

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

La mayoría de las bacterias son capaces de formar biopelículas aunque la composición de éstas y las condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo varían de acuerdo al tipo y cepa bacteriana (Lasa et al., 2005). De primera instancia fue importante comprobar los tiempos de generación de cada bacteria para que concordaran con los tiempos de incubación propuestos para los posteriores experimentos y se observó que la fase de crecimiento inició a partir de las 4 horas y se prolongó hasta las 12 horas de incubación, obteniéndose tiempos de generación entre 2 y 6 horas, lo que permitió que el crecimiento de las bacterias fuera abundante en los tiempos de incubación propuestos.

Las 4 cepas que se utilizaron, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*; demostraron la capacidad de formar biopelículas bajo las condiciones propuestas en ambas superficies, vidrio y polietileno; ya que la polaridad de la superficie, los tipos de interacciones y moléculas de adhesión varían de acuerdo a la superficie (metal, cristal, polietileno, mineral, etc.), sin embargo es indispensable que se establezca esta unión para la formación de biopelículas. No existen diferencias significativas en la formación de biopelículas de cada bacteria en vidrio (Figuras 5-8). En lo que respecta a la densidad óptica sólo existieron diferencias significativas ($p < 0.5$) en *K. pneumoniae* (mayor a D.O. 0.2) y *P. aeruginosa* (mayor a D.O. 0.2 y temperatura de 37°C). En lo referente a los tiempos de incubación, las diferencias significativas ($p < 0.5$) se presentan principalmente a las 48 horas de incubación donde la producción de biopelícula se ve incrementada. En la prueba cuantitativa en superficie de polietileno (Figuras 9-12) no existen diferencias significativas

en los tiempos de incubación ni las temperaturas para ninguna de las bacterias, datos no mostrados; particularmente *S. epidermidis* y *K. pneumoniae* presentan diferencias significativas ($p < 0.5$) en la densidad óptica, ya que la primera se desarrolla mejor a 0.2 mientras que la segunda se favorece a 0.3.

Las bacterias, como mecanismo de supervivencia, han desarrollado estrategias que les permite captar el hierro en su forma Fe^{3+} del ambiente y de proteínas como la transferrina y lactoferrina, estas moléculas que captan el hierro son llamadas sideróforos y su producción está regulada por la presencia de hierro en el medio en que se encuentre la bacteria (Simões et al., 2007); altas concentraciones de hierro inhibe la síntesis y liberación de los sideróforos, mientras que la disminución del hierro causa un aumento en la producción de los sideróforos (Moelling et al., 2007).

El proceso de captación de hierro implica que los sideróforos, que poseen una alta afinidad por el hierro (Fe^{3+}) con constantes de afinidad mayores a 10^{30} (Narrillos Rodríguez, 2014), se unan al hierro disponible en el medio y estos complejos sean transportados al interior de la bacteria a través de sistemas transportadores dependientes de ATP, en el citoplasma a través de la enzima ferri-sideróforo reductasa el Fe^{3+} se transforma en Fe^{2+} (Contreras, 2013) que fácilmente se disocia del complejo y está disponible para el uso o almacenamiento de la bacteria (Figura 25). Las proteínas que se encargan de transportar el hierro al interior de las bacterias se encuentran bajo la regulación de los genes de la caja *fur* (o análogos, dependiendo de la bacteria), región altamente conservada en el genoma bacteriano (Contreras, 2013), los cuales a su vez son regulados por las concentraciones intracelulares de hierro; la proteína Fur en presencia de Fe^{2+} forma un complejo que se une a la caja *fur* y reprime la transcripción de estos genes, por lo tanto un ambiente rico en hierro

impide la producción de sideróforos mientras que la escasez de hierro estimula la expresión de los genes y producción de sideróforos, como se ha demostrado en *P. aeruginosa* y la síntesis de Pioverdina, molécula con capacidad para secuestrar al hierro (Banin et al., 2005; Lin et al., 2012; Musk et al., 2005).

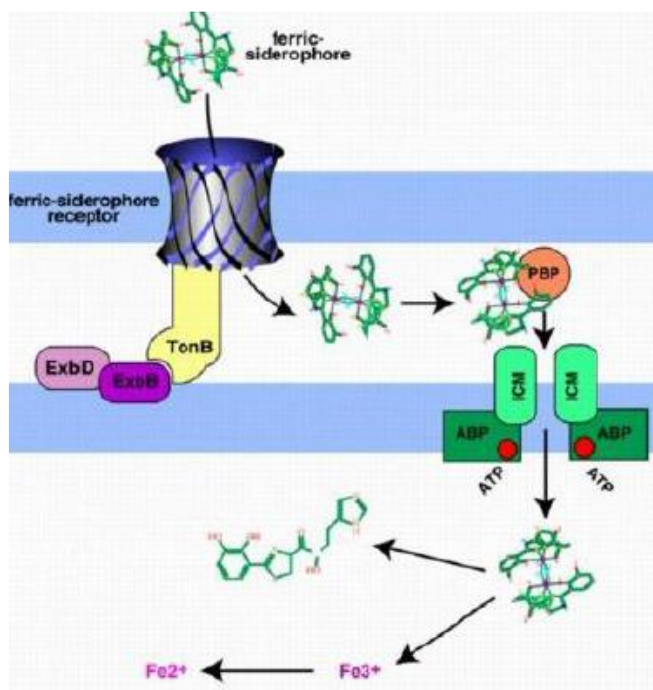


Figura 25: Mecanismo de captación de hierro en bacterias mediado por sideróforos (Narrillos Rodríguez, 2014).

El hierro es un componente crucial para el desarrollo bacteriano, implicado en múltiples procesos como producción de energía, síntesis de nucleótidos, expresión de genes y patogenicidad (Berlutti et al., 2004) mediante la expresión de factores de virulencia como la producción de pioverdina y pioquelina en *P. aeruginosa*, la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae*, toxina I tipo Shiga de *E. coli* enterohemorrágica y la toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae* (Simões et al., 2007). Debido al rol que desempeña el hierro en el crecimiento bacteriano, se ha propuesto considerar el metabolismo del hierro como una posible terapia antimicrobiana basada en la quelación (Gentile et al., 2014). En años recientes

se ha identificado el papel del hierro en la formación de biopelículas implicado en la adhesión y fijación a la superficie, motilidad, estabilización de la matriz extracelular de polisacáridos y la transformación de las células en fase plactónica (Chhibber et al., 2013); el hierro es requisito para la formación de biopelículas de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *S. epidermidis*, *Mycobacterium smegmatis* (Chhibber et al., 2013; Lin et al., 2012; Ojha & Hatfull, 2007), la presencia del hierro impide formación de biopelículas de *S. mutans* y *Legionella sp.* (Berlutti et al., 2004; Lin et al., 2012), por otro lado la formación de biopelículas de *Acinetobacter baumannii*, *Actinomyces naeslundii* y *C. albicans* (Gentile et al., 2014; Hameed et al., 2008; Moelling et al., 2007) es independiente del hierro presente en el medio, mientras que el papel del hierro en las biopelículas de *S. aureus* ha demostrado resultados tanto positivos como negativos (Lin et al., 2012) por lo que el campo de investigación queda abierto para determinar el rol del hierro y su relación con las biopelículas.

Los primeros ensayos de formación de biopelículas con base a la disponibilidad de hierro (Figuras 13 a 16), en los cuales el medio fue únicamente suplementado con concentraciones de cloruro férrico que van desde los 50 a 1000 μM , demostraron que sí existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones usadas por cada bacteria, coincidiendo en que la mayor formación de biopelícula se encuentra a 50 y/o 1000 μM de hierro. Recordemos que el hierro es un componente estructural de los citocromos mitocondriales debido a que este metal posee la capacidad de donar y recibir electrones (implicación en la cadena de transporte de electrones) y por ello tiene la capacidad de inducir la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la reacción de Fenton (Hameed et al., 2008; Ojha & Hatfull, 2007) como se ha demostrado a través del

uso de nanopartículas de óxido de hierro (Thukkaram et al., 2014) provocando lesiones, muerte celular y disrupción de la biopelícula por el daño del estrés oxidativo, lo que explicaría la reducción de las biopelículas al aumentar el hierro (capítulo V, apartado 5a) y el comportamiento de las biopelículas de *P. aeruginosa* (Figura 16), similar a lo que observaron Musk et al. donde a 250 μM y 48 horas se interrumpe la formación de biopelícula.

Los experimentos posteriores se realizaron utilizando un quelante de hierro para remover la disponibilidad de este metal y comprobar el efecto que tiene el hierro en la formación de biopelículas al ir añadiendo distintas cantidades de hierro (Figuras 17-20). La primera parte del experimento consistió en observar si hubo una disminución en la formación de biopelículas por el efecto del hierro como se describió en el ensayo anterior. El crecimiento de las bacterias presentó un fenómeno de *swarming* similar al que desarrollan especies de *Proteus*, el crecimiento bacteriano en la placa fue menor al que se observa en un antibiograma convencional y para cuantificarlo se tomó un inóculo de cada bacteria para preparar la densidad óptica adecuada para la formación de la biopelícula (capítulo V, apartado 3). Lo primero en notar es que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los tiempos de incubación ya que a las 12 y 24 horas la formación de biopelícula es nula, lo que podría atribuirse a múltiples causas: 1) los requerimientos bacterianos de hierro se encuentran en el orden de 10^{-7} g (Berlutti et al., 2004) lo que implica que las bacterias se desarrollaron en medios ricos en hierro y su abundancia está provocando la producción de ROS y la muerte de las bacterias; 2) a las 24 horas es muy probable que las bacterias hayan consumido la mayoría de los nutrientes del medio (Vital-López et al., 2015) a la par que se generan compuestos de desecho y ROS que dificultarían el crecimiento. A las 48 horas se observó la formación de biopelículas debido a que la concentración del hierro ha

disminuido permitiendo el crecimiento de las bacterias, además el hierro y la generación de ROS causa un ambiente hostil y condiciones de estrés que provoca la agregación de las bacterias que termina eventualmente en la formación de una biopelícula, similar a lo que sucede con *S. mutans* donde la deficiencia de hierro en el medio también estimula un ambiente de estrés que lleva a la agregación bacteriana y promueve la formación de biopelículas (Berlutti et al., 2004); por otro lado el crecimiento bacteriano es posible debido a que las nuevas células pueden obtener su alimento de los restos de las bacterias muertas y nutrientes que queden presentes aún en el medio. Finalmente el hierro estimula la producción de polisacáridos como se ha observado en *S. mutans* y *C. diphtheriae* (Moelling et al., 2007) siendo estos el componente mayoritario del EPS es lógico asumir que ello promueve la formación de biopelículas; mientras que las bacterias embebidas en una biopelícula muestran un incremento en el metabolismo de glicoproteínas, polisacáridos, síntesis de peptidoglicanos, metabolismo de purinas y vía de pentosas fosfato (Vital-López et al., 2015) consistente con el enunciado anterior y el aumento de los polisacáridos en la formación de biopelículas. Los resultados son consistentes con los obtenidos anteriormente en que a la menor concentración de hierro (50 μM) se observa la mayor formación de biopelícula y conforme se aumenta la concentración tiende a disminuir seguramente por la producción de ROS; no obstante, en los bacilos Gram negativos se obtuvieron resultados inversos ya que *K. pneumoniae* sufrió una disminución en su formación de biopelícula y *P. aeruginosa* no se vio afectada por la presencia de hierro.

Es importante considerar no sólo la capacidad de formación de biopelículas sino también el grosor y extensión de la biopelícula, a pesar de que dicho experimento no se llevó a cabo. Como se menciona anteriormente las condiciones de estrés de las bacterias juega un

papel determinante en la formación de la biopelícula ya que como mecanismo de supervivencia las bacterias tienden a juntarse y adherirse, tanto en situaciones donde exista un exceso o una falta de hierro. No obstante la presencia del hierro es crucial para determinar el tipo de biopelícula que se forma, en el caso de que el metal se encuentre ausente o su disponibilidad sea limitada se forma una biopelícula delgada (Berlutti et al., 2004) que puede ser fácilmente removible (el hierro también está implicado en la producción de EPS y la adherencia a la superficie), en contraste con las biopelículas convencionales que se adhieren fuertemente a la superficie (mayor presencia de EPS) que son difíciles de erradicar. La presencia del hierro *per se* no es suficiente para estimular la formación de la biopelícula tradicional, es necesario que la bacteria cuente con los mecanismos de captación de hierro (transporte activo de complejo sideróforo-Fe³⁺) ya que de lo contrario las células exhibirán un fenotipo diferente, dificultará su crecimiento y tenderán a formar biopelículas delgadas y removibles (Simões et al., 2007).

En el caso de *P. aeruginosa* y muchas otras bacterias formadores de biopelículas se ha demostrado que la inhibición de las biopelículas se presenta tanto por la ausencia como por el exceso de hierro (Musk et al., 2005; Simões et al., 2007), aunque los mecanismos implicados son diferentes. En contraste, en modelos de *S. aureus* se ha demostrado que el hierro puede actuar inhibiendo la formación de biopelículas al igual que estimular su producción, dependiendo del tipo de cepa y los mecanismos de respuesta al hierro (García et al., 2015; Lin et al., 2012); de tal manera se puede decir que los diferentes efectos del hierro sobre las biopelículas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* observados en este trabajo son dependientes del tipo de respuesta que desarrollen las bacterias por el ambiente en que se encontraron (hierro suplementado y quelante-hierro suplementado).