimiento celular, inactiva la fracción del complemento C3b a iC3b o lo degrada; ClfB se expresa únicamente en la fase de crecimiento exponencial, es el mayor determinante de adherencia en las células escamosas, favorece la colonización nasal.^{37,38}

- Proteínas repetidas serin-aspartato SdrC, SdrD, SdrE, SdrF, SdrG, SasG: los genes Sdr se correlacionan con tejidos específicos, como el SdrC que se expresa en las células mamarias, su unión al fibrinógeno es muy importante para la adhesión de la bacteria, permite que se acumule en la superficie celular, se asocia con sepsis y su ligando es la β -neuroxina conocida como células de adhesión neuronales.³⁹
- SdrC y SdrD contribuyen a la adherencia de las células escamosas en *S. aureus*, SdrD interactúa con el patógeno y el sistema inmune, SdrD y SdrE han sido aisladas en infecciones óseas, SdrE induce la agregación plaquetaria, presenta una variante alélica denominada Bbp asociada en la formación de biopelícula e infecciones óseas causando osteomielitis. Estas proteínas se encuentran asociadas a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA).⁴⁰
- SdrF encontrada en catéteres de pacientes con falla cardíaca congestiva infectados con *S. epidermidis*, permite la adherencia del colágeno tipo I a través de las regiones A y B mediante las uniones fuertes y débiles, respectivamente.⁴¹
- SdrG aislada en *S. epidermidis* une el fibrinógeno, el cual puede representar un paso importante en la colonización del biomaterial implantado mediante una fuerte adhesión del patógeno y baja disociación, debido a un incremento del receptor ligando, es tiempo dependiente y genera cambios conformacionales especialmente en la superficie de la célula.⁴² Las proteínas SasG promueven, *in vitro*, la adhesión a células epiteliales descamadas de fosas nasales.⁴³
- Proteínas de unión al colágeno (CNA): actúa como un puente de unión entre la célula bacteriana y el colágeno en la matriz, se encuentra asociada a la artritis séptica.⁴⁴ La interacción de CNA y colágeno tipo I genera la formación de trombos en el torrente sanguíneo, se expresa en la fase de crecimiento exponencial.⁴⁵
- Proteínas de unión fibrinógeno/fibronectina FNBPA y FNBPB: se consideran similares en secuencia y organización, se unen al fibrinógeno, elastina y fibronectina, activan la agregación plaquetaria, promueven el ataque y colonización al tejido favoreciendo la formación de biopelícula en cepas MRSA tanto de la comunidad como hospitalaria, mediante respuesta endotelial proinflamatoria y procoagulante, su dominio aminoterminal se une a la proteína ClfA. FNBPA se une a las células vivas y es dependiente de zinc, interactúa en la adhesión célula-célula, su expresión está asociada al tiempo de exposición; este factor de virulencia se relaciona con la endocarditis, y es inhibida por la heparina.⁴⁶ Para FNBPB su sistema de unión es similar al de FNBPA, se une a fibrinógeno y elastina, estimula la respuesta endotelial a procesos proinflamatorios y procoagulantes para favorecer la formación de biopelícula.⁴⁷
- Proteínas de superficie reguladoras de hierro, entre las que tenemos IsdA, IsdB, IsdC, IsdH. El hierro es un nutriente vital para las interacciones de *S. aureus* con el huésped, la adquisición es regulada por estas proteínas, las cuales se expresan en la superficie de la célula y transfieren el grupo hem hacia el citoplasma. Si hay una baja concentración de hierro en

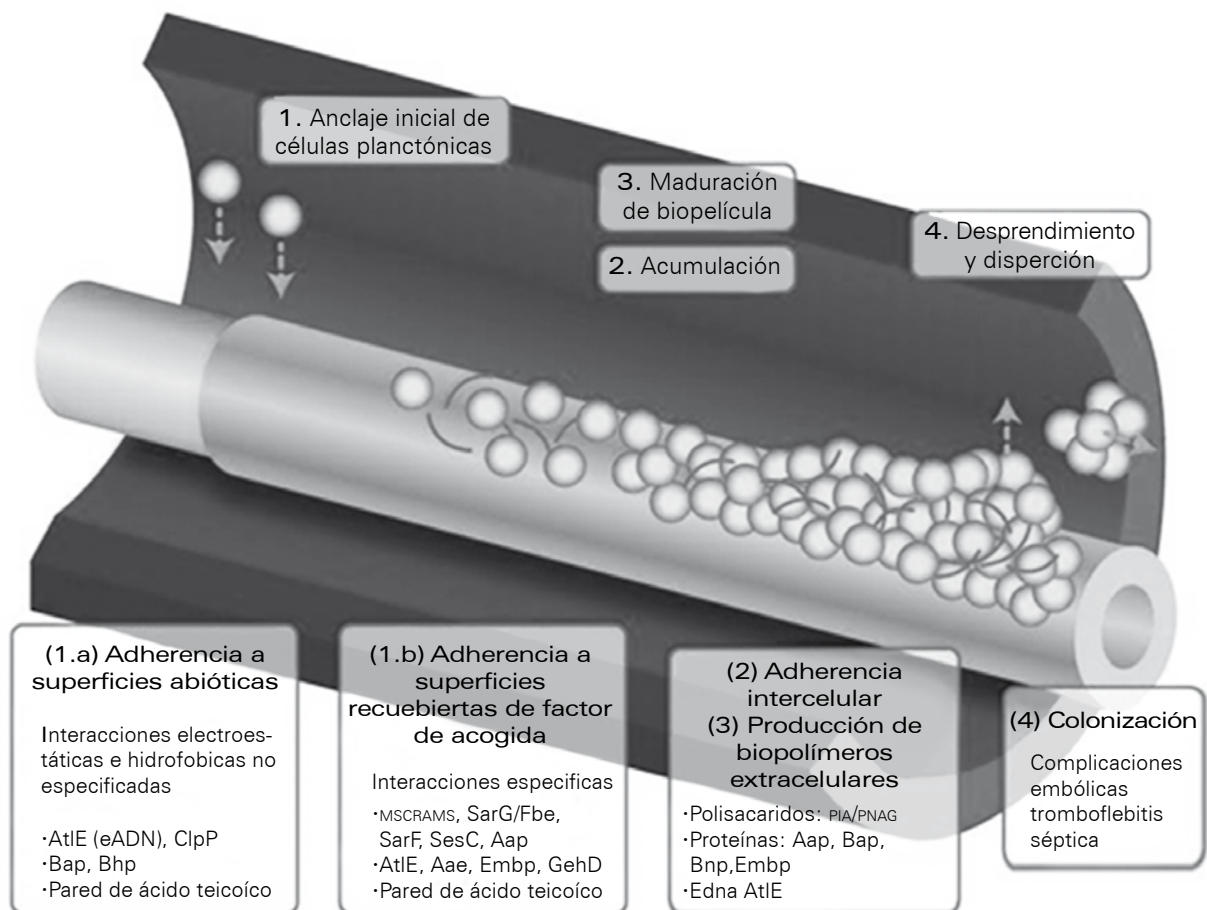
la sangre o en el tejido, IsdB se sobreexpresa durante el proceso infeccioso *in vivo*.⁴⁸

- Proteína A: ésta se une al receptor Fc de los anticuerpos generando un efecto inmunoinvasivo que inhibe la activación de la vía clásica del sistema de complemento, genera la destrucción de los polimorfonucleares neutrófilos inhibiendo la fagocitosis, permite la adherencia de la bacteria a las plaquetas, interfiere con la señalización del factor de necrosis tumoral (TNF) sobre los macrófagos y células epiteliales, activa el interferón tipo I, componente esencial en el desarrollo de biopelícula, y se encuentra asociada a infecciones como neumonía.⁴⁹⁻⁵¹
- En esta fase de adhesión, para que estas proteínas interactúen y se unan a las superficies bióticas o abióticas deben estar expuestas a fluidos corporales, inicialmente se da una integración reversible entre interacciones hidrofóbicas, la carga de la superfi-

cie de la célula, fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrodinámicas y la modificación de la superficie por la adsorción de moléculas extracelulares, como complemento, fibrinógeno, fibronectina, vitonectina, sales inorgánicas del huésped, lo que genera una unión débil.⁵²

- Para que se establezca una adherencia fuerte se requieren las uniones de los receptores específicos del huésped, así como de las interacciones moleculares de la estructura de la bacteria, como pilis, fimbrias, cápsula. Por lo tanto, la adhesión se encuentra altamente influenciada por factores que incluyen las condiciones de flujo y ambientales, la disponibilidad de oxígeno, las propiedades de la bacteria, la calidad de los nutrientes en el sitio de adherencia y las de la superficie tanto del biomaterial como del tejido del huésped (figura 3).⁵³

Figura 3
Etapas de formación de la biopelícula: 1. adhesión; 2. producción de biopolímeros extracelulares; 3. maduración de la biopelícula; 4. desprendimiento y colonización



Segunda fase: maduración

Teniendo en cuenta que la formación de la biopelícula es un proceso altamente dinámico y se desarrolla paso a paso, en esta fase los microorganismos se organizan en pequeños

agregados, que pueden formarse a partir de una sola bacteria seguido de un crecimiento clonal o por comportamientos colectivos que incluyen una multiplicación y aglomeración

bacteriana estructurada, separadas por canales llenos de líquido, los cuales son importantes tanto para la regulación de la transferencia de masa como de nutrientes y distribución espacial de solutos, así como la presencia de gradientes de oxígeno y pH dentro de la biopelícula.^{54,55}

Matriz extracelular

Estos agregados polimicrobianos se encuentran encapsulados en una matriz extracelular, generalmente producida por los mismos microorganismos, compuesta por un conglomerado de diferentes tipos de biopolímeros llamados sustancias poliméricas extracelulares (SPE); se generan microambientes dependientes del pH, lo que incrementa la movilidad bacteriana y como consecuencia el metabolismo bacteriano favorece la formación o el rompimiento de la biopelícula. Los SPE constituyen una gran porción de la biomasa, que puede contener proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, los cuales hacen que se presente una estructura tridimensional cuyas funciones se pueden clasificar en adhesión, cohesión, retención de agua, barrera protectora, adsorción de compuestos orgánicos e inorgánicos, actividad enzimática, fuente de nutrientes, intercambio de información genética, aceptor y donador de electrones y exportación de componentes bacterianos, entre otros.^{56,57}

Operon *ica* *ADBC* y su gen regulador *ica* *R*

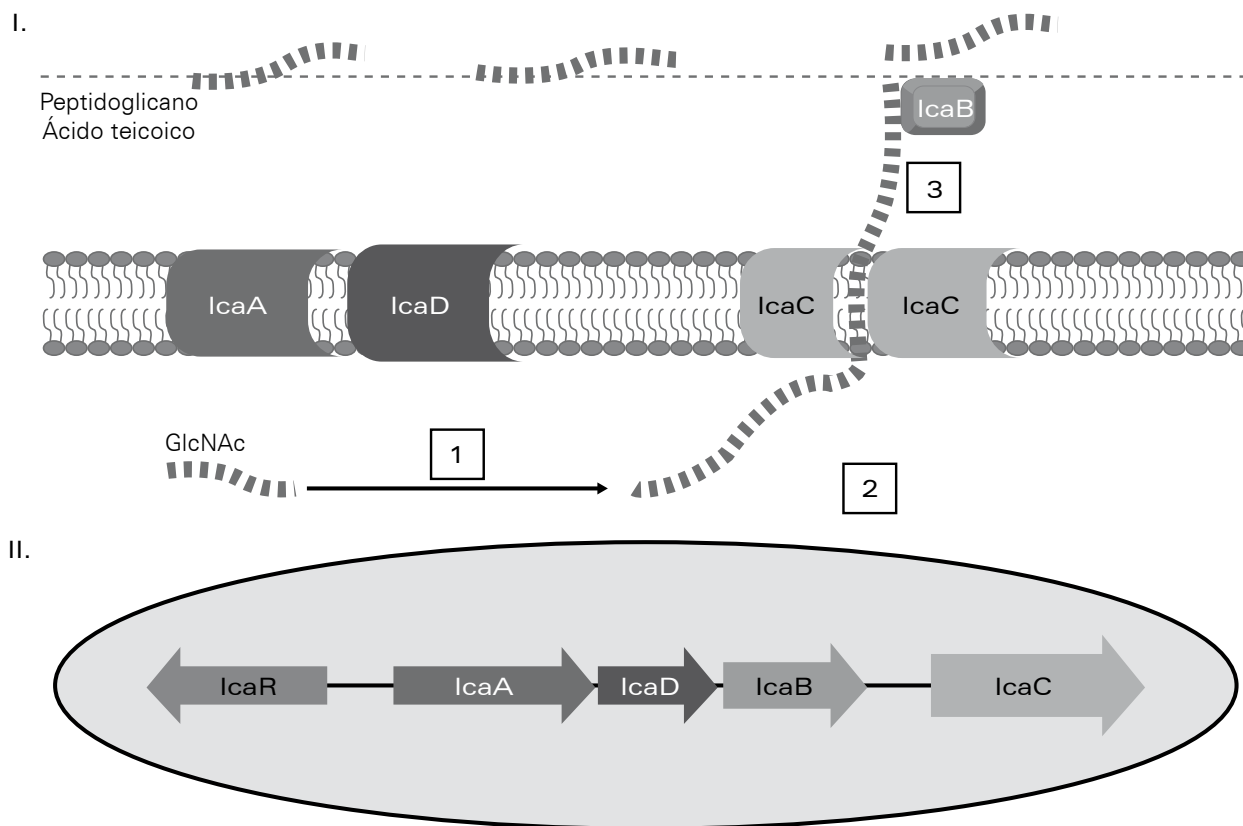
En los *Staphylococcus* sp. la SPE se encuentra conformada por ADN-extracelular, filamentos o fibrillas de amiloides, y el principal componente de la matriz es el polisacárido de adhesión intracelular (PIA), donde el incremento de temperatura, la osmolaridad, la anaerobiosis, la glucosa y el etanol pueden inducir e incrementar la producción de PIAs, contribuyendo de esta manera a la virulencia, resistencia de la biopelícula.⁵⁸

El PIA está conformado por dos fracciones: la fracción 1 (80%) está constituida por enlaces β -1,6 de poli N-acetil-glucosaminoglicano (PGNA), parcialmente deacetilada por la acumulación bacteriana y cargada positivamente debido a residuos no acetilados, posee además aproximadamente 130 residuos 2-deoxy-2-amino-D-glucopiranosil; la fracción 2 es en parte aniónica, cuenta con grupos fosfato y éster enlazados a succinato, con pocos residuos de D-glucosamina no N-acetilados, factor importante en la formación de la biopelícula y su expresión es regulada por los genes del operon *ica* *ADBC*.^{59,60}

El gen clúster *ica* *ADBC* es el responsable de la síntesis de PIA; está compuesto de cinco genes que codifican sus respectivas proteínas: *IcaA*, *IcaB*, *IcaC* e *IcaD*, encargadas de acoplar el exopolisacárido más abundante de la biocapa, donde cada uno de ellos presenta las siguientes funciones⁶¹ (figura 4).

Figura 4

I: Exportación de la cadena de PGNA por acción de la proteína de membrana. *IcaC*: 1. El exopolisacárido poli-N-acetil-glucosamina (GlcNAc) es sintetizado por la GlcNAc transferasa *IcaA*, requiere de la proteína de membrana *IcaD*. 2. Exportación de la cadena creciente de PGNA por la proteína de membrana *IcaC*. 3. Eliminación de los grupos amino por acción de la desacetilasa *IcaB*. II: Operon *ica* *ADBC* y el gen *ica* *R*



- **IcaA:** codifica para la enzima catalítica que requiere de la proteína *icaD* para la actividad completa, actúan como enzimas transmembranales, específicamente como N-acetil-glucosaminiltransferasa, utiliza UDP- glucosamina (UDP-GlcNAc) para construir N-acetilglucosamina (GlcNAc) no ramificada, es primordial en la estructura de la biopelícula con una longitud de hasta 15 a 20 residuos en el interior de la célula bacteriana.
- **IcaB:** codifica para la proteína de superficie celular que contribuye en la formación de cadenas poliméricas de más de 30 residuos, permitiendo que éstas puedan quedar ancladas a la membrana, colaborando de esta manera en la agregación y formación de la biopelícula. Contiene una señal de secuencia típica para codificar proteínas extracelulares que son secretadas cuando el microorganismo se encuentra en condiciones especiales de crecimiento (medios de cultivo, superficies de polímeros, etcétera).
- **IcaC:** codifica para la molécula que se encuentra en mayor cantidad en la membrana celular, está involucrada en la exportación a la superficie celular de los residuos que son sintetizados.
- **IcaR:** regulador represor negativo, principal responsable de la síntesis de PIA a través de la transcripción completa del operon *icaADBC*, en asociación de diversas moléculas reguladoras. Su secuencia completa fue reportada en 2005 (disponible para su consulta NC 002976), así como su estructura cristalizada.⁶²

Este regulador de 22 kDa pertenece a la familia de proteínas represoras de tetraciclina (TetR) caracterizadas por estar involucradas en la activación o represión de transcripción de genes; al igual que ellas, *IcaR* es un homodímero predominantemente α helicoidal, en el cual las α hélices 2 y 3 conforman su dominio N-terminal de unión al ADN con un motivo hélice-giro-hélice (HTH), donde la cavidad de cada motivo está cargada negativamente y se encuentra constituida por aminoácidos no polares; por otro lado, las α hélices 4 a 9 cercanas al extremo C-terminal contribuyen a la dimerización.⁶²

Si bien PIA representa el principal mecanismo de formación de biopelícula en *S. aureus* y *S. epidermidis*, numerosos estudios han mostrado la existencia especialmente en *S. aureus* de formas alternativas independientes de PIA, en ausencia del *locus ica*, algunos como e-ADN y ácidos teicocicos en la matriz de la biopelícula, y proteínas como Bap, SasC, FNBPA y FNBPB.⁶³⁻⁶⁷

Tercera fase: dispersión

El paso final en la biopelícula es el desprendimiento de las células bacterianas, donde fuerzas mecánicas relacionadas con el flujo sanguíneo, interrupción de los exopolisacáridos, factores enzimáticos o surfactantes pueden llegar a destruir la SPE para favorecer la diseminación y colonización del patógeno en nuevas superficies durante los procesos infecciosos, y el estímulo de otros factores de virulencia, como la resistencia a los antibióticos.

Estrategias antibiopelícula

En los últimos años, con el incremento de la resistencia bacteriana asociada a la biopelícula, las investigaciones se

han orientado a descubrir nuevos compuestos naturales, sintéticos o biológicos enfocados a disminuir el tiempo de exposición a las infecciones y los costos que ocasionan estos pacientes hospitalizados.⁶⁸

La nanotecnología, como una alternativa, se considera promisorio en las infecciones bacterianas debido a la flexibilidad en sus síntesis y su posible función como una droga citotóxica, especialmente las que se encuentran unidas a la plata (Ag), presentan actividad antimicrobial porque tienen la capacidad de impedir la replicación del ADN o bloquear la cadena respiratoria de la bacteria, además sirven para inhibir la formación de biopelícula en altas concentraciones, permiten penetrar en una biopelícula madura y su efectividad estará no sólo sobre las bacterias que están en la superficie, sino en las capas más profundas.⁶⁹

Sin embargo, los resultados de su eficacia han sido contradictorios, pues la adhesión parece depender de la organización espacial y de las nanocaracterísticas. Además, las superficies pueden ser químicamente modificadas por adición de nanopartículas como hierro, plata, zinc o titanio. Muchas de éstas ejercen actividad antimicrobiana por interacciones electrostáticas con la membrana de la bacteria, las cuales permiten la alteración de la misma.⁷⁰

Otras estrategias antibiopelícula incluyen:

- **Proteínas DNABII:** a estas proteínas se les ha atribuido la capacidad de facilitar la formación de estructuras en forma de tejido o malla conformadas por el ADN extracromosomal proveniente de la biopelícula producida por *Haemophilus influenzae* durante el transcurso de una infección. Las proteínas que hacen parte de esta estructura se dividen en dos subtipos, la HU y la HIF, y han sido postuladas como blanco para crear una vacuna, ya que las proteínas DNABII juegan un papel importante en el mantenimiento estructural de la biopelícula. Adicionalmente, la utilización de una vacuna anti-HIF en conjunto con amoxicilina ha mostrado una clara acción bactericida.⁷¹
- **Degradación de PIA:** algunas bacterias producen una enzima denominada dispersin B que degrada el enlace beta de la N-acetil-glucosamina del PIA. Esta enzima ha sido encontrada en *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y se le ha atribuido un efecto potencial antibiopelícula, mediante el desensamblaje de la misma en muchas cepas de *S. epidermidis* y *S. aureus*.⁷²
- **Lisostafina:** esta enzima degrada el peptidoglicano de los estafilococos. La forma de acción no es bien conocida, pero se cree que la matriz extracelular producida por cocos Gram positivos puede tener moléculas que hacen parte de la pared celular, sobre las cuales actúa la lisostafina.⁷³
- **Proteínasa K, tripsina y DNasa:** la proteínasa K y la tripsina fácilmente pueden alterar la biopelícula en *S. epidermidis*, destruyendo proteínas de la biopelícula en superficies inertes. Además, la DNasa I también ha tenido éxito en el desensamblaje de la biopelícula en *S. aureus*, destruyendo el ADN extracelular presente en las biopelículas. Este hallazgo contribuye como

evidencia de que las proteínas DNABII y el eDNA son importantes componentes estructurales de la matriz de la biopelícula.^{74,75}

- Recubrimiento de la superficie de dispositivos médicos: se ha propuesto cubrir los dispositivos médicos con antibióticos u otras sustancias antibacterianas como estrategia para alterar la superficie del dispositivo. Estos enfoques han tenido un éxito limitado, por los diversos mecanismos de resistencia bacteriana; por esta razón, los esfuerzos deben enfocarse tanto en los estudios básicos moleculares de formación de biopelícula, como en las diferentes estrategias para su control.⁷⁶
- Vacuna antiPIA y antiproteínas de unión a la fibronectina (LPXTG): se han producido sueros antiPIA que utilizan anticuerpos tipo IgG1 y varias proteínas de la superficie, como proteínas de unión a la fibronectina (LPXTG) A y B, pero sólo se ha demostrado su eficacia en modelos de infección animal.^{77,78}
- Vacuna antiácido lipoteicoico: consiste en un anticuerpo tipo IgG dirigido contra el ácido lipoteicoico de los estafilococos. El ácido lipoteicoico interviene en la adherencia de la bacteria a la fibronectina. Esta vacuna ha mostrado una buena actividad en neonatos, y se encuentra en fase de validación para su utilización generalizada.⁷⁹
- Alginato liasa: es una enzima producida por *P. auriginosa* utilizada para degradar polímeros de la matriz de la biopelícula durante la etapa de maduración. Se ha demostrado que al utilizar esta enzima junto con DNasa y con medicamentos como la amikacina, aumenta notablemente la acción del antimicrobiano sobre las bacterias que conviven en la biopelícula. También puede ser útil para el tratamiento de la fibrosis quística, donde se acumula polisacárido alginato en los pulmones de las personas infectadas por la *Pseudomonas auriginosa*.^{80,81}
- Óxido nítrico: es resultado del metabolismo anaerobio bacteriano, y se ha demostrado que sirve como señal de dispersión de las bacterias que conviven en la biopelícula. Cuando se metaboliza, el nitroprusiato de sodio produce óxido nítrico. La utilización del nitroprusiato interviene en el desprendimiento de las colonias formadas en la biopelícula y potencia los tratamientos con antibióticos.^{82,83}
- Quorum sensing: como mecanismo de producción de factores de virulencia, lo que implica la producción de biopelícula como respuesta a la poca actividad de agr en su efecto regulador de biopelícula. Se ha evidenciado en superficies abióticas la capacidad de inducir el sistema agr para inhibir la formación de la biopelícula. Del mismo modo, se conoce que los factores de virulencia agr-dependientes tienen su verdadera importancia en superficies bióticas al momento de inducir infección, lo que conlleva a realizar más estudios *in vivo*.⁸⁴
- A101: es un polisacárido capsular que está presente en *Vibrio* sp.; este exopolisacárido, compuesto por galacturónico, ácido glucurónico, ramnosa y glucosamina, inhibe la formación de biopelículas

en una amplia gama de bacterias Gram negativas y Gram positivas, sin poseer actividad antibacteriana.

- A101 tiene la capacidad de afectar la biopelícula ya producida por *Pseudomonas aeruginosa*, e inhibe la interacción de la superficie celular de *S. aureus*. Esta molécula se está probando para el recubrimiento de dispositivos médicos.⁸⁵
- Exoproductos bacterianos: las *Pseudoalteromonas* sp. son conocidas como productoras de varios compuestos extracelulares biológicamente activos, incluyendo agentes antibacterianos. Un ejemplo es la proteína ABPP, que juega un papel importante en la última etapa de formación de biopelícula en medios marinos. ABPP ha demostrado que induce la alteración en la biopelícula producida por bacterias Gram negativas, además de afectar la viabilidad celular de las bacterias que conviven en ésta.⁸⁶⁻⁸⁸

Las cepas de *E. coli* productoras de cápsulas del grupo II liberan un polisacárido que previene la formación de biopelículas en bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Este polisacárido actúa tanto en la adhesión inicial al debilitar los contactos de la superficie celular como en la posterior formación de biopelícula mediante la reducción de interacciones célula-célula. Un lipopéptido obtenido a partir de una cepa de *Bacillus circulans* de origen marino, demostró propiedades antiadhesivas contra diversas bacterias, pero su efecto en la formación de biopelículas todavía no se ha investigado.⁸⁹

Por otra parte, se encontró que los extractos de *Kingella kingae* inhiben la biopelícula de los siguientes microorganismos: *Aggregatibacter actinomycetem comitans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* y *K. kingae*. En estos casos, la biopelícula se pudo inhibir gracias a la modificación de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de la célula, específicamente, a nivel de la matriz de la biopelícula y el sustrato, mediante la actividad de un polisacárido. En la estructura del extracto se encuentran dos polisacáridos: un polisacárido lineal con la estructura $\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-GlcNAc p} - (1 \rightarrow 5)-\beta\text{-D-Ocl a p} - (2 \rightarrow$, idéntico a un polisacárido capsular producido por *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 5; adicionalmente, un polisacárido lineal, designado PAM galactano, el cual muestra propiedades de surfactante que inhibe la formación de biopelículas en diversas bacterias y hongos.⁹⁰

Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAM) y su actividad de amplio espectro hace de ellos una alternativa promisoría, están conformados por pocos aminoácidos (12-50 aa) con carga neta de +2 a +9, que cuando se unen a un sitio alostérico de una enzima, disminuye o incrementa su actividad, presentan un carácter anfipático o catiónico y actúan directamente sobre la membrana celular o en varios sitios target. Las investigaciones de los PAM se ha expandido durante las últimas décadas, y se han encontrado reportados en la base de datos Antimicrobial Peptide Database, APD2 (<http://aps.unmc.edu/AP>), 2 600 péptidos naturales o sintéticos, además el incremento de los péptidos con actividad

antibiopelícula ha promovido la creación de una respectiva base de datos BaAMPS (<http://www.baamps.it>) enfocada en la interacción de los PAM tanto con los componentes de la pared celular como con la membrana celular.⁹¹

En los organismos vivos, estos péptidos son parte de la respuesta inmune innata y actúan como defensa del huésped modulando las respuestas de éste dirigidas hacia el ataque o muerte de las bacterias, afectando funcionalmente al microorganismo como en la síntesis de proteínas o inhibiendo su replicación. Los PAM son producidos por células como los polimorfonucleares neutrófilos, los macrófagos, entre otros, los cuales producen PAM de menos de 200 aminoácidos con un alto potencial para uso clínico, ya que ejerce múltiples mecanismos de acción sobre el agente infeccioso, amplio espectro de actividad y bajo potencial de resistencia. Uno de los péptidos más reconocidos es la catelicidina humana LL-37, la cual inhibe la formación de biopelícula en *Pseudomonas*.⁹²

Según su estructura y su composición, los PAM se clasifican en lineales, alfa hélice, y según su carga en aniónicos o catiónicos; y los aminoácidos que lo componen se clasifican en: péptidos con predominio de un aminoácido (prolina, triptofano, arginina, histidina); péptidos con predominio alfa helicoidales con región anfipática (cecropina, maganina, LL-37); péptidos con estructura β -plegada con

predominio de puentes disulfuro intramoleculares; péptidos con estructura extendida; péptidos con estructura de bucle (*loop*) por un puente disulfuro.⁸⁴

Otras investigaciones a través del mundo han sido enfocadas en explorar el conocimiento y su aplicabilidad de los péptidos derivados de fuentes naturales, como de vertebrados, invertebrados, plantas, hongos y bacterias. Algunos péptidos han demostrado ser más inmunomoduladores que con actividad antimicrobiana; el término péptidos antimicrobianos (PAM) se utiliza cuando éste contribuye con las defensas del huésped y presenta actividad inmunomoduladora.⁸⁵

Existen más de dos mil PA reportados en la base de datos Antimicrobial Peptide, y han sido clasificados con base en sus características de longitud, carga, estructura e hidrofobicidad, tales características están dirigidas a incrementar la actividad antimicrobiana, reducir la toxicidad y hacer que éstos resistan la degradación proteolítica por las proteasas del huésped,⁸⁶ la optimización de los PAM ha sido orientada hacia la inhibición de la biopelícula y probados en diferentes escenarios clínicos, incluyendo infecciones orales, tejidos lesionados por quemaduras, y en catéteres médicos, los cuales tienen la habilidad de prevenir la formación de biopelícula, reducir la biomasa y eliminar células microbiales que se encuentran dentro de la biopelícula.⁸⁷⁻⁹⁰

Referencias

1. Otto, M., "Staphylococcus epidermidis pathogenesis", *Methods Mol Biol*, 2014, 1106: 17-31.
2. Tenover, F.C., Gaynes, R.P. Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferreri, J.J., Portnoy, D.A. y Rood, J.I., "The epidemiology of Staphylococcus aureus infections", en *Gram-positive pathogens*, ASM Press, Washington, 2000, pp. 414-421.
3. Jones, R.N., "Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001)", *Semin Respir Crit Care Med*, 2003, 24: 121-134.
4. N'Diaye, A., Mijouin, L., Hillion, M., Díaz, S., Konato-Ghiorgi, Y., Percoco, G. et al., "Effect of substance P in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis virulence: implication for skin homeostasis", *Front Microbiol*, 2016, 7: 506.
5. Chessa, D., Ganau, G. y Mazzarello, V., "An overview of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus with a focus on developing countries", *J Infect Dev Ctries*, 2015, 9: 547-550.
6. Kleerebezem, M. y Quadri, L.E., "Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior", *Peptides*, 2001, 22: 1579-1596.
7. Monnet, V., Juillard, V. y Gardan, R., "Peptide conversations in Gram-positive bacteria", *Crit Rev Microbiol*, 2014, 8: 1-13.
8. Jayaraman, A. y Wood, T.K., "Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease", *Annu Rev Biomed Eng*, 2008, 10: 145-167.
9. Tsai, C.S. y Winans, S.C., "LuxR-type quorum-sensing regulators that are detached from common scents", *Mol Microbiol*, 2010, 77, 1072-1082.
10. Jiménez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H. y Quax, W.J., "The multiple signaling systems regulating virulence in pseudomonas aeruginosa", *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76: 46-65.
11. Fetzner, S., "Quorum quenching enzymes", *J Biotechnol*, 2015, 201: 2-14.
12. Burnside, K. y Rajagopal, L., "Aspects of eukaryotic-like signaling in Gram-positive cocci: a focus on virulence", *Future Microbiol*, 2011, 6: 747-761.
13. Song, L., Sudhakar, P., Wang, W., Conrads, G., Brock, A., Sun, J. et al., "A genome-wide study of two-component signal transduction systems in eight newly sequenced mutansstreptococci strains", *BMC Genomics*, 2012, 13: 128.
14. Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A. y Novick, R.P., "Regulation of exoprotein gene expression in Staphylococcus aureus by agr", *Mol Gen Genet*, 1986, 202: 58-61.
15. Le, K.Y. y Otto, M., "Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview", *Front Microbiol*, 2015, 6: 1174.
16. Lyon, G.J. y Novick, R.P., "Peptide signaling in Staphylococcus aureus and other Gram-positive bacteria", *Peptides*, 25, 1389-1403.
17. Zhang, L., Gray, L., Novick, R.P. y Ji, G., "Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in Staphylococcus aureus", *J Biol Chem*, 2002, 277: 34736-34742.
18. Saenz, H.L., Augsburger, V., Vuong, C., Jack, R.W., Götz, F. y Otto, M., "Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone", *Arch. Microbiol*, 2000, 174: 452-455.
19. Waters, C.M. y Bassler, B.L., "Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria", *Annu Rev Cell Dev*

- Biol*, 2005, 21: 319-346.
20. Jayaraman, A., Wood, T.K., "Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease", *Annu Rev Biomed Eng*, 2008, 10: 145-167.
21. Davies, D.G., "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm", *Science*, 1998, 280: 295-298.
22. Boles, B.R. y Horswill, A.R., "Staphylococcal biofilm disassembly", *Trends Microbiol*, 2011, 19: 449-455.
23. França, A., Carvalhais, V., Vilanova, M., Pier, G.B. y Cerca, N., "Characterization of an in vitro fed-batch model to obtain cells released from *S. epidermidis* biofilms", *AMB Express*, 2016, 6 (1): 23.
24. Hermanowicz, S.W., "A simple 2D biofilm model yields a variety of morphological features", *Math Biosci*, 2001, 169: 1-14.
25. Donlan, R.M. y Costerton, J.W., "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms", *Clin. Microbiol*, 2002, 15: 167-193.
26. Yao, Y., Sturdevant, D.E. y Otto, M., "Genome-wide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms", *J Infect Dis*, 2005, 191: 289-298.
27. Vandecasteele, S.J., Peetermans, W.E., Carbonez, A. y Van Eldere, J., "Metabolic activity of *Staphylococcus epidermidis* is high during initial and low during late experimental foreign-body infection", *J Bacteriol*, 2004, 186: 2236-2239.
28. Murakami, H., Matsumaru, H., Kanamori, M., Hayashi, H. y Ohta, T., "Cell wall-affecting antibiotics induce expression of a novel gene, *drp35*, in *Staphylococcus aureus*", *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 264: 348-351.
29. Yarwood, J.M., McCormick, J.K. y Schlievert, P.M., "Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*", *J Bacteriol*, 2001, 183: 1113-1123.
30. Conlon, P., Geoghegan, J.A., Waters, E.M., McCarthy, H., Rowe, S.E., Davies, J.R. *et al.*, "A role for the A-domain-ofun processed accumulation associated protein (Aap) in the attachment phase of the *Staphylococcus epidermidis* biofilm phenotype", *J Bacteriol*, 2014, 196: 4268-4275.
31. Bose, J.L., Lehman, M.K., Fey, R.D. y Bayles, K.W., "Contribution of the *Staphylococcus aureus* AtlA and GLmureinhydrolase activities in cell division autolysis, and biofilm formation", *PLOS ONE*, 2012, 7: e42244.
32. Gross, M., Cramton, S.E., Gotz, F. y Peschel, A., "Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces", *Infect Immun*, 2001, 69: 3423-3426.
33. Weidenmaier, C. y Peschel, A., "Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram positive physiology and host interactions", *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 276-287.
34. Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T.J. y Geoghegan, J.A., "Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*", *Front Cell Infect Microbiol*, 2014, 4: 171.
35. Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K. y Hook, M., "Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*", *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 49-62.
36. Montanaro, L., Speziale, P., Campoccia, D., Ravaioli, S., Cangini, I., Pietrocola, G., Giannini, S. y Arciola, C.R., "Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics", *Future Microbiol*, 2011, 6: 1329-1349.
37. Anderson, A.S., Scully, I.L., Buurman, E.T., Eiden, J. y Jansen, K.U., "Staphylococcus aureus clumping factor a remains a viable vaccine target for prevention of *S. aureus* infection", *M Bio*, 2016, 8 (7): e000225.
38. Hair, P.S., Echague, C.G., Sholl, A.M., Watkins, J.A., Geoghegan, J.A., Foster, T.J. y Cunnion, K.M., "Clumping factor A interaction with complement factor i increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis", *Infect Immun*, 2010, 78: 1717-1727.
39. Barbu, E.M., Ganesh, V.K., Gurusiddappa, S., Mackenzie, R.C., Foster, T.J., Sudhof, T.C. y Höök, M., "beta-Neurexin is a ligand for the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM SdrC", *PLOS Pathog*, 2010, 6: e1000726.
40. Zhang, X., Wu, M., Zhuo, W., Gu, J., Zhang, S., Ge, J. y Yang, M., "Crystal structures of Bbp from *Staphylococcus aureus* reveal the ligand binding mechanism with fibrinogen α ", *Protein Cell*, 2015, 6: 757-766.
41. Herman-Bausier, P. y Dufrêne, Y.F., "Atomic force microscopy reveals a dual collagen-binding activity for the staphylococcal surface protein SdrF", *Mol Microbiol*, 2016, 99: 611-621.
42. Bowden, M.G., Heuck, A.P., Ponnuraj, K., Kolosova, E., Choe, D., Gurusiddappa, S., Narayana, S.V., Johnson, A.E. y Höök, M., "Evidence for the 'dock, lock, and latch' ligand binding mechanism of the staphylococcal microbial surfacecomponent recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) SdrG", *J Biol Chem*, 2008, 283: 638-647.
43. Corrigan, R.M., Miajlovic, H. y Foster, T.J., "Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells", *BMC Microbiol*, 2009, 9: 22.
44. Xu, Y., Rivas, J.M., Brown, E.L., Liang, X. y Höök, M., "Virulence potential of the staphylococcal adhesin CNA in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen", *J Infect Dis*, 2004, 189: 2323-2333.
45. Mascari, L.M. y Ross, J.M., "Quantification of staphylococcal-collagen binding interactions in whole blood by use of a confocal microscopy shear-adhesion assay", *J Infect Dis*, 2003, 188: 98-107.
46. Herman-Bausier, P., El-Kirat-Chatel, S., Foster, T.J., Geoghegan, J.A. y Dufrêne, Y.F., "Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein a mediates cell-cell adhesion through low-affinity homophilic bonds", *M Bio*, 2015, 26 (6): e00413-415.
47. Burke, F.M., Di Poto, A., Speziale, P. y Foster, T.J., "The A domain of fibronectin-binding protein B of *Staphylococcus aureus* contains a novel fibronectin binding site", *FEBS J*, 2011, 278: 2359-2371.
48. Yu, S., Zhang, H., Yao, D., Liu, W., Wang, X., Chen, X. *et al.*, "Identification of CD4(+) T-cell epitopes on iron-regulated surface determinant B of *Staphylococcus aureus*", *Microb Pathog*, 2015, 89: 108-113.
49. Whitehouse, J., Flaxman, A., Rollier, C., O'Shea, M.K., Fallowfield, J., Lindsay, M. *et al.*, "Population variation in anti-*S. aureus* IgG isotypes influences surface protein A mediated immune subversion", *Vaccine*, 2016, 34 (34): 1792-1799.
50. Martin, F.J., Gómez, M.I., Wetzel, D.M. *et al.*, "Staphylococcus aureus activates type I IFN signaling in mice and humans through the Xr repeated sequences of protein", *A J Clin Invest*, 2009, 119: 1931-1939.
51. Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M. *et al.*,

- "Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*", *J Bacteriol*, 2009, 191: 832-843.
52. Dunne, W.M., "Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?", *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15: 155-166.
 53. Pavithra, D. y Doble, M., "Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants: issues and prevention", *Biomed Mater*, 2008, 3: 034003.
 54. Pintelon, T.R., Picioreanu, C., Van Loosdrecht, M.C. y Johns, M.L., "The effect of biofilm permeability on bio-clogging of porous media", *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 1031-1042.
 55. Stacy, A., McNally, L., Darch, S.E., Brown, S.P. y Whiteley, M., "The biogeography of polymicrobial infection", *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14: 93-105.
 56. Stewart, E.J., Ganesan, M., Younger, J.G. y Solomon, M.J., "Artificial biofilms establish the role of matrix interactions in staphylococcal biofilm assembly and disassembly", *Sci Rep*, 2015, 5: 13081.
 57. Flemming, H.C. y Wingender, J., "The biofilm matrix", *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8: 623-633.
 58. Cue, D., Lei, M.G. y Lee, C.Y., "Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci", *Front Cell Infect Microbiol*, 2012, 2: 38.
 59. Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaioli, S. y Montanaro, L., "Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects", *Front Cell Infect Microbiol*, 2015, 5: 7.
 60. Otto, M., "Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections", *Semin Immunopathol*, 2012, 34: 201-214.
 61. Rohde, H., Frankenberger, S., Zähringer, U. y Mack, D., "Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesion (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial associated infections", *Eur J Cell Biol*, 2010, 89: 103-111.
 62. Ruiz de los Mozos, I., Vergara-Irigaray, M., Segura, V., Villanueva, M., Bitarte, N., Saramago, M. *et al.*, "Basw pairing interaction between 5'-and 3'-UTRS controls icaR mRNA translation in *Staphylococcus aureus*", *PLoS Genet*, 2013, 9: e1004001.
 63. Geoghegan, J.A., Corrigan, R.M., Gruszka, D.T., Speziale, P., O'Hara, J.P., Potts, J.R., *et al.*, "Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*", *J Bacteriol*, 2010, 192: 5663-5673.
 64. Costerton, J.W., Stewart, P.S. y Greenberg, E.P., "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections", *Science*, 1999, 284: 1318-1322.
 65. Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E. *et al.*, "Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*", *J Bacteriol*, 2009, 191: 832-843.
 66. O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D.A., Loughman, A. *et al.*, "A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FNBPA and FNBPB", *J Bacteriol*, 2008, 190: 3835-3850.
 67. Whelan, F. y Potts, J.R., "Two repetitive, biofilm-forming proteins from *Staphylococci*: from disorder to extension", *Biochem Soc Trans*, 2015, 43: 861-866.
 68. Fridkin, S.K., Edwards, J.R., Tenover, F.C., Gaynes, R.P. y McGowan, J.E. Jr., "Antimicrobial resistance prevalence rates in hospital antibiograms reflect prevalence rates among pathogens associated with hospital-acquired infections. Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) Project. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Hospitals", *Clin Infect Dis*, 2001, 33: 324-330.
 69. Ramasamy, M., Lee, J.H. y Lee, J., "Potent antimicrobial and antibiofilm activities of bacteriogenically synthesized gold-silver nanoparticles against pathogenic bacteria and their physicochemical characterizations", *J Biomater Appl*, 2016, 31: 366-378.
 70. Padmavathi, A.R. y Pandian, S.K., "Antibiofilm activity of biosurfactant producing coral associated bacteria isolated from gulf of mannar", *Indian J Microbiol*, 2014, 54: 376-382.
 71. Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. y Lewis, K., "Persister cells and tolerance to antimicrobials", *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 230: 13-18.
 72. Kaplan, J.B., Ragunath, C., Ramasubbu, N. y Fine, D.H., "Detachment of actinobacillus actinomycetem comitans biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity", *J Bacteriol*, 2003, 185: 4693-4698.
 73. Chaignon, P., Sadovskaya, I., Ragunath, Ch., Ramasubbu, N., Kaplan, J.B. y Jabbouri, S., "Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition", *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75: 125-132.
 74. Boles, B.R. y Horswill, A.R., "Staphylococcal biofilm disassembly", *Trends Microbiol*, 2011, 19: 449-455.
 75. Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B. y Kaplan, J.B., "Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms", *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 470-476.
 76. Otto, M., "Staphylococcal biofilms", *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, 322: 207-228.
 77. Kelly-Quintos, C., Cavacini, L.A., Posner, M.R., Goldmann, D. y Pier, G.B., "Characterization of the opsonic and protective activity against *Staphylococcus aureus* of fully human monoclonal antibodies specific for the bacterial surface polysaccharide poly-N-acetylglucosamine", *Infect Immun*, 2006, 74: 2742-2750.
 78. Provenza, G., Provenzano, M., Visai, L., Burke, F.M., Geoghegan, J.A., Stravalaci, M., Gobbi, M., Mazzini, G., Arciola, C.R., Foster, T.J. y Speziale, P., "Functional analysis of a murine monoclonal antibody against the repetitive region of the fibronectin-binding adhesins-fibronectin-binding protein A and fibronectin-binding protein B from *Staphylococcus aureus*", *FEBS J*, 2010, 277: 4490-4505.
 79. Weisman, L.E., Thackray, H.M., García-Prats, J.A., Nessim, M., Schneider, J.H., Fretz, J. *et al.*, "Phase 1/2 double-blind, placebo-controlled, dose escalation, safety, and pharmacokinetic study of pagibaximab (BSYX-A110), an antistaphylococcal monoclonal antibody for the prevention of staphylococcal bloodstream infections, in very-low-birth-weight neonates", *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 2879-2886.
 80. Alipour, M., Suntres, Z.E. y Omri, A., "Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*", *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64: 317-325.
 81. Alkawash, M.A., Sothill, J.S. y Schiller, N.L., "Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms", *APMIS*, 2006, 114: 131-138.
 82. Barraud, N., Hassett, D.J., Hwang, S.H., Rice, S.A., Kjelleberg, S. y Webb, J.S., "Involvement of nitric oxide

- in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*", *J Bacteriol*, 2006, 188: 7344-7353.
83. Kaplan, J.B., "Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses", *J Dent Res*, 2010, 89: 205-218.
 84. Thoendel, M., Kavanaugh, J.S., Flack, C.E. y Horswill, A.R., "Peptide signaling in the staphylococci", *Chem Rev*, 2011, 111: 117-151.
 85. Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y. y Yu, W., "Antibiofilm activity an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. ou101", *PLoS One*, 2011, 7 (6): e18514.
 86. Dheilly, A., Soum-Soutéra, E., Klein, G.L., Bazire, A., Compère, C., Haras, D. y Dufour, A., "Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6", *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 3452-3461.
 87. Das, P., Mukherjee, S. y Sen, R., "Antiadhesive action of a marine microbial surfactant", *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2009, 71: 183-186.
 88. Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P. y Ghigo, J.M., "Broad-spectrum bio-film inhibition by a secreted bacterial polysaccharide", *Proc Nat Acad Sci*, 2006, 103: 12558-12563.
 89. Lohner, K., "Membrane-active antimicrobial peptides as template structures for novel antibiotic agents", *Curr Top Med Chem*, 2016 [epub ahead of print].
 90. Ribeiro, S.M., Felício, M.R., Boas, E.V., Gonçalves, S., Costa, F.F., Samy, R.P., Santos, N.C. y Franco, O.L., "New frontiers for anti-biofilm drug development", *Pharmacol Ther*, 2016, pii: S0163-7258(16)00035-8.
 91. Burnside, K. y Rajagopal, L., "Aspects of eukaryotic-like signaling in Gram-positive cocci: a focus on virulence", *Future Microbiol*, 2011, 6: 747-761.
 92. Gedik, A.H., Cakir, E., Gokdemir, Y., Uyan, Z.S., Kocyigit, A., Torun, E., Karadag, B., Ersu, R. y Karakoc, F., "Cathelicidin (LL37) and human α 2-defensin levels of children with post-infectious bronchiolitis obiterans", *Clin Respir J*, 2015, DOI: 10.1111/crj.12331.