



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Estudio de las interacciones bacterianas en biofilms polimicrobianos
formados por especies prevalentes en infecciones de úlceras de pie
diabético y evaluación de la eficacia antibiofilm del tratamiento
combinado de antibióticos y terapia fotodinámica**

Tesis para optar por el título de doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de
Química Biológica

Autor: Lic. Florencia Mariani

Director: Dra. Estela M. Galvan

Consejero de estudios: Dra. Ángeles Zorreguieta

Laboratorio de Patogénesis Bacteriana

Centro de Estudios Biomédicos Básicos, Aplicados y Desarrollo (CEBBAD)

Universidad Maimónides

Buenos Aires, Agosto 2025

RESUMEN

Las infecciones de úlceras de pie diabético (UPD) presentan mezclas complejas de especies bacterianas coexistiendo en biofilms. A pesar de su relevancia, el conocimiento sobre las interacciones entre las especies bacterianas dentro de los biofilms es limitado. Estas infecciones son difíciles de tratar, demandan altas dosis de antibióticos y presentan una elevada tasa de fracaso terapéutico. Esta tesis doctoral, mediante una colaboración con el Lab. de Microbiología del Hospital de Clínicas (UBA), evidenció una alta prevalencia de *Enterococcus faecalis* en UPD polimicrobianas, siendo esta especie frecuentemente co-aislada con *Escherichia coli*, *Morganella morganii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se investigó también el efecto de las interacciones inter-especies sobre el crecimiento bacteriano en biofilms utilizando el modelo de macrocolonia en medio Lubbock-glucosa agarizado, simulando las condiciones de la herida de piel. Ensayos de formación de biofilms duales *E. faecalis*/*E. coli*, *E. faecalis*/*M. morganii* y *E. faecalis*/*P. aeruginosa* evidenciaron la capacidad de coexistencia de éstas en biofilms. Las tres especies gram-negativas (*E. coli*, *M. morganii* y *P. aeruginosa*) presentaron similar número de células viables en macrocolonias mixtas con *E. faecalis* que en biofilms monomicrobianos. Por otra parte, *E. faecalis* vio favorecido su crecimiento en biofilms mixtos con *E. coli* y con *P. aeruginosa* respecto a biofilms simples (1 Log₁₀ y entre 2-4 Log₁₀ de incremento en el número de células viables, respectivamente). Finalmente, en búsqueda de alternativas terapéuticas antibiofilm, se evaluó la combinación de antibióticos con terapia fotodinámica (TFD) sobre biofilms simples y mixtos de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*. Se observó una drástica disminución en la viabilidad de *P. aeruginosa* en biofilms simples y mixtos expuestos de manera secuencial a amikacina (25-100 µg/ml) por 24 h, luego a TFD utilizando 600 µM azul de metileno activado por luz LED roja (λ_{max} 639 nm, irradiancia 44 Wm⁻²) por 2 h, y nuevamente a amikacina por 24 h. Estos tratamientos aplicados de manera individual no tuvieron la misma efectividad. Tampoco se observó pérdida de viabilidad de *E. faecalis* cuando el tratamiento combinado incluyó el uso de ampicilina (75 µg/ml). En conjunto, los resultados obtenidos representan un avance en la comprensión de las interacciones bacterianas en infecciones asociadas a UPD, revelando la capacidad de *E. faecalis* para beneficiarse de su coexistencia con *P. aeruginosa* en biofilms mixtos bajo condiciones que simulan el microambiente de las heridas. Asimismo, se demuestra el potencial de la TFD combinada con antibióticos como estrategia innovadora para el control de *P. aeruginosa* en infecciones polimicrobianas en biofilms.

Palabras clave: biofilms, macrocolonia, infección, terapia fotodinámica.

Study of bacterial interactions in polymicrobial biofilms formed by prevalent species in diabetic foot ulcer infections and evaluation of the antibiofilm efficacy of combined antibiotic and photodynamic therapy.

ABSTRACT

Diabetic foot ulcer (DFU) infections present complex mixtures of bacterial species coexisting in biofilms. Despite their relevance, the knowledge about the interactions between different bacterial species within biofilms is limited. Moreover, these infections are difficult to treat, require high antibiotic doses, and exhibit a high rate of therapeutic failure. In this doctoral thesis, through a collaboration with the Microbiology Laboratory of the Hospital de Clínicas (UBA), a high prevalence of *Enterococcus faecalis* was found in polymicrobial DFU infections, with this species frequently co-isolated with *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The effect of interspecies interactions on bacterial growth in biofilms was also investigated using the macrocolony model on Lubbock-glucose agar medium, which simulates the conditions of a skin wound. Dual biofilm formation assays of *E. faecalis*/*E. coli*, *E. faecalis*/*M. morganii*, and *E. faecalis*/*P. aeruginosa* demonstrated the ability of these species to coexist in biofilms. The three Gram-negative species (*E. coli*, *M. morganii*, and *P. aeruginosa*) exhibited a similar number of viable cells in mixed macrocolonies with *E. faecalis* and in single-species biofilms. On the other hand, *E. faecalis* showed enhanced growth in mixed biofilms with *E. coli* and *P. aeruginosa* compared to single-species biofilms (an increase of 1 Log₁₀ and between 2-4 Log₁₀ in the number of viable cells, respectively). Finally, in the search for alternative antibiofilm therapies, the combination of antibiotic treatment with photodynamic therapy (PDT) was evaluated on single and mixed biofilms of *P. aeruginosa* and *E. faecalis*. A drastic reduction in *P. aeruginosa* viability was observed in both single and mixed biofilms exposed sequentially to amikacin (25-100 µg/ml) for 24 hours, followed by PDT using 600 µM methylene blue activated by red LED light (λ_{max} 639 nm, irradiance 44 Wm⁻²) for 2 hours, and subsequently another 24-hour exposure to amikacin. In contrast, these treatments applied individually were ineffective. No significant loss of *E. faecalis* viability was observed when the combined treatment included ampicillin (75 µg/ml). Overall, the results obtained represent an advance in understanding bacterial interactions in DFU-associated infections, revealing the ability of *E. faecalis* to benefit from its coexistence with *P. aeruginosa* in mixed biofilms under nutritional conditions that partially mimic the microenvironment of these wounds. Furthermore,

this study demonstrates the potential of PDT combined with antibiotics as an innovative strategy for controlling *P. aeruginosa* in polymicrobial biofilm infections.

Keywords: biofilms; macrocolony, infections, photodynamic

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Estela Galvan, por permitirme realizar este doctorado a su lado, brindandome los recursos y el espacio para aprender y potenciarme.

A la universidad Universidad Maimónides, que me otorgó parte del financiamiento y donde tambien pude desarrollarme como docente.

A los integrantes del CEBBAD, con quienes comparti grandes charlas y recuerdos, logrando que estos años transcurridos sean algo inolvidable.

A la Dra. Silvia Moreno, quien siempre tuvo palabras de apoyo y compartió generosamente su experiencia.

A Nicolas, que desde el primer día fue un gran compañero y amigo. Contar con su paciencia, apoyo y escucha fue clave para llegar hasta acá.

A Ana, mi primer amiga en CABA, que logro hacerme sentir en casa, con quien tengo las mejores anécdotas y quien me presto el hombro incontable cantidad de veces. No hay palabras suficientes para describir la importancia de su amistad.

A Andrea, Cintia, y Santiago, por ser parte de los mejores y peores momentos.

A mi hermana, que me aguantó hasta el cansancio durante estos últimos años.

Y, por último, y lo mas importante: a mis PAPÁS y a mi hermano quienes más creen en mí. Sin su apoyo incondicional, nada de este proceso hubiera sido posible. Gracias por nunca dudar y darme siempre su confianza. Esta tesis es también suya.

PUBLICACIONES:

Los resultados del presente trabajo han sido publicados en:

- ◆ **Mariani F.**, Juarez G.E., Barberis C., Veiga F., Vay C., Galvan EM. (2023) Interspecies interactions in mixed-species biofilms formed by *Enterococcus faecalis* and gram-negative bacteria isolated from polymicrobial diabetic foot ulcers. *Biofouling*, 39(5):579-590. [DOI: 10.1080/08927014.2023.2236949](https://doi.org/10.1080/08927014.2023.2236949).
- ◆ **Mariani F.**, Costilla C.R., Oppezzo O., Galvan E.M. Effect of combined antibiotic treatment and methylene-blue-activated-photodynamic therapy on *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* biofilms from diabetic foot ulcers. Manuscrito en preparación.

ABREVIATURAS

- AKN: amikacina
- AM: azul de metileno
- AMP: ampicilina
- CBM : concentración bactericida mínima
- CIM: concentración inhibitoria mínima
- CV: Cristal violeta
- DO: densidad óptica
- Ec: *Escherichia coli*
- Ef: *Enterococcus faecalis*
- FS: fotosensibilizador
- LB: Luria-Bertani
- MH : Mueller Hinton
- Mm: *Morganella morganii*
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- Pa: *Pseudomonas aeruginosa*
- SEM: microscopía electrónica de barrido
- TFD: Terapia fotodinámica
- TSA: tripteína soja agar (*tryptic soy broth agar*)
- TSB: tripteína soja caldo (*tryptic soy broth*)
- UFC: unidades formadoras de colonias
- UPD: úlcera de pie diabético

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
AGRADECIMIENTOS:.....	5
PUBLICACIONES:.....	6
ABREVIATURAS.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Infecciones polimicrobianas mediadas por biofilms.....	10
1.2 Generalidades de los biofilms.....	11
1.3 Etapas del desarrollo de biofilms.....	12
1.4 Interacciones interespecíficas en biofilms polimicrobianos.....	15
1.4.1 Interacciones benéficas.....	17
1.4.2 Interacciones competitivas.....	18
1.5 Diabetes Mellitus e infecciones de úlceras de pie de diabético.....	19
1.6 <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Morganella morganii</i> : microorganismos reportados en infecciones polimicrobianas de heridas.....	21
1.6.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	21
1.6.2 <i>Escherichia coli</i>	21
1.6.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
1.6.4 <i>Morganella morganii</i>	23
1.7 El biofilm como factor de cronicidad en heridas infectadas.....	24
1.7.1 Cronicidad debido a la tolerancia al sistema inmune del hospedador.....	24
1.7.2 Cronicidad debido a la tolerancia a agentes antimicrobianos.....	25
1.8 La terapia fotodinámica antimicrobiana como estrategia alternativa para el manejo de infecciones en heridas.....	26
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
2.1 Hipótesis de trabajo.....	30
2.2 Objetivo general.....	30

2.3 Objetivos específicos:	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 Estudio microbiológico sobre infecciones de úlceras de pie diabético (UPD)	31
3.2 Aislados bacterianos utilizados en experimentos in vitro	31
3.3 Medios y condiciones de cultivo	34
3.4 Formación de biofilms en placas multipocillo y determinación de biomasa por tinción con cristal violeta	36
3.5 Formación de biofilms en macrocolonias	36
3.6 Desarrollo de cultivos planctónicos	37
3.7 Cuantificación de células cultivables	37
3.8 Determinación de concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas sobre cultivos planctónicos de <i>E. faecalis</i> y <i>P. aeruginosa</i>	38
3.9 Desafío de biofilms en macrocolonia con antibióticos y terapia fotodinámica	39
3.9.1 Tratamiento con antibióticos	39
3.9.2 Aplicación de terapia fotodinámica	39
3.9.3 Aplicación combinada de antibióticos con terapia fotodinámica	40
3.10 Observación de biofilms en macrocolonia mediante microscopía electrónica de barrido	40
3.11 Análisis estadísticos	40
4. RESULTADOS	42
<u>4.1 CAPÍTULO 1: Estudio observacional prospectivo sobre infecciones en UPD</u>	<u>42</u>
4.1.1. Especies aisladas de muestras monomicrobianas	42
4.1.2. Especies aisladas de muestras polimicrobianas	45
<u>4.2 CAPÍTULO 2: Interacciones interespecies en biofilms mixtos formados por bacterias aisladas de UPD polimicrobianas</u>	<u>50</u>
4.2.1 Análisis de la capacidad formadora de biofilms de las especies más prevalentes en UPD polimicrobianas	50
4.2.2 Biofilms mixtos de <i>E. faecalis</i> / <i>E. coli</i> : coexistencia de ambas especies y mejor crecimiento de <i>E. faecalis</i> en presencia de <i>E. coli</i>	54
4.2.3 <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Morganella morganii</i> exhiben interacción neutral en biofilms	

mixtos.....	61
4.2.4 <i>P. aeruginosa</i> favorece el crecimiento de <i>E. faecalis</i> en biofilms mixtos.....	66
<u>4.3 CAPÍTULO 3: Evaluación del uso combinado de antibióticos y terapia fotodinámica para combatir biofilms de <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. faecalis</i>.....</u>	<u>73</u>
4.3.1 Susceptibilidad de biofilms al tratamiento con antibiótico.....	73
4.3.2 Susceptibilidad de biofilms al tratamiento fotodinámico.....	78
4.3.3 Susceptibilidad de biofilms al tratamiento combinado con antibióticos y terapia fotodinámica.....	80
4.3.4 Visualización del efecto de terapias antimicrobianas sobre biofilms mediante microscopía electrónica de barrido.....	85
5. DISCUSIÓN:.....	89
5.1 Prevalencia de microorganismos y resistencia a antibióticos en aislamientos provenientes de pacientes con infecciones de UPD en un hospital público de CABA.....	89
5.2 Interacciones inter-especies en biofilms mixtos formados por <i>E. faecalis</i> y bacterias Gram-negativas prevalentes en UPD polimicrobianas.....	92
5.3 Terapia fotodinámica combinada con antibióticos para combatir biofilms de <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. faecalis</i>	96
6. CONCLUSIONES:.....	100
7. PERSPECTIVAS.....	102
8. ANEXO.....	103
9. BIBLIOGRAFÍA.....	107

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones polimicrobianas mediadas por biofilms

La patogénesis bacteriana es causada por la alteración del balance normal de bacterias que habitan en individuos sanos (Levin & Antia, 2001). Dentro de este acervo microbiano, la colonización de algunos microorganismos puede influir en la colonización de los otros (Anju *et al.*, 2022). Las enfermedades polimicrobianas involucran múltiples organismos que actúan colectivamente para facilitar la progresión de la enfermedad. Aunque este fenómeno se describió a principios del siglo XX, los recientes avances tecnológicos en el diagnóstico han llevado a la apreciación de que muchas infecciones son mucho más complejas de lo que se creía originalmente (Doualeh *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2022; Adekoya *et al.*, 2025).

Se ha estimado que más del 80% de las infecciones bacterianas en humanos están correlacionadas con la formación de biofilms (también denominados biopelículas) (Fleming & Rumbaugh, 2017). Los biofilms bacterianos pueden provocar enfermedades en el cuerpo a través de infecciones relacionadas o no al uso de dispositivos médicos. Se han reportado infecciones causadas por biofilms que se encuentran asociados a componentes bióticos, como por ejemplo las infecciones crónicas de las vías respiratorias en pacientes con fibrosis quística, endocarditis de la válvula nativa, otitis media crónica, sinusitis crónica e infecciones crónicas de heridas en pacientes con diabetes; como así también se han descripto una gran cantidad de dispositivos médicos/prótesis que pueden ser blanco para el desarrollo de infecciones por biofilms (Wu *et al.*, 2015).

Las infecciones polimicrobianas que se establecen como biofilms pueden afectar distintas partes del cuerpo, como por ejemplo la cavidad bucal, el oído, el pulmón y las heridas de piel (Fig. 1) (Anju *et al.*, 2022). Se ha descripto que la superficie dental resulta apropiada para la adhesión de microorganismos; es así como *Streptococcus mutans*, el agente etiológico más común causante de caries dentales, promueve la coagregación de otras bacterias (tales como *Bifidobacterium* sp., y *Scardovia wiggsiae*) resultando en un biofilm polimicrobiano (Havsed *et al.*, 2021). En el caso de la otitis media, los microorganismos reportados en co-infecciones son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* en asociación también con diferentes virus (Vergison, 2008). Por otra parte, a nivel del pulmón y en particular en pacientes con fibrosis quística, patógenos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, entre otros, causan infecciones polimicrobianas en las vías aéreas (Van den Bossche *et al.*, 2021). Por último, las infecciones de heridas, que prosperan cuando la barrera epitelial se encuentra

comprometida por condiciones subyacentes del paciente (como por ejemplo la obesidad o la diabetes mellitus), suelen presentar naturaleza polimicrobiana. En capítulos posteriores se ahondará sobre esta problemática.

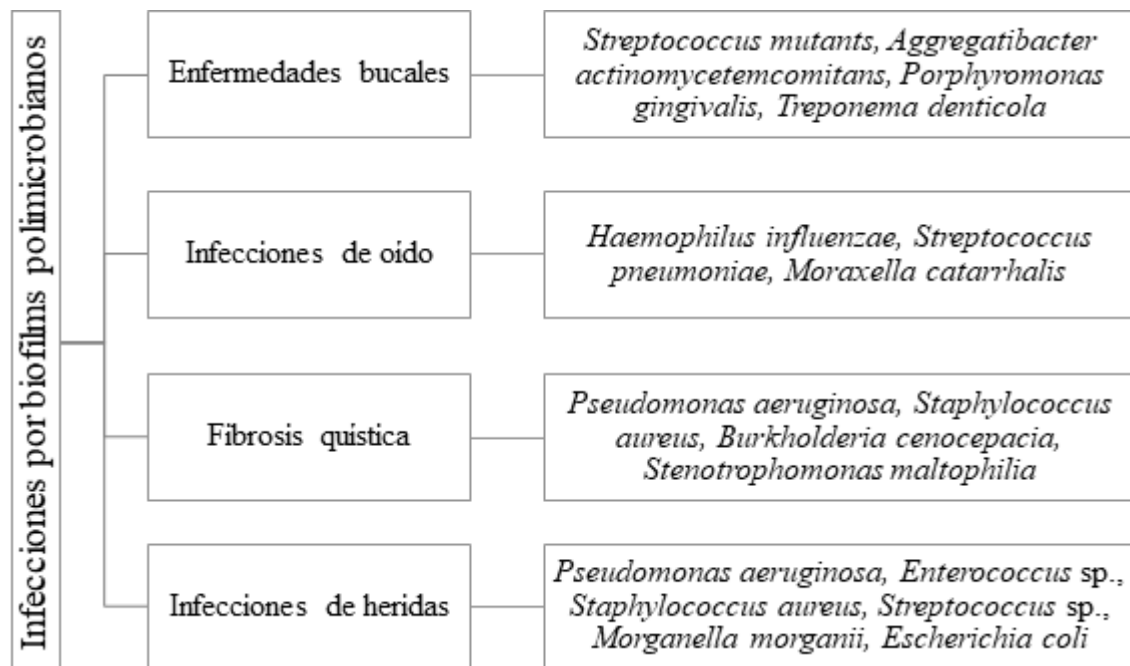


Figura 1. Diferentes infecciones causadas por biofilms polimicrobianos y los microorganismos involucrados. Adaptado de Anju *et al.*, 2022.

1.2 Generalidades de los biofilms

El biofilm se define como una comunidad sésil de microorganismos compuesta por células que se encuentran unidas irreversiblemente a un sustrato o interfaz o entre sí, que están embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares autoproducidas y que exhiben un fenotipo alterado en cuanto a su tasa de crecimiento y transcripción génica (Donlan & Costerton, 2002).

Los biofilms bacterianos pueden considerarse una forma emergente de vida bacteriana, en la que la vida comunitaria de las bacterias es muy diferente a la de las células en vida libre (planctónicas) (Fleming *et al.*, 2016). Pueden estar conformados por una única especie bacteriana (monomicrobianos o simples) o por dos o más especies (polimicrobianos o mixtos).

Los biofilms son ubicuos en la naturaleza y comprenden al 90% o más de todos los microorganismos conocidos (Rittman, 2018). Este fenotipo predomina en entornos naturales como así también en entornos productivos e industriales, siendo, por ejemplo, la causa principal de la bioincrustación en

la mayoría de los sistemas industriales (Little *et al.*, 2020). Además, todos los organismos superiores, incluidos los humanos, están colonizados por microorganismos que forman biofilms, los cuales pueden estar asociados con infecciones persistentes en plantas y animales, incluidos los humanos (Fleming *et al.*, 2016).

1.3 Etapas del desarrollo de biofilms

La formación de un biofilm es un proceso de desarrollo secuencial y altamente regulado, que involucra al menos cinco etapas fenotípicamente distintivas (Fig. 2); cada una de estas etapas presentan patrones únicos de expresión génica y producción de proteínas (Rumbaugh & Sauer, 2020).

Las etapas iniciales, que ocurren en las primeras horas, corresponden a la adhesión bacteriana a una superficie biótica o abiótica. En primer lugar se produce una unión reversible a la superficie a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas; esta unión es inestable y las células regresan con frecuencia a la fase líquida. Durante esta etapa entran en juego diferentes apéndices bacterianos (flagelos, pili y fimbrias). Posteriormente, la adhesión se hace irreversible cuando el efecto acumulativo de las interacciones que favorecen la adhesión de las bacterias a la superficie superan a las fuerzas de repulsión (Veerachamy *et al.*, 2014).

La siguiente etapa corresponde a la multiplicación y división celular, en donde se desarrollan las microcolonias que comienzan con la producción de sustancias poliméricas extracelulares. Esta etapa se continúa con el aumento de la biomasa (maduración del biofilm) que termina de consolidar la matriz con varias capas celulares estableciendo así las estructuras de comunicación dentro de los mismos y el funcionamiento de cada célula. Dicha matriz, además de actuar como una barrera ante agentes externos, posee canales por donde pueden circular tanto el agua como los nutrientes y los desechos celulares (Tolker-Nielsen & Molin, 2000). La composición de la matriz extracelular ha sido extensamente estudiada y se ha reportado que puede involucrar polisacáridos, proteínas, ADN extracelular y lípidos en distintas proporciones dependiendo de la especie bacteriana estudiada (Flemming *et al.*, 2023). La maduración del biofilm se lleva a cabo mediante la secreción de factores de señalización por parte de las células bacterianas adheridas, lo cual conduce a la expresión de genes específicos relacionados con el biofilm. Estos factores de señalización desempeñan un papel vital en el proceso de quórum sensing, que consiste en la capacidad de las células bacterianas para detectar la densidad celular a través de la comunicación célula a célula y en consecuencia modificar su expresión génica (Wolska *et al.*, 2016).

La dispersión es considerada como la etapa final del desarrollo del biofilm dado que marca el desprendimiento de bacterias desde el biofilm y la transición de estas células sésiles a células en crecimiento planctónico, lo cual facilita un nuevo ciclo de desarrollo de biofilm en nuevos sitios de colonización (Purevdorj-Gage *et al.*, 2005). Es entonces cuando la densidad de población aumenta y las señales de quórum alcanzan niveles suficientes que se activa la maduración y por último la dispersión del biofilms. Este último paso es crucial para permitir que las bacterias puedan colonizar nuevos nichos, para lo cual algunos de los integrantes del biofilm vuelven a adquirir características de células planctónicas y se desprenden. De este modo se logra diseminar la infección y comenzar nuevamente el ciclo de formación del biofilm (Sharma *et al.*, 2023).

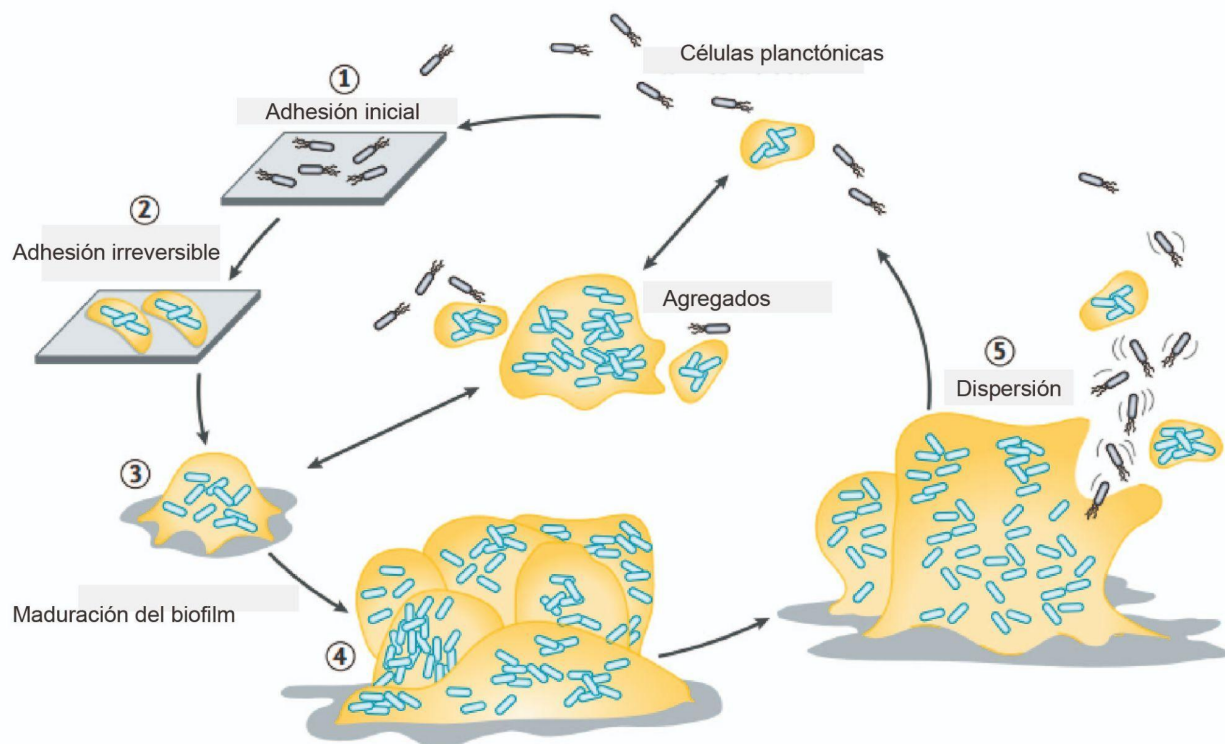


Figura 2. Etapas del desarrollo de un biofilm. La formación de biofilms es un proceso cíclico en el cual se pueden diferenciar cinco etapas. Inicia con una adhesión reversible de células planctónicas a la superficie (1), seguida de la adhesión irreversible (2). Luego, las bacterias se multiplican, formando microcolonias (3), seguido de su maduración (4). En la etapa de dispersión parte de la biomasa se desprende, liberando células bacterianas para iniciar el ciclo en otro lugar (5). En algunos casos existe también la formación de agregados que exhiben características similares a los biofilms aunque no estén adheridos a una superficie (panel del centro). Estos agregados pueden adherirse a la superficie o dispersarse (como indican las flechas). Adaptado de Rumbaugh & Sauer 2020.

1.4 Interacciones interespecíficas en biofilms polimicrobianos

Las bacterias en un consorcio de biofilms multi-especies se comunican principalmente a través de cuatro mecanismos altamente específicos: interacciones físicas, intercambio de material genético, redes metabólicas y señales difusibles, que en muchos casos sólo se producen cuando las respectivas especies bacterianas se encuentran en estrecha cercanía dentro de biofilms polimicrobianos (Joshi *et al.*, 2021). Estas comunicaciones interespecies pueden causar comportamientos sociales que pueden ser neutrales, cooperativos o competitivos para las especies involucradas (Burmølle *et al.*, 2014). Estos dos últimos tipos son los que configuran principalmente la organización y funcionalidad de una comunidad de biofilm multiespecie (Mariani & Galvan, 2023). Además, es importante tener en consideración la heterogeneidad espacial que puede encontrarse dentro de estos biofilms, donde pueden presentarse microambientes como consecuencia de la segregación espacial de las distintas especies dentro del biofilm y por la generación de diferentes gradientes químicos (O_2 , nutrientes, entre otros) (Fig. 3) (Røder *et al.*, 2020).

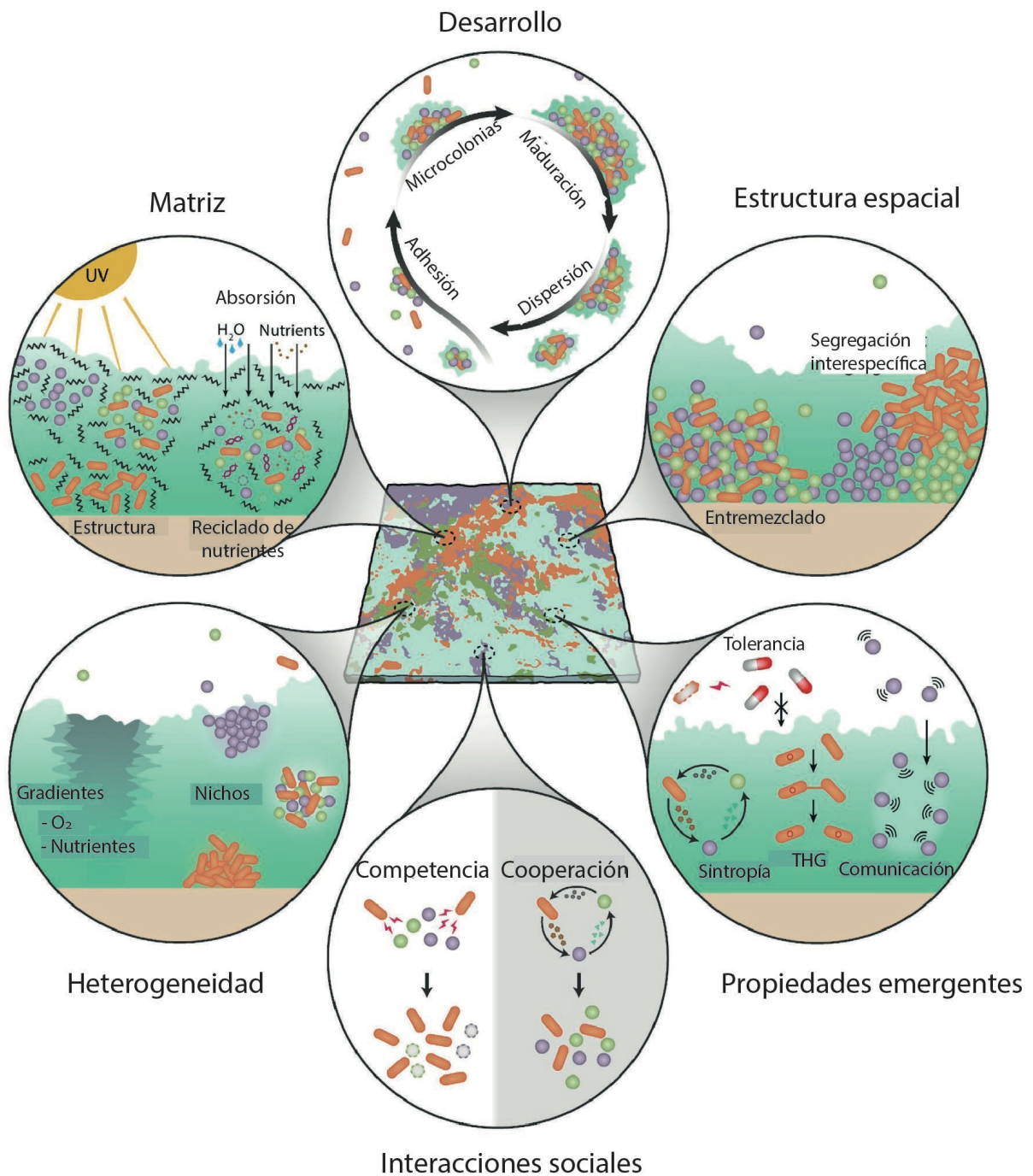


Figura 3. Actividades y propiedades emergentes que moldean la heterogeneidad en biofilms polimicrobianos. La ecología de las comunidades de biofilms, compuestas por pocas o numerosas especies, es compleja; las diversas actividades y procesos suelen estar vinculados, afectándose mutuamente a lo largo del espacio y a lo largo de las generaciones. El desarrollo de la comunidad crea e influye en la heterogeneidad. Los nichos y las distintas distribuciones espaciales de las células se desarrollan y se mantienen mediante gradientes y la formación de matrices. Por lo tanto, la forma en que interactúan los miembros de la comunidad depende en gran medida de la localización espacial en la estructura de la biopelícula. Adaptado de Røder *et al.*, 2020.

1.4.1 Interacciones benéficas

En los biofilms polimicrobianos, la sinergia y la cooperación entre las especies microbianas son importantes para mantener la coexistencia de diferentes microorganismos en el mismo nicho.

Un comportamiento que promueve la coexistencia de múltiples especies dentro de un biofilm ocurre cuando los microbios inician la cohesión y la coagregación mediante la producción de varias moléculas de adhesión que inducen interacciones intercelulares. La coagregación ha sido ampliamente estudiada en los biofilms que se desarrollan en la cavidad bucal, como ser la placa dental, y puede involucrar fimbrias, otras proteínas de superficie con propiedades adhesivas y polisacáridos extracelulares; por ejemplo, las fimbrias cortas de *Porphyromonas gingivalis* desempeñan un papel en la co-adhesión con *Streptococcus gordonii* (Park *et al.*, 2005).

Otra estrategia cooperativa importante se relaciona con las interacciones metabólicas, como la alimentación cruzada. Esto sucede cuando diferentes especies tienen acceso a sustratos nutritivos distintivos, y el producto del metabolismo de una especie puede utilizarse en la nutrición de otra. Un ejemplo es el de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Streptococcus gordonii*, bacterias aisladas de la cavidad oral humana. Se ha demostrado que *S. gordonii* puede secretar lactato como subproducto metabólico, y este lactato es utilizado como fuente de carbono preferida por *A. actinomycetemcomitans*, lo que favorece su crecimiento (Ramsey *et al.*, 2011).

La detección de quórum (quorum sensing), un tipo de señalización celular relacionada con la capacidad de detectar y responder a la densidad de población celular mediante la regulación génica, es importante en la formación de biofilms y la comunicación inter-especies. El quorum sensing actúa a través de pequeñas moléculas señalizadoras difusibles (autoinductores). Se ha reportado que el autoinductor 2 (AI-2), producido por *Enterococcus faecalis*, promueve comportamientos colectivos de *Escherichia coli* a densidades celulares más bajas, lo que mejora la autoagregación de *E. coli* y también conduce a la coagregación dependiente de la quimiotaxis entre las dos especies (Laganenka & Sourjik, 2018).

Además, dentro de los biofilms, diferentes especies de bacterias pueden utilizar la transferencia horizontal de genes para intercambiar genes resistentes a los antibióticos, lo que ayuda a toda la comunidad a sobrevivir a la exposición a los antibióticos (Madsen *et al.*, 2012). Los mecanismos de la transferencia horizontal de genes incluyen la conjugación, la transformación, la transducción, las vesículas de membrana y los agentes de transferencia génica. Por ejemplo, un estudio describió que un plásmido que alberga un gen de resistencia a la carbapenemasa (blaNDM-1) puede transferirse de *E. coli* a *P. aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii* mediante conjugación dentro de biopelículas de dos especies (Tanner *et al.*, 2017).

Finalmente, los microorganismos en biofilms polimicrobianos pueden beneficiarse mutuamente al secretar ciertas moléculas beneficiosas, como enzimas que inactivan agentes perjudiciales. Tal es el caso de los estudios que evidenciaron que la producción de beta-lactamasa por *Moraxella catarrhalis* proporciona protección pasiva a *Streptococcus pneumoniae* contra la destrucción por antibióticos betalactámicos, en el contexto de la otitis media (Perez *et al.*, 2014).

1.4.2 Interacciones competitivas

Las bacterias en biofilms mixtos deben coexistir y competir por un espacio limitado y nutrientes. La competencia entre especies se encuentra entre las interacciones predominantes en las comunidades microbianas. Las interacciones competitivas se clasifican en dos modalidades: explotadora y de interferencia. La primera se refiere a las interacciones indirectas entre organismos, mediante las cuales un organismo impide el acceso y/o limita el uso de recursos por parte de otro organismo, mientras que la segunda se relaciona con la producción de factores antagónicos para obstaculizar a los competidores (Rendueles & Ghigo, 2015).

En los biofilms, las bacterias viven en condiciones ambientales severas, caracterizadas por bajas concentraciones de nutrientes y bajas tasas de renovación o intercambio de gases. Debido a los requerimientos limitados de nutrientes, diferentes especies bacterianas compiten por ellos para sobrevivir. La competencia por el hierro ha sido ampliamente reportada y está relacionada con la producción de moléculas quelantes de hierro (sideróforos) por parte de los microorganismos (Burmølle *et al.*, 2014). Por ejemplo, se ha postulado que la competencia por el hierro modula la composición bacteriana de biofilms duales formados por cepas uropatógenas de *K. pneumoniae* y *E. coli*, promoviendo el crecimiento de *K. pneumoniae* en detrimento de *E. coli* (Juarez & Galvan, 2018).

Además, los subproductos metabólicos generados por un microorganismo pueden ser tóxicos para los organismos circundantes; en consecuencia, esto proporciona al primero una ventaja competitiva. Este fenómeno ha sido observado en biofilms mixtos que contienen al uropatógeno *Proteus mirabilis*, el cual produce altos niveles de amoníaco y otros compuestos volátiles que disminuyen drásticamente la viabilidad de otros uropatógenos Gram-negativos, como *K. pneumoniae* y *E. coli* (Juarez *et al.*, 2020). La competencia bacteriana también puede ser impulsada por la producción de pequeños compuestos antimicrobianos, como colicinas, microcinas y bacteriocinas. Se ha reportado que *E. coli* causa la muerte de *S. aureus* en modelos de infecciones polimicrobianas de heridas, a través de la producción de una genotoxina denominada colibactina (Wong *et al.*, 2022). También puede ocurrir inhibición del crecimiento bacteriano dependiente del contacto, la cual está mediada

por el sistema de secreción tipo 6 (T6SS) que permite que una bacteria inyecte una molécula tóxica en otras bacterias competidoras. En este sentido, el T6SS de *Burkholderia thailandensis* evita la proliferación de otras especies competidoras, por ejemplo, *Pseudomonas putida* (Schwarz *et al.*, 2010).

Por último, la competencia por interferencia sucede por alteración del desarrollo del biofilm. Para ello, las bacterias utilizan diversas estrategias: i) inhibición del quorum sensing como resultado de la degradación de las moléculas de quorum sensing o mediante el bloqueo de su síntesis (Chu *et al.*, 2012); ii) inhibición de la adhesión mediante la modificación de la superficie con biosurfactantes o la regulación negativa de las moléculas de adhesión (Rendueles *et al.*, 2011); iii) degradación de la matriz causada por enzimas secretadas (Sugimoto *et al.*, 2013); y iv) inducción de la dispersión del biofilm en las especies competidoras mediante la secreción de moléculas mensajeras específicas (Davies & Marques, 2009).

1.5 Diabetes Mellitus e infecciones de úlceras de pie de diabético

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica grave que se produce cuando el cuerpo no puede producir suficiente insulina o no puede utilizar eficazmente la insulina que produce, lo que provoca niveles elevados de glucosa (hiperglucemia). Las complicaciones derivadas de la hiperglucemia pueden ser macrovasculares o microvasculares. La enfermedad macrovascular afecta principalmente a los sistemas cardiovascular y cerebrovascular, mientras que la enfermedad microvascular incluye nefropatía, retinopatía y neuropatías (Packer *et al.*, 2023). El 11,1% de la población adulta mundial entre 20 y 79 años sufre de diabetes (589 millones de personas en 2024), y casi la mitad desconoce que la padece. Para 2050, las proyecciones muestran que 1 de cada 8 adultos, aproximadamente 856 millones, vivirá con diabetes, lo que supone un aumento del 46% (IDF Diabetes Atlas, 2025). Las úlceras del pie diabético (UPD) son una complicación común y altamente mórbida de la diabetes. Las vías de ulceración incluyen la pérdida de sensibilidad, isquemia y traumatismos menores. Las consecuencias de las UPD incluyen deterioro funcional, infección, hospitalización, amputación de extremidades inferiores y muerte (McDermott *et al.*, 2023). El riesgo de UPD a lo largo de la vida es del 19% al 34%, y esta cifra aumenta con la mayor longevidad y la complejidad médica de las personas con diabetes. La morbilidad tras una úlcera incidental es alta, con tasas de recurrencia del 65% a los 3-5 años, una incidencia de amputación de extremidades inferiores a lo largo de la vida del 20% y una mortalidad a los 5 años del 50-70% (Chen *et al.*, 2023).

La patogénesis de la UPD, que implica una interacción multifactorial entre la neuropatía, la enfermedad vascular periférica y la alteración de la cicatrización de heridas, todo ello exacerbado por la hiperglucemia, crea un entorno propicio para la colonización e infección microbiana. Es así como aproximadamente el 50% de las UPD desarrollan una infección (Kalan & Brennan, 2019). El desarrollo de las infecciones del pie diabético se ve influenciado por la carga microbiana, la diversidad microbiana, la presencia de organismos patógenos y las asociaciones sinérgicas entre especies microbianas. Además, el entorno en el que estos organismos existen determina su fenotipo y virulencia, lo que, en última instancia, desencadena la respuesta del huésped que se manifiesta como signos clínicos de infección (Boulton *et al.*, 2020).

En pacientes con las primeras etapas de infección superficial, predominan los cocos aeróbicos Gram-positivos, de los cuales *Staphylococcus aureus* y los estreptococos son los más frecuentemente aislados. Los pacientes con heridas infectadas crónicamente, necrosis extensa, gangrena húmeda y uso prolongado de antibióticos presentan etiologías microbianas mixtas. En estos pacientes se pueden aislar varios microorganismos simultáneamente, incluyendo bacterias aeróbicas Gram-positivas y Gram-negativas, y anaerobios (Ghotaslou *et al.* 2018).

Se ha descrito que los microorganismos presentes en las infecciones de UPD varían según la ubicación geográfica (Saeed *et al.*, 2020). Entre las bacterias aerobias facultativas más comúnmente aisladas se encuentran *S. aureus*, estafilococos coagulasa-negativos, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente en países desarrollados. Por su parte, en África, Asia y Latinoamérica se reportan más frecuentemente bacterias Gram-negativas (Carro *et al.*, 2020). Dentro de las especies anaerobias se han incluido cocos Gram-positivos, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. y diversas especies del grupo de *Bacteroides fragilis* (Saeed *et al.*, 2020).

Las bacterias presentes en las UPD infectadas crónicamente encuentran un entorno ideal para la formación de biofilms polimicrobianos. Varios estudios han informado que los biofilms son ubicuos en UPD y han propuesto que contribuyen al retraso en la cicatrización de las heridas (Johani *et al.*, 2017; Afonso *et al.*, 2021). Además, los pacientes diabéticos sufren una reducción del suministro de sangre periférica, lo que dificulta aún más que el sistema inmunológico y los tratamientos con antibióticos erradiquen estos biofilms (Pouget *et al.*, 2020). Esto se suma a las evidencias que muestran la limitada eficacia de los tratamientos con antibiótico en las infecciones que involucran biofilms (González *et al.*, 2018). En conjunto, resulta claro que el manejo de las infecciones en UPD constituye un desafío clínico de gran relevancia.

1.6 *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Morganella morganii*: microorganismos reportados en infecciones polimicrobianas de heridas

Como se mencionó previamente, un diverso rango de patógenos puede ser aislado de infecciones de UPD. Entre ellos, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *M. morganii* se hallaron de manera prevalente en infecciones polimicrobianas de UPD en un hospital público de CABA (esta tesis y Mariani *et al.*, 2023).

1.6.1 *Enterococcus faecalis*

Bacteria Gram-positiva comensal en el intestino humano y también un patógeno oportunista responsable de diversas infecciones, incluidas infecciones del sitio quirúrgico y UPD (Kao & Kline, 2019). Esta especie bacteriana posee resistencia intrínseca a ciertos antibióticos, como los aminoglucósidos (gentamicina, amikacina), y se ha observado en algunos aislados la adquisición de resistencia a vancomicina (Levitus *et al.*, 2023). En las heridas de piel, las infecciones por *E. faecalis* están asociadas a la formación de biofilms, lo cual resulta en un incremento en la tolerancia a antibióticos que puede conducir a infecciones persistentes (Ch'ng *et al.*, 2019). Además, *E. faecalis* tiene mecanismos para evadir y suprimir el clearance inmunitario, por ejemplo, suprimiendo el fenotipo proinflamatorio similar a M1 en macrófagos y previniendo la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (Kao & Kline, 2019; Kao *et al.*, 2023). También se ha reportado que *E. faecalis* puede persistir y replicarse dentro de células epiteliales y macrófagos, complicando así el tratamiento (Nunez *et al.*, 2022). La combinación de la formación de biofilm y la evasión del sistema inmune favorece el retraso de la sanación de heridas infectadas por *E. faecalis* (Celik *et al.*, 2024). Las infecciones de heridas donde se encuentra presente *E. faecalis* suelen ser polimicrobianas, apareciendo frecuentemente co-aislada con *S. aureus*, *E. coli* y otros microorganismos (Xu *et al.*, 2024).

1.6.2 *Escherichia coli*

Especie bacteriana Gram-negativa compleja y diversa en la que se encuentran cepas comensales, patógenos intestinales y patógenos extra-intestinales. Dentro de este último grupo aparecen cepas aisladas de infecciones de piel y tejidos blandos, especialmente de infecciones polimicrobianas (Ranjan *et al.*, 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido a *E. coli* en la lista de patógenos prioritarios dado el incremento de aislados con múltiples resistencias a antibióticos, incluyendo carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación (OMS, 2024). Además ha sido ampliamente reportada la capacidad de este patógeno de formar biofilms, lo cual incrementa su

tolerancia a antibióticos (Ballén *et al.*, 2022). Se ha postulado que los factores de virulencia presentes en los aislados de infecciones de piel y tejidos blandos son los mismos que se encuentran en otras cepas de *E. coli* extra-intestinales (aisladas de infecciones urinarias, bacteriemias y meningitis neonatal). Entre estos factores de virulencia se encuentran adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro (sideróforos) y proteínas de síntesis de cápsula (Curova *et al.*, 2020). Como se mencionó anteriormente, *E. coli* suele coexistir con patógenos como *S. aureus* y *E. faecalis* en infecciones cutáneas (Ranjan *et al.*, 2017).

1.6.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Bacteria Gram-negativa, heterotrófica y móvil, que está presente en diversos entornos como agua, suelo, plantas y animales, incluidos los seres humanos (Jurado-Martin *et al.*, 2021). Es considerada un patógeno oportunista, capaz de causar tanto infecciones agudas como crónicas. Su amplia diversidad genética y mecanismos de resistencia antimicrobiana le confieren una capacidad extraordinaria para desarrollar resistencia, tanto a través de mutaciones cromosómicas como por la adquisición horizontal de genes, sumado a su resistencia intrínseca. Es así como *P. aeruginosa* puede presentar resistencia a un amplio espectro de antibióticos entre los que se incluyen aminoglucósidos, fluoroquinolonas, beta-lactámicos y tetraciclinas (Elfadadny *et al.*, 2024). También es una especie capaz de formar biofilms. Estas características hacen que *P. aeruginosa* sea un desafío para el área de la salud, y la OMS la ha clasificado como un patógeno prioritario para el desarrollo de nuevas terapias (OMS, 2024). El comportamiento oportunista de *P. aeruginosa* aprovecha las brechas en las defensas del huésped para iniciar y establecer infecciones. En infecciones cutáneas, *P. aeruginosa* no sólo es responsable del daño epitelial, sino que también altera los mecanismos de reparación epitelial tras una lesión. Esto provoca infecciones persistentes y alteración de la función orgánica (Ruffin & Brocheiro, 2019). Esta bacteria usualmente se adhiere a la superficie del epitelio cutáneo y forma biofilms (Jensen *et al.*, 2017). Además, puede invadir tejidos más profundos, donde se la ha observado en agregados, embebida en la matriz extracelular o incluso internalizada en queratinocitos (Kirketerp-Møller *et al.*; 2008; Zhao *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2018). Este comportamiento no sólo contribuye a la cronicidad de las infecciones, sino que también refuerza la persistencia de *P. aeruginosa* en el tejido afectado, dificultando aún más su tratamiento. Hay una gran variedad de factores de virulencia que favorecen la infección de piel. Los constituyentes estructurales (pili, LPS, lectinas) y los factores secretados (p. ej., piocianina, ExoA, LasB, ramnolípidos) contribuyen a la muerte celular, la desorganización del citoesqueleto o la disrupción de las uniones estrechas. La permeabilidad paracelular favorece la trans migración

bacteriana y la infiltración hacia el compartimento basolateral; la disrupción de la matriz extracelular por metaloproteinasas de matriz y el desprendimiento celular hacia la matriz extracelular favorecen la propagación bacteriana. Las toxinas del sistema de secreción tipo 3 (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) inyectadas a través de la membrana basolateral contribuyen a la muerte celular y a la alteración de la integridad epitelial. Los pili y el flagelo también participan en la adherencia bacteriana a la célula huésped. Las citocinas, liberadas por las células epiteliales, los macrófagos y los neutrófilos infiltrados, también contribuyen al daño epitelial (Ruffin & Brocheiro, 2019). *P. aeruginosa* es capaz de coexistir con otros microorganismos en infecciones polimicrobianas de heridas de piel. En este contexto, numerosos estudios han abordado la interacción de *P. aeruginosa* con *S. aureus*, si bien también se ha destacado la co-infección con microorganismos del género *Enterococcus* (*faecalis* y *faecium*) y *Candida* (Sachdeva *et al.*, 2024).

1.6.4 *Morganella morganii*

Patógeno oportunista Gram-negativo ampliamente distribuido en la naturaleza, incluido en la microbiota intestinal comensal humana. Este microorganismo es reconocido como un patógeno oportunista importante, frecuentemente identificado como agente causal de infecciones nosocomiales en adultos, contribuyendo a casos de infecciones del tracto urinario y de heridas (Bandy, 2020; Chen *et al.*, 2024). *M. morganii* posee resistencia intrínseca a un amplio espectro de agentes antimicrobianos, incluyendo ampicilina, amoxicilina y la mayoría de las cefalosporinas de primera y segunda generación, así como macrólidos, lincosamidas, glicopéptidos, fosfomicina, ácido fusídico y colistina (Liu *et al.*, 2016). De manera similar a otras Enterobacterias, *M. morganii* también alberga una diversa variedad de genes de resistencia a antibióticos (tetraciclina, beta-lactámicos de espectro extendido, carbapenemes) cuya adquisición resulta facilitada por la presencia de elementos genéticos móviles (Jin *et al.*, 2022). Entre los factores de virulencia que presenta están incluidos la ureasa, proteasa IgA, hemolisinas, diversas adhesinas y sistema de secreción tipo III (Liu *et al.*, 2016). Se ha reportado la presencia de *M. morganii* en infecciones polimicrobianas cutáneas en donde también se detectó la presencia de *E. faecalis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, entre otros (Kakurai *et al.*, 2025).

Resulta pertinente destacar nuevamente que las heridas infectadas con múltiples microorganismos, entre los que se encuentran los mencionados previamente, son de importancia dado que las interacciones entre diferentes tipos de bacterias pueden dificultar el tratamiento, aumentar la virulencia de las infecciones y retrasar la cicatrización.

1.7 El biofilm como factor de cronicidad en heridas infectadas

Los biofilms son un problema importante en las infecciones crónicas en humanos debido a su papel en la persistencia de la infección y en la tolerancia incrementada a los tratamientos antimicrobianos. La matriz del biofilm protege a los microorganismos de la respuesta inmunitaria del huésped y de los agentes antimicrobianos, lo que prolonga la infección y dificulta el tratamiento. La capacidad de los biofilms para albergar bacterias resistentes a múltiples fármacos agrava aún más el problema, convirtiendo estas infecciones en una preocupación importante tanto para los pacientes como para la salud pública (Ascenzioni *et al.*, 2021; Sahoo & Meshram, 2024).

Entre las infecciones persistentes mediadas por biofilms se encuentran las infecciones crónicas de heridas, donde a menudo la formación de biofilms en heridas que no cicatrizan provoca inflamación prolongada y resistencia a los tratamientos habituales (Diban *et al.*, 2023). Esto complica el proceso de curación y con frecuencia requiere intervenciones terapéuticas avanzadas, como el desbridamiento quirúrgico. Como consecuencia, el costo de atención médica que se destina a estas infecciones crónicas es sensiblemente alto. Se ha reportado que el 78,2% de las heridas crónicas presentan un biofilm asociado. En 2017, el gasto global en atención médica para heridas fue de 7.800 miles de millones de dólares, de los cuales se estima que 281 mil millones corresponden a biofilms (Cámara *et al.*, 2022).

1.7.1 Cronicidad debido a la tolerancia al sistema inmune del hospedador

La respuesta inicial del sistema inmunitario tras una infección la proporciona el sistema inmune innato, que ataca de forma no específica a los microorganismos invasores a través de la activación de los macrófagos residentes y del sistema del complemento, provocando una mayor atracción de leucocitos polimorfonucleares. La tolerancia del biofilm a los polimorfonucleares está mediada por su tamaño, que impide la fagocitosis, la protección de la matriz, la inactivación del sistema del complemento, el bloqueo de la opsonización y la evasión del reconocimiento inmunitario. En las infecciones crónicas, aunque los mecanismos de respuesta inmunitaria del huésped pueden reducir la población bacteriana, las células persistentes supervivientes pueden volver a crecer y los síntomas clínicos reaparecen (Ciofu *et al.*, 2022).

1.7.2 Cronicidad debido a la tolerancia a agentes antimicrobianos

Una de las propiedades distintivas de los biofilms es su tolerancia incrementada a los antibióticos y otros agentes antimicrobianos de hasta 1000 veces en comparación con las células bacterianas en estado planctónico (Mah, 2012). Esta tolerancia incrementada a los antimicrobianos es atribuida a una multiplicidad de factores (Fig. 4) (Ciofu *et al.*, 2022; Zafer *et al.*, 2024).

Entre ellos se puede mencionar la matriz del biofilm, que limita la difusión de algunos antibióticos dificultando su acceso a las bacterias dentro del biofilm. Se ha demostrado la interacción directa entre antibióticos y componentes de la matriz del biofilm, como por ejemplo entre el antibiótico catiónico tobramicina y componentes de carga negativa de la matriz de biofilms (polisacáridos y DNA extracelular; Cao *et al.*, 2016). Una consecuencia de esta difusión más lenta es que las células bacterianas del biofilm ganan tiempo para activar respuestas adaptativas al estrés que contribuyen a la tolerancia.

También se ha observado, tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, que la matriz actúa como reservorio de enzimas modificadoras de antibióticos, como las β -lactamasas, que se encuentran enriquecidas en las capas externas del biofilm y pueden inactivar los antibióticos antes de que lleguen a las células bacterianas (Bagge *et al.*, 2004; Amanatidou *et al.*, 2019).

Por otra parte, al adoptar el modo de crecimiento en biofilms, una amplia proporción de esta población bacteriana está creciendo lentamente o no está creciendo. La baja actividad metabólica de estas células bacterianas puede traducirse en una baja producción de sitios blanco para varios antibióticos, por ejemplo, las enzimas implicadas en la replicación, la formación de proteínas o la producción de peptidoglicano (Stokes *et al.*, 2019).

Otro fenómeno relacionado con una tolerancia incrementada a antibióticos en biofilms es la activación temporaria de bombas de eflujo de múltiples antibióticos en respuesta a la exposición a estos compuestos (Chiang *et al.*, 2012).

Finalmente, la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos puede verse favorecida dentro de un biofilm debido a la movilidad restringida de las células incrustadas en una matriz y a la corta distancia entre las células en los agregados, y probablemente también por el DNA extracelular en la matriz, que puede crear contacto intercelular y donar material genético para la transformación. La conjugación, que requiere un contacto estrecho entre el dador y el receptor, es probablemente el mecanismo de transferencia horizontal de genes más común en los biofilms (Hausner & Wuertz 1999).

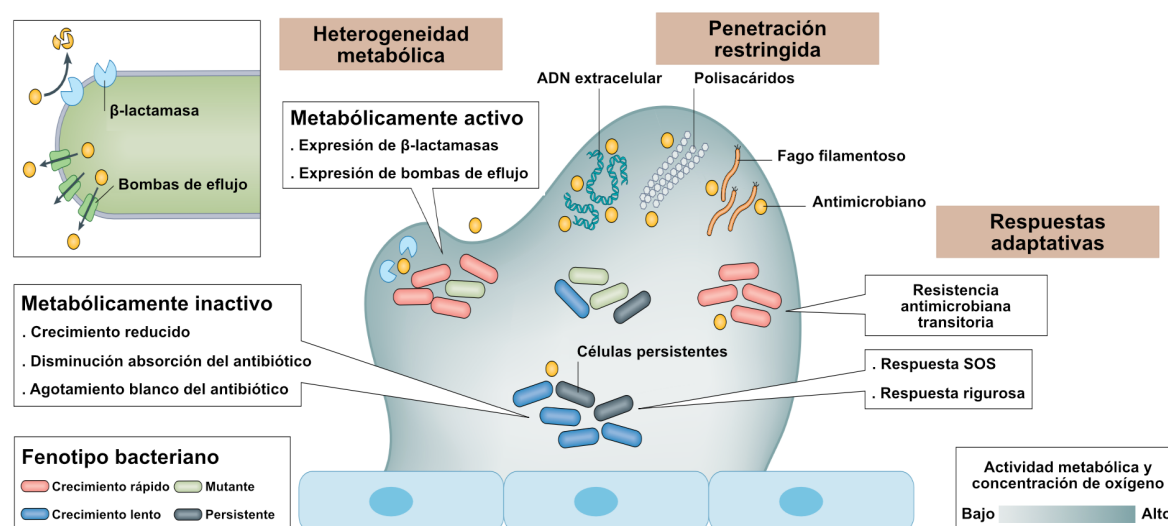


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos de tolerancia antimicrobiana de los biofilms. Tesis doctoral Vazquez NM (2024).

A pesar de su importancia, el reconocimiento temprano de las infecciones asociadas a biofilms aún representa una necesidad insatisfecha en microbiología clínica. Por lo tanto, es urgente desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas para gestionar eficazmente las infecciones crónicas asociadas a biofilms (Ascenzioni *et al.*, 2021). Para ello, resulta necesario promover un conocimiento integral de los diferentes procesos moleculares que contribuyen a la resistencia y persistencia de los biofilms.

1.8 La terapia fotodinámica antimicrobiana como estrategia alternativa para el manejo de infecciones en heridas

Como ya se mencionó anteriormente, las heridas crónicas transcurren con el desarrollo de infecciones asociadas a biofilms, lo cual dificulta el proceso de cicatrización. Además, el crecimiento en la frecuencia de aparición de microorganismos con múltiples resistencias a antibióticos conlleva al fracaso de los tratamientos convencionales de antibióticos. En este contexto, muchas investigaciones se han centrado en desarrollar nuevas opciones terapéuticas, entre las que se encuentran la terapia con bacteriófagos, nanopartículas (plata y zinc), inhibición del sensado de quórum, péptidos antimicrobianos, surfactantes, fitoquímicos, enzimas que degradan la matriz del biofilm, terapia de ultrasonido, terapia con luz azul y terapia fotodinámica (Goswami *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2024).

La terapia fotodinámica (TFD) se basa en un proceso fotoquímico que involucra la administración de un fotosensibilizador (FS) seguida de la exposición a luz con una longitud de onda que coincide con las transiciones de energía electrónica del FS. Esto provoca que el FS entre en un estado triplete excitado, lo que lleva a la producción de radicales de oxígeno citotóxicos, ya sea a través del mecanismo tipo I tras una transferencia de carga al agua (que genera radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y anión superóxido), o mediante el mecanismo tipo II, iniciada por la transferencia de energía al oxígeno molecular (que resulta en iones de oxígeno singlete (Fig. 5) (Warrier *et al.*, 2021; Sing & Lilge, 2025). La administración tópica del FS permite su rápida asociación con microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos y ha demostrado una alta eficacia para controlar la infección y acelerar la cicatrización de heridas (Yang *et al.*, 2021). Cabe destacar que diversos estudios han evidenciado que la TFD es efectiva contra una amplia gama de microorganismos, tanto en estadio planctónico como en biofilms (Fig. 5) (Warrier *et al.*, 2021; Songca & Adjei, 2022). Además, la TFD también presenta varias ventajas, como una alta selectividad y una acción rápida en comparación con los antimicrobianos convencionales, la baja probabilidad de generar resistencia, y su relativa rentabilidad (Calixto *et al.*, 2016; Lan *et al.*, 2019).

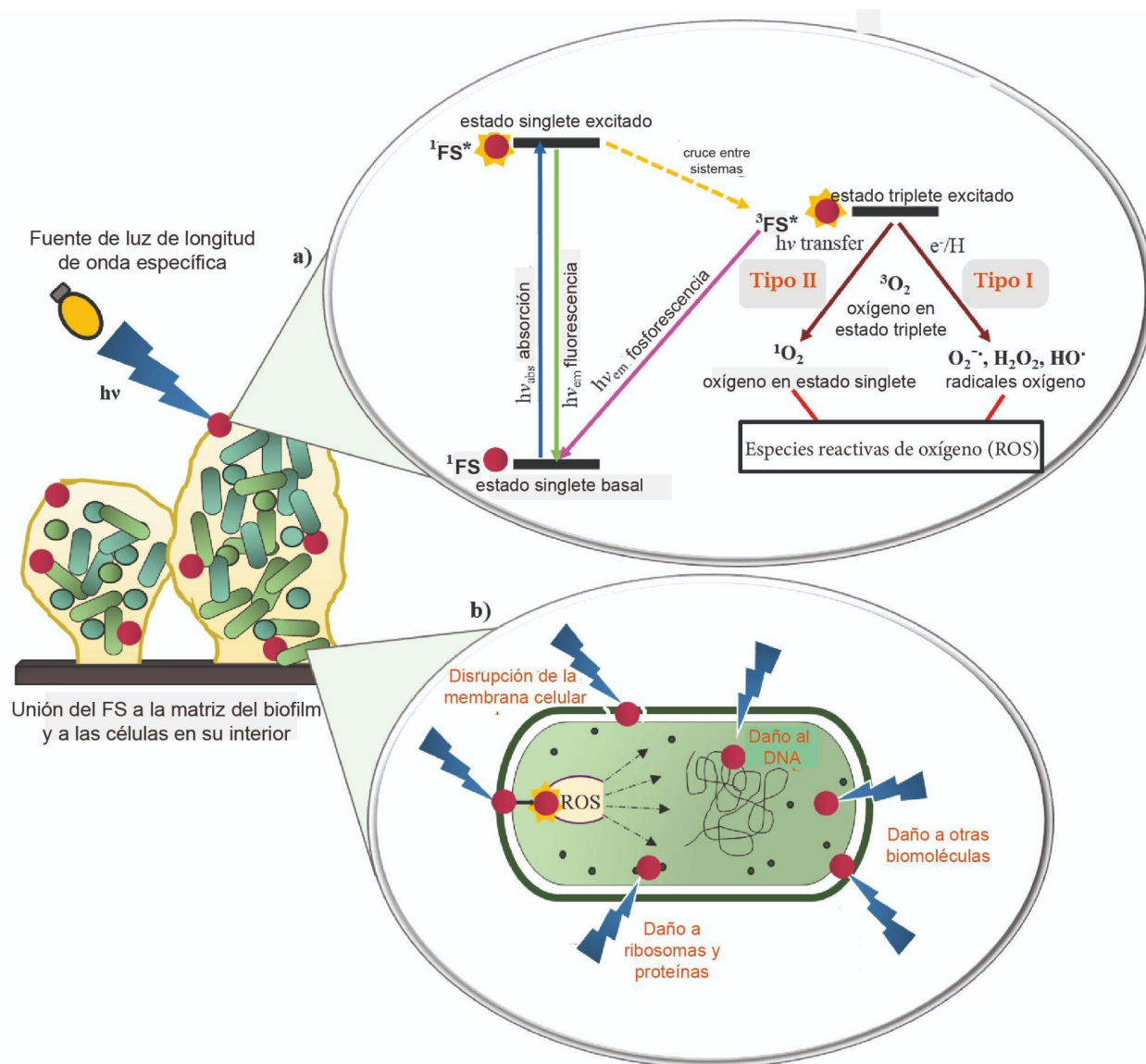


Figura 5. Esquema de la terapia fotodinámica. (a) La molécula de fotosensibilizador (FS) unida a la matriz del biofilm y a las células dentro del biofilm, absorbe energía lumínica ($h\nu_{abs}$) de una longitud de onda específica y alcanza el estado temporario de singlete excitado ($^1FS^*$) desde su estado de singlete basal (^1FS). El $^1FS^*$ es inestable, emite energía ($h\nu_{em}$) en forma de fluorescencia y experimenta un cruce entre sistemas para alcanzar un estado de triplete excitado ($^3FS^*$) que, o bien pierde energía ($h\nu_{em}$) o lleva a cabo una reacción fotoquímica en presencia de una molécula de oxígeno en estado triplete basal ($^3O_2$). En el mecanismo de Tipo 1, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando $^3FS^*$ transfiere un electrón o un átomo de H a $^3O_2$. En el mecanismo Tipo 2, $^3FS^*$ transfiere energía a $^3O_2$ para producir ROS. (b) Las ROS generadas pueden producir daño oxidativo celular a diferentes niveles: sobre la membrana, el DNA o las proteínas, lo que además puede llevar a la muerte celular. Modificado de Warriar *et al.*, 2021.

En los últimos años se han estudiado numerosos FSs, tales como fenotiazinas, curcumina, derivados de hematoporfirina, ftalocianina, xanteno y clorinas, para mejorar la eficacia de la TFD (Figueiredo-Godoi *et al.*, 2022). Entre ellos se destaca el azul de metileno (AM), un derivado catiónico de la fenotiazina que presenta una absorción sustancial de luz roja a una longitud de onda de entre 600 y 700 nm y que puede penetrar en tejidos con una absorción de 0,5 a 1,5 cm causando muerte celular. Diversos experimentos *in vitro* y en modelos animales han demostrado la eficacia del AM en la TFD contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo biofilms polimicrobianos (Biel *et al.*, 2011; Vecchio *et al.*, 2015; Karner *et al.*, 2020). Además, el AM es de fácil acceso y ha sido aprobado por la Administración Federal de Medicamentos de EEUU y la Agencia Europea de Medicamentos para su uso en humanos con un excelente perfil de seguridad, demostrando no generar toxicidad significativa ni producir subproductos tóxicos al fotoactivarse (Cwalinski *et al.*, 2020).

Además, para mejorar su efectividad, se ha propuesto la combinación de la TFD con antibióticos convencionales, lo que podría generar un efecto aditivo o sinérgico, permitiendo superar la resistencia a antibióticos de los microorganismos (Perez-Laguna *et al.*, 2020; Songca & Adjei, 2022). Esta combinación tiene el potencial de reducir los tiempos de tratamiento, minimizar las dosis de antibióticos, evitar toxicidad y mejorar la eficacia terapéutica. Dado que diferentes antibióticos tienen distintos blancos y mecanismos de acción resulta necesario avanzar en la investigación del tratamiento combinado de uno o más antibióticos con la TFD.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis de trabajo

La presencia de varias especies bacterianas residiendo conjuntamente dentro de biofilms multi-especies favorece la ocurrencia de interacciones inter-especies (cooperativas o competitivas) que pueden modificar la composición de la comunidad microbiana como así también alterar la susceptibilidad de dichos microorganismos a terapias antimicrobianas.

2.2 Objetivo general

La prevalencia de las infecciones en UPD representa un desafío sanitario a nivel mundial ya que la ausencia de un manejo adecuado de estas infecciones pueden llevar a la amputación de los miembros e incluso la muerte de los pacientes. Al formar comunidades polimicrobianas, las bacterias en UPD generan infecciones crónicas y con una alta tolerancia a los antibióticos dificultando aún más los tratamientos.

Se propone entonces avanzar en el conocimiento de las interacciones inter-especies dentro de comunidades bacterianas mixtas que se establecen sobre heridas de pie de diabético, de manera de contribuir al entendimiento de los mecanismos involucrados en el establecimiento de biofilms multi-especies y su susceptibilidad a terapias antimicrobianas.

Se espera que los conocimientos generados puedan proyectarse hacia el desarrollo de nuevas estrategias de potencial interés biomédico.

2.3 Objetivos específicos:

- Analizar las prevalencias de los diferentes organismos aislados de pacientes con úlceras de pie de diabético atendidos en un hospital público de CABA.
- Estudiar la dinámica poblacional de biofilms multi-especies formados por bacterias prevalentes en infecciones polimicrobianas de heridas de pie diabético (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii* y *Pseudomonas aeruginosa*).
- Evaluar el efecto de la terapia fotodinámica antimicrobiana sola y en combinación con antibióticos sobre biofilms mixtos de *E. faecalis* y *P. aeruginosa* y comparar con el resultado de estos tratamientos sobre biofilms monomicrobianos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estudio microbiológico sobre infecciones de úlceras de pie diabético (UPD)

Se realizó un estudio observacional prospectivo para monitorear las especies microbianas presentes en pacientes diabéticos con infecciones en UPD. Este estudio fue llevado a cabo en colaboración con el Laboratorio de Bacteriología del Hospital de Clínicas José de San Martín (Universidad de Buenos Aires, CABA) entre Junio 2018 y Diciembre 2019. El protocolo de investigación contó con la aprobación del Comité de Ética del mencionado hospital (protocolo 2019-04-09). Se incluyeron todas las muestras de tejidos de pacientes diagnosticados con diabetes mellitus que fueron recibidas en el laboratorio. Se colectó información demográfica de los registros médicos, tales como edad, sexo y evaluación microbiológica. Las muestras incluyeron raspados del fondo de la úlcera después de la limpieza con solución salina y desbridamiento de la herida; muestras más profundas como tejidos blandos y huesos fueron obtenidos por biopsia. El material fue enviado al laboratorio de manera inmediata (dentro de las 2 h posteriores a su toma). La identificación y susceptibilidad antimicrobiana de las cepas bacterianas se determinaron como parte del trabajo de rutina en el laboratorio de microbiología del hospital, utilizando espectrometría de masas (MALDI TOF MS) y el sistema automatizado Vitek-2C (BioMérieux).

3.2 Aislados bacterianos utilizados en experimentos *in vitro*

Se utilizaron cepas clínicas co-aisladas de infecciones polimicrobianas de UPD del estudio mencionado anteriormente. Se seleccionaron cepas correspondientes a las asociaciones microbianas que mostraron mayor prevalencia (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii* y *Pseudomonas aeruginosa*) (Tabla 1). También se utilizaron las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC29212 y *P. aeruginosa* PAO1. Los aislados fueron mantenidos en el laboratorio a largo plazo a -80°C en TSB suplementado con 15% glicerol.

Tabla 1. Cepas clínicas aisladas de UPD polimicrobianas utilizadas en este estudio

Cepas	Descripción	Resistencia antibiótica	Fuente
<i>Enterococcus faecalis</i>			
Ef013	Cepa co-aislada con <i>E. coli</i> Ec012 del paciente #06	CIP, LEV, MIN	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Ef037	Cepa co-aislada con <i>M. morganii</i> Mm035 y <i>P. aeruginosa</i> Pa036 del paciente #20	MIN	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Ef062	Cepa co-aislada con <i>P. aeruginosa</i> Pa061 y <i>Streptococcus agalactiae</i> 060 del paciente #34	-	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Ef069	Cepa co-aislada con <i>E. coli</i> Ec066, <i>M. morganii</i> Mm067 y <i>Streptococcus anginosus</i> 068 del paciente #37	MIN	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Ef106	Cepa co-aislada con <i>P. aeruginosa</i> Pa105 del paciente #56	MIN	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Ef111	Cepa co-aislada con <i>M. morganii</i> Mm110 del paciente #66	MIN	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Ef ATCC29212	Cepa de referencia	-	ATCC
<i>Escherichia coli</i>			
Ec012	Cepa co-aislada con <i>E. faecalis</i> Ef013 del paciente #06	AMP, AMS, CTR, CTZ, ERT, IMI, MER, TRS	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Ec066	Cepa co-aislada con <i>M. morganii</i> Mm067, <i>Streptococcus anginosus</i> 068 y <i>E. faecalis</i> Ef069 del paciente #37	AMP	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Ec098	Cepa co-aislada con <i>E. faecalis</i> Ef096, <i>S. aureus</i> 097, y <i>K. pneumoniae</i> 099 del paciente #51	AMP, AMS	Mariani <i>et al.</i> , 2023
<i>Morganella morganii</i>			
Mm035	Cepa co-aislada con <i>P. aeruginosa</i> Pa036 y <i>E. faecalis</i> Ef037 del paciente #20	AMP, AMS, CEP, CTR, CTZ, CIP, GEN, LEV, TRS	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Mm067	Cepa co-aislada con <i>E. coli</i> Ec066, <i>Streptococcus anginosus</i> 068, y <i>E. faecalis</i> Ef069 del paciente #37	AMP, AMS, TRS	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Mm110	Cepa co-aislada con <i>E. faecalis</i> Ef111 del paciente #66	AMP, AMS, CIP, GEN, LEV, TRS	Mariani <i>et al.</i> , 2023

Tabla 1. Cepas clínicas aisladas de UPD polimicrobianas utilizadas en este estudio (continuación)

Cepas	Descripción	Resistencia antibiótica	Fuente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Pa036	Cepa co-aislada con <i>M. morganii</i> Mm035 y <i>E. faecalis</i> Ef037 del paciente #20	CEP, CIP, GEN, LEV	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Pa061	Cepa co-aislada con <i>E. faecalis</i> Ef062 y <i>Streptococcus agalactiae</i> 060 del paciente #34	-	Mariani <i>et al.</i> , 2023
Pa105	Cepa co-aislada con <i>E. faecalis</i> Ef106 del paciente #56	IMI, CIP, LEV	Mariani <i>et al.</i> , 2023
PA01	Cepa de referencia	-	ATCC

AMP, ampicilina; AMS: ampicilina-sulbactam; CEP: cefepima; CTR: ceftriaxona; CTZ, ceftazidima; CIP, ciprofloxacina; ERT: ertapenem; IMI: imipenem; MER: meropenem GEN, gentamicina; LEV, levofloxacina; MIN: minociclina; TRS, trimetoprima/sulfametoxazol.

3.3 Medios y condiciones de cultivo

Los medios de cultivos utilizados a lo largo de esta tesis se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados

Medio de cultivo	Componentes	Cantidades
Trypteína Soya Caldo / Agar (TSB / TSA)	Trypteína	17 g/L
	Peptona de Soja	3 g/L
	NaCl	5 g/L
	K ₂ HPO ₄	2,5 g/L
	Glucosa	2,5 g/L
	Agar (cuando es necesario)	15 g/L
Lubbock-Glc Caldo / Agar	TSB	450 ml/L
	Plasma bovino	500 ml/L
	Lisado de glóbulos rojos equinos	50 ml/L
	Glucosa	10 g/L
	Agar (cuando es necesario)	15 g/L
Mueller Hinton (MH) Caldo / Agar	Infusión de carne	300 g/L
	Peptona ácida de caseína	17,5 g/L
	Almidón	1,5 g/L
	Agar (cuando es necesario)	15 g/L
Mac Conkey Agar	Peptona de carne	1,5 g/L
	Peptona de gelatina	17 g/L
	Trypteína	1,5 g/L
	Lactosa	10 g/L
	Mezcla de sales biliares N° 3	1,5 g/L
	Cloruro de sodio	5 g/L

Medio de cultivo	Componentes	Cantidades
	Rojo neutro	0,03 g/L
	Cristal Violeta	0,001 g/L
	Agar	13,5 g/L
Bilis Esculina Agar	Extracto de carne	3 g/L
	Peptona de carne	5 g/L
	Bilis de buey	40 g/L
	Esculina	1 g/L
	Citrato férrico	0,5 g/L
	Agar	15 g/L

El medio Lubbock se preparó de acuerdo a lo reportado por Sun *et al.* (2008). Para la preparación del lisado de glóbulos rojos equinos, la sangre equina fresca (ACG Laboratorios) se centrifugó durante 5 min a $1000 \times g$, a 4°C . Se retiró el sobrenadante obtenido y el precipitado de glóbulos rojos se resuspendió en igual volumen de H_2O estéril. Luego, se realizaron 5 secuencias de congelado y descongelado (-20°C y T ambiente) para permitir la lisis de los glóbulos rojos. Por último, se centrifugó durante 60 min a $8000 \times g$, a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante (lisado de glóbulos rojos equinos) se conservó a -20°C . El plasma bovino irradiado con radiación gamma (Internegocios) se fraccionó y se conservó a -20°C .

Los inóculos bacterianos para los ensayos se prepararon de la siguiente manera: a partir de los stocks a -80°C , las cepas se sembraron en estrías sobre placas de TSA y se incubaron durante toda la noche (overnight) a 37°C para obtener colonias aisladas. Posteriormente, se utilizaron colonias individuales para inocular TSB (3 ml) y se incubaron overnight a 37°C y 200 rpm. El crecimiento bacteriano se midió por dispersión de luz a 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) en espectrofotómetro (Spectrum SP-1102). Se estableció la relación entre la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ y el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Este último se obtuvo luego de realizar diluciones al décimo de los cultivos, inocular en TSA, incubar overnight a 37°C y realizar recuento de UFC.

3.4 Formación de biofilms en placas multipocillo y determinación de biomasa por tinción con cristal violeta

Se desarrollaron biofilms en condiciones estáticas siguiendo el protocolo descrito previamente (Juarez & Galván 2018). Para ello, se prepararon inóculos bacterianos conteniendo 1×10^7 UFC/ml en medio Lubbock. Las suspensiones bacterianas se colocaron en placas multipocillo x 96 de poliestireno (200 µl por pocillo). Cada condición se ensayó por cuadruplicado en cada experimento. Las placas inoculadas se incubaron por 3 h a 37°C para permitir la adhesión bacteriana a la superficie, luego de lo cual se cambió el medio. Los biofilms se desarrollaron durante 24, 48 y 72 h a 37°C realizando cambio de medio cada 24 h.

Sobre estos biofilms se determinó la biomasa por medio de la tinción con cristal violeta (CV) (Vazquez *et al.*, 2022). Para ello, a los tiempos indicados se descartó el medio de cultivo y se lavó la placa tres veces con 200 µl de solución salina. Posteriormente, se colocaron 200 µl de solución de CV al 0,1% a todos los pocillos. Después de 15 min de teñido, el exceso de colorante se eliminó mediante lavado con solución salina (NaCl 0,9%). Finalmente, el CV unido al biofilm fue solubilizado por lavado con ácido acético 30% y se midieron las absorbancias a 595 nm (A_{595nm}). Cada condición se ensayó por cuadruplicado y se realizaron al menos tres experimentos independientes.

3.5 Formación de biofilms en macrocolonias

Los ensayos utilizando el modelo de biofilm en macrocolonia se realizaron siguiendo la técnica descrita por Wong *et al.* (2022), con modificaciones menores. Brevemente, se prepararon inóculos en Lubbock-Glc conteniendo 1×10^8 células/ml de *E. coli*, *E. faecalis*, *M. morganii* y *P. aeruginosa*. Para inóculos mixtos (duales) se mantuvo la relación 1:1 para cada especie. Volúmenes de 5 µl de inóculo fueron sembrados en placas de Lubbock-Glc-Agar o sobre discos de membranas de ésteres de celulosa con un tamaño de poro de 0,22 µm (GSWP14250; Millipore, Bedford, MA) colocados sobre placas de Lubbock-Glc-Agar. Estas placas fueron luego incubadas a 37°C por 24 h y al cabo de este tiempo las macrocolonias desarrolladas fueron procesadas. En algunos ensayos, las macrocolonias fueron desarrolladas en TSA.

Para evaluar el número de células viables en las macrocolonias, las mismas fueron disgregadas mecánicamente en solución salina estéril con una punta plástica estéril. Para el recuento de UFC, la suspensión bacteriana fue diluída serialmente al décimo y plaquedada en medios selectivos como se explica en la sección “Cuantificación de células cultivables”.

Para la determinación de la biomasa por tinción con CV, macrocolonias desarrolladas sobre membranas se lavaron suavemente con solución salina estéril antes de efectuar la tinción con CV como se explicó anteriormente y posterior medición de $A_{595\text{nm}}$.

Cada combinación de macrocolonias se realizó por triplicado y se realizaron al menos tres experimentos independientes.

3.6 Desarrollo de cultivos planctónicos

Suspensiones bacterianas (3 ml) simples o mixtas conteniendo 1×10^6 células/ml en Lubbock-Glc fueron incubadas a 37°C en agitación y monitoreadas durante un lapso de 24 h. A los tiempos indicados, se tomaron muestras de estos cultivos para realizar diluciones al décimo y plaques en medios apropiados para determinar las UFC de cada especie como se explica en la sección “Cuantificación de células cultivables”.

Se realizó para cada aislado tres experimentos independientes cada uno de ellos con correspondientes triplicados.

3.7 Cuantificación de células cultivables

El número de células cultivables en las distintas suspensiones bacterianas (provenientes de biofilms disgregados mecánicamente o de cultivos planctónicos) fue determinado por recuento de UFC. Para ello, se realizaron diluciones seriadas (1:10) de las suspensiones bacterianas monomicrobianas, se plaquearon en TSA y se incubaron overnight a 37°C para la obtención y recuento de colonias individuales. En el caso de cultivos mixtos, cada especie bacteriana fue discriminada utilizando condiciones de crecimiento selectivas, según se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Medios selectivos utilizados

Especies a diferenciar	Medio selectivo 1	Medio selectivo 2
<i>E. faecalis/ E. coli</i>	TSA suplementado con Polimixina B 2 µg/ml Selectivo para <i>E. faecalis</i>	TSA suplementado con Amp 100 µg/ml Selectivo para <i>E. coli</i>
<i>E. faecalis/ M. morganii</i>	TSA suplementado con NaCl 5% (p/v) Selectivo para <i>E. faecalis</i>	TSA suplementado con Amp 100 µg/ml Selectivo para <i>M. morganii</i>
<i>E. faecalis/ P. aeruginosa</i>	Bilis esculina azida agar Selectivo para <i>E. faecalis</i>	TSA suplementado con Amp 30 µg/ml Selectivo para <i>P. aeruginosa</i>

3.8 Determinación de concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas sobre cultivos planctónicos de *E. faecalis* y *P. aeruginosa*

Se determinaron las concentraciones de antibiótico (ampicilina y amikacina, Sigma-Aldrich) eficaces contra cultivos planctónicos de los aislados clínicos *P. aeruginosa* Pa036 y *E. faecalis* Ef037. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) y las concentraciones bactericidas mínimas (CBM) se obtuvieron aplicando el método de microdilución en caldo MH siguiendo los recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2018). Los ensayos se realizaron en microplacas estériles de 96-pocillos utilizando un volumen final de 200 µl e inoculando 1×10^6 UFC/ml de bacterias en medio MH conteniendo o no concentraciones crecientes del antibiótico a evaluar. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h en agitación a 200 rpm. Posteriormente se evaluó el crecimiento bacteriano por medición de la DO_{600nm} en espectrofotómetro de microplacas µQuant™ (BioTek). La CIM fue definida como la mínima concentración del antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano en un $95\% \pm 5\%$. Para determinar la CBM se realizaron diluciones seriadas al décimo de los tubos donde no se observó turbidez y se realizó el recuento de UFC. La CBM correspondió a la mínima concentración de antimicrobiano que produjo un descenso en la viabilidad celular del 99,9% (3 Log₁₀ UFC).

3.9 Desafío de biofilms en macrocolonia con antibióticos y terapia fotodinámica

Se desarrollaron macrocolonias de *P. aeruginosa* y *E. faecalis* mixtas y simples sobre membranas de 0,2 μm colocadas en Lubbock-Glc-agar durante 24 h, como se describió previamente.

3.9.1 Tratamiento con antibióticos

Macrocolonias simples y mixtas fueron expuestas a diferentes concentraciones de los antibióticos ampicilina y amikacina. Para ello, las macrocolonias desarrolladas en Lubbock-Glc-agar fueron trasladadas a placas de MH-agar ya sea sin antibiótico (control) o suplementadas con los antibióticos indicados (tratamiento) y luego fueron incubadas a 37°C durante diferentes tiempos (24 y 48 h). Posteriormente las macrocolonias se dispersaron mecánicamente y se realizó el recuento de UFC.

3.9.2 Aplicación de terapia fotodinámica

Macrocolonias simples y mixtas desarrolladas en Lubbock-Glc-agar fueron tratadas mediante terapia fotodinámica (TFD) utilizando azul de metileno (AM) como fotosensibilizante. Se preparó una solución stock de AM 6 mM en PBS, que fue esterilizada por filtración a través de membrana de 0,22 μm y almacenada en oscuridad. Alícuotas de 20 μl de AM a distintas concentraciones (60 μM , 600 μM y 6 mM) fueron colocadas sobre las macrocolonias asegurando una cobertura homogénea de las mismas y se realizó una incubación de 2 h en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, las macrocolonias se colocaron sobre una placa de agar-agar (1,7%) y se expusieron a radiación con un arreglo de diodos emisores de luz LED roja (con una estrecha banda de emisión con $\lambda_{\text{max}} = 639 \text{ nm}$) durante 2 h (Forte Giacobone *et al.*, 2016). Durante la irradiación, las placas se posicionaron sobre una plataforma de acero inoxidable conectada a un sistema de circulación de agua termostatzado para mantener la temperatura constante a 20 °C. La medición de irradiancia a una distancia de 0,4 cm de la superficie de la muestra fue de 44 W/m² (medido con radiómetro ILT1400-A equipado con sensor SEL033/QNDSZ/W International Light Technologies, Peabody, MA) (Forte Giacobone *et al.*, 2016). El control se realizó utilizando macrocolonias irradiadas en ausencia de azul de metileno. Luego de la TFD, las macrocolonias se dispersaron mecánicamente y se determinaron los números de células viables mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

3.9.3 Aplicación combinada de antibióticos con terapia fotodinámica

Macrocolonias simples y mixtas desarrolladas en Lubbock-Glc-agar fueron expuestas secuencialmente a distintos tratamientos antimicrobianos, según los siguientes esquemas:

1) medio con antibiótico (24 h) → TFD (2 h) → medio sin antibiótico (24 h) y

2) medio con antibiótico (24 h) → TFD (2 h) → medio con antibiótico (24 h).

Posteriormente, se efectuó el recuento de UFC de las macrocolonias dispersadas mecánicamente.

3.10 Observación de biofilms en macrocolonia mediante microscopía electrónica de barrido

Se desarrollaron biofilms en macrocolonia de *P. aeruginosa* y *E. faecalis* mixtos y simples sobre membranas de 0,2 µm como se describió previamente y luego fueron expuestas a los tratamientos indicados. Posteriormente, estos biofilms fueron procesados para ser observados por microscopía electrónica de barrido, de acuerdo a lo descripto por Serra *et al.*, (2013). Brevemente, las membranas conteniendo las macrocolonias fueron colocadas en una placa de vidrio conteniendo 1% (p/v) de tetróxido de osmio en 0.05 M buffer cacodilato (pH 7.5) e incubadas durante 45 min a temperatura ambiente para permitir que ocurra la fijación de la muestra. Luego de cuatro lavados con buffer cacodilato, las macrocolonias fueron deshidratadas por pasaje secuencial a través de soluciones conteniendo concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100% etanol). Todas las soluciones utilizadas fueron proveídas por el Servicio de Microscopía Electrónica LANAIS-MIE (UBA-CONICET). Las muestras deshidratadas fueron secadas en un secador por punto crítico (CPD Polaron, Reino Unido), utilizando dióxido de carbono líquido como fluido de transición. A lo largo de los procedimientos descriptos, los biofilms de macrocolonias se manipularon con sumo cuidado para preservar al máximo su integridad estructural. Luego del secado, las macrocolonias se montaron en soportes de aluminio utilizando cinta adhesiva de doble faz y se recubrieron con oro en un pulverizador catódico (Pelco 9100 Sputter Coater, Estados Unidos). Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de barrido Zeiss GeminiSEM 360 (Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido, MACN - CONICET) operado a un voltaje de aceleración de 15 kV en modo de alto vacío. Se examinaron al menos cuatro macrocolonias independientes por cepa o condición.

3.11 Análisis estadísticos

La significancia estadística de los datos mostrados en el Capítulo 2, en donde se comparan las condiciones de crecimiento monomicrobianos vs. mixto, se determinó utilizando la prueba t de

Student (una cola). Para los datos presentados en el Capítulo 3, en donde se comparan los distintos tratamientos antimicrobianos, la significancia estadística se determinó aplicando One-way ANOVA y las pruebas a posteriori de Dunnett (para comparar cada grupo con un grupo control) y de Tukey (para comparar de a pares las medias de todos los grupos entre ellos). En todos los casos se utilizó el software GraphPad Prism versión 9 (GraphPad Software, EE.UU.). Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de P fueron menores a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO 1: Estudio observacional prospectivo sobre infecciones en UPD

Las úlceras de pie de diabetico (UPD) representan una seria complicación para los individuos con diabetes mellitus dado que son una zona de colonización bacteriana en donde se generan condiciones propicias para la formación de biofilms. Es por ello que resulta necesario una mejor comprensión de las comunidades microbianas establecidas en las mismas (Saeed *et al.* 2020). Como punto de partida para este trabajo de tesis se realizó un estudio microbiológico prospectivo de 18 meses de duración en colaboración con el Lab. de Microbiología del Hospital de Clínicas (UBA) de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, con el fin de identificar las especies microbianas más comúnmente presentes en UPD. Sobre un total de 114 casos, se observó una mayoría de pacientes de sexo masculino (75%) y el rango etario fue de 16 a 84 años, con una mediana en 59 años. Además, se reportaron 49 muestras monomicrobianas y 65 muestras polimicrobianas.

4.1.1. Especies aisladas de muestras monomicrobianas

Las muestras monomicrobianas correspondieron mayormente a bacterias Gram-positivas (67,3%) de 11 especies diferentes (Tabla 4). El resto de los aislados fueron identificados como bacterias Gram-negativas (32,7%) y abarcaron 5 especies distintas. Las especies prevalentes en estas muestras monomicrobianas fueron *E. faecalis*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* (20,4%, 16,3% y 12,2% de los casos, respectivamente).

Posteriormente se analizó la sensibilidad a antibióticos de estas especies prevalentes (Tabla 5). La totalidad de los aislados de *E. faecalis* fueron sensibles a ampicilina y a vancomicina. El 25% de las cepas de *S. aureus* fueron meticilino-resistentes (determinado por la sensibilidad a oxacilina) mientras que se observó un 50% de aislados sensibles a eritromicina y a gentamicina. Además se determinó que todos los aislados fueron sensibles a vancomicina, linezolid, minociclina y TMS. Por otra parte, el 100% de los aislamientos de *P. aeruginosa* mostraron sensibilidad a colistina y también se observó una alta proporción de cepas sensibles a piperacilina-tazobactam; en cambio, en estos aislados se evidenció menor susceptibilidad a carbapenems, aminoglucósidos y ciprofloxacina.

Tabla 4. Microorganismos aislados en UPD monomicrobianas

Microorganismos	Cantidad de aislados (%)
Bacterias Gram-positivas	
<i>Enterococcus faecalis</i>	10 (20,4%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 (16,3%)
<i>Streptococcus grupo viridians</i>	3 (6,1%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3 (6,1%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2 (4,1%)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2 (4,1%)
<i>Enterococcus avium</i>	1 (2,0%)
<i>Vagococcus fluvialis</i>	1 (2,0%)
<i>Microbacterium sp.</i>	1 (2,0%)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1 (2,0%)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 (2,0%)
Bacterias Gram-negativas	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 (12,2%)
<i>Morganella morganii</i>	4 (8,2%)
<i>Escherichia coli</i>	2 (4,1%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 (4,1%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2 (4,1%)

Tabla 5. Sensibilidad a antibióticos de aislados prevalentes en UPD monomicrobianas

Microorganismo	Antibiótico evaluado	Cepas sensibles (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilina	100
	Ampicilina-Sulbactam	100
	Linezolid	90
	Vancomicina	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	Linezolid	100
	Vancomicina	100
	Oxacilina	75
	Ciprofloxacina	87,5
	Rifampicina	100
	Eritromicina	50
	Clindamicina	62,5
	Minociclina	100
	Gentamicina	50
	Trimetoprima-Sulfametoxazol	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piperacilina-Tazobactam	83,3
	Ceftazidima	50
	Cefepime	33,3
	Imipenem	66,7
	Meropenem	33,3
	Amikacina	50
	Gentamicina	33,3
	Ciprofloxacina	33,3
	Colistina	100

4.1.2. Especies aisladas de muestras polimicrobianas

A partir de los 65 casos de individuos con UPD polimicrobianas se obtuvieron 183 aislados microbianos, de los cuales 81 (49,7%) fueron identificados como bacterias Gram-positivas, 80 aislados correspondieron a bacterias Gram-negativas y 2 (1,2%) a hongos (Tabla 6). Estas muestras polimicrobianas exhibieron una amplia diversidad de especies, identificándose 17 especies Gram-positivas y 17 especies Gram-negativas. *E. faecalis* se destacó como el microorganismo más prevalente (56,9% de los pacientes), mientras que la segunda especie Gram-positiva más frecuente fue *S. aureus* (13,8% de los pacientes). En estas infecciones polimicrobianas los microorganismos Gram-negativos predominantes fueron *E. coli*, *M. morganii*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa* (24,6%, 20,0%, 18,5% y 12,3% de los pacientes).

Los casos polimicrobianos presentaron principalmente dos especies co-aisladas (61,3% de los pacientes), mientras que las muestras conteniendo tres y cuatro especies de manera simultánea fueron 24,6% y 12,3% de los pacientes, respectivamente. Resultó interesante que en el 74% de las infecciones que presentaron dos especies de microorganismos de manera concomitante, las mismas correspondieron a una especie Gram-positiva junto a una Gram-negativa. En particular, *E. faecalis* (37 casos polimicrobianos) fue frecuentemente co-aislada con *E. coli*, *M. morganii* y *P. aeruginosa* (30, 22 y 16%, respectivamente) (Fig. 6).

Finalmente, se analizó la sensibilidad a antibióticos de los microorganismos con mayor prevalencia en UPD polimicrobianas (Tabla 7). Al igual a lo observado en casos monomicrobianos, todos los aislados de *E. faecalis* fueron sensibles a ampicilina y vancomicina. Respecto a *S. aureus*, aproximadamente el 50% de las cepas fueron meticilino-resistentes; además se detectó este mismo porcentaje de aislados sensibles a eritromicina y clindamicina. El 100% de los aislamientos de *S. aureus* fueron sensibles a vancomicina, rifampicina y minociclina. Por otra parte, aproximadamente el 50% de las cepas de *E. coli* fueron sensibles a ampicilina-sulbactam, ciprofloxacina o trimetoprima-sulfametoxazol mientras que prácticamente la totalidad de los aislados fueron sensibles a amikacina y carbapenems. *M. morganii* presentó una muy alta proporción de aislados susceptibles a amikacina y piperacilina-tazobactam y también una proporción mayor al 50% de cepas sensibles a carbapenems, ciprofloxacina o gentamicina. Todas las cepas de *P. mirabilis* se evidenciaron sensibles a carbapenems y también se observó una muy alto porcentaje de cepas sensibles a piperacilina-tazobactam, amikacina y cefalosporinas. Los aislados de *P. aeruginosa* mostraron sensibilidad a colistina en alta proporción y en menor medida a amikacina, meropenem, piperacilina-tazobactam y ceftazidima.

Tabla 6. Especies microbianas aisladas de UPD polimicrobianas

Microorganismos	Aislados	% de casos
Bacterias Gram-positivas		
<i>Enterococcus faecalis</i>	37 (22,7%)	56,9%
<i>Staphylococcus aureus</i>	9 (5,5%)	13,8%
<i>Streptococcus grupo viridians</i>	8 (4,9%)	12,3%
<i>Enterococcus faecium</i>	5 (3,1%)	7,7%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4 (2,5%)	6,2%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2 (1,2%)	3,1%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2 (1,2%)	3,1%
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2 (1,2%)	3,1%
<i>Enterococcus avium</i>	2 (1,2%)	3,1%
<i>Enterococcus raffinosus</i>	2 (1,2%)	3,1%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Dermabacter hominis</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Corynebacterium stratium</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Pediococcus pentosaeus</i>	1 (0,6%)	1,5%
Bacterias Gram-negativas		
<i>Escherichia coli</i>	16 (9,8%)	24,6%
<i>Morganella morganii</i>	13 (8,0%)	20,0%
<i>Proteus mirabilis</i>	12 (7,4%)	18,5%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 (4,9%)	12,3%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6 (3,7%)	9,2%
<i>Enterobacter cloacae</i>	6 (3,7%)	9,2%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 (2,5%)	6,2%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3 (1,8%)	4,6%
<i>Proteus grupo vulgaris</i>	3 (1,8%)	4,6%
<i>Providencia rettgeri</i>	2 (1,2%)	3,1%
<i>Pseudomonas grupo putida</i>	2 (1,2%)	3,1%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Serratia marcescens</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Pasteurella dagmatis</i>	1 (0,6%)	1,5%
Hongos		
<i>Candida albicans</i>	1 (0,6%)	1,5%
<i>Candida tropicalis</i>	1 (0,6%)	1,5%

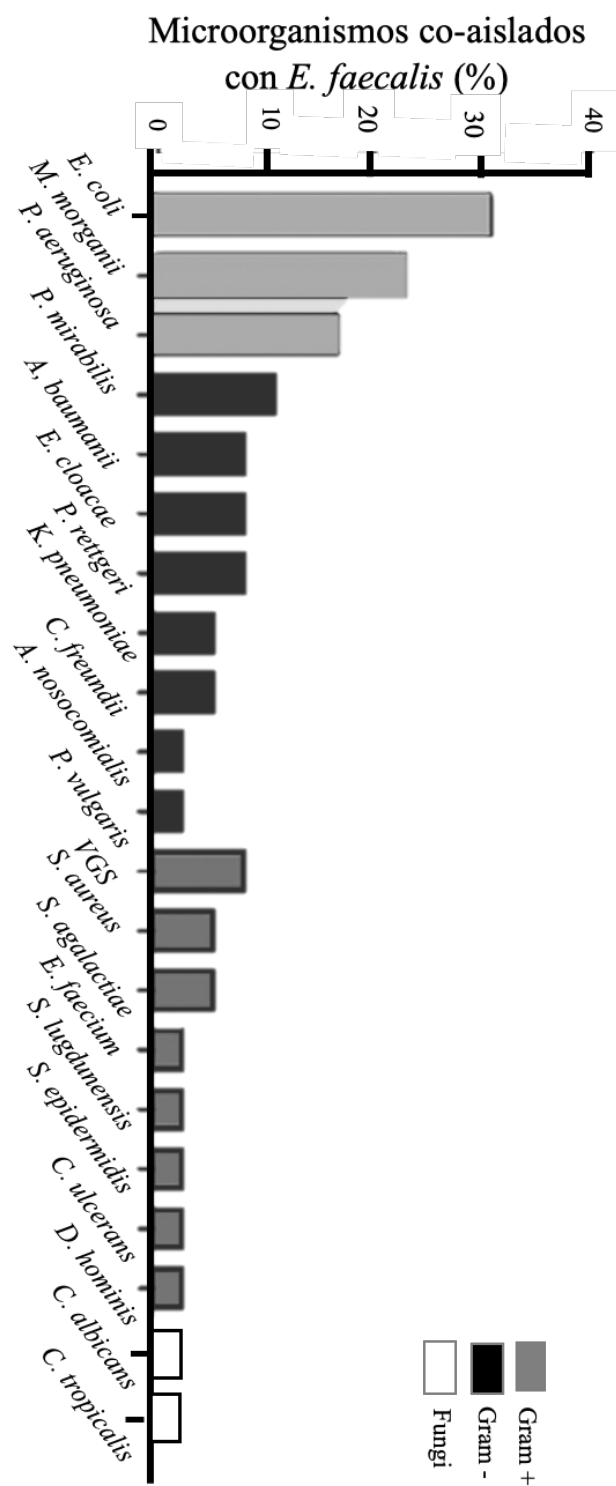


Figura 6. Microorganismos co-aislados con *E. faecalis* en UPD polimicrobianas. Resultados obtenidos a partir de un total de 37 casos polimicrobianos que reportaron *E. faecalis* (100%) en conjunto a 1, 2 o 3 especies microbianas (21, 10 y 6 casos, respectivamente).

Tabla7. Sensibilidad a antibióticos de aislados prevalentes en UPD polimicrobiana

Microorganismo	Antibiótico evaluado	Cepas sensibles (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilina	97,3
	Ampicilina-Sulbactam	100
	Linezolid	90
	Vancomicina	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	Linezolid	100
	Vancomicina	100
	Oxacilina	55,6
	Ciprofloxacina	77,8
	Rifampicina	100
	Eritromicina	55,6
	Clindamicina	55,6
	Minociclina	100
	Gentamicina	77,8
	Trimetoprima-Sulfametoxazol	88,9
<i>Escherichia coli</i>	Ampicilina	31,3
	Ampicilina-Sulbactam	43,8
	Cefazolina	68,8
	Ceftriaxona	68,8
	Ceftazidima	68,8
	Cefepime	75,0
	Imipenem	93,8
	Meropenem	93,8
	Ertapenem	93,8
	Amikacina	100
	Gentamicina	87,5
	Ciprofloxacina	50
	Trimetoprima-Sulfametoxazol	56,3
<i>Morganella morganii</i>	Piperacilina-Tazobactam	92,3
	Ceftriaxona	69,2
	Ceftazidima	69,2
	Cefepime	69,2
	Imipenem	84,6
	Meropenem	84,6
	Ertapenem	84,6
	Amikacina	100
	Gentamicina	61,5
	Ciprofloxacina	61,5
	Levofloxacina	61,5
	Trimetoprima-Sulfametoxazol	46,2

<i>Proteus mirabilis</i>	Ampicilina	41,7
	Ampicilina-Sulbactam	58,3
	Piperacilina-Tazobactam	91,7
	Cefazolina	75
	Ceftriaxona	75
	Ceftazidima	75
	Cefepime	75
	Imipenem	100
	Meropenem	100
	Ertapenem	100
	Amikacina	83,3
	Gentamicina	41,7
	Ciprofloxacina	58,3
	Trimetoprima-Sulfometoxazol	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piperacilina-Tazobactam	62,5
	Ceftazidima	62,5
	Cefepime	50
	Imipenem	25
	Meropenem	62,5
	Amikacina	65
	Gentamicina	37,5
	Ciprofloxacina	12,5
	Colistina	87,5

En resumen, las UPD mostraron una elevada frecuencia de infecciones polimicrobianas, en las que *E. faecalis* se asoció con frecuencia a *E. coli*, *M. morganii* y *P. aeruginosa*, reflejando interacciones microbianas relevantes en la patogenia. Si bien hubo detección de cepas multirresistentes, también se presentaron muchos aislados con opciones terapéuticas efectivas como vancomicina, amikacina, carbapenems y colistina. En conjunto, los resultados subrayan la importancia de la caracterización microbiológica para orientar tratamientos dirigidos y optimizar el manejo clínico de los pacientes.

4.2 CAPÍTULO 2: Interacciones interespecies en biofilms mixtos formados por bacterias aisladas de UPD polimicrobianas

4.2.1 Análisis de la capacidad formadora de biofilms de las especies más prevalentes en UPD polimicrobianas

Dado que este trabajo de tesis pretende aportar conocimiento relevante sobre las interacciones inter-especies en biofilms polimicrobianos que se desarrollan en UPD, resultó importante la elección de un medio de cultivo apropiado, que simule las condiciones nutricionales presentes en el lecho de las heridas crónicas de piel. Se eligió el medio Lubbock (Sun *et al.*, 2008), que está formulado sobre TSB, al cual se le añade lisado de glóbulos rojos equinos y plasma bovino (ver composición en Tabla 2).

Se utilizó este medio para analizar la capacidad formadora de biofilm de los aislados correspondientes a las especies bacterianas más frecuentes en infecciones polimicrobianas en UPD que se encontraban disponibles en nuestro laboratorio: *E. faecalis* (10 aislados), *S. aureus* (5 aislados), *E. coli* (9 aislados), *M. morganii* (5 aislados), *P. mirabilis* (5 aislados) y *P. aeruginosa* (3 aislados). Para ello, se siguió el protocolo estándar de desarrollo de biofilms en placas multipocillo de poliestireno, permitiendo la adhesión inicial de las bacterias a la superficie durante 3 h, y evaluando la biomasa de biofilms en función del tiempo (24, 48 y 72 h) mediante tinción con cristal violeta (Fig. 7).

Los resultados obtenidos evidenciaron la capacidad de producir biofilms de los aislados clínicos de las especies en estudio. Se observó un incremento en la biomasa en función del tiempo entre las 24 y 72 h, con excepción de los aislados de *P. mirabilis*, en donde los valores más altos de biomasa se detectaron a las 48 h y luego se observó un moderado descenso a las 72 h. Todas las cepas analizadas de *S. aureus* (Fig. 7B), *M. morganii* (Fig. 7D), *P. mirabilis* (Fig. 7E) y *P. aeruginosa* (Fig. 7F) pudieron considerarse como altos productores de biofilm a las 72 h ($A_{595nm} > 1$), al igual que el 70% de los aislados de *E. faecalis* (Fig. 7A) y de *E. coli* (Fig. 7C). *S. aureus* se destacó por presentar los mayores desarrollos de biomasa (valores de A_{595nm} entre 10 y 21 para biofilms de 72 h de las distintas cepas) (Fig. 7B), seguida por *P. aeruginosa*, en donde el 66 % de las cepas presentaron biomasa cuyos valores de A_{595nm} fueron superiores a 5,5 (Fig. 7F). Los mayores niveles de biomasa de los aislados de *P. mirabilis* estuvieron en un rango promedio de A_{595nm} entre 2,1 y 3,0 (Fig. 7E) y los de *M. morganii* entre 1,4 - 2,3 (Fig. 7D). Por su parte, los aislados de *E. faecalis* que fueron

altos productores de biofilm mostraron biomasa con A595nm entre 1,1 - 3,0 a las 72 h (Fig. 7A), mientras que los aislados de *E. coli* fueron los que desarrollaron menor biomasa en las condiciones experimentales ensayadas (Fig. 7C).

Con el propósito de lograr una mejor aproximación a las concentraciones elevadas de glucosa en pacientes diabéticos, se decidió suplementar el medio Lubbock con 1 % glucosa (Lubbock-Glc) tal como ha sido reportado en otros estudios relacionados a infecciones en personas diabéticas (Löffler *et al.*, 2013; Ballén *et al.*, 2020; Pouget *et al.*, 2021). Además, se adoptó el modelo de biofilm en macrocolonia, reportado por diversos autores como relevante para el estudio de biofilms bacterianos relacionados a heridas (Keogh *et al.*, 2016; Wong *et al.* 2022; Liu *et al.*, 2024). Este modelo consiste en inocular una dada cantidad de bacterias (aprox 5×10^5 UFC) en una gota sobre un medio agarizado (en nuestro caso Lubbock-Glc) e incubar a 37°C para permitir el desarrollo del biofilm.

Se seleccionó un aislado clínico de cada una de las especies de interés y se realizaron ensayos de desarrollo de biofilms en macrocolonia durante 24 h. *E. faecalis* fue la especie que mostró menor desarrollo, observándose macrocolonias de 0,5 cm de diámetro, de aspecto plano y cuyo recuento de células viables fue aprox. 6 Log₁₀ UFC (Tabla 8). Por otra parte, las macrocolonias de *S. aureus*, *E. coli*, *M. morganii* y *P. aeruginosa* evidenciaron un mayor tamaño y un rango de UFC entre 8,5 - 9,2 Log₁₀ UFC/macrocolonia. En particular, los biofilms de *M. morganii* y *P. aeruginosa* mostraron un claro aspecto mucoso, mientras que *P. mirabilis* presentó el fenotipo de swarming característico de esta especie.

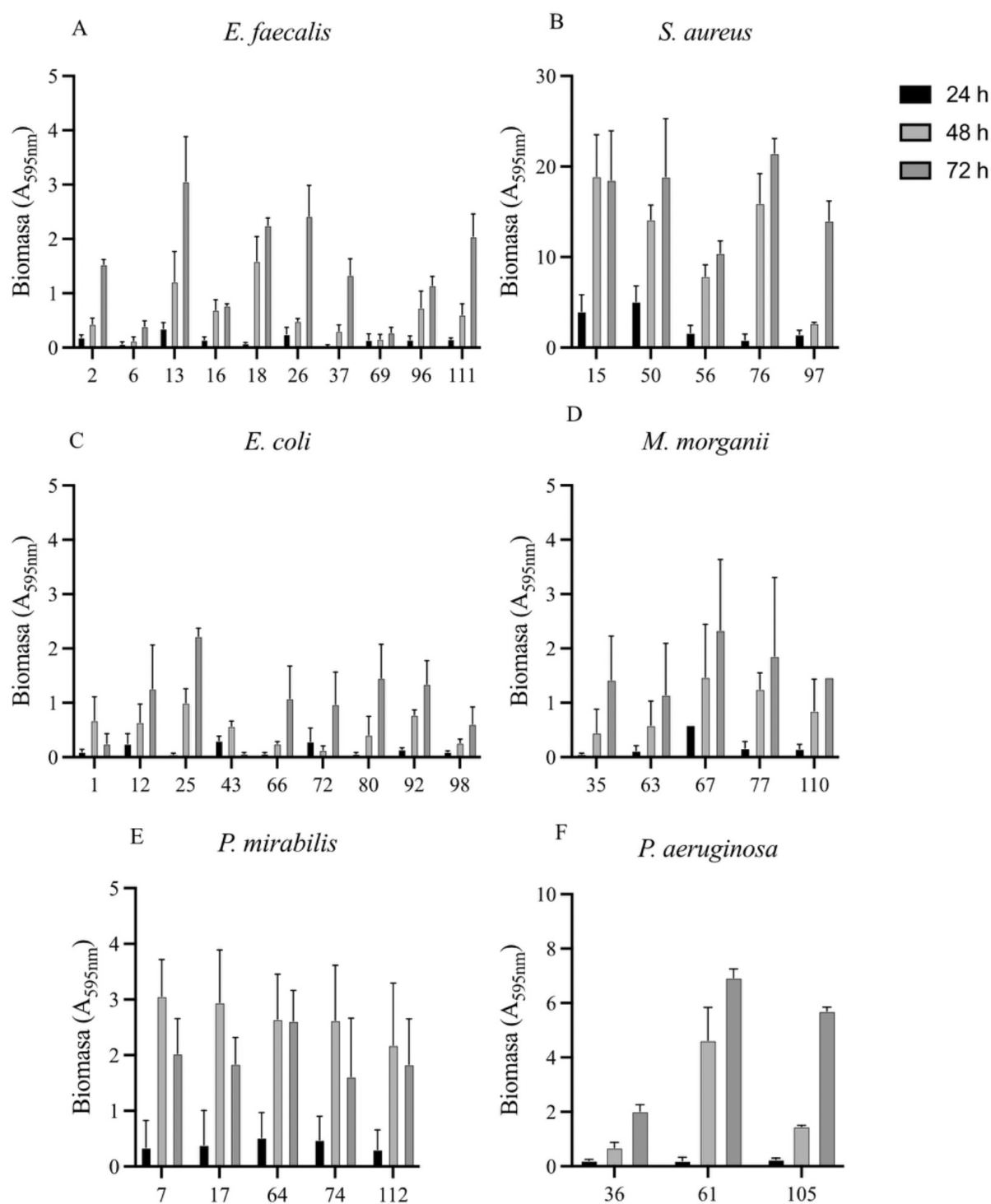
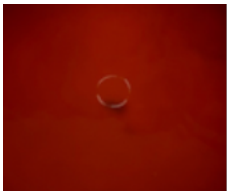
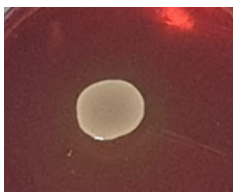
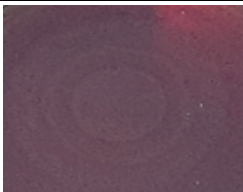
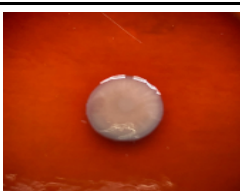


Figura 7. Biomasa de biofilms de aislados clínicos de UPD polimicrobianas en placas multipocillo mediante el ensayo de cristal violeta. Aislados de las especies prevalentes en UPD polimicrobianas fueron inoculados en medio Lubbock sobre placas multipocillos de poliestireno. Se determinó la producción de biomasa de los aislados clínicos indicados a 24, 48 y 72 h por medición de la absorbancia a 595 nm (A_{595nm}) luego de la tinción con cristal violeta. Los datos se expresan como la media $\pm$ E.E. de tres experimentos independientes.

Tabla 8. Biofilms desarrollados en el modelo de macrocolonia en Lubbock-Glc-agar

Microorganismo	Imagen representativa ^a	Células viables/macrocolonia (Log ₁₀ UFC ± DE) ^a
<i>E. faecalis</i> Ef037		5,92 ± 0,74
<i>S. aureus</i> Sa015		9,19 ± 0,06
<i>E. coli</i> Ec012		8,79 ± 0,72
<i>M. morganii</i> Mm035		8,50 ± 0,25
<i>P. mirabilis</i> Pm017		n.d.
<i>P. aeruginosa</i> Pa036		9,02 ± 0,23

^aBiofilms desarrollados durante 24 h a 37°C. Cada imagen tiene un tamaño aproximado de 3x3cm.

4.2.2 Biofilms mixtos de *E. faecalis*/ *E. coli*: coexistencia de ambas especies y mejor crecimiento de *E. faecalis* en presencia de *E. coli*.

Con el propósito de estudiar si las interacciones inter-específicas entre *E. faecalis* y *E. coli* modulan el crecimiento de estos microorganismos en biofilms mixtos, se seleccionaron tres pares de cepas de *E. faecalis* (Ef) y *E. coli* (Ec) co-aisladas de UPD: Ef013/Ec012, Ef069/Ec066 y Ef096/Ec098. Se desarrollaron biofilms simples (monomicrobianos) y mixtos (duales o polimicrobianos) en macrocolonias sobre Lubbock-Glc-agar a 37°C durante 24 h. Para los biofilms mixtos se partió de inóculos conteniendo igual número de células de cada una de las especies involucradas. El crecimiento de cada especie dentro de las macrocolonias se definió por recuento de UFC en medios selectivos.

El análisis del crecimiento bacteriano en macrocolonias monomicrobianas al cabo de 24 h evidenció recuentos de UFC significativamente más bajos para los tres aislados de *E. faecalis* que para los de *E. coli* (diferencia promedio entre *E. faecalis* y *E. coli*: 1,6-2,9 Log₁₀ UFC, p<0,05) (Fig. 8A-C). Estos resultados indican que las condiciones experimentales utilizadas fueron más favorables para el desarrollo de *E. coli* en biofilms de una sola especie en comparación con *E. faecalis*.

En biofilms mixtos, todas las cepas de *E. coli* crecieron a niveles similares a los observados en macrocolonias monomicrobianas de esta especie. Por otra parte, no todas las cepas de *E. faecalis* analizadas se comportaron de la misma manera en biofilms duales con *E. coli*. En el caso de *E. faecalis* 013 (Ef013), ésta mostró un mayor número de células cuando creció junto con *E. coli* 012 (Ec012), en comparación a lo observado en biofilms de una sola especie (aprox. 1 Log₁₀ de incremento en UFC, p<0,05) (Fig. 8A). En cambio, para las otras dos cepas de *E. faecalis* (Ef067 y Ef096) se observaron recuentos de UFC similares en macrocolonias simples y mixtas (Fig. 8B-C).

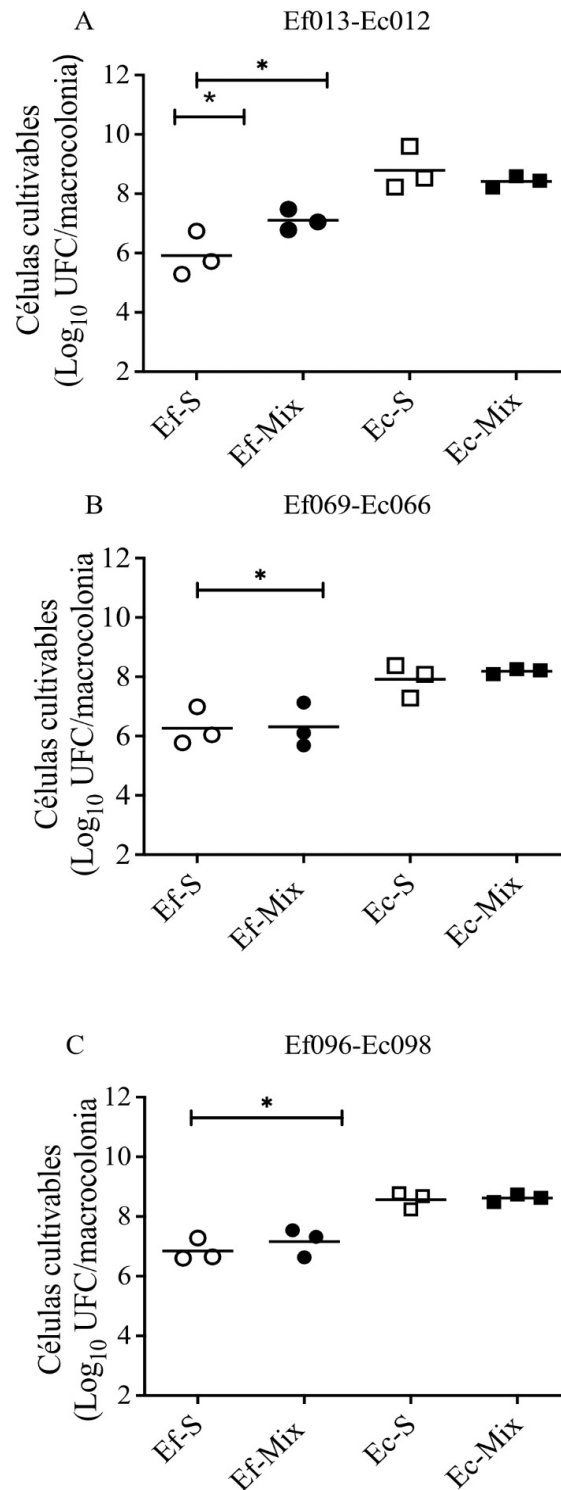


Figura 8. Crecimiento bacteriano de biofilms de *E. faecalis* y *E. coli* en macrocolonias. Se desarrollaron macrocolonias de especies simples (S) y mixtas (Mix) en Lubbock-Glc-agar durante 24 h a 37°C y posteriormente se realizó el recuento de UFC de cada especie. Las especies co-aisladas de UPD estudiadas fueron Ef013/Ec012, Ef069/Ec098 y Ef096/Ec098. En cada caso, N = 3 experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ mediante la prueba t de Student pareada.

También resultó de interés evaluar el porcentaje de cada especie presente en los biofilms mixtos a las 24h, teniendo en cuenta que el inóculo inicial presenta cantidades iguales de ambas especies (Fig. 9). En todos los casos se observó una mayor proporción de *E. coli* que de *E. faecalis* en los biofilms mixtos. Macrocolonias mixtas de Ef069/Ec066 y Ef096/Ec098 presentaron un porcentaje de células de *E. faecalis* inferior al 5%, mientras que *E. faecalis* Ef013 tuvo un desempeño ligeramente mejor en los biofilms Ef013/Ec012 (donde el porcentaje de células de Ef013 superó el 10%).

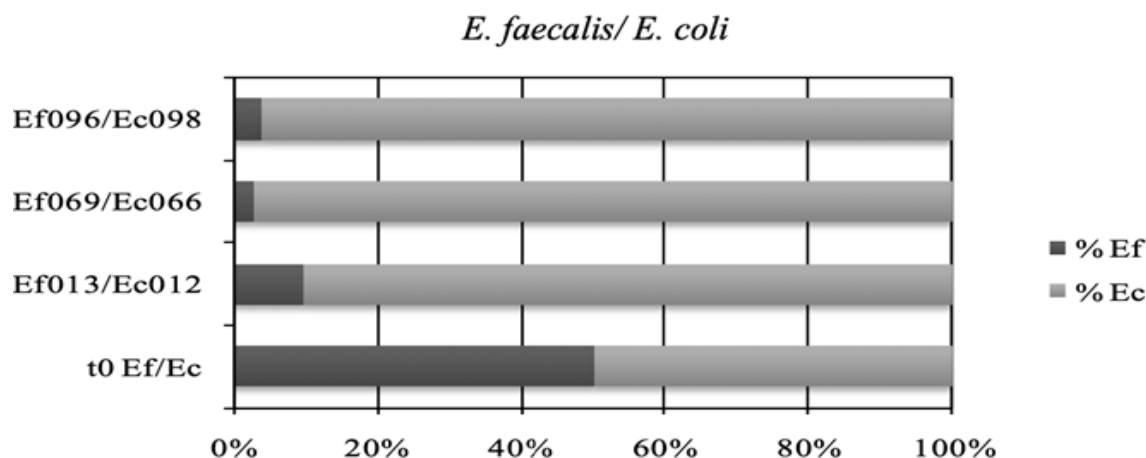


Figura 9. Porcentajes de células viables de *E. faecalis* (Ef) y *E. coli* (Ec) en biofilms mixtos. Cultivos mixtos conteniendo igual número de cada especie bacteriana fueron inoculados sobre la superficie de placas de Lubbock-Glc-agar (t0). Biofilms en macrocolonia fueron desarrollados por 24 h y luego se realizó el recuento de UFC de cada especie y se calculó el porcentaje de cada especie en la macrocolonia. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes para cada combinación de especies.

Haciendo foco en la interacción entre Ef013 y Ec012, la cual había mostrado un efecto beneficioso sobre el crecimiento de Ef013 en biofilms en macrocolonia, se exploró el efecto sobre la biomasa de los biofilms. Para ello, las macrocolonias fueron desarrolladas durante 24 h sobre membranas estériles de ésteres de celulosa de 0,2 μm de porosidad colocadas sobre Lubbock-Glc-agar y posteriormente teñidas con cristal violeta. Se observó que al formar macrocolonias monomicrobianas, Ec012 mostró aprox. el doble de biomasa que Ef013 (Tabla 9). Por su parte, los biofilms mixtos exhibieron niveles de biomasa similares a los observados para macrocolonias simples de Ec012.

Tabla 9. Biomasa de biofilms de *E. faecalis* y *E. coli* en macrocolonia

Cepas	Biomasa (A_{595nm}) (promedio $\pm$ DE) ^a
Ef013-S	0,837 $\pm$ 0,087
Ec012-S	1,542 $\pm$ 0,055
Ef013/Ec012	1,707 $\pm$ 0,347

^aLos datos corresponden a la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

Para investigar si Ec012 también favorece el crecimiento de Ef013 en cultivos planctónicos, se monitoreó el número de células viables en cultivos líquidos de Lubbock-Glc inoculados con una sola de las especies o de manera mixta. Al igual que lo previamente observado en biofilms, cultivos monomicrobianos de Ec012 mostraron crecimiento significativamente mejor que cultivos simples de Ef013 (recuento celular a las 24 h: $7,7 \pm 0,2$ vs $5,5 \pm 0,3$ Log₁₀ UFC/ml, respectivamente; $p < 0,05$) (Fig. 10A-B). En cultivos mixtos (Fig. 10C), tanto *E. faecalis* como *E. coli* crecieron a niveles similares a lo observado para cada especie en cultivos monomicrobianos.

Estos resultados indican que el efecto beneficioso sobre el crecimiento de Ef013 observado en biofilms mixtos con Ec012 es específico de este modo de crecimiento ya que no se observó en cultivos planctónicos.

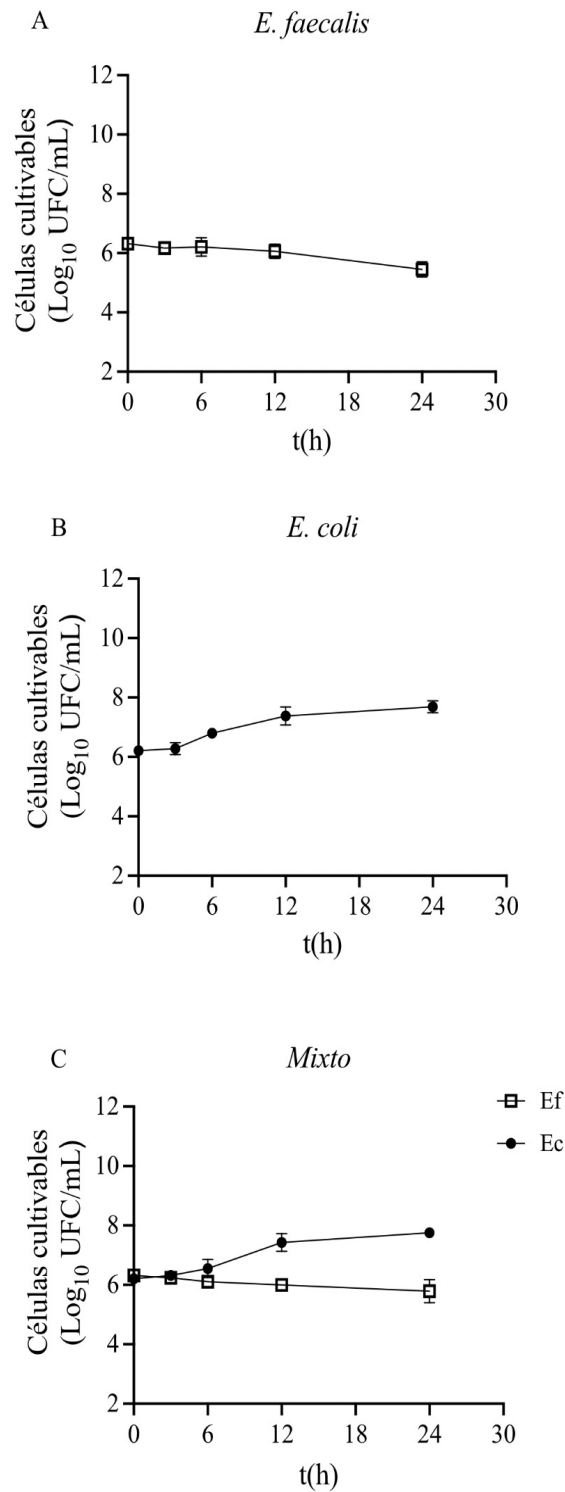


Figura 10. Cultivos planctónicos de *E. faecalis* y *E. coli* luego de inoculaciones simples y mixtas. Curvas de tiempo de crecimiento planctónico en Lubbock-Glc mediante determinación del número de células cultivables (UFC). Las especies co-aisladas de UPD fueron *E. faecalis* Ef013 y *E. coli* Ec012. Cada punto representa la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes. El análisis estadístico mediante prueba *t* de Student no mostró diferencias significativas entre las curvas a los tiempos analizados durante el experimento ($p > 0.05$).

Se analizó también si estas diferencias observadas para los crecimientos en macrocolonias eran adjudicables solamente al crecimiento en contexto de similitud a la herida (medio Lubbock-Glc) o si se podría extrapolar a condiciones de crecimiento en un medio rico de uso estándar en el laboratorio (TSA). Cuando biofilms en macrocolonia de Ef013/Ec012 fueron desarrollados en TSA, no se observaron diferencias en el recuento de UFC entre biofilms mixtos o simples, ni para Ef013 ($8,6 \pm 0,3$ vs $8,5 \pm 0,5$ Log UFC/macrocolonia, respectivamente) ni para Ec012 ($8,1 \pm 0,1$ vs $8,2 \pm 0,2$ Log₁₀ UFC/macrocolonia, respectivamente) (Fig. 11). Este resultado sugiere que el efecto positivo que Ec012 ejerce sobre Ef013 necesita de las condiciones nutricionales específicas simuladas por el medio Lubbock-Glc.

Se exploró posteriormente si Ef013 también podría mostrar un mejor crecimiento en biofilms mixtos con cepas de *E. coli* no co-aisladas comparado con biofilms de una sola especie. Así fue como se combinaron las cepas *E. coli* 066 (Ec066) y 098 (Ec098) con Ef013 y se determinó la relación de número de células entre biofilms mixtos y de una sola especie. Como se observó con Ec012, el establecimiento de Ef013 en macrocolonias mixtas con Ec066 y Ec098 resultó en un número significativamente mayor de células de *E. faecalis* que esta cepa creciendo sola en biofilms mientras que no se detectaron diferencias en las UFC de *E. coli* (Fig. 12A). Por el contrario, cuando Ec012 se combinó en biofilms de macrocolonias con cepas no co-aisladas de *E. faecalis*, como Ef069 y Ef096, no se observó un claro efecto beneficioso en el crecimiento de *E. faecalis* (Fig. 12B). En estas combinaciones, los números de células de Ec012 no se vieron afectados o se redujeron parcialmente en biofilms mixtos frente a monomicrobianos. Estos hallazgos sugieren que las cepas de *E. coli* pueden establecer una interacción positiva en biofilms con Ef013, favoreciendo su crecimiento.

En conjunto, los resultados muestran que *E. faecalis* y *E. coli* pueden coexistir en biofilms y en cultivos planctónicos desarrollados en un medio que simula las condiciones nutricionales en UPD. Además, se encontró una cepa de *E. faecalis* cuyo crecimiento en biofilms se ve favorecido por la presencia de *E. coli*.

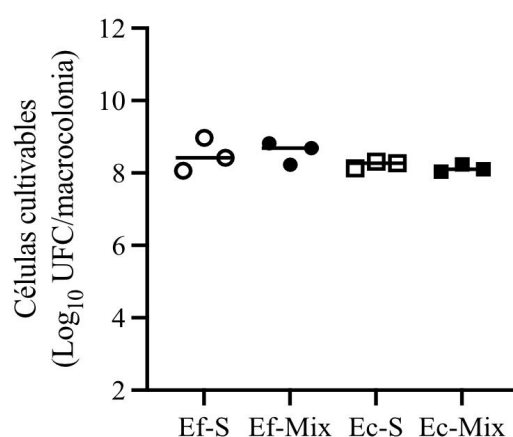


Figura 11. Crecimiento bacteriano de macrocolonias de *E. faecalis* y *E. coli* en medio TSA. Se desarrollaron macrocolonias de especies simples (S) y mixtas (Mix) de *E. faecalis* Ef013 y *E. coli* Ec012 en TSA durante 24 h a 37°C y posteriormente se realizó el recuento de UFC de cada especie. En cada caso, N = 3 experimentos independientes.

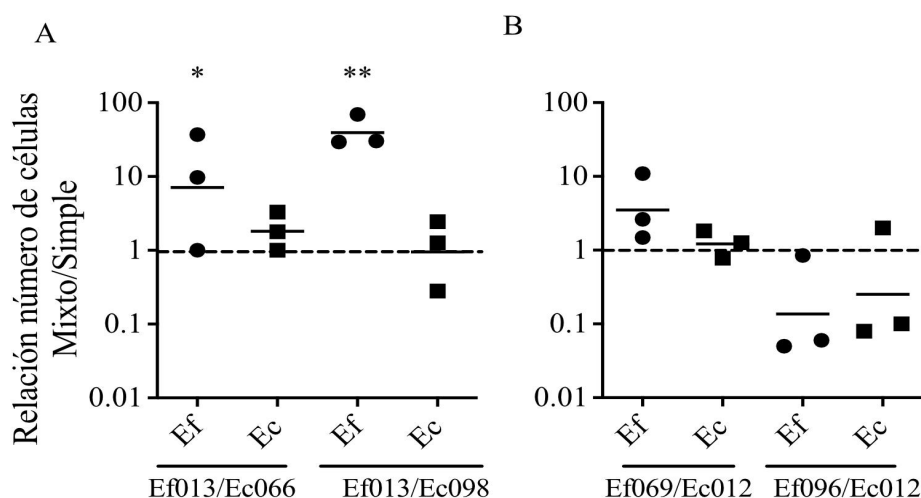


Figura 12. Comparación del crecimiento bacteriano en macrocolonias mixtas y simples de *E. faecalis* 013 con cepas de *E. coli* no co-aisladas (Ec066 y Ec098) (A) y de *E. coli* 012 con cepas de *E. faecalis* no co-aisladas (Ef069 y Ef096) (B). Se calcularon las proporciones de números de células de cada especie en biofilms mixtos respecto a biofilms monomicrobianos (simples) para macrocolonias desarrolladas en Lubbock-Glc-agar durante 24 h. En cada caso, N = 3 experimentos independientes. Las líneas de puntos indican una proporción de número de células en biofilms mixtos respecto a biofilms simples igual a 1, lo que representaría similar crecimiento de una cepa particular en macrocolonias simples y mixtas. (*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$ por test t de Student pareado cuando se comparó con la proporción inicial (a t0 la proporción fue igual a 1).

4.2.3 *Enterococcus faecalis* y *Morganella morganii* exhiben interacción neutral en biofilms mixtos

Puesto que *E. faecalis* y *M. morganii* fueron frecuentemente co-aisladas en UPD polimicrobianas, se evaluó la dinámica de crecimiento de estas especies bacterianas en biofilms mixtos *in vitro* en macrocolonias sobre medio Lubbock-Glc-agar. Para ello se usaron tres pares de cepas clínicas co-aisladas de UPD: Ef037/Mm035, Ef069/Mm067 y Ef111/Mm110.

Determinaciones de UFC de macrocolonias monomicrobianas realizadas a las 24 h de desarrollo mostraron que todas las cepas de *M. morganii* analizadas alcanzaron números de células más altos que las cepas de *E. faecalis* (7,6-8,6 vs 5,5-6,1 Log₁₀ UFC/macrocolonia, respectivamente; p<0,05) (Fig. 13A-C). En macrocolonias mixtas se observó que cada especie bacteriana creció a niveles similares que su correspondiente macrocolonia simple, sugiriendo una interacción neutral entre *E. faecalis* y *M. morganii* en las condiciones experimentales analizadas (Fig. 13A-C).

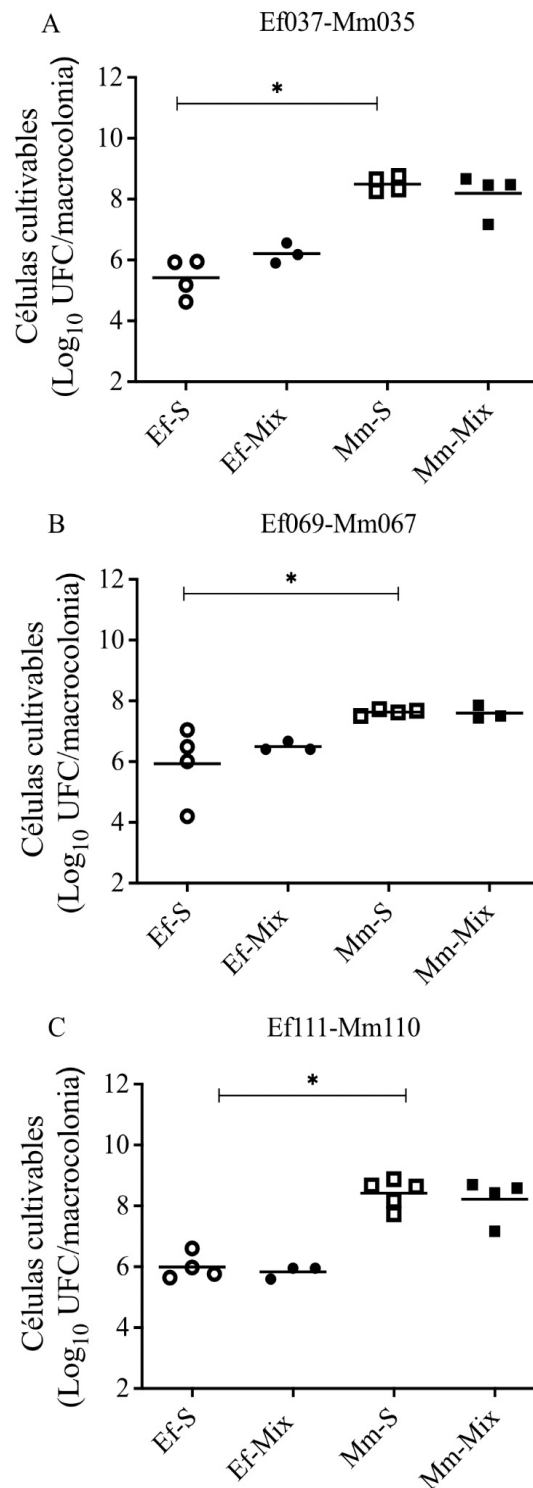


Figura 13. Crecimiento bacteriano de *E. faecalis* y *M. morganii* en macrocolonias. Se desarrollaron macrocolonias de especies simples (S) y mixtas (Mix) en Lubbock-Glc-agar durante 24 h a 37°C y posteriormente se realizó el recuento de UFC de cada especie. Las especies co-aisladas de UPD estudiadas fueron Ef037/Mm035, Ef069/Mm067 y Ef111/Mm110. En cada caso, N = 3 experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ mediante la prueba t de Student pareada.

La evaluación de la composición microbiana en biofilms mixtos mostró una mayor proporción de *M. morganii* (superior al 96%) que de *E. faecalis* (inferior al 4%) en los tres pares de cepas estudiados (Fig. 14).

Se realizó también la cuantificación de la biomasa de biofilms mediante tinción con violeta cristal para biofilms de especies únicas y mixtas Ef111 y Mm110. Las biofilms Mm110 de una sola especie exhibieron aprox. 2,7 veces mayor biomasa que Ef111 (Tabla 10). Además, las biofilms de especies mixtas exhibieron niveles similares de biomasa a la biopelícula de una sola especie Mm110.

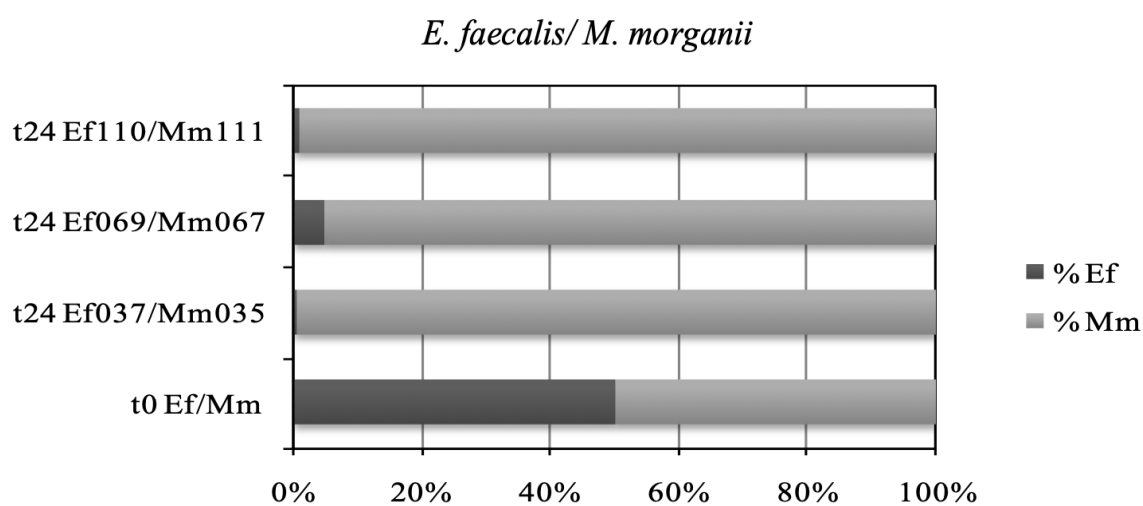


Figura 14. Porcentajes de células viables de *E. faecalis* (Ef) y *M. morganii* (Mm) en biofilms mixtos. Cultivos mixtos conteniendo igual número de cada especie bacteriana fueron inoculados sobre la superficie de placas de Lubbock-Glc-agar (t0). Biofilms en macrocolonia fueron desarrollados por 24 h y luego se realizó el recuento de UFC de cada especie y se calculó el porcentaje de cada especie en la macrocolonia. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes para cada combinación de especies.

Tabla 10. Biomasa de biofilms de *E. faecalis* y *M. morganii* en macrocolonia.

Cepas	Biomasa (A_{595nm}) (Mean $\pm$ DE) ^a
Ef111-S	0,733 $\pm$ 0,027
Mm110-S	1,967 $\pm$ 0,065
Ef111/Mm110	2,084 $\pm$ 0,086

^aLos datos corresponden a la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

Por último, al igual que lo observado en biofilms mixtos, en crecimiento planctónico también se observó interacción neutra entre *E. faecalis* y *M. morganii* (Fig. 15).

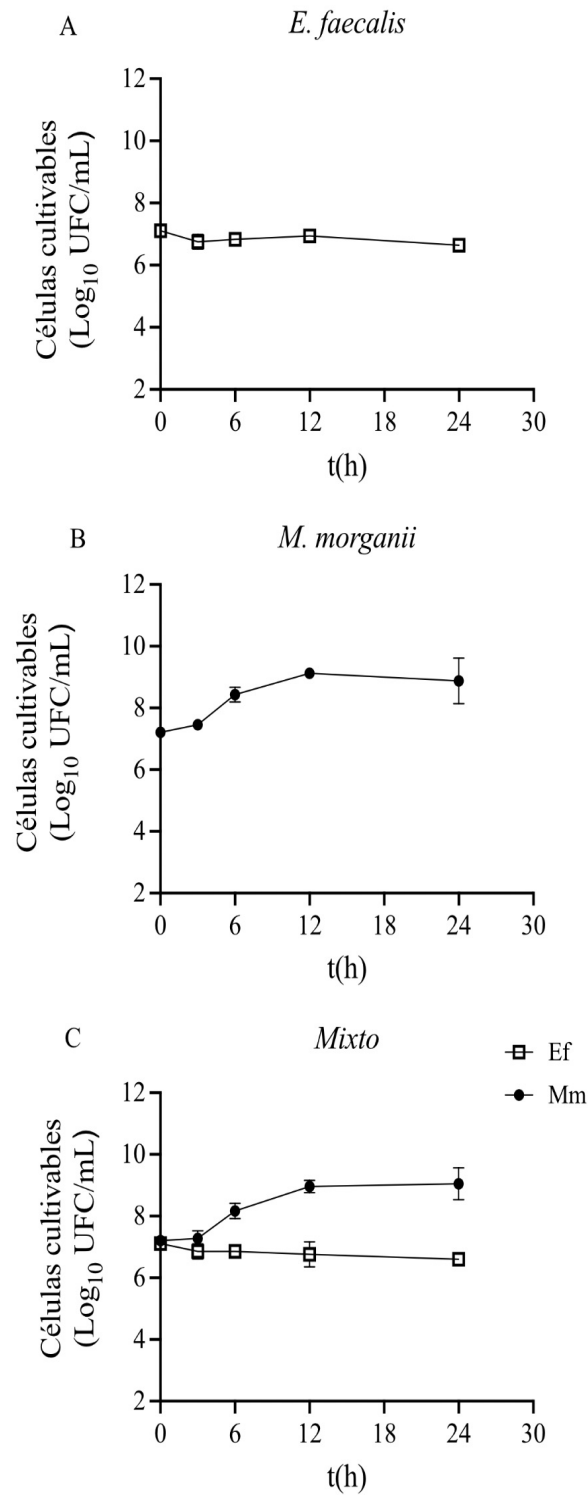


Figura 15. Cultivos planctónicos de *E. faecalis* y *M. morganii* luego de inoculaciones simples y mixtas. Curvas de tiempo de crecimiento planctónico en Lubbock-Glc mediante determinación del número de células cultivables (UFC). Las especies co-aisladas de UPD fueron *E. faecalis* Ef111 y *M. morganii* Mm110. Cada punto representa la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes. El análisis estadístico mediante prueba *t* de Student no mostró diferencias significativas entre las curvas a los tiempos analizados durante el experimento ($p > 0.05$).

4.2.4 *P. aeruginosa* favorece el crecimiento de *E. faecalis* en biofilms mixtos

Para investigar las interacciones bacterianas que ocurren en biofilms mixtos conformados por *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, desarrollados en Lubbock-Glc-agar, se utilizaron tres pares de cepas clínicas co-aisladas: Ef037/Pa036, Ef062/Pa061 y Ef106/Pa105.

Los recuentos de UFC en macrocolonias monomicrobianas de 24 h evidenciaron menor crecimiento de *E. faecalis* comparado con *P. aeruginosa* (4,4-5,3 vs 8,4-9,2 Log₁₀ UFC/macrocolonia, respectivamente; $p < 0,05$) (Fig. 16A-C).

Por otra parte, en biofilms mixtos se observó un mejor crecimiento de *E. faecalis* en comparación a macrocolonias simples, en los tres pares clínicos analizados (Fig. 16A-C). Este aumento fue estadísticamente significativo para Ef037 (4,5 Log₁₀ de aumento en UFC, $p < 0,01$) (Fig. 16A) y Ef062 (3,8 Log₁₀ de incremento en UFC, $p < 0,01$) (Fig. 16B), mientras que Ef106 exhibió un aumento de 2 Log₁₀ ($p = 0,06$) (Fig. 16C). En cambio, no se presentaron diferencias en el número de células viables en macrocolonias mixtas comparadas con biofilms simples, en ninguna de las cepas estudiadas (Fig. 16A-C).

Posteriormente se realizaron experimentos para discernir si el efecto beneficioso para el crecimiento de *E. faecalis* en biofilms mixtos con *P. aeruginosa* observado en cepas clínicas co-aisladas de UPD ocurre también en cepas de referencia, lo que daría cuenta de un efecto más general entre estas dos especies bacterianas. Para ello se ensayaron las cepas *E. faecalis* ATCC29212 y *P. aeruginosa* PAO1. Notablemente, también se obtuvo un aumento estadísticamente significativo en los recuentos de UFC de esta cepa *E. faecalis* en macrocolonias mixtas en comparación con las monomicrobianas (4,1 Log₁₀ mayor número de UFC; $p < 0,01$) (Fig. 16D).

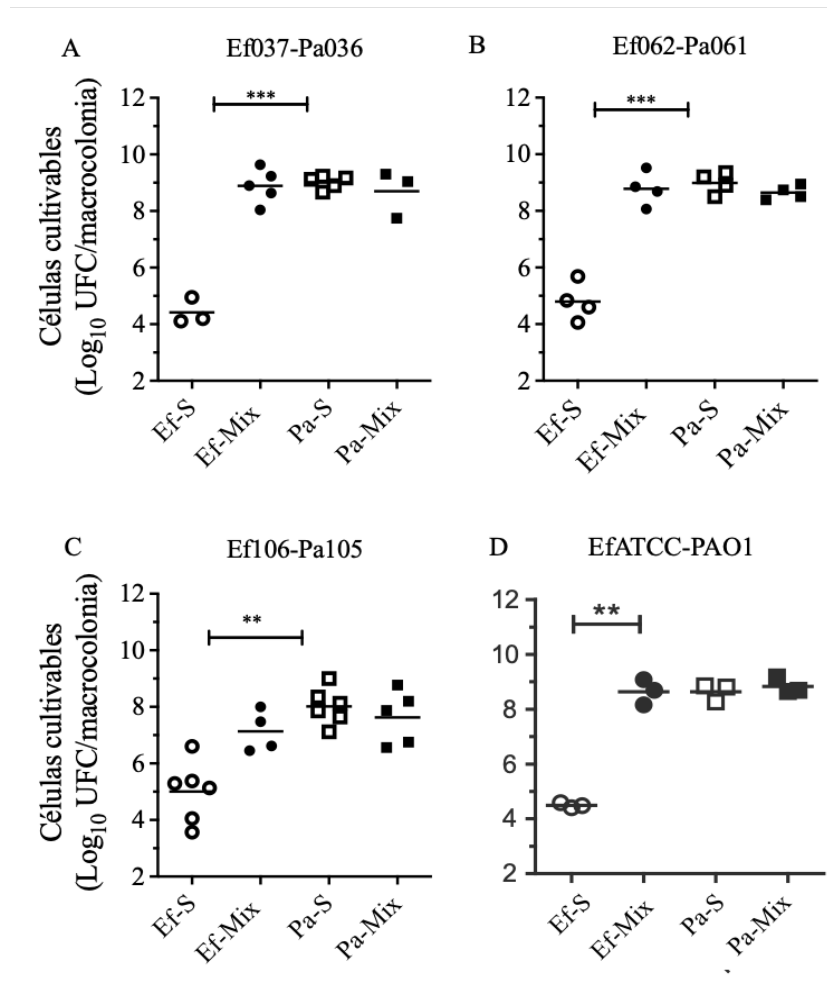


Figura 16. Crecimiento bacteriano de *E. faecalis* y *P. aeruginosa* en macrocolonias. Se desarrollaron macrocolonias de especies simples (S) y mixtas (Mix) en Lubbock-Glc-agar durante 24 h a 37°C y posteriormente se realizó el recuento de UFC de cada especie. Las especies co-aisladas de UPD estudiadas fueron Ef037/Pa036, Ef062/Pa061 y Ef106/Mm105; también se ensayaron las cepas de referencia EfATCC29212/PAO1. En cada caso, N = 3 experimentos independientes. (**) $p < 0,01$ mediante la prueba t de Student pareada.

La determinación del porcentaje de cada especie a las 24 h mostró diferentes contribuciones de las cepas individuales de *E. faecalis* y *P. aeruginosa* a la composición de las comunidades mixtas (Fig. 17). Mientras que biofilms mixtos de Ef106/Pa105 estuvieron compuestos por un 26% de *E. faecalis* y un 74% de *P. aeruginosa*, estas proporciones se invirtieron en macrocolonias de Ef062/Pa061 que mostraron un 62% de *E. faecalis* y un 38% de *P. aeruginosa*.

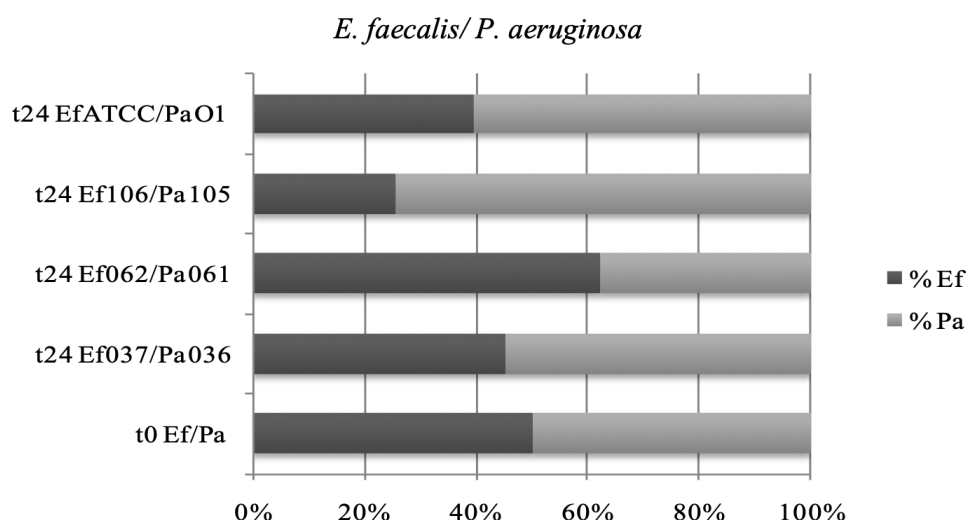


Figura 17. Porcentajes de células viables de *E. faecalis* (Ef) y *P. aeruginosa* (Pa) en biofilms mixtos. Cultivos mixtos conteniendo igual número de cada especie bacteriana fueron inoculados sobre la superficie de placas de Lubbock-Glc-agar (t0). Biofilms en macrocolonia fueron desarrollados por 24 h y luego se realizó el recuento de UFC de cada especie y se calculó el porcentaje de cada especie en la macrocolonia. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes para cada combinación de especies.

Dado que todos los pares ensayados de *E. faecalis*/*P. aeruginosa* mostraron un efecto beneficioso para el crecimiento de *E. faecalis* en biofilms mixtos, se continuaron los estudios con el par Ef037/Pa036.

Se determinó la biomasa de los biofilms simples y mixtos de 24 h mediante tinción con cristal violeta (Tabla 11). Biofilms monomicrobianos de Pa036 exhibieron aprox. 2,5 veces mayor cantidad de biomasa que macrocolonias simples de Ef037. Además, la biomasa de los biofilms mixtos fue similar a la observada para biofilms de Pa036 simple.

Por otra parte, cuando se determinó el crecimiento bacteriano en macrocolonias desarrolladas por 24 h en medio TSA, en lugar de Lubbock-Glc-agar, no se observó ninguna diferencia en el recuento

de UFC en biofilms mixtos comparado con los de una sola especie ni para Ef037 ($8,2 \pm 0,3$ vs $8,9 \pm 0,1$ Log₁₀ UFC/macrocлонia, respectivamente) ni para Pa036 ($9,5 \pm 0,2$ vs $10,1 \pm 0,2$ Log₁₀ UFC/macrocлонia, respectivamente) (Fig. 18). Este resultado sugiere que el efecto positivo que *P. aeruginosa* ejerce sobre *E. faecalis* tiene lugar bajo condiciones nutricionales específicas como las que provee el medio Lubbock-Glc.

Tabla 11. Biomasa de biofilms de *E. faecalis* y *P. aeruginosa* en macrocлонia.

Cepas	Biomasa (A_{595nm}) (Mean $\pm$ DE) ^a
Ef037-S	$0,721 \pm 0,197$
Pa036-S	$1,831 \pm 0,184$
Ef037/Pa036	$1,837 \pm 0,293$

^aLos datos corresponden a la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

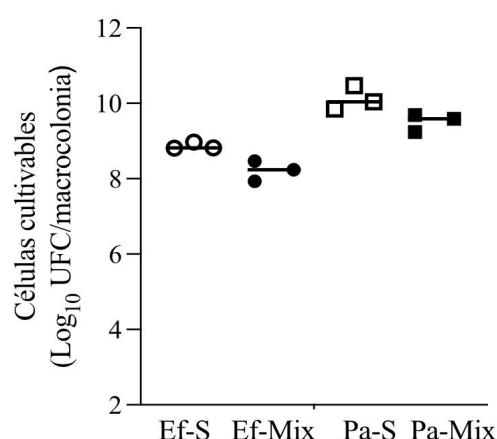


Figura 18. Crecimiento bacteriano de macrocлонias de *E. faecalis* y *P. aeruginosa* en medio TSA. Se desarrollaron macrocлонias de especies simples (S) y mixtas (Mix) de *E. faecalis* Ef037 y *P. aeruginosa* Pa036 en TSA durante 24 h a 37°C y posteriormente se realizó el recuento de UFC de cada especie. En cada caso, N = 3 experimentos independientes.

Posteriormente se investigó si en cultivos planctónicos en medio Lubbock-Glc también ocurre un mejor crecimiento de *E. faecalis* en co-inoculación con *P. aeruginosa* que en cultivos monomicrobianos. Para ello, se determinó el número de UFC/ml en cultivos líquidos simples y mixtos a lo largo de 24 h (Fig. 19). Los resultados obtenidos evidenciaron igual crecimiento de Ef037 en cultivos mixtos que en cultivos monomicrobianos a todos los tiempos ensayados. Lo mismo se observó para Pa036. En ambos casos (mixtos y simples), *P. aeruginosa* mostró un mayor crecimiento que *E. faecalis* en las condiciones ensayadas (recuento celular a las 24 h: Pa-S = $9,85 \pm 0,5$ y Pa-Mix = $10,3 \pm 0,10$ vs Ef-S = Ef-Mix = $6,06 \pm 0,4$ Log₁₀UFC ml⁻¹, respectivamente; p<0,05) (Fig. 19). Las dos especies ensayadas presentaron comportamientos de crecimiento similares al cultivarse juntas.

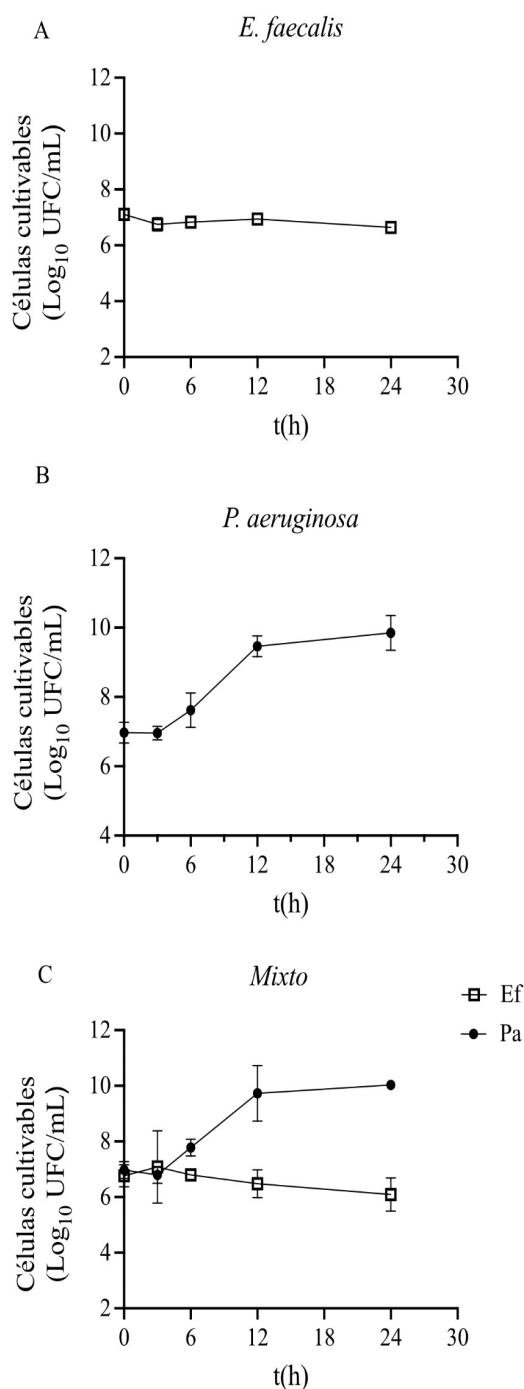


Figura 19. Cultivos planctónicos de *E. faecalis* y *P. aeruginosa* luego de inoculaciones simples y mixtas. Curvas de tiempo de crecimiento planctónico en Lubbock-Glc mediante determinación del número de células cultivables (UFC). Las especies co-aisladas de UPD fueron *E. faecalis* Ef037 y *P. aeruginosa* Pa036. Cada punto representa la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes. El análisis estadístico mediante prueba *t* de Student no mostró diferencias significativas entre las curvas a los tiempos analizados durante el experimento ($p > 0.05$).

En conjunto, los resultados permiten destacar varias consideraciones relevantes. Las especies bacterianas prevalentes en UPD mostraron capacidad para formar biofilms *in vitro*, empleando un medio que simula las condiciones nutricionales del microambiente de heridas crónicas. La aplicación del modelo de macrocolonias con el medio Lubbock-Glc permitió una aproximación más realista del entorno de la herida, evidenciando interacciones interespecies específicas. En biofilms mixtos, determinadas cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* favorecieron selectivamente el crecimiento de *E. faecalis*, un efecto dependiente del medio y ausente en cultivos planctónicos o en medios ricos. En contraste, la interacción de *E. faecalis* con *M. morganii* fue neutra, sin afectación mutua en el crecimiento.

Se realizó para complementar el análisis inicial (*t* de Student) un análisis de varianza de una vía (ANOVA) (Fig - 1 Anexo). En este análisis las diferencias no se mantuvieron estadísticamente significativas. Esta discrepancia puede atribuirse a la mayor exigencia del ANOVA para detectar efectos, dado que el ajuste por comparaciones múltiples incrementa el umbral de significancia. En consecuencia, los resultados deben interpretarse con cautela dado que si bien existen indicios de un aumento relativo de *E. faecalis* en algunas condiciones mixtas, el efecto no alcanza significancia global.

Esto sugiere que el fenómeno podría ser dependiente del contexto experimental o al contexto de los pacientes de los que derivan los aislados.

4.3 CAPÍTULO 3: Evaluación del uso combinado de antibióticos y terapia fotodinámica para combatir biofilms de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*

Dado que bacterias establecidas en biofilms suelen ser difíciles de erradicar con la terapia estándar de antibióticos, se propuso evaluar el tratamiento combinado de antibióticos con terapia fotodinámica de manera comparativa a tratamientos antimicrobianos individuales. Las especies bacterianas seleccionadas para este estudio fueron *P. aeruginosa* y *E. faecalis*, que se evidenciaron presentes conjuntamente en alta frecuencia en infecciones polimicrobianas de UPD. Como terapia fotodinámica se utilizó la aplicación de azul de metileno como agente fotosensibilizador seguido por irradiación con luz roja (máximo de emisión a 670 nm) (Forte Giacobone *et al.*, 2016).

4.3.1 Susceptibilidad de biofilms al tratamiento con antibiótico

De los datos provistos por el Hospital de Clínicas, se desprende que Pa036 es sensible a amikacina y que Ef037 es sensible a ampicilina. Por ello se decidió testear estos antibióticos sobre biofilms de las respectivas especies bacterianas. Dado que en general las bacterias establecidas en biofilms son menos susceptibles a la acción de los antibióticos que sus contrapartes planctónicas, se tomó como criterio para establecer las concentraciones de antibiótico a utilizar sobre los biofilms, aquellas que fueran iguales o superiores a las efectivas sobre cultivos planctónicos.

Entonces, en primer lugar se estudió la actividad antimicrobiana de amikacina y ampicilina sobre cultivos planctónicos de estos aislados. Para ello, se determinaron los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) siguiendo el protocolo estándar en medio MH. Se pudo confirmar que amikacina es efectiva contra Pa036 (CIM y CBM de 0,78 y 2,50 µg/ml, respectivamente), mientras que la susceptibilidad de Ef037 a este antibiótico fue mucho menor (CIM y CBM de 50 y 100 µg/ml, respectivamente) (Tabla 12). Por otra parte, ampicilina mostró efectos antimicrobianos contra cultivos planctónicos de Ef037 (CIM 15 µg/ml y CBM de 30 µg/ml) pero no logró inhibir el crecimiento Pa036 a las máximas concentraciones ensayadas (240 µg/ml).

También se evaluó la acción individual de cada uno de estos antibióticos sobre cultivos mixtos de Pa036/Ef037 mediante la determinación de las CBM. Estos experimentos evidenciaron valores de CBM similares a los obtenidos en cultivos monomicrobianos (Tabla 12).

Tabla 12. Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) y bactericidas mínimas (CMB) de amikacina y ampicilina para cultivos simples y mixtos de Pa036 y Ef037

	AMK (µg/ml)		AMP (µg/ml)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
Pa036-S	0,78	2,50	> 240	> 240
Ef037-S	50	100	15	30
Pa036-Mix	n.d.	1,25	n.d.	> 240
Ef037-Mix	n.d.	100	n.d.	30

Valores obtenidos de al menos tres experimentos independientes. n.d.: no determinado.

Posteriormente se investigó el efecto del desafío con antibióticos sobre la viabilidad de las células en biofilm. Para ello, macrocolonias de Pa036 y Ef 037 desarrolladas sobre membranas durante 24 h en Lubbock-Glc-agar fueron transferidas a placas de MH-agar suplementadas con concentraciones crecientes de antibiótico o sin suplementar (control) e incubadas a 37°C por 24 h. Luego, los biofilms fueron dispersados mecánicamente y se realizó el recuento de UFC.

Los biofilms monomicrobianos de Pa036 fueron desafiados con amikacina, en el rango de concentraciones que se corresponde a 1X-100X la CBM planctónica (2,5-250 µg/ml). En la Fig. 20A se observa que este antibiótico fue capaz de causar una reducción moderada de UFC cuando se aplicó 2,5 µg/ml ($11,1 \pm 0,8$ vs. $9,8 \pm 0,5$ Log₁₀ UFC/macrocolonia para control vs. tratamiento, respectivamente). El desafío con 250 µg/ml amikacina no provocó reducciones de viabilidad significativamente mayores.

Los resultados obtenidos sobre biofilms simples de Ef037 se muestran en la Fig. 20B. Resultó llamativo que el recuento de células viables de Ef037 en el control sin tratar fuera significativamente mayor al observado en los ensayos mostrados en el Capítulo 2 de esta tesis ($12,7 \pm 0,9$ vs. $5,92 \pm 0,74$ Log₁₀ UFC/macrocolonia); esta diferencia pudo ser atribuida a diferencias en los lotes de plasma bovino utilizado para confeccionar el medio Lubbock (Fig. 2-Anexo). El desafío con ampicilina de biofilms simples de Ef037, con hasta 100X su CBM planctónica (3.000 µg/ml), no produjo cambios significativos en la viabilidad celular (Fig. 20B).

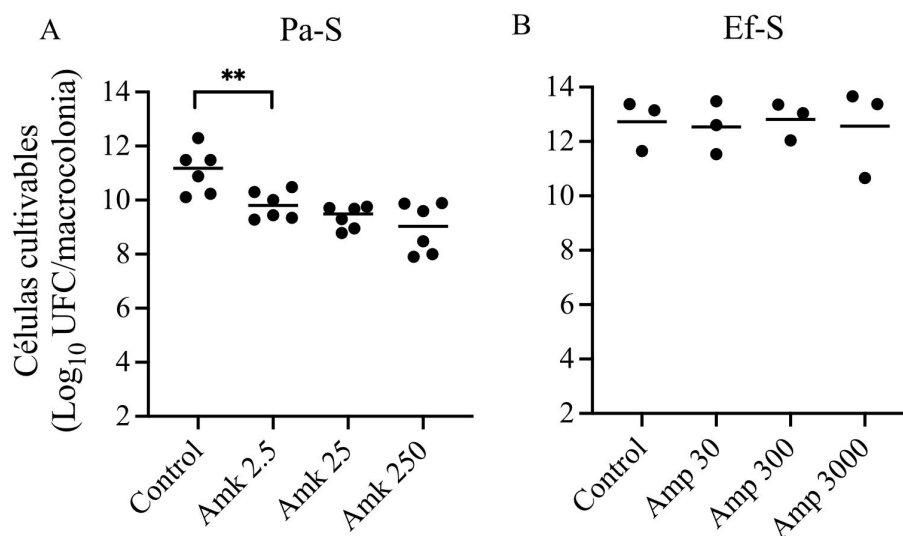


Fig. 20. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de amikacina y ampicilina sobre la viabilidad celular en biofilms simples de *P. aeruginosa* (A) y *E. faecalis* (B). Macrocolonias monomicrobianas de Pa036-S y Ef037-S fueron desarrolladas sobre membranas de 0,2 µm de porosidad durante 24 h en Lubbock-Glc-agar y posteriormente expuestas a diferentes concentraciones de amikacina (Amk) y ampicilina (Amp) y en MH-agar por 24 h adicionales. Finalmente se realizó la determinación de células cultivables mediante recuento de UFC. Los puntos corresponden a experimentos independientes y las líneas indican el promedio. (**) $p < 0,01$ por one-way ANOVA seguido del post-test de Tukey

Finalmente se examinó la susceptibilidad a antibióticos de Pa036 y Ef037 en biofilms mixtos. Macrocolonias expuestas a concentraciones crecientes de amikacina mostraron un ligero descenso en la viabilidad de *P. aeruginosa* respecto a los controles sin tratar, alcanzando reducciones de aproximadamente 2 Log₁₀ UFC/macrocolonia cuando los biofilms fueron expuestos a 250 µg/ml amikacina (Fig. 21A). En cambio, no se observó ningún efecto sobre el número de células cultivables de *E. faecalis* en biofilms mixtos expuestos a esas mismas concentraciones de amikacina ni tampoco cuando se utilizaron concentraciones de ampicilina de hasta 3.000 µg/ml (Fig. 21B). Sorpresivamente, Pa036 mostró una caída promedio de viabilidad de 3 Log₁₀ UFC/macrocolonia frente a la mayor concentración de ampicilina ensayada (3.000 µg/ml), mientras que menores concentraciones no afectaron la viabilidad celular en el biofilm (Fig. 21A).

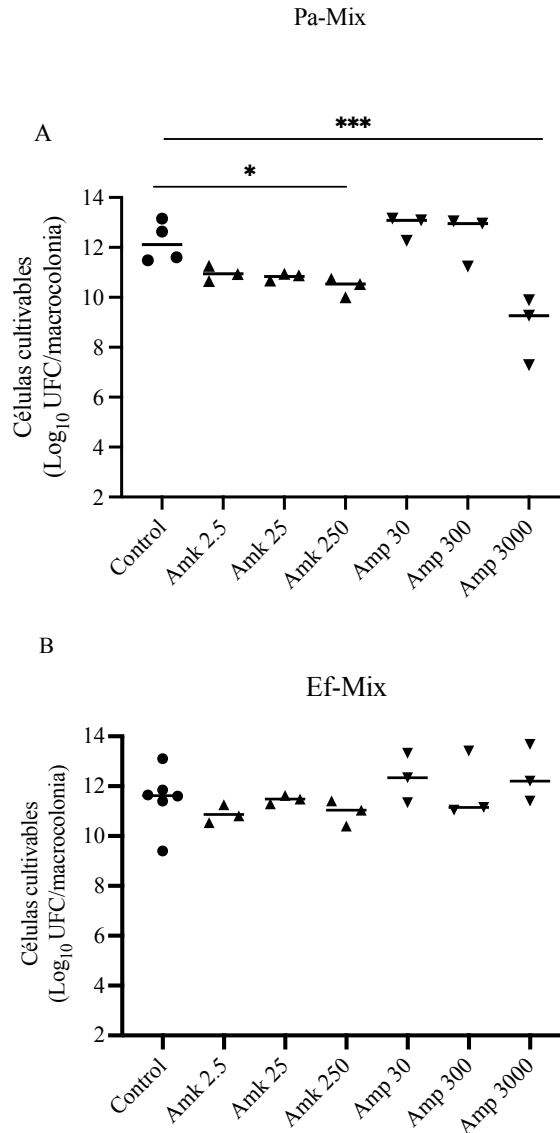


Fig. 21. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de amikacina y ampicilina sobre la viabilidad celular en biofilms mixtos de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*. Macrocolonias mixtas de Pa036/Ef037 fueron desarrolladas sobre membranas de 0,2 μ m de porosidad durante 24 h en Lubbock-Glc-agar y posteriormente expuestas a diferentes concentraciones de amikacina (Amk) o ampicilina (Amp) en MH-agar por 24 h adicionales. Finalmente se realizó la determinación de células cultivables de cada especie en los biofilms mixtos (Pa-Mix y Ef-Mix) mediante recuento de UFC en medios selectivos. Los puntos corresponden a experimentos independientes y las líneas indican el promedio. No se observaron diferencias significativas entre cada condición al aplicar one-way ANOVA con post-test de Tukey

Cuando se ensayó una combinación de amikacina y ampicilina (25 y 75 µg/ml, respectivamente) sobre biofilms mixtos se observaron efectos similares a los encontrados para cada antibiótico aplicado de manera individual, tanto sobre Pa036 como sobre Ef037; estas concentraciones ensayadas no produjeron cambios significativos en la viabilidad celular de Pa036 (Fig. 22A) o Ef037 (Fig. 22B) comparado con el control sin tratar.

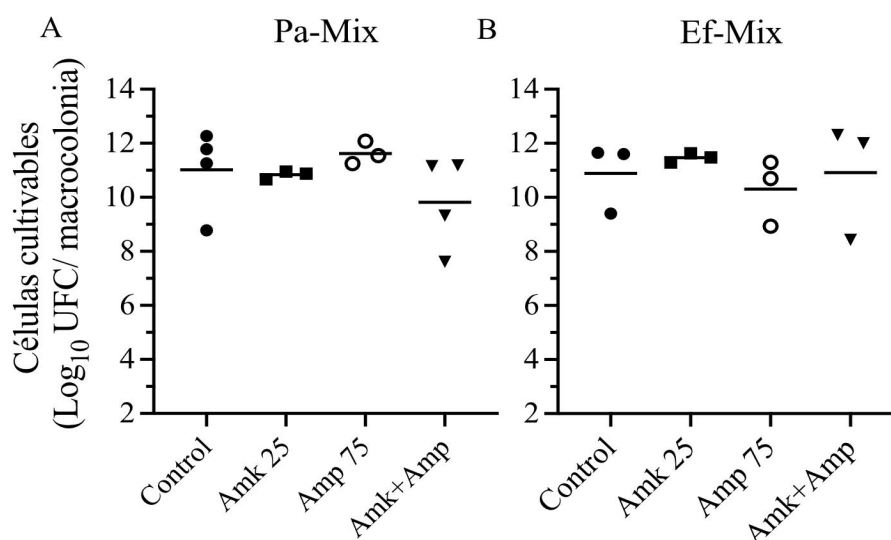


Fig. 22. Efecto de la aplicación combinada de amikacina y ampicilina sobre la viabilidad celular en biofilms mixtos de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*. Macrocolonias mixtas de Pa036/Ef037 fueron desarrolladas como se explicó en la leyenda de la Fig. 21 y luego fueron expuestas a amikacina (Amk 25 µg/ml), ampicilina (Amp 75 µg/ml) o una combinación de ambos en MH-agar por 24 h. Finalmente se realizó la determinación de células cultivables de cada especie en los biofilms mixtos (Pa-Mix y Ef-Mix) mediante recuento de UFC en medios selectivos. Los puntos corresponden a experimentos independientes y las líneas indican el promedio. No se observaron diferencias significativas entre cada condición al aplicar one-way ANOVA con post-test de Tukey.

En conjunto, los resultados obtenidos evidenciaron que *P. aeruginosa* y *E. faecalis* al encontrarse conformando biofilms fueron menos susceptibles a la acción bactericida de antibióticos que sí habían resultado efectivos contra estos mismos microorganismos en estadio planctónico (ampicilina contra *E. faecalis* y amikacina contra *P. aeruginosa*).

4.3.2 Susceptibilidad de biofilms al tratamiento fotodinámico

Como terapia alternativa al uso de los antibióticos se ensayó la terapia fotodinámica (TFD) utilizando como fotosensibilizador al azul de metileno (AM) junto con la aplicación de irradiación con luz LED roja. Para ello macrocolonias simples y mixtas de Pa036 y Ef037 fueron desarrolladas durante 24 h sobre membranas de 0,2 μm de porosidad colocadas sobre Lubbock-Glc-agar. Previo a la irradiación con luz roja, las macrocolonias fueron expuestas a distintas concentraciones de AM (colocando una gota de 20 μl encima de las mismas durante 2 h en oscuridad) y posteriormente los biofilms se irradiaron con una fuente de luz LED roja (λ_{max} 639 nm) por 2 h. Finalmente, se evaluó la viabilidad celular en las macrocolonias realizando recuento de UFC.

Se observó que la aplicación de TFD empleando concentraciones de 60 y 600 μM AM no produjo cambios significativos en el número de UFC de Pa036 ni Ef037 en biofilms simples o mixtos, en comparación con el recuento celular de las respectivas macrocolonias control irradiadas en ausencia de AM (Fig. 23). Sin embargo, la dosis de 6.000 μM AM produjo una reducción en el recuento de UFC en todos los casos. Pa036 en biofilms simples (Fig. 23A) se mostró más afectada que en biofilms mixtos (Fig. 23C), registrándose descensos promedio en la viabilidad celular de 3,5 Log_{10} UFC y 2,2 Log_{10} UFC, respectivamente. También el descenso de viabilidad de Ef037 en macrocolonias monomicrobianas (Fig. 23B) fue mayor que en macrocolonias mixtas (Fig. 23D), al ser ambas expuestas a TFD con 6.000 μM AM, evidenciándose descensos promedio de la viabilidad celular de 6,6 Log_{10} UFC y 3,6 Log_{10} UFC, respectivamente.

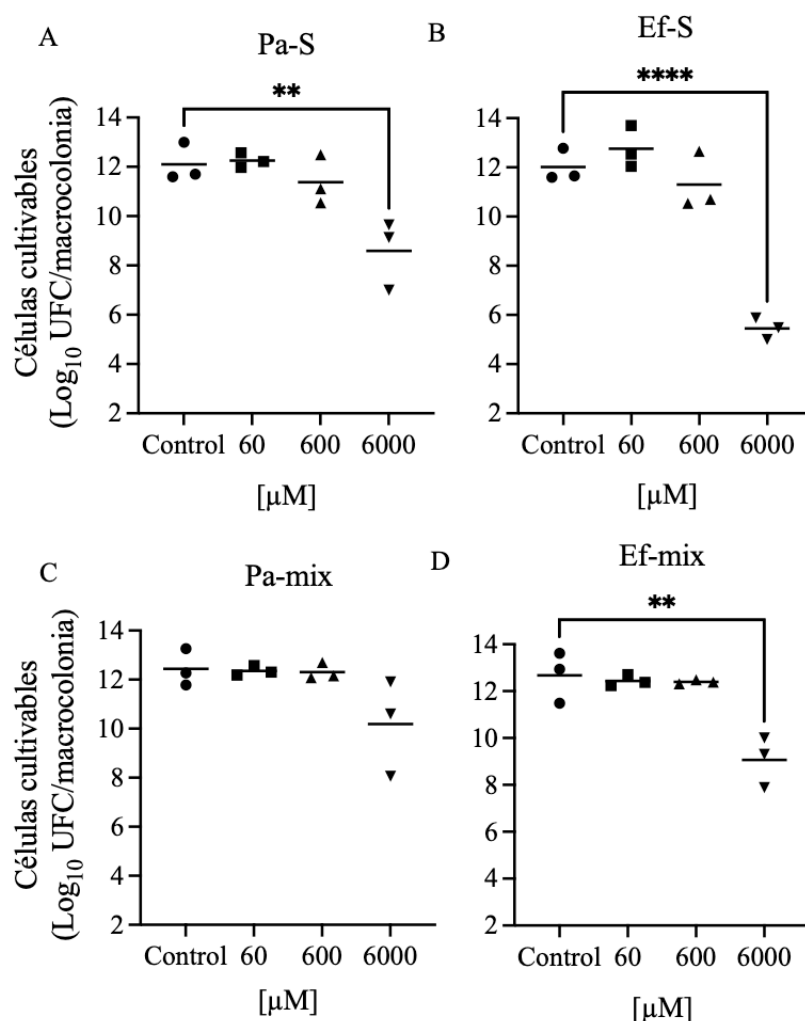


Fig. 23. Efecto de la aplicación de terapia fotodinámica utilizando diferentes concentraciones de azul de metileno sobre la viabilidad celular en biofilms simples y mixtos de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*. Macrocolonias simples (S) y mixtas (Mix) de Pa036 y Ef037 fueron desarrolladas como se explicó en la leyenda de la Fig. 21 y luego fueron expuestas a TFD (ver detalle en Materiales y Métodos) utilizando concentraciones crecientes de azul de metileno (AM, 60-6.000 μM). Finalmente se realizó la determinación de células cultivables de cada especie mediante recuento de UFC en medios selectivos. Los valores corresponden a experimentos independientes y las líneas indican el promedio. (**) $p < 0,01$ one-way ANOVA con post-test de Tukey.

4.3.3 Susceptibilidad de biofilms al tratamiento combinado con antibióticos y terapia fotodinámica

Se investigó si la combinación del tratamiento con antibiótico y la TFD con AM, aplicados de manera secuencial, producen una mayor reducción en la viabilidad de las células en biofilm respecto a los tratamientos individuales.

En primer lugar se llevaron a cabo estudios en biofilms simples de *P. aeruginosa* desarrollados como se explicó previamente. Se seleccionaron dos concentraciones de amikacina a testear: 100 y 250 µg/ml y TFD con 600µM AM. Los resultados utilizando 100 µg/ml amikacina se muestran en la Fig. 24A. Como se esperaba, los tratamientos individuales con amikacina durante 24 h y TFD durante 2 h no modificaron significativamente la viabilidad de biofilms simples de Pa036. Por el contrario, la exposición por 24 h a 100 µg/ml amikacina seguida por la TFD y luego permitiendo que el biofilm se recupere por 24 h en medio MH sin antibiótico produjo un descenso significativo de 6,1 Log₁₀ UFC respecto del control sin tratar ($5,5 \pm 0,9$ vs. $11,6 \pm 1,0$ Log₁₀ UFC, respectivamente, $p < 0,0001$). Un efecto aún mayor se observó cuando se aplicó amikacina seguido de TFD y expuesto nuevamente a amikacina, en donde posterior al tratamiento no se lograron detectar células viables en el biofilm (recuento inferior a 1,0 Log₁₀ UFC). Cabe destacar que la exposición a amikacina durante 48 h tuvo una menor eficiencia para afectar la viabilidad de Pa036 en el biofilm, mostrando un descenso de 2,7 Log₁₀ UFC en comparación con el control sin tratar ($8,9 \pm 1,9$ vs. $11,6 \pm 1,0$ Log₁₀ UFC, respectivamente, $p = 0,06$). Se observaron resultados similares cuando para la combinación antibiótico+TFD se utilizó una concentración de amikacina de 250 µg/ml (Fig. 24B). En este caso, también la aplicación consecutiva de amikacina - TFD - amikacina prácticamente logró la eliminación de células viables del biofilm simple de Pa036 (recuento inferior a 1,0 Log₁₀ UFC), mientras que la exposición durante 48 h a 250 µg/ml amikacina produjo un efecto menor, pero significativo, de pérdida de la viabilidad celular comparado con el control sin tratar ($7,1 \pm 0,2$ vs. $11,9 \pm 0,6$ Log₁₀ UFC, respectivamente, $p < 0,0001$). Además, la aplicación solamente de amikacina + TFD (seguido por 24 h en medio sin antibiótico) logró una reducción significativa del recuento de UFC respecto al control sin tratar ($6,1 \pm 0,6$ vs. $11,9 \pm 0,6$ Log₁₀ UFC, respectivamente, $p < 0,0001$), pero de menor magnitud que si se aplica por segunda vez el antibiótico.

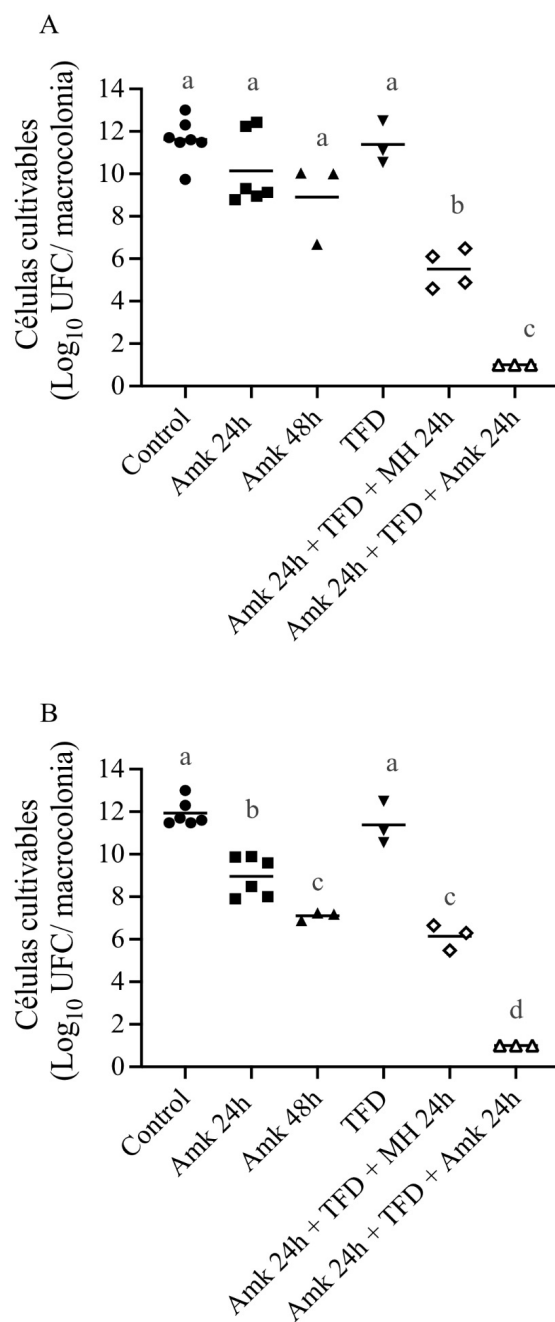


Fig. 24. Efecto de la aplicación combinada de terapia fotodinámica y amikacina sobre la viabilidad celular en biofilms simples de *P. aeruginosa*. Macrocolonias simples de Pa036 fueron desarrolladas como se explicó en la leyenda de la Fig. 21 y luego fueron expuestas a amikacina 100 µg/ml (A) o 250 µg/ml (B) sola o en combinación con TFD utilizando azul de metileno 600 µM. Los tratamientos combinatorios fueron secuenciales: Amk por 24 h seguido por la TFD y luego Medio MH sin antibiótico o una segunda exposición a Amk por 24 h adicionales. Finalmente se realizó el recuento de UFC. Los valores corresponden a experimentos independientes y las líneas indican el promedio. Las letras diferentes indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) obtenidos mediante one-way ANOVA con post-test de Tukey.

En segundo lugar, se investigó el efecto de la terapia combinada antibiótico-TFD sobre biofilms simples de *E. faecalis*. Para ello se usó la concentración de ampicilina de 75 µg/ml y TFD con 600µM AM aplicados de manera secuencial: ampicilina por 24 h seguido de TFD y posterior recuperación en ausencia de antibiótico por 24 h y ampicilina - TFD - ampicilina; también se evaluaron los tratamientos individuales. Como se observa en la Fig. 25, ninguno de los tratamientos resultó en una modificación significativa de la viabilidad celular de Ef037 en biofilms simples.

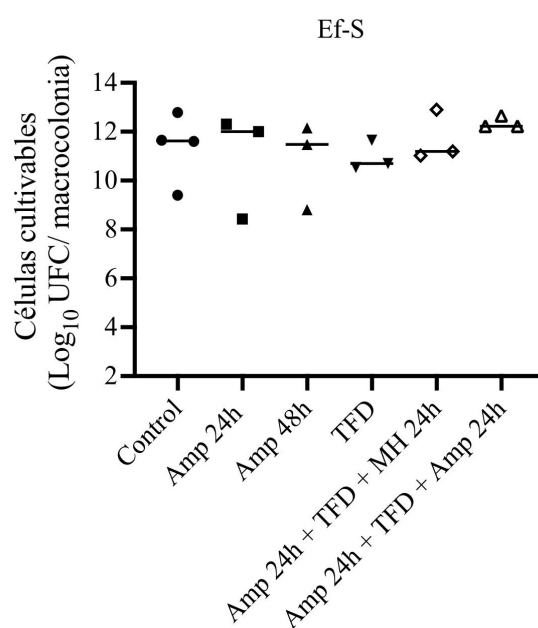


Fig. 25. Efecto de la aplicación combinada de terapia fotodinámica y ampicilina sobre la viabilidad celular en biofilms simples de *E. faecalis*. Macrocolonias simples de Ef037 fueron desarrolladas como se explicó en la leyenda de la Fig. 21 y luego fueron expuestas a ampicilina 75 µg/ml sola o en combinación con TFD utilizando azul de metileno 600 µM. Los tratamientos combinatorios fueron secuenciales: Amp por 24 h seguido por la TFD y luego Medio MH sin antibiótico o una segunda exposición a Amp por 24 h adicionales. Finalmente se realizó el recuento de UFC. Los valores corresponden a experimentos independientes y las líneas indican el promedio.

Por último, se realizaron estudios de exposición secuencial a antibióticos y TFD sobre biofilms mixtos de Pa036/Ef037 (Fig. 26). Se analizó la aplicación conjunta de los antibióticos evaluados anteriormente (amikacina 25 µg/ml y ampicilina 75 µg/ml), seguido de TFD empleando 600µM AM. En líneas generales, cada especie bacteriana mostró el mismo comportamiento en biofilms mixtos que el observado previamente en biofilms monomicrobianos. La mayor reducción en la viabilidad de Pa036 ocurrió con el desafío sucesivo de los biofilms mixtos con antibióticos - TFD - antibióticos, obteniéndose recuentos de $2,4 \pm 1,6$ y $11,0 \pm 1,6$ Log₁₀ UFC para biofilms tratados y controles sin tratar, respectivamente, lo que equivale a de una drástica baja en la viabilidad de 8,6 Log₁₀ UFC (Fig. 26A). Cuando los biofilms mixtos fueron expuestos a antibióticos - TFD - medio sin antibióticos, la viabilidad celular de Pa036 descendió a $6,8 \pm 0,2$ Log₁₀ UFC lo que corresponde a una caída de aproximadamente 3,2 Log₁₀ UFC respecto al control sin tratar. El tratamiento sólo con antibióticos durante 48 h mostró una reducción promedio de 3,2 Log₁₀ UFC. En relación a la viabilidad de Ef037 en biofilms mixtos, ninguno de los tratamientos aplicados evidenció alteración de la viabilidad bacteriana (Fig. 26B).

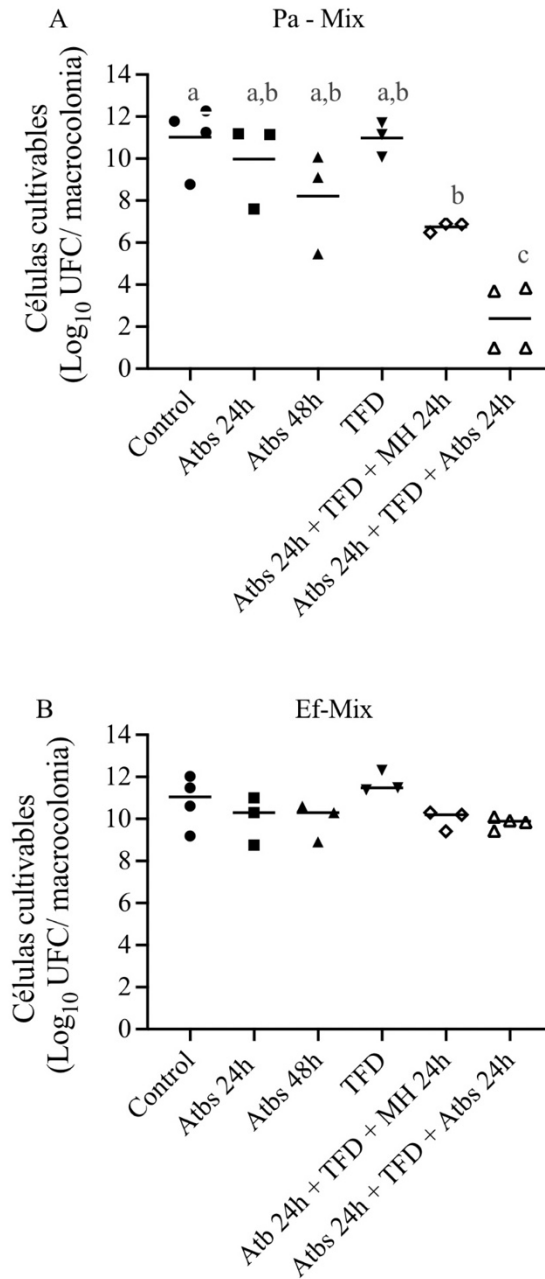


Fig. 26. Efecto de la aplicación combinada de terapia fotodinámica y antibióticos sobre la viabilidad celular en biofilms mixtos de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*. Macrocolonias mixtas de Pa036/Ef037 fueron desarrolladas como se explicó en la leyenda de la Fig. 21 y luego fueron expuestas a antibióticos (Atbs, amikacina 25 µg/ml + ampicilina 75 µg/ml) solos o en combinación con TFD utilizando azul de metileno 600 µM. Los tratamientos combinatorios fueron secuenciales: Atbs por 24 h seguido por la TFD y luego Medio MH sin antibiótico o una segunda exposición a Atbs por 24 h adicionales. Finalmente se realizó la determinación de células cultivables de cada especie en los biofilms mixtos (Pa-Mix y Ef-Mix) mediante recuento de UFC en medios selectivos. Los valores corresponden a experimentos independientes y las líneas indican el promedio. Las letras diferentes indican valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) obtenidos mediante one-way ANOVA con post-test de Tukey.

4.3.4 Visualización del efecto de terapias antimicrobianas sobre biofilms mediante microscopía electrónica de barrido

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para caracterizar la morfología de los biofilms sometidos a los distintos tratamientos antimicrobianos.

Biofilms simples de Pa036 desarrollados como macrocolonia se encuentran conformados por células bacterianas agrupadas de manera ordenada, que presentan la típica morfología de bacilo (Fig. 27A). Probablemente debido a limitaciones técnicas no resultó posible evidenciar en estos biofilms su matriz extracelular. Cuando los biofilms fueron expuestos a 100 µg/ml amikacina, se evidenció la aparición de algunas células con morfología alterada y signos evidentes de colapso celular (Fig. 27B). Se observó una mayor incidencia de bacterias dañadas cuando se aplicó el tratamiento amikacina + TFD (Fig. 27C). El tratamiento que produjo alteraciones más pronunciadas y extendidas a la mayoría de las células en el biofilm fue la exposición secuencial a amikacina - TFD - amikacina (Fig. 27D).

Respecto a los biofilms simples de Ef037, los controles sin tratamiento mostraron agregados densos de diplococos (Fig. 28A). Cabe destacar que ninguno de los tratamientos antimicrobianos aplicados exhibió cambios importantes en la morfología de las células de *E. faecalis* establecidas en biofilms (Fig. 28B-D).

En biofilms mixtos de Pa036/Ef037 observados por SEM resultó evidente la presencia de sectores en donde ambas especies estaban en estrecho contacto (Fig. 29A), mientras que también se encontraron regiones donde predominaba la presencia de una de las especies: *P. aeruginosa* (Fig. 29B) o *E. faecalis* (Fig. 29C). La exposición secuencial de estos biofilms a antibióticos - TFD - antibióticos (donde el desafío con antibióticos involucró el uso combinado de amikacina y ampicilina) mostró efectos adversos solamente sobre Pa036, principalmente en aquellos sectores con predominio de esta especie bacteriana (Fig. 29E); mientras que cuando Pa036 se encontró en estrecha cercanía con Ef037 su morfología se vio prácticamente inalterada (Fig. 29D). Por su parte, la morfología de Ef037 no se vio afectada en ninguna de las condiciones observadas (Fig. 29E-F).

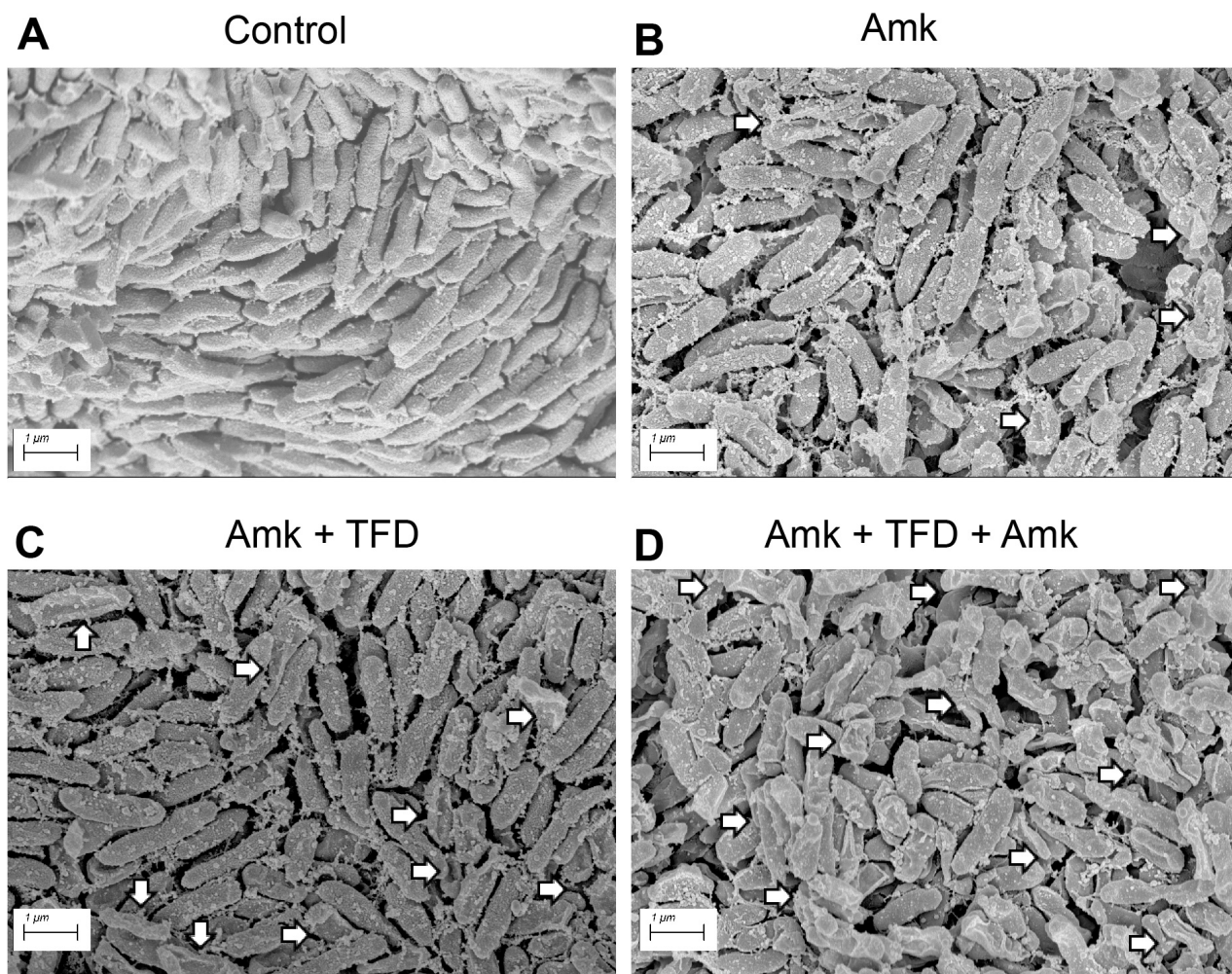


Fig. 27. Micrografías electrónicas de barrido de biofilms monomicrobianos de *P. aeruginosa* sometidas a distintos tratamientos antimicrobianos. Macrocolonias simples de Pa036 fueron desarrolladas y expuestas a tratamientos antimicrobianos descritos en la leyenda de la Fig. 24A. Control sin tratamiento (A), amikacina (Amk) 100 $\mu\text{g/ml}$ (B), Amk + TFD utilizando azul de metileno 600 μM (C) y Amk + TFD + Amk. Imágenes representativas obtenidas a una magnificación de 10.000 X. Las flechas indican la presencia de cambios morfológicos.

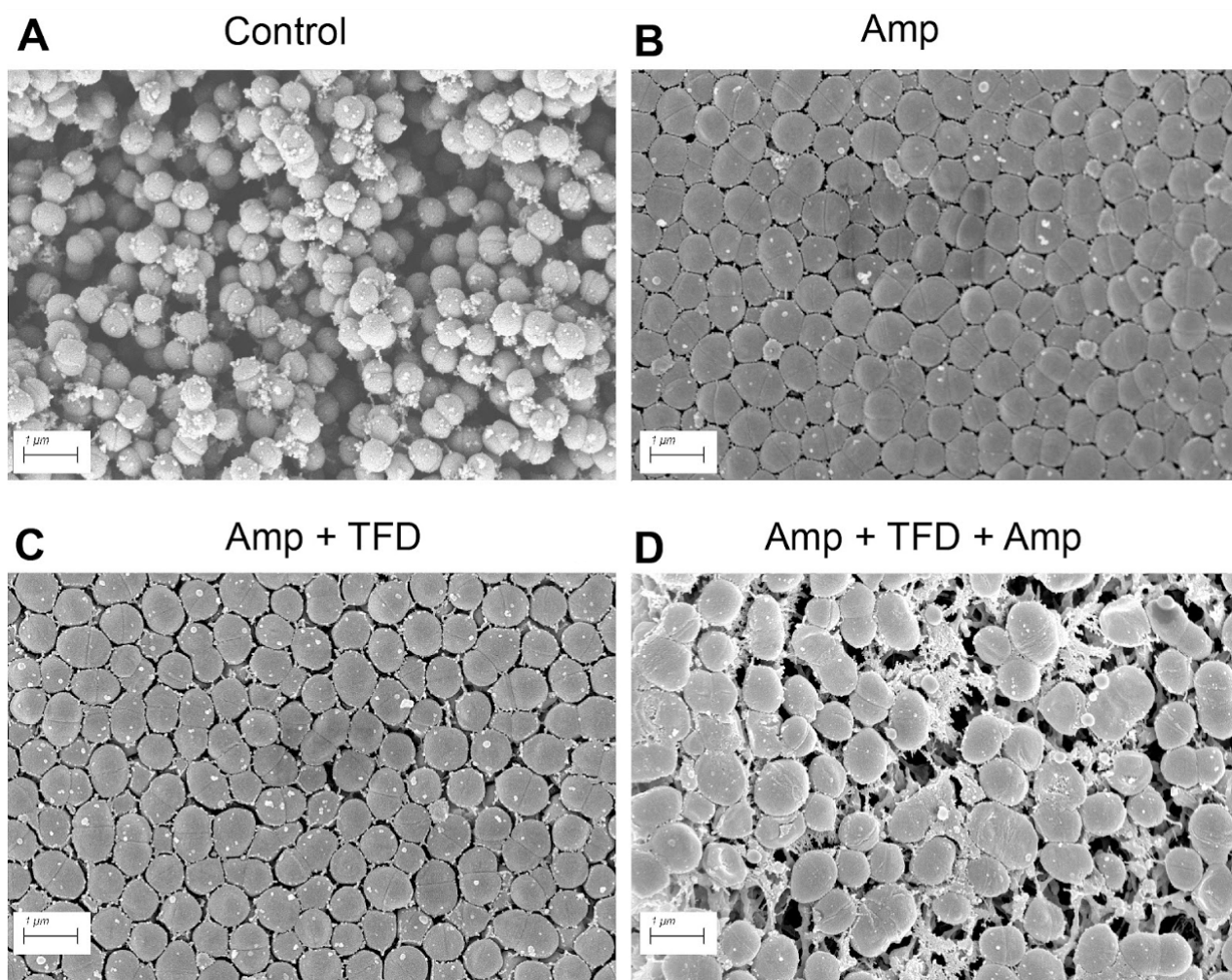


Fig. 28. Micrografías electrónicas de barrido de biofilms monomicrobianos de *E. faecalis* sometidas a distintos tratamientos antimicrobianos. Macrocolonias simples de Ef037 fueron desarrolladas y expuestas a tratamientos antimicrobianos descritos en la leyenda de la Fig. 25. Control sin tratamiento (A), ampicilina (Amp) 75 µg/ml (B), Amp + TFD utilizando azul de metileno 600 µM (C) y Amp + TFD + Amp. Imágenes representativas obtenidas a una magnificación de 10.000 X.

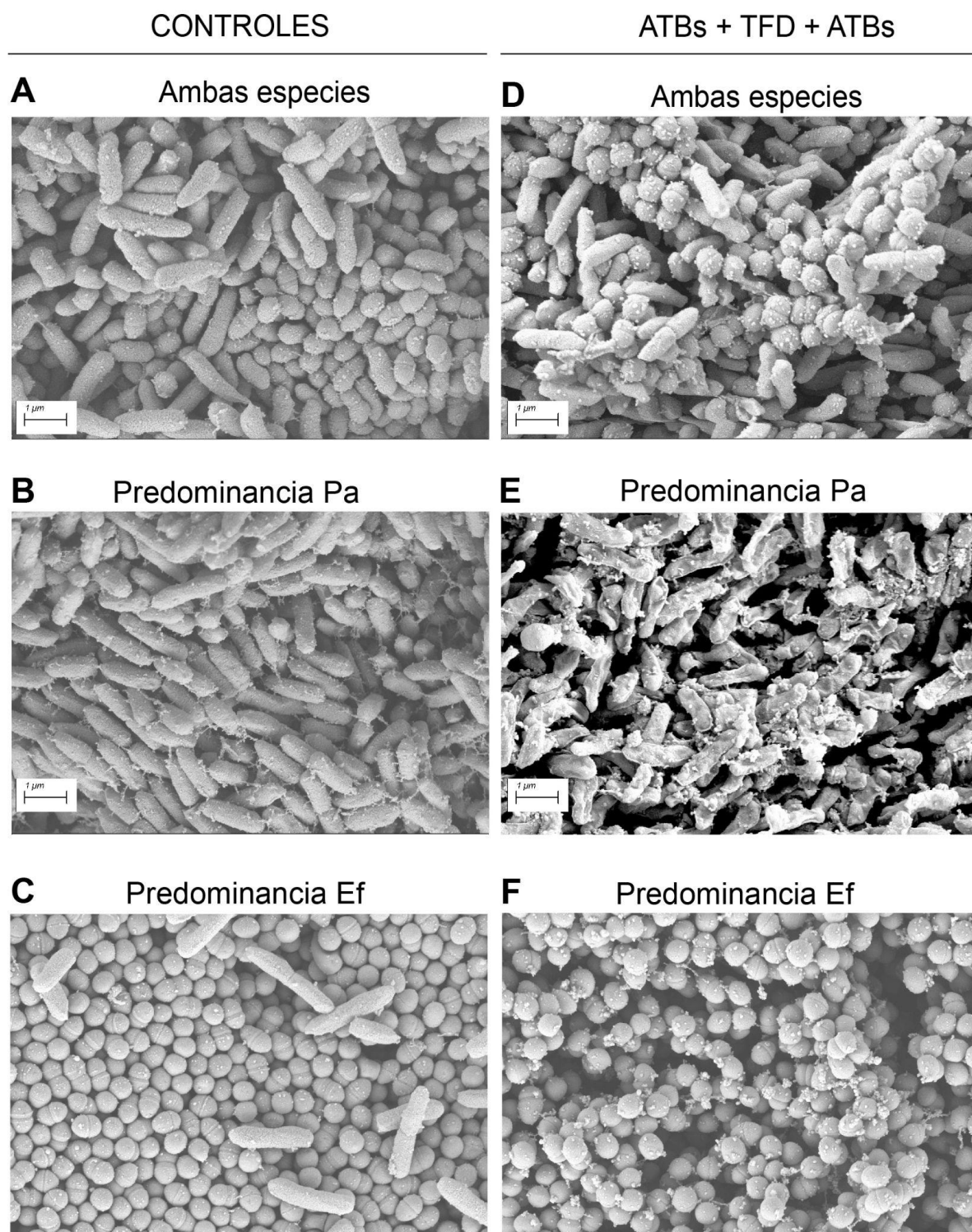


Fig. 29. Micrografías electrónicas de barrido de biofilms mixtos de *P. aeruginosa*/*E. faecalis* sometidas a distintos tratamientos antimicrobianos. Macrocolonias mixtas de Pa036/Ef037 fueron desarrolladas y expuestas o no al tratamiento antimicrobiano secuencial descrito en la leyenda de la Fig. 26. Controles sin tratamiento (A-C) y sometidos a ATBs (amikacina 25 $\mu\text{g/ml}$ + ampicilina 75 $\mu\text{g/ml}$) + TFD utilizando azul de metileno 600 μM + ATBs (D-F). Imágenes representativas obtenidas a una magnificación de 10.000 X. En un mismo biofilm mixto se aprecian sectores donde co-existen ambas especies (A y D), predomina *P. aeruginosa* (B y D) o predomina *E. faecalis* (C y F).

5. DISCUSIÓN:

Las úlceras de pie diabético (UPD) son heridas crónicas que proporcionan un entorno favorable para la proliferación bacteriana, que suele establecerse como biofilms polimicrobianos, dificultando la cicatrización de estas heridas. Las infecciones de UPD son una complicación importante de la diabetes mellitus y una de las principales causas de amputaciones de extremidades inferiores (McDermott *et al.*, 2023). Esta tesis se orientó a abordar el estudio de estas infecciones, los patógenos causantes y sus interacciones y la evaluación de estrategias antimicrobianas que utilizan la terapia fotodinámica con el fin último de aportar conocimientos que permitan mejorar la salud y la calidad de vida de las personas con diabetes, prevenir complicaciones graves y reducir la carga económica asociada a la atención de estas infecciones.

5.1 Prevalencia de microorganismos y resistencia a antibióticos en aislamientos provenientes de pacientes con infecciones de UPD en un hospital público de CABA

En nuestro estudio realizado en pacientes del Hospital Nacional de Clínicas (UBA-CABA), la mayoría de individuos con infecciones de UPD fueron de sexo masculino (75% sobre un total de 114 casos). Estos hallazgos se encuentran en línea con lo reportado por otros estudios (Carro *et al.*, 2020; Pontes *et al.*, 2020; Satpathy *et al.*, 2024) y se propone que los hombres tienen un alto riesgo de desarrollar complicaciones del pie diabético debido a una mayor prevalencia de neuropatía, menor movilidad articular y mayor presión en el pie (Seth *et al.*, 2019). La mediana de la edad de la población estudiada se situó en 59 años, lo cual podría deberse a una mayor prevalencia de diabetes mellitus tipo II en pacientes de edad avanzada (Seth *et al.*, 2019).

Además, el estudio aquí presentado mostró que una proporción elevada de los casos examinados correspondieron a infecciones polimicrobianas (57,0%), resultado similar al obtenido en un estudio realizado en otro hospital público bonaerense en 2018, donde se evidenció un 54% de cultivos polimicrobianos en infecciones de UPD (Carro *et al.*, 2020). En concordancia con esto, un trabajo en India reportó que la mayoría de estas infecciones resultaron polimicrobianas (85,0%) (Suryaetha *et al.*, 2018). Existen también otros estudios que han reportado menores proporciones de UPD polimicrobianas tanto en Latinoamérica como Europa y Asia (Carro *et al.*, 2020; Macdonald *et al.*, 2020; Seth *et al.*, 2019). Varios estudios han mostrado que las infecciones de aparición temprana suelen ser monomicrobianas, mientras que las crónicas suelen ser polimicrobianas y están relacionadas con pacientes que han sido tratados recientemente con terapia antimicrobiana (Spichler *et al.*, 2015; Saeed *et al.*, 2020).

De los 114 pacientes muestreados se obtuvieron 232 aislados, los cuales correspondieron en partes iguales a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. Este hallazgo se asemeja a otro relevamiento realizado en Latinoamérica que mostró 56% y 44% de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente, en infecciones de UPD (Carro *et al.*, 2020). En varios estudios de países en desarrollo, se ha observado en los últimos años un aumento en la prevalencia de gérmenes Gram-negativos como causa de infección en pie diabético, especialmente en climas cálidos y húmedos (Fetni *et al.*, 2023; Thanganadar Appapalam *et al.*, 2021). Cuando se analizaron los aislados obtenidos en nuestro estudio según se hubieran encontrado en infecciones monomicrobianas o polimicrobianas, se halló una predominancia de bacterias Gram-positivas en UPD monomicrobianas (67,3%), mientras que en UPD polimicrobianas la mayoría de los casos (74%) involucró asociaciones entre organismos Gram-positivos y Gram-negativos. En la literatura, son escasos los reportes que analizan cuáles son las especies que se asocian en este tipo de infecciones polimicrobianas.

En nuestro estudio observacional, el microorganismo aislado con mayor frecuencia en UPD fue *E. faecalis*, tanto para muestras monomicrobianas como polimicrobianas (20,4 y 56,9% de los casos, respectivamente). Si bien *S. aureus* se ha descrito como el organismo más frecuente en las infecciones de UPD, varios reportes indican que *E. faecalis* también se aísla comúnmente en esta condición (Jneid *et al.*, 2018; Shettigar *et al.*, 2018; Saeed *et al.*, 2020). En nuestro caso, las especies bacterianas más frecuentemente co-aisladas con *E. faecalis* fueron *E. coli*, *M. morganii* y *P. aeruginosa*. Un estudio reciente de co-ocurrencias no aleatorias de especies por pares en UPD evidenció numerosas asociaciones positivas entre *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* (género Proteobacteria) y especies de *Enterococcus* (Barshes *et al.*, 2022). Una limitación del estudio aquí presentado radica en que las condiciones de cultivo utilizadas para el aislamiento de los microorganismos a partir de las muestras de UPD no sería efectivo para microorganismos anaeróbicos. Otros autores han identificado varios anaerobios en infecciones de UPD, siendo los más frecuentes los cocos Gram-positivos de los géneros *Peptoniphilus*, *Anaerococcus* y *Finnegoldia*, como así también bacilos Gram-negativos de los géneros *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Prevotella* (Villa *et al.*, 2024).

Respecto a la sensibilidad a antibióticos de las especies prevalentes en UPD, el presente estudio encontró algunas diferencias entre aislados provenientes de infecciones monomicrobianas de aquellas de origen polimicrobiano, dependiendo la especie y el antibiótico analizado. En el caso de *E. faecalis*, donde existe una preocupación en el ámbito clínico por la creciente aparición de cepas resistentes a vancomicina (Levitus *et al.*, 2023), la totalidad de los aislados obtenidos resultaron

sensibles a este antibiótico. Respecto a *S. aureus* resultó relevante analizar la sensibilidad a oxacilina, ya que la misma se utiliza como marcador para identificar la resistencia a meticilina. Las cepas SARM (*S. aureus* resistentes a meticilina) se asocian con una mayor morbilidad, mortalidad, estancia hospitalaria y costos significativos (Nazari *et al.*, 2025). En este estudio se evidenció un mayor porcentaje de cepas SARM en aislamientos provenientes de infecciones polimicrobianas en comparación a las monomicrobianas (44% vs 25%, respectivamente). Cabe notar que tanto las infecciones polimicrobianas como las infecciones que involucran SAMR han sido asociadas con heridas de mayor tiempo de evolución (Kwon & Armstrong, 2018). En el análisis de los organismos Gram-negativos, para el caso de *P. aeruginosa* (que se encontró prevalente tanto en UPD mono- como polimicrobianas) fue de interés monitorear la sensibilidad a aminoglucósidos, fluoroquinolonas y carbapenems ya que forman parte de las familias de antibióticos hacia las cuales la adquisición de resistencias por parte de *P. aeruginosa* repercute en una mayor complejidad para encontrar tratamientos eficaces (Elfadadny *et al.*, 2024). Nuestro estudio mostró proporciones similares de cepas sensibles a los aminoglucósidos amikacina y gentamicina entre aislamientos monomicrobianos y polimicrobianos, evidenciándose una menor sensibilidad a la gentamicina (aprox. 30% de los aislados) en comparación con amikacina (donde más del 50% de los aislados fueron sensibles). Las cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de aislados mono- y polimicrobianos también presentaron una alta proporción de sensibilidad hacia alguno de los carbapenems estudiados (imipenem o meropenem), alcanzando el 75% de los casos. Estos resultados concuerdan con revisiones bibliográficas que examinan la susceptibilidad a antibióticos de aislados de *P. aeruginosa* provenientes de UPD y han reportado una susceptibilidad a amikacina que abarcó el 50-86% de los casos y una susceptibilidad a carbapenems del 60-99% (Garouzi *et al.*, 2023; Huwae *et al.*, 2023). En cambio, los niveles de sensibilidad a la fluoroquinolona ciprofloxacina encontrados en nuestro estudio fueron marcadamente menores, reportándose solamente un 35% y 10% de cepas sensibles según los aislados de *P. aeruginosa* provinieran de infecciones mono- o polimicrobianas. Finalmente, en relación a las enterobacterias que se encontraron de manera prevalente en muestras de UPD polimicrobianas (*E. coli* y *M. Morganii*), estos aislados resultaron en su mayoría ser sensibles a la cefalosporina de tercera generación ceftazidima (70% de los aislados de ambas especies) y a carbapenems (85-95% de los aislados). Si bien, en conjunto, los resultados del análisis de sensibilidad a antibióticos de las especies prevalentes en infecciones de UPD indican que sería posible seleccionar antibióticos frente a los cuales estas bacterias son sensibles, no hay que desconocer el hecho de que estos ensayos de sensibilidad no se efectúan sobre bacterias en forma

de biofilm (estructuras que incrementan la tolerancia bacteriana hacia los antibióticos) lo cual incidiría negativamente en la eficacia del tratamiento antibiótico.

5.2 Interacciones inter-especies en biofilms mixtos formados por *E. faecalis* y bacterias Gram-negativas prevalentes en UPD polimicrobianas

En esta tesis se exploraron las interacciones entre las especies prevalentes en UPD polimicrobianas cuando se encuentran formando biofilms. Se desarrollaron biofilms *in vitro* utilizando el medio Lubbock-Glc, que incluye plasma y glóbulos rojos para simular mejor las condiciones presentes en una herida crónica (Sun *et al.*, 2008; Thaarup & Bjarnsholt, 2021), y el modelo de biofilms en macrocolonias, que es utilizado por diversos laboratorios para el estudio de biofilms relacionados a heridas (Keogh *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2022; 92; Liu *et al.*, 2024). Además, la utilización de aislados clínicos resulta particularmente relevante, dado que muchas investigaciones se basan en cepas de referencia que han sido sometidas a extensos procesos de subcultivo en condiciones de laboratorio, lo que puede inducir adaptaciones fenotípicas y genotípicas no representativas de los aislamientos clínicos originales (Fux *et al.*, 2005).

En cuanto al crecimiento planctónico de *E. faecalis* en el medio Lubbock se observó una ausencia de crecimiento neto (valores de UFC que se mantuvieron dentro del mismo orden de magnitud a lo largo del tiempo). Este patrón podría interpretarse como un estado de equilibrio fisiológico, en el cual las tasas de división y de muerte celular se compensan. Este comportamiento podría estar vinculado a diferencias en la composición nutritiva y condiciones ambientales del cultivo; en ese sentido diferentes estudios han demostrado que medios con concentraciones elevadas de carbohidratos (glucosa o sacarosa) favorecen significativamente la viabilidad planctónica de *E. faecalis* respecto a medios pobres en azúcares, o como hemina y vitamina K en medios líquidos mejora el crecimiento inicial libre (Kim., 2020; Seneviratne 2013). Además, condiciones como la concentración de sal, pH y temperatura también modulan el crecimiento planctónico (Akoğlu 2020). Futuros estudios deberían evaluar el comportamiento planctónico de *E. faecalis* en medios con composiciones nutricionales diversas, a fin de esclarecer si la estabilidad en los recuentos de UFC observada responde a limitaciones específicas del medio Lubbock o a un patrón fisiológico intrínseco de la especie.

Los resultados obtenidos demuestran que todas las cepas bacterianas analizadas fueron capaces de formar biofilms, tanto de manera individual como en consorcio. Esto sugiere que no existieron interacciones competitivas evidentes entre *E. faecalis* y las especies Gram-negativas estudiadas (*E. coli*, *M. morganii* y *P. aeruginosa*) bajo las condiciones ensayadas.

Se observaron interacciones neutrales entre *E. faecalis* y *M. morganii*, ya que cada especie mostró el mismo nivel de crecimiento en biofilms mixtos y de una sola especie. Resultados comparables se obtuvieron en condiciones de crecimiento planctónico. Un estudio previo reportó interacciones beneficiosas entre estos dos patógenos en el contexto de infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres. En ese trabajo, se observó que los biofilms mixtos de *E. faecalis* con *M. morganii* desarrollados en TSB-Glc en placas multipocillo presentaron una mayor biomasa en comparación con los biofilms monomicrobianos (Gaston *et al.*, 2020); sin embargo, dicho estudio no evaluó el número de células bacterianas viables.

En el contexto de las interacciones entre *E. faecalis* y *E. coli*, uno de los pares co-aislados analizados (Ef013-Ec012) mostró un incremento de aproximadamente 1 Log₁₀ en el número de células viables de *E. faecalis* al formar biofilms mixtos en medio Lubbock-Glc-agar, en comparación con biofilms mono-especie. Asimismo, el crecimiento de Ef013 se vio favorecido en biofilms mixtos junto a otras cepas de *E. coli* (Ec066 y Ec098) provenientes de UPD, con incrementos entre 1 y 2 Log₁₀ UFC. Sin embargo, este impacto positivo sobre el crecimiento de *E. faecalis* no se replicó en los otros dos pares de cepas clínicas provenientes de co-aislamientos *E. faecalis*/*E. coli* (Ef069-Ec066 y Ef096-Ec098).

Adicionalmente, el crecimiento conjunto de *E. faecalis* con *P. aeruginosa* en biofilms desarrollados en Lubbock-Glc-agar resultó altamente favorable para *E. faecalis*, con aumentos de hasta 4 Log₁₀ en el recuento de células viables. Este efecto se observó en todos los pares *E. faecalis*/*P. aeruginosa* analizados, incluidas las cepas de laboratorio *E. faecalis* ATCC29212 y *P. aeruginosa* PAO1, lo que sugiere la existencia de un mecanismo general subyacente responsable de este fenómeno.

Es importante destacar que todos los efectos beneficiosos sobre el crecimiento de *E. faecalis* observados en este estudio se manifiestan únicamente cuando las bacterias crecen en Lubbock- Glc en forma de biofilms, y no en estadio planctónico. Esto sugiere que el entorno particular de los biofilms favorece la aparición de estas interacciones interespecies.

Considerando el crecimiento limitado de *E. faecalis* en medio Lubbock-Glc observado para en los ensayos mostrados en el Capítulo 2, es probable que los efectos beneficiosos sobre su crecimiento, detectados en determinadas combinaciones bacterianas, se deban al aprovechamiento de algún metabolito producido por su co-habitante (*P. aeruginosa* o *E. coli*) en el biofilm mixto. En este sentido, se ha propuesto que ciertos metabolitos extracelulares pueden facilitar fenómenos de alimentación cruzada ("cross-feeding", en inglés) entre microorganismos (Fritts *et al.*, 2021).

Para explorar si estas interacciones están mediadas por factores solubles secretados, se realizaron ensayos de crecimiento en proximidad. Para ello, se inocularon macrocolonias de una sola especie

en agar Lubbock-Glc-soft agar (agar al 1%), colocándolas a una distancia de 2 cm, y se incubaron a 37°C durante 24 h. Al evaluar los pares Ef037/Pa036 y Ef013/Ec012, en ningún caso se observó una mejora en el crecimiento de las macrocolonias de *E. faecalis* (evaluado mediante el recuento de UFC) por hallarse en cercanía de la otra especie (Fig 3- Anexo). Por lo tanto, serán necesarios estudios adicionales que permitan dilucidar con mayor precisión los mecanismos involucrados en el efecto beneficioso sobre *E. faecalis*.

Cuando los biofilms se desarrollaron en condiciones nutricionales que sustentan un buen crecimiento de *E. faecalis*, no se observaron diferencias en el número de células viables entre condiciones monomicrobianas y mixtas. Esto sucedió, por ejemplo, cuando los biofilms se formaron en medio TSB. También se observó este fenómeno cuando la preparación del medio Lubbock-Glc involucró algunos lotes particulares de plasma bovino (adquiridos de la compañía Internegocios, Bs. As.). Resulta apropiado aclarar que el plasma bovino no es comercializado como tal por ningún proveedor habitual; en nuestro caso, lo obtenemos como un producto secundario de la compañía Internegocios, lo que trae aparejadas limitaciones en el control de calidad entre lote y lote. Sin embargo, este hallazgo resalta la importancia de tener en cuenta las condiciones particulares de cada paciente, ya que éstas van a impactar en el desarrollo de las infecciones bacterianas. En este contexto, se ha reportado que características del paciente, como el mal control glucémico, son fuertemente predictivas de ulceración y amputación (Boulton *et al.*, 2020).

Otros autores han reportado que *E. faecalis* puede promover el crecimiento en biofilm de *E. coli* y este efecto se atribuyó a la exportación de L-ornitina por parte de *E. faecalis*, una señal metabólica que estimula la biosíntesis del sideróforo enterobactina en *E. coli* (Keogh *et al.*, 2016). Ese trabajo se realizó utilizando el modelo de biofilms en macrocolonias bajo condiciones de limitación de hierro. Los mismos autores mostraron que la coinfección con *E. faecalis* favorece el crecimiento de *E. coli* en un modelo murino de infección de heridas. Este hallazgo se obtuvo al inocular 10.000 veces mayor cantidad de *E. faecalis* que *E. coli*, relación muy diferente a la que utilizamos en nuestros ensayos *in vitro* (relación 1:1 entre ambas especies); además, las cepas utilizadas no provienen de heridas. La diferencia entre los resultados obtenidos por Keogh y colaboradores respecto a los reportados en esta tesis pueden explicarse por las distintas condiciones experimentales utilizadas, en particular la fuente de las cepas analizadas y los medios de cultivo empleados.

Otros autores han realizado estudios de biofilms mixtos de *E. faecalis* y *P. aeruginosa*. Respecto a la distribución espacial de las especies, se ha reportado que *P. aeruginosa* forma un biofilm estructurado sobre el biofilm de *E. faecalis* (Lee *et al.*, 2017). Esta distribución espacial podría favorecer la accesibilidad de *E. faecalis* a micronutrientes metálicos traza como hierro, zinc y

manganeso, considerando que los metales nutrientes se difunden diferencialmente por toda la biomasa bacteriana (Baishya *et al.*, 2022). Además, se ha reportado que los biofilms de especies mixtas que involucran *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, y desarrollados en medio BHI, presentan una mayor biomasa en comparación con los formados por especies individuales (Mottola *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017). El incremento en el grosor de la matriz del biofilm se ha asociado con la expresión de los exopolisacáridos Pel y Psl por parte de *P. aeruginosa* (Lee *et al.*, 2017). Por el contrario, bajo las condiciones utilizadas en esta tesis (macrocolonias desarrolladas en Lubbock-GI-agar), no se observó ningún efecto sinérgico en la biomasa. Desafortunadamente, los estudios de Mottola y colaboradores (2016) y de Lee y colaboradores (2017) no evaluaron la cantidad de células de cada especie presente en la biopelícula lo que no permite hacer comparaciones con nuestros hallazgos. Por otro lado, otros autores han reportado una interacción competitiva entre estas especies, en donde *E. faecalis* inhibe el crecimiento de *P. aeruginosa* dentro de biofilms cuando el hierro es limitado (Tan *et al.*, 2022). Un reporte reciente indica que la ornitina producida por *E. faecalis* reduce la respuesta de *P. aeruginosa* a las quinolonas (moléculas de quorum sensing) producidas por ella misma para competir con otras especies bacterianas. Esta reducción de la respuesta de *P. aeruginosa* a las quinolonas favorece el crecimiento de *E. faecalis* (Fink *et al.*, 2025).

En nuestro análisis la composición de los biofilms mixtos, mostró que la proporción relativa de *Enterococcus faecalis* disminuyó respecto al tiempo inicial (T0), aunque el número absoluto de UFC aumentó a lo largo del experimento. Esto sugiere que, si bien *E. faecalis* mantiene su capacidad de crecimiento dentro del consorcio, la coexistencia con especies Gram-negativas implica una competencia en la que la densidad de estas últimas aumenta en mayor proporción, modificando el balance poblacional del biofilm. En ese sentido la reducción porcentual de *E. faecalis* no necesariamente refleja una inhibición de su crecimiento, sino un desarrollo más marcado de la especie acompañante. Algunos autores han relacionado este tipo de comportamiento a las diferentes tasas de reproducción dadas por una disposición en las biofilms que permita más acceso de nutrientes para el crecimiento sumado a la importancia de comprender los componentes de la matriz, los cuales pueden cambiar en diferentes fases de la formación de los biofilms (Dong J., 2023).

Desde un punto de vista ecológico, este comportamiento podría ser consistente con interacciones de tipo comensalismo o competencia asimétrica, donde ambas especies se desarrollan, pero una de ellas adquiere predominio en etapas avanzadas del biofilm. Estos hallazgos refuerzan la importancia de considerar tanto las medidas absolutas (UFC totales) como las relativas (porcentajes de composición) para interpretar la dinámica real de los consorcios bacterianos.

En conjunto, los resultados presentados en este estudio contribuyen a una mejor comprensión de las complejas interacciones entre especies bacterianas en el contexto de los biofilms polimicrobianos asociados a las UPD.

Es de destacar que es posible que el efecto positivo observado en ciertos ensayos o momentos del cultivo sean transitorios o dependiente del contexto experimental, relacionado con fases tempranas de establecimiento del biofilm, condiciones locales de nutrientes o variaciones en la estructura espacial del consorcio. En este sentido, el hecho de que la significancia estadística no se mantenga al considerar el conjunto completo de réplicas sugiere que la interacción entre *E. faecalis* y sus cohabitantes no es constante, sino que responde a dinámicas variables de cooperación y competencia que podrían cambiar a lo largo del tiempo o entre experimentos.

5.3 Terapia fotodinámica combinada con antibióticos para combatir biofilms de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*

Los biofilms representan un fenotipo bacteriano especialmente difícil de combatir debido a su elevada tolerancia tanto a las respuestas inmunes del huésped como a los agentes antimicrobianos, lo que los convierte en un factor clave en la persistencia de las UPD y da cuenta de la dificultad para su adecuada cicatrización (Azevedo *et al.*, 2020). Estas infecciones suponen una amenaza significativa para la salud pública global, ya que presentan altos niveles de tolerancia a múltiples antibióticos, lo que reduce notablemente la eficacia de los tratamientos convencionales contra infecciones bacterianas. En particular, el crecimiento bacteriano en forma de biofilm puede incrementar hasta mil veces la tolerancia a los antibióticos en comparación con las bacterias en estado planctónico (Mah, 2012)

Actualmente el tratamiento propuesto consiste en la aplicación de diferentes dosis y combinaciones de antibióticos, sin embargo, la utilización de los mismos de forma recurrente para pacientes que presentan infecciones crónicas presenta como principal desventaja la selección de cepas resistentes (Høiby *et al.*, 2023).

En nuestros ensayos *in vitro*, los biofilms preformados de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*, tanto en crecimiento monomicrobiano como mixto, mostraron una escasa susceptibilidad frente al desafío con antibióticos que resultaron efectivos contra las mismas bacterias en crecimiento planctónico. En particular, la aplicación de amikacina durante 24 h, incluso a concentraciones iguales o superiores a la CBM planctónica de *P. aeruginosa*, produjo sólo una leve reducción en la viabilidad bacteriana dentro del biofilm, sin superar los 2 Log₁₀ UFC. Además, este efecto no mostró una relación dosis-dependiente, ya que se observó una disminución similar de viabilidad utilizando 1X

y 100X la CBM de amikacina. Por su parte, la viabilidad de *E. faecalis* en biofilms no fue afectada por el tratamiento con ampicilina, independientemente de la concentración evaluada.

Ante este escenario de ineficacia antibiótica, se evaluó el efecto de la terapia fotodinámica (TFD) como una estrategia alternativa para el control de biofilms. Este tipo de terapia presenta baja capacidad a generar resistencia, probablemente porque las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan tienen varios objetivos estructurales y metabólicos que dañan a los patógenos; en cambio los antibióticos convencionales poseen un único sitio blanco (Wang *et al.*, 2021).

Entre los agentes fotosensibilizadores disponibles, el azul de metileno destaca como uno de los más utilizados debido a su baja toxicidad, lo que lo convierte en una opción segura y eficiente en tratamientos de TFD (Cwalinski *et al.*, 2020). Este compuesto se activa al absorber luz en el rango de 600-700 nm. Para ello, en esta tesis se utilizó como fuente de irradiación un arreglo de diodos emisores de luz (LED) roja, con una longitud de onda máxima (λ_{max}) de 639 nm. Las muestras fueron irradiadas durante 2 h con un flujo de energía de 44 W/m², lo que equivale a una dosis total de 32 J/cm².

Distintos trabajos han reportado que la aplicación de TFD con azul de metileno disminuye la viabilidad tanto de cepas Gram-negativas como Gram-positivas en cultivo planctónico, entre las que se incluyen *P. aeruginosa* (Forte Giacobone *et al.*, 2016; Zada *et al.*, 2024) y *E. faecalis* (Soares *et al.*, 2018; Rubilar-Huenchuman *et al.*, 2024). Ensayos preliminares realizados sobre cultivos planctónicos en medio Lubbock-Glc, evidenciaron que *E. faecalis*, tanto en crecimiento monomicrobiano como en co-cultivo con *P. aeruginosa*, sufrió una drástica caída de viabilidad celular (aproximadamente de 5 Log₁₀ UFC) tras 60 minutos de aplicación de TFD con 600 μ M azul de metileno; por el contrario, este mismo tratamiento no afectó la viabilidad de *P. aeruginosa* en cultivos simples ni mixtos (Fig. 4 - Anexo). Este resultado diferencial fue inesperado; una posible explicación es que la absorción de luz por parte del medio Lubbock podría estar disminuyendo la eficacia del tratamiento y por razones aún no determinadas, este fenómeno afectaría principalmente la acción antimicrobiana sobre *P. aeruginosa*.

En relación con los efectos sobre biofilms, los resultados obtenidos en esta tesis, muestran que la TFD con azul de metileno sólo produjo una reducción significativa en la viabilidad celular cuando se empleó una alta concentración del fotosensibilizante (6 mM). Este tratamiento fue más efectivo en biofilms monomicrobianos, causando un descenso mayor en el número de células viables de *E. faecalis* en comparación con *P. aeruginosa* (reducciones de 7 y 3 Log₁₀ UFC, respectivamente, en relación a sus controles no tratados). Sin embargo, cuando ambas especies formaban parte de biofilms mixtos, su susceptibilidad al tratamiento fue menor, siendo este efecto particularmente

evidente en *E. faecalis*, cuya reducción fue de sólo 3 Log₁₀ UFC. La menor eficacia de la TFD observada en los biofilms mixtos en comparación con los biofilms monomicrobianos podría explicarse por diversas interacciones entre las dos especies bacterianas. En los biofilms polimicrobianos, podría verse modificada la estructura de su matriz extracelular, lo que puede actuar como una barrera física más densa que limite la penetración del agente fotosensibilizante y del oxígeno necesario para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fontana *et al.*, 2009).

Por otra parte, en nuestros experimentos, al reducir la concentración de azul de metileno a 600 µM se perdió el efecto bactericida de la TFD. Sin embargo, otros autores han reportado actividad bactericida sobre biofilms de *P. aeruginosa* utilizando TFD con una concentración de 250 µM azul de metileno, empleando una dosis de 25-30 J/cm² con láser de $\lambda = 660$ nm (Prochnow *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019) y que este efecto no fue de mayor magnitud al incrementar la concentración del fotosensibilizante (en todos los casos, reducción de 3 Log₁₀ UFC) (Yang *et al.*, 2019). En estos trabajos se mostró también que la adición de peróxido de hidrógeno o etanol como aditivo incrementaron la actividad antimicrobiana de la TFD con azul de metileno. La aplicación de TFD con azul de metileno en biofilms de *E. faecalis* desarrollados *in vitro* también ha sido previamente reportada (Kishen *et al.*, 2010; López-Jimenez *et al.*, 2015; Namba *et al.*, 2022). En particular, se han reportado reducciones de 2-5 Log₁₀ UFC sobre la viabilidad de *E. faecalis* en biofilms al aplicar 100-160 µM azul de metileno y una dosis total entre 30 y 270 J/cm². Cabe remarcar que en estos estudios se utilizaron cepas de referencia mientras que en el nuestro se analizaron aislados clínicos. En relación a biofilms polimicrobianos en el contexto de heridas infectadas, el efecto de la TFD con azul de metileno no ha sido ampliamente explorado. Algunos estudios han mostrado su efecto sobre biofilms multi-especie de patógenos que causan infecciones en la cavidad bucal o dispositivos de uso médico (Biel, 2015; Bueno-Silva *et al.*, 2024).

Por último, se seleccionaron condiciones sub-letales de los tratamientos anti-biofilm individuales con antibióticos y TFD, con el objetivo de evaluar el efecto de su aplicación combinada. Se observó que el esquema más efectivo consistió en la aplicación secuencial de antibiótico, seguida de TFD, y posteriormente un segundo desafío con antibiótico. Este protocolo resultó altamente eficaz contra *P. aeruginosa* tanto en biofilms monomicrobianos como mixtos, logrando en los primeros una reducción en la viabilidad celular cercana a su erradicación. En contraste, *E. faecalis* no se vio significativamente afectado por los tratamientos combinados evaluados.

Diversos estudios han demostrado que la combinación de la TFD con antibióticos puede constituir una estrategia particularmente relevante en el abordaje de infecciones bacterianas mediadas por biofilms, ya que este enfoque actúa sobre múltiples sitios blanco debilitando la estructura de la

matriz extracelular y también favoreciendo la penetración y eficacia de los antibióticos (Pérez-Laguna *et al.*, 2020; Ronqui *et al.*, 2016; Mathur *et al.*, 2023). En este sentido, la generación de especies reactivas de oxígeno mediante TFD contribuye tanto a la eliminación directa de bacterias como a la desorganización de la biopelícula, exponiendo a las células previamente protegidas. Esto permite que el antibiótico, incluso administrado en concentraciones más bajas, ejerza un efecto más potente sobre las bacterias remanentes, dando lugar a una acción sinérgica que supera los resultados obtenidos con cada tratamiento por separado. La relevancia de esta estrategia radica en su potencial para superar la marcada tolerancia de las biopelículas frente a los antibióticos convencionales, un fenómeno que constituye uno de los principales desafíos terapéuticos en la actualidad. Asimismo, la posibilidad de reducir las dosis de antibióticos sin comprometer la eficacia terapéutica resulta de gran interés en el contexto del incremento global de la resistencia antimicrobiana. Cabe destacar que algunos investigadores han señalado que la eficacia de la combinación entre antibióticos y TFD depende en gran medida del tipo de antibiótico utilizado, dado que algunos de ellos pueden mostrar efectos sinérgicos mientras que otros presentan interacciones antagónicas con la TFD (Zangirolami *et al.*, 2024).

En los biofilms mixtos, las observaciones mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) revelaron heterogeneidades en la distribución de las dos especies bacterianas. En particular, en aquellos lugares donde *P. aeruginosa* se encontraba en estrecha proximidad con *E. faecalis*, el tratamiento combinado no logró inducir los drásticos cambios morfológicos que sí se observaron en regiones enriquecidas exclusivamente con *P. aeruginosa*. Estos hallazgos sugieren la existencia de un efecto protector de *E. faecalis* sobre *P. aeruginosa*, cuyos mecanismos moleculares aún no han sido dilucidados y requerirán investigaciones futuras .

Finalmente, cabe destacar que la TFD que emplea luz en el espectro rojo (619 - 780 nm) presenta una ventaja adicional en el tratamiento de lesiones cutáneas, ya que puede modular diversos procesos biológicos en los tejidos a través de un fenómeno conocido como fotobiomodulación. Este efecto se produce por la absorción de la luz por cromóforos intracelulares y, mediante mecanismos fotoquímicos y fototérmicos, promueve la actividad mitocondrial, incrementa la producción de energía celular, mejora la perfusión tisular, atenúa la respuesta inflamatoria y estimula tanto la síntesis de colágeno como la regeneración celular en la zona afectada, lo que en conjunto favorece la cicatrización (Zhang *et al.*, 2024).

En conjunto, estos hallazgos respaldan la TFD combinada con antibióticos como una alternativa innovadora y con proyección clínica para el manejo de infecciones persistentes y de patógenos multirresistentes.

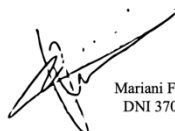
6. CONCLUSIONES:

- Las úlceras de pie de diabético constituyen un nicho favorable para el desarrollo de infecciones bacterianas, las cuales con frecuencia presentan un carácter polimicrobiano, con una combinación de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.
- *Enterococcus faecalis* destacó como el patógeno más frecuente a nivel local, tanto en infecciones monomicrobianas como polimicrobianas.
- En infecciones polimicrobianas, *Enterococcus faecalis* mostró una alta frecuencia de co-aislamiento con *Escherichia coli*, *Morganella morganii* y *Pseudomonas aeruginosa*, lo que sugiere interacciones microbianas relevantes en la patogenia.
- A pesar de la problemática asociada a la resistencia antimicrobiana, se identificaron antibióticos con eficacia consistente frente a los aislados locales. *Enterococcus faecalis* mostró sensibilidad a ampicilina y vancomicina; *Escherichia coli* y *Morganella morganii* fueron sensibles a amikacina y carbapenémicos; mientras que *Pseudomonas aeruginosa* presentó sensibilidad a amikacina y colistina.
- Las especies bacterianas predominantes en las úlceras del pie diabético evidenciaron capacidad de formación de biofilms *in vitro*, empleando un medio de cultivo que simula las condiciones nutricionales propias de las heridas en pacientes diabéticos.
- En biofilms mixtos, *Enterococcus faecalis* presenta interacciones beneficiosas que favorecen su crecimiento al coexistir con *Pseudomonas aeruginosa* o con *Escherichia coli*, siendo este efecto dependiente de la cepa en el caso de *E. coli*. En cambio, su interacción con *Morganella morganii* resulta neutral.
- La ventaja en el fitness observada en ciertas especies no se presenta en condiciones de crecimiento planctónico ni cuando las biopelículas mixtas se forman en medios de cultivo ricos y estandarizados, como el TSA.
- Los biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* presentan alta tolerancia a antibióticos individuales y combinados (amikacina y ampicilina), mostrando que las concentraciones efectivas sobre cultivos planctónicos no son suficientes para reducir su viabilidad en biofilms.

- La terapia fotodinámica con azul de metileno y luz roja reduce la viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* en biofilms, pero sólo a altas concentraciones del fotosensibilizador, y muestra una eficacia menor en biofilms mixtos.
- La combinación secuencial de dosis subletales de antibióticos y terapia fotodinámica potencia significativamente la eliminación de *Pseudomonas aeruginosa* en biofilms simples y mixtos, mientras que *Enterococcus faecalis* permanece sin afectación significativa. Este efecto diferencial se evidencia por microscopía electrónica, que muestra daño estructural en *P. aeruginosa*, mientras *E. faecalis* conserva su integridad celular.

7. PERSPECTIVAS

- Profundizar en la caracterización molecular de las interacciones cooperativas observadas en biofilms mixtos, particularmente entre *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, con el propósito de identificar posibles blancos terapéuticos para interrumpir sinergias bacterianas relevantes a nivel patogénico.
- Evaluar si el crecimiento en biofilms mixtos modifica la capacidad de las bacterias para adherirse e invadir las células del hospedador y para inducir respuestas inflamatorias, respecto de bacterias provenientes de biofilms monomicrobianos.
- Optimizar los parámetros de la fototerapia mediante el ajuste de la intensidad, longitud de onda y modos de aplicación de la luz, con el fin de reducir los tiempos de exposición necesarios sin comprometer la eficacia terapéutica.
- Investigar estrategias alternativas para erradicar eficazmente *Enterococcus faecalis* en comunidades polimicrobianas.
- Explorar combinaciones terapéuticas que incluyan azul de metileno junto con otros antimicrobianos o agentes potenciadores, utilizando en modelos celulares y animales. Evaluar posibles efectos sinérgicos, la reducción de las dosis requeridas y la minimización de la toxicidad



Mariani Florencia
DNI 37086493



Estela Galvan
DNI 23395515

8. ANEXO

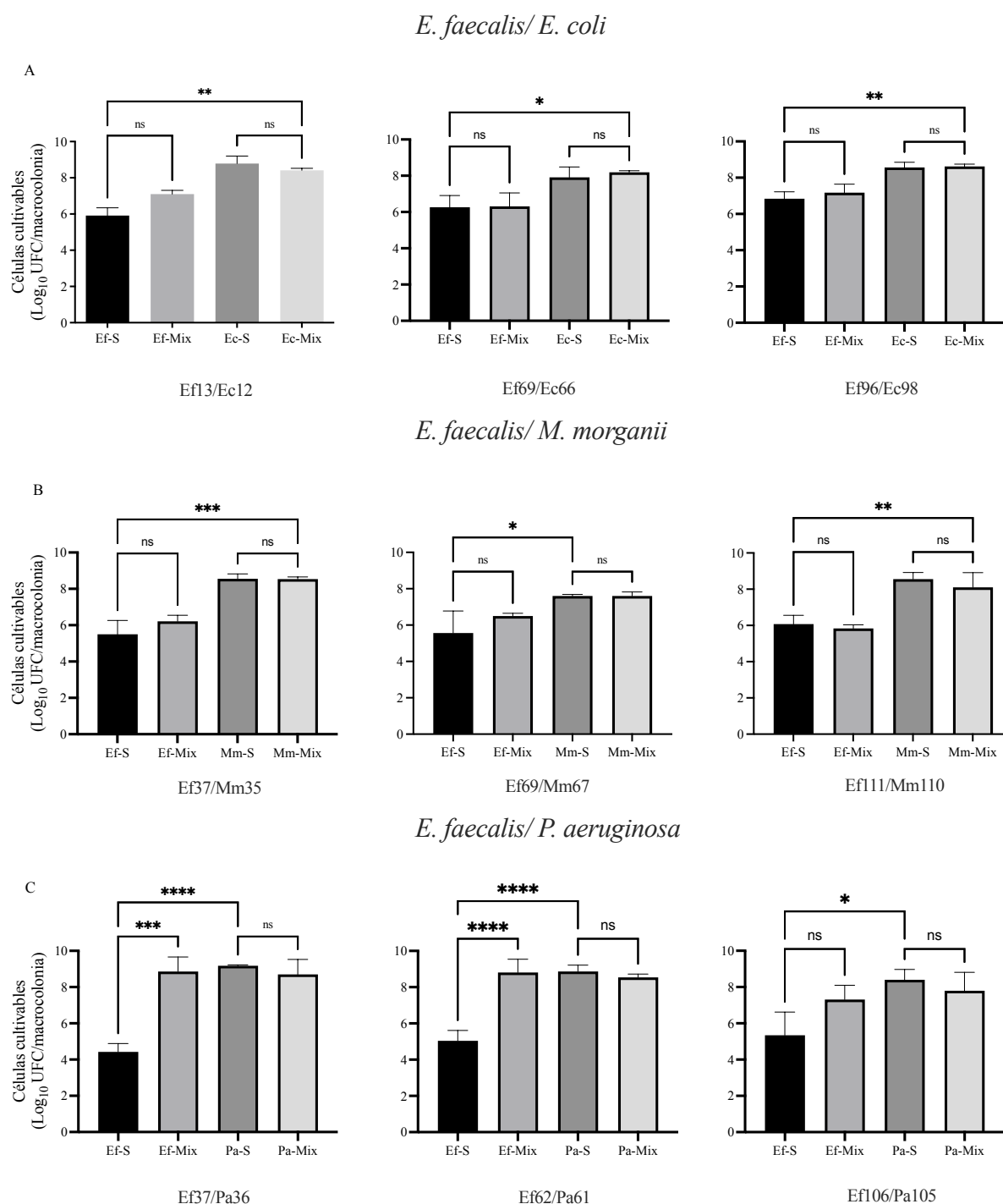


Fig 1- Anexo. Comparación del número de células cultivables en biofilms simples y mixtos de *E. faecalis* y especies Gram-negativas. Recuentos expresados como log₁₀ UFC/macrocoulonia para *Ef* y las especies acompañantes A-*Escherichia coli* (*Ec*), B-*Morganella morganii* (*Mm*) y C-*Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) en condiciones de cultivo simple (S) y mixto (Mix). Los datos se analizaron mediante one-way ANOVA seguido de la prueba post hoc de Tukey. La normalidad se verificó con el test de Shapiro–Wilk ($p > 0,05$). Los símbolos indican el nivel de significancia estadística: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****), ns: no significativo.

Cada punto representa una réplica biológica independiente (n = 3). Las barras indican la media $\pm$ DE.

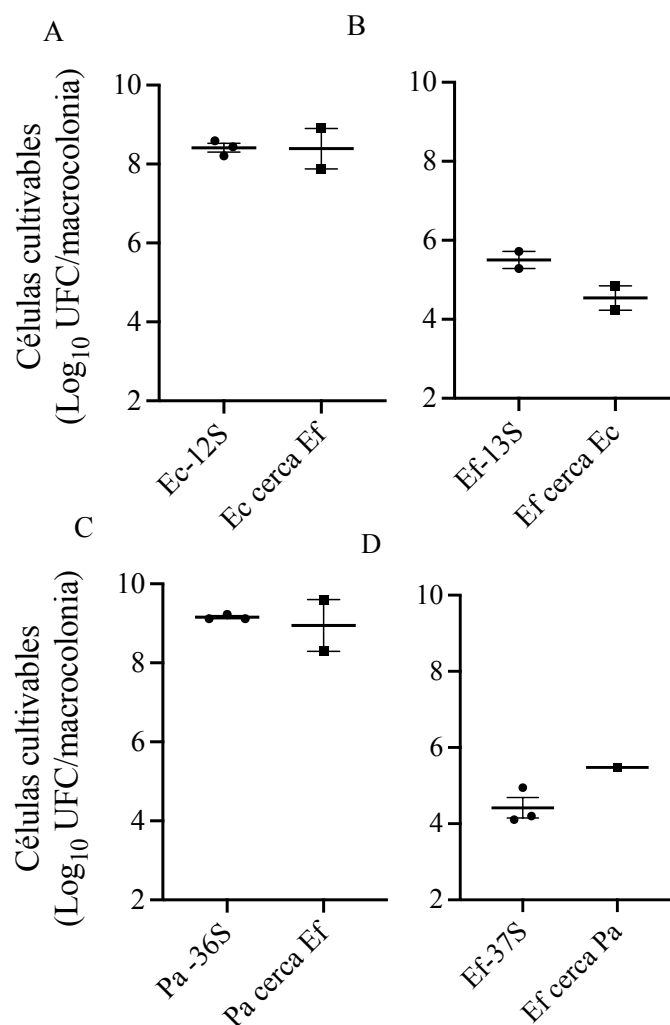


Fig 3- Anexo. Crecimiento bacteriano de biofilms de *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *E. coli* en macrocolonias. Se desarrollaron macrocolonias de *E. faecalis* simples (S) en Lubbock-Glc-agar (1%) en forma independiente o a una distancia de 2 cm de *E. coli* o *P. aeruginosa* durante 24 h a 37°C y posteriormente se realizó el recuento de UFC de cada especie. Experimentos independientes fueron realizados. (*) $p < 0,05$ mediante la prueba t de Student pareada.

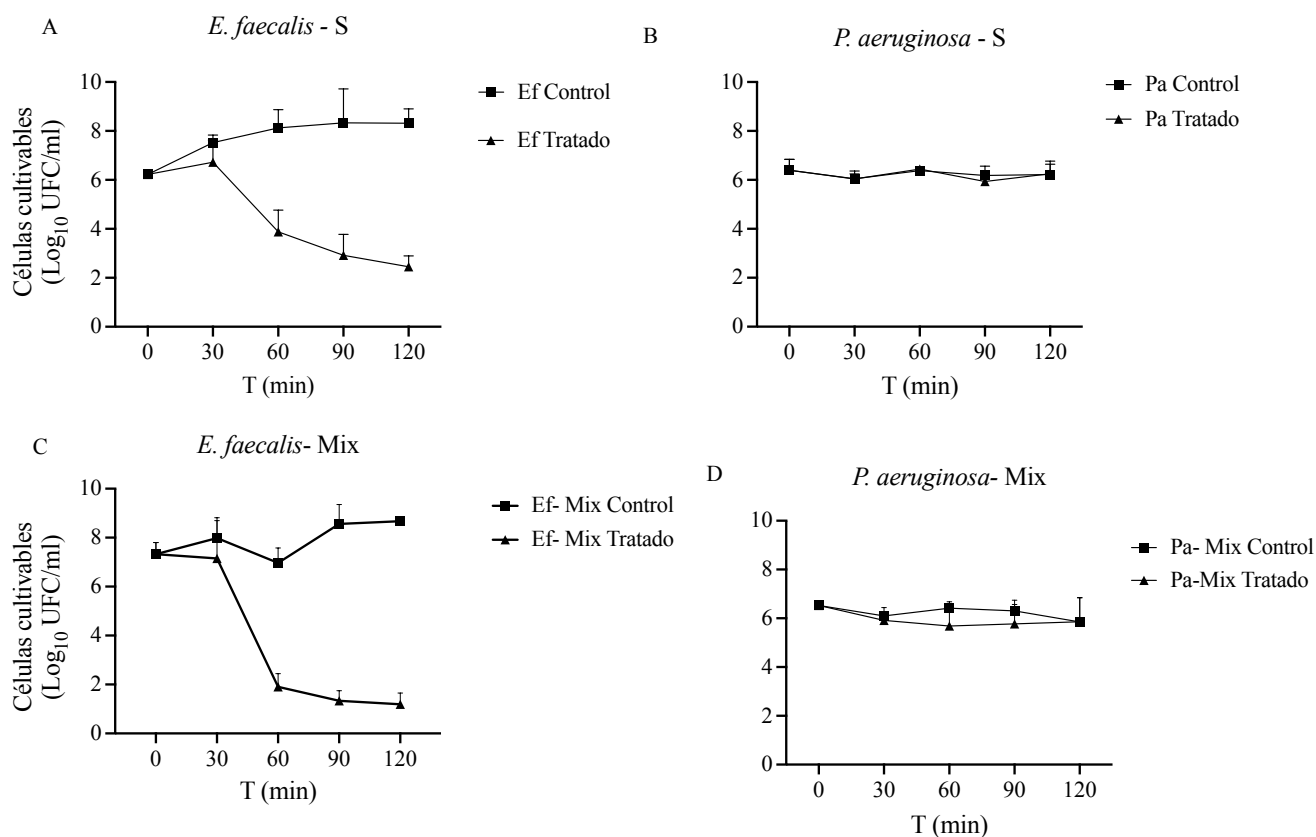


Fig 4- Anexo. Efecto de la aplicación de TFD con 600 μ M de azul de metileno sobre cultivos planctónicos. Se realizaron inóculos ON en TSB a 37 grados hasta lograr una concentración de 6 Log₁₀ UFC. Luego se inoculó en Lubbock-Glc y se dejó a temperatura ambiente con 600 μ M de AM expuestos a luz led roja durante 2 h. Se tomaron 20 μ l de muestra cada 30 minutos. Las especies estudiadas fueron *Ej037* y *Pa036*. En cada caso, se monitorearon las inoculaciones de una sola especie (S) y de especies mixtas (M). Se muestra la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Adekoya, A. E., West, S. R., Arriaga, S. K., & Ibberson, C. B. (2025). Infections as ecosystems: Community metabolic interactions in microbial pathogenesis. *Infection and Immunity*, 93(8), e00530-24. <https://doi.org/10.1128/iai.00530-24>
- Afonso, A. C., Oliveira, D., Saavedra, M. J., Borges, A., & Simões, M. (2021). Biofilms in diabetic foot ulcers: Impact, risk factors and control strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8278. <https://doi.org/10.3390/ijms22158278>
- Akoğlu A. (2020). The effect of some environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation by some lactic acid bacteria isolated from a local cheese in Turkey. *Biotechnology letters*, 42(3), 481–492. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02794-4>.
- Alves, P. M., Al-Badi, E., Withycombe, C., Jones, P. M., Purdy, K. J., & Maddocks, S. E. (2018). Interaction between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is beneficial for colonisation and pathogenicity in a mixed biofilm. *Pathogens and Disease*, 76(1), fty003. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty003>
- Amanatidou, E., Matthews, A. C., Kuhlicke, U., Neu, T. R., McEvoy, J. P., & Raymond, B. (2019). Biofilms facilitate cheating and social exploitation of β -lactam resistance in *Escherichia coli*. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 5(1), 36. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0109-2>
- Anju, V. T., Busi, S., Imchen, M., Kumavath, R., Mohan, M. S., Salim, S. A., Subhaswaraj, P., & Dyavaiah, M. (2022). Polymicrobial infections and biofilms: Clinical significance and eradication strategies. *Antibiotics*, 11(12), 1731. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121731>
- Ascenzioni, F., Cloeckert, A., Di Domenico, E. G., Dunyach-Remy, C., & Guembe, M. (2021). Editorial: Microbial biofilms in chronic and recurrent infections. *Frontiers in Microbiology*, 12, 803324. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.803324>
- Azevedo, M. M., Lisboa, C., Cobrado, L., Pina-Vaz, C., & Rodrigues, A. (2020). Hard-to-heal wounds, biofilm and wound healing: an intricate interrelationship. *British journal of nursing* (Mark Allen Publishing), 29(5), S6–S13. <https://doi.org/10.12968/bjon.2020.29.5.S6>

- Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J. B., Ciofu, O., Givskov, M., & Høiby, N. (2004). Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1168–1174. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1168-1174.2004>
- Baishya, J., Everett, J. A., Chazin, W. J., Rumbaugh, K. P., & Wakeman, C. A. (2022). The innate immune protein calprotectin interacts with and encases biofilm communities of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 898796. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.898796>
- Ballén, V., Cepas, V., Ratia, C., Gabasa, Y., & Soto, S. M. (2022). Clinical *Escherichia coli*: from biofilm formation to new antibiofilm strategies. *Microorganisms*, 10(6), 1103. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061103>
- Ballén, V., Ratia, C., Cepas, V., & Soto, S. M. (2020). *Enterococcus faecalis* inhibits *Klebsiella pneumoniae* growth in polymicrobial biofilms in a glucose-enriched medium. *Biofouling*, 36(7), 846–861. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1824272>
- Bandy, A. (2020). Ringing bells: *Morganella morganii* fights for recognition. *Public Health*, 182, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2020.01.016>
- Barshes, N. R., Clark, N. J., Bidare, D., Dudenhoeffer, J. H., Mindru, C., & Rodriguez-Barradas, M. C. (2022). Polymicrobial foot infection patterns are common and associated with treatment failure. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(10), ofac475. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac475>
- Biel M. A. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy for treatment of biofilm-based infections. *Advances in experimental medicine and biology*, 831, 119–136. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09782-4_8
- Biel, M. A., Sievert, C., Usacheva, M., Teichert, M., & Balcom, J. (2011). Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilms. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 1(4), 329–334. <https://doi.org/10.1002/alr.20089>

Boulton, A. J. M., Armstrong, D. G., Hardman, M. J., Malone, M., Embil, J. M., Attinger, C. E., Lipsky, B. A., Aragón-Sánchez, J., Li, H. K., Schultz, G., & Kirsner, R. S. (2020). Diagnosis and management of diabetic foot infections. American Diabetes Association.

Bueno-Silva B, Parma-Garcia J, Frigo L, Suárez LJ, Macedo TT, Uyeda FH, Melo MARDC, Sacco R, Mourão CF, Feres M, Shibli JA, Figueiredo LC. Antimicrobial Activity of Methylene Blue Associated with Photodynamic Therapy: In Vitro Study in Multi-Species Oral Biofilm. Pathogens. 2024 Apr 21;13(4):342. doi: 10.3390/pathogens13040342.

Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., & Sørensen, S. J. (2014). Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter? Trends in Microbiology, 22(2), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.004>

Calixto, G. M., Bernegossi, J., de Freitas, L. M., Fontana, C. R., & Chorilli, M. (2016). Nanotechnology based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. Molecules, 21(3), 342. <https://doi.org/10.3390/molecules21030342>

Cámara, M., Green, W., MacPhee, C. E., Rakowska, P. D., Raval, R., Richardson, M. C., Slater-Jefferies, J., Steventon, K., & Webb, J. S. (2022). Economic significance of biofilms: a multidisciplinary and cross-sectoral challenge. NPJ Biofilms and Microbiomes, 8(1), 42. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00306-y>

Cao, B., Christophersen, L., Kolpen, M., Jensen, P. Ø., Sneppen, K., Høiby, N., Moser, C., & Sams, T. (2016). Diffusion retardation by binding of tobramycin in an alginate biofilm model. PLoS ONE, 11(4), e0153616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153616>

Carro, G. V., Saurral, R., Salvador Sagüez, F., & Witman, E. L. (2020). Diabetic foot infections: Bacterial isolates from the centers and hospitals of Latin American countries. International Journal of Lower Extremity Wounds, 21(4), 562–573. <https://doi.org/10.1177/1534734620976305>

Celik, C., Lee, S. T. T., Tanoto, F. R., Veleba, M., Kline, K., & Thibault, G. (2024). Decoding the complexity of delayed wound healing following *Enterococcus faecalis* infection. eLife, 13, RP95113. <https://doi.org/10.7554/eLife.95113>

Ch'ng, J. H., Chong, K. K. L., Lam, L. N., Wong, J. J., Kline, K. A. (2019). Biofilm-associated infection by enterococci. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 82–94.

Chen, J., Wu, Y., Zhang, G., Kang, W., Wang, T., Li, J., Zhou, M., Zhang, L., Liu, Y., Xu, X., Jia, X., Xu, Y., & Liu, Y. (2024). Tracing the possible evolutionary trends of *Morganella morganii*: Insights from molecular epidemiology and phylogenetic analysis. *mSystems*, 9(7), e0030624. <https://doi.org/10.1128/msystems.00306-24>

Chen, L., Sun, S., Gao, Y., & Ran, X. (2023). Global mortality of diabetic foot ulcer: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 25(1), 36–45. <https://doi.org/10.1111/dom.14840>

Chiang, W. C., Pamp, S. J., Nilsson, M., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2012). The metabolically active subpopulation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms survives exposure to membrane-targeting antimicrobials via distinct molecular mechanisms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 245–256. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00929.x>

Chu, W., Zere, T. R., Weber, M. M., Wood, T. K., Whiteley, M., Hidalgo-Romano, B., Valenzuela, E. Jr., & McLean, R. J. (2012). Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 411–419. <https://doi.org/10.1128/AEM.06396-11>

Ciofu, O., Moser, C., Jensen, P. Ø., & Høiby, N. (2022). Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 621–635. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00682-4>

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (29th ed.). Wayne, PA: Author.

Čurová, K., Slebodníková, R., Kmeťová, M., Hrabovský, V., Maruniak, M., Liptáková, E., & Siegfried, L. (2020). Virulence, phylogenetic background and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* associated with extraintestinal infections. *Journal of Infection and Public Health*, 13(10), 1537–1543. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.032>

Cwalinski, T., Polom, W., Marano, L., Roviello, G., D'Angelo, A., Cwalina, N., Matuszewski, M., Roviello, F., Jaskiewicz, J., & Polom, K. (2020). Methylene blue-current knowledge, fluorescent properties, and its future use. *Journal of Clinical Medicine*, 9(11), 3538. <https://doi.org/10.3390/jcm9113538>

Davies, D. G., & Marques, C. N. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1393–1403. <https://doi.org/10.1128/JB.01214-08>

Diban, F., Di Lodovico, S., Di Fermo, P., D'Ercole, S., D'Arcangelo, S., Di Giulio, M., & Cellini, L. (2023). Biofilms in chronic wound infections: Innovative antimicrobial approaches using the in vitro Lubbock chronic wound biofilm model. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1004. <https://doi.org/10.3390/ijms24021004>

Dong, J., Liu, L., Chen, L., Xiang, Y., Wang, Y., & Zhao, Y. (2023). The Coexistence of Bacterial Species Restructures Biofilm Architecture and Increases Tolerance to Antimicrobial Agents. *Microbiology spectrum*, 11(2), e0358122. Advance online publication. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03581-22>.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>

Doualeh, M., Payne, M., Litton, E., Raby, E., & Currie, A. (2022). Molecular Methodologies for Improved Polymicrobial Sepsis Diagnosis. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 4484. <https://doi.org/10.3390/ijms23094484>

Elfadadny, A., Ragab, R. F., AlHarbi, M., Badshah, F., Ibáñez-Arancibia, E., Farag, A., Hendawy, A. O., De Los Ríos-Escalante, P. R., Aboubakr, M., Zakai, S. A., & Nageeb, W. M. (2024). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1374466. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1374466>

- Fetni, S., Ouahab, A., & Hamlaoui, F. (2023). Bacteriological profile and frequency of antibiotic resistance in the infected diabetic foot. *Cellular and Molecular Biology*, 69(5), 143–149. <https://doi.org/10.14715/cmb/2023.69.5.22>
- Figueiredo-Godoi, L. M. A., Garcia, M. T., Pinto, J. G., Ferreira-Strixino, J., Faustino, E. G., Pedroso, L. L. C., & Junqueira, J. C. (2022). Antimicrobial photodynamic therapy mediated by fotenticine and methylene blue on planktonic growth, biofilms, and burn infections of *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics*, 11(5), 619. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050619>
- Fink, M. M., Weaver, A. A., Parmar, D., Paczkowski, J. E., Li, L., Klaers, M. K., Junker, E. A., Jarocki, E. A., Sweedler, J. V., & Shrout, J. D. (2025). *Pseudomonas aeruginosa* alkyl quinolone response is dampened by *Enterococcus faecalis*. *mBio*, 16(2), e0332024. <https://doi.org/10.1128/mbio.03320-24>
- Fleming, D., & Rumbaugh, K. P. (2017). Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms*, 5(2), 15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015>
- Flemming, H. C., van Hullebusch, E. D., Neu, T. R., Nielsen, P. H., Seviour, T., Stoodley, P., Wingender, J., & Wuertz, S. (2023). The biofilm matrix: Multitasking in a shared space. *Nature Reviews Microbiology*, 21(2), 70–86. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00791-0>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fontana, C. R., Abernethy, A. D., Som, S., Ruggiero, K., Doucette, S., Marcantonio, R. C., Boussios, C. I., Kent, R., Goodson, J. M., Tanner, A. C., & Soukos, N. S. (2009). The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *Journal of Periodontal Research*, 44(6), 751–759. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01187.x>
- Forte Giacobone, A. F., Ruiz Gale, M. F., Hogert, E. N., & Oppezzo, O. J. (2016). A possible phenomenon of persistence in *Pseudomonas aeruginosa* treated with methylene blue and red light. *Photochemistry and Photobiology*, 92(5), 702–707. <https://doi.org/10.1111/php.12613>

- Fritts, R. K., McCully, A. L., & McKinlay, J. B. (2021). Extracellular metabolism sets the table for microbial cross-feeding. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1), e00135–20. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00135-20>
- Fux, C. A., Shirtliff, M., Stoodley, P., & Costerton, J. W. (2005). Can laboratory reference strains mirror “real-world” pathogenesis? *Trends in Microbiology*, 13(2), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.001>
- Garousi, M., Monazami Tabar, S., Mirazi, H., Farrokhi, Z., Khaledi, A., & Shakerimoghaddam, A. (2023). Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in diabetic foot infections: A global systematic review and meta-analysis. *Germs*, 13(4), 362–372. <https://doi.org/10.18683/germs.2023.1406>
- Gaston, J. R., Andersen, M. J., Johnson, A. O., Bair, K. L., Sullivan, C. M., Guterman, L. B., White, A. N., Brauer, A. L., Learman, B. S., Flores-Mireles, A. L., & Armbruster, C. E. (2020). *Enterococcus faecalis* polymicrobial interactions facilitate biofilm formation, antibiotic recalcitrance, and persistent colonization of the catheterized urinary tract. *Pathogens*, 9(10), 835. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100835>
- Ghotaslou, R., Memar, M. Y., & Alizadeh, N. (2018). Classification, microbiology and treatment of diabetic foot infections. *Journal of Wound Care*, 27(7), 434–441. <https://doi.org/10.12968/jowc.2018.27.7.434>
- González, J. F., Hahn, M. M., & Gunn, J. S. (2018). Chronic biofilm-based infections: Skewing of the immune response. *Pathogens and Disease*, 76(3), fty023. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty023>
- Goswami, A. G., Basu, S., Banerjee, T., & Shukla, V. K. (2023). Biofilm and wound healing: From bench to bedside. *European Journal of Medical Research*, 28(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01121-7>
- Hausner, M., & Wuertz, S. (1999). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3710–3713. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3710-3713.1999>

- Havsed, K., Stensson, M., Jansson, H., Carda-Diéguez, M., Pedersen, A., Neilands, J., Svensäter, G., & Mira, A. (2021). Bacterial composition and metabolomics of dental plaque from adolescents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 716493. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.716493>
- Høiby, N., Moser, C., Oliver, A., Williams, C., Ramage, G., Borghi, E., Azeredo, J., & Macià, M. D.; ESGB board. (2023). To update or not to update the ESCMID guidelines for the diagnosis and treatment of biofilm infections - That is the question! *Biofilm*, 6, 100135. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100135>
- Huang, Y., Xiao, Z., Cao, Y., Gao, F., Fu, Y., Zou, M., Luo, X., Jiang, Y., & Xue, Y. (2022). Rapid microbiological diagnosis based on 16S rRNA gene sequencing: A comparison of bacterial composition in diabetic foot infections and contralateral intact skin. *Frontiers in microbiology*, 13, 1021955. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1021955>
- Huwae, T. E. C. J., Ratridewi, I., Lena, Y. M., Retnoningsih, D., Sananta, P., & Asmiragani, S. (2023). Culture and sensitivity pattern of aerobic bacterial isolates in diabetic foot infections during 2018–2022 in Asian countries: a literature review study. *Annals of Medicine and Surgery (London)*, 85(2), 161–165. <https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000000223>
- International Diabetes Federation. (2025). *IDF diabetes atlas (11th ed.)*. International Diabetes Federation. Bruselas, Bélgica.
- Jensen, P. Ø., Kolpen, M., Kragh, K. N., & Kühl, M. (2017). Microenvironmental characteristics and physiology of biofilms in chronic infections of CF patients are strongly affected by the host immune response. *APMIS*, 125(4), 276–288. <https://doi.org/10.1111/apm.12668>
- Jing, Y., Yin, Z., Wang, P., Guan, J., Chen, F., Wang, L., Li, X., Mu, X., & Zhou, D. (2022). A genomic and bioinformatics view of the classification and evolution of *Morganella* species and their chromosomal accessory genetic elements harboring antimicrobial resistance genes. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e0265021. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02650-21>
- Jneid, J., Cassir, N., Schuldiner, S., Jourdan, N., Sotto, A., Lavigne, J.-P., & La Scola, B. (2018). Exploring the microbiota of diabetic foot infections with culturomics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 282. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00282>

- Johani, K., Malone, M., Jensen, S., Gosbell, I., Dickson, H., Hu, H., & Vickery, K. (2017). Microscopy visualisation confirms multi-species biofilms are ubiquitous in diabetic foot ulcers. *International Wound Journal*, 14(6), 1160–1169. <https://doi.org/10.1111/iwj.12777>
- Joshi, R. V., Gunawan, C., & Mann, R. (2021). We are one: Multispecies metabolism of a biofilm consortium and their treatment strategies. *Frontiers in Microbiology*, 12, 635432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.635432>
- Juarez, G. E., & Galván, E. M. (2018). Role of nutrient limitation in the competition between uropathogenic strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in mixed biofilms. *Biofouling*, 34(3), 287–298. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1434876>
- Juarez, G. E., Mateyca, C., & Galvan, E. M. (2020). *Proteus mirabilis* outcompetes *Klebsiella pneumoniae* in artificial urine medium through secretion of ammonia and other volatile compounds. *Heliyon*, 6(2), e03361. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03361>
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Kakurai, M., Takeyama, S., & Moriyama, Y. (2025). Necrotizing soft tissue infections caused by *Morganella morganii*: a case report and review of the literature. *Cureus*, 17(3), e80718. <https://doi.org/10.7759/cureus.80718>
- Kalan, L. R., & Brennan, M. B. (2019). The role of the microbiome in nonhealing diabetic wounds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1435(1), 79–92. <https://doi.org/10.1111/nyas.13926>
- Kao, P. H. N., & Kline, K. A. (2019). Dr. Jekyll and Mr. Hide: How *Enterococcus faecalis* subverts the host immune response to cause infection. *Journal of Molecular Biology*, 431(16), 2932–2945. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.030>
- Kao, P. H., Ch'ng, J. H., Chong, K. K. L., Stocks, C. J., Wong, S. L., & Kline, K. A. (2023). *Enterococcus faecalis* suppresses *Staphylococcus aureus*-induced NETosis and

promotes bacterial survival in polymicrobial infections. FEMS Microbes, 4, xtad019. <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtad019>

Karner, L., Drechsler, S., Metzger, M., Hacobian, A., Schädli, B., Slezak, P., Grillari, J., & Dungel, P. (2020). Antimicrobial photodynamic therapy fighting polymicrobial infections - a journey from in vitro to in vivo. Photochemical & Photobiological Sciences, 19(10), 1332–1343. <https://doi.org/10.1039/d0pp00108b>

Keogh, D., Tay, W. H., Ho, Y. Y., Dale, J. L., Chen, S., Umashankar, S., Williams, R. B. H., Chen, S. L., Dunny, G. M., & Kline, K. A. (2016). Enterococcal metabolite cues facilitate interspecies niche modulation and polymicrobial infection. Cell Host & Microbe, 20(4), 493–503. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.004>

Kim, M. A., Rosa, V., & Min, K. S. (2020). Characterization of *Enterococcus faecalis* in different culture conditions. Scientific reports, 10(1), 21867. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78998-5>

Kirketerp-Møller, K., Jensen, P. Ø., Fazli, M., Madsen, K. G., Pedersen, J., Moser, C., et al. (2008). Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. Journal of Clinical Microbiology, 46, 2717–2722. <https://doi.org/10.1128/JCM.00501-08>

Kishen, A., Upadya, M., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2010). Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. Photochemistry and photobiology, 86(6), 1343–1349. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00792.x>

Kwon, K. T., & Armstrong, D. G. (2018). Microbiology and antimicrobial therapy for diabetic foot infections. Infection & Chemotherapy, 50(1), 11–20. <https://doi.org/10.3947/ic.2018.50.1.11>

Laganenka, L., & Sourjik, V. (2018). Autoinducer 2-dependent *Escherichia coli* biofilm formation is enhanced in a dual-species coculture. Applied and Environmental Microbiology, 84(5), e02638-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02638-17>

- Lan, M., Zhao, S., Liu, W., Lee, C. S., Zhang, W., & Wang, P. (2019). Photosensitizers for photodynamic therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 8(13), e1900132. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900132>
- Lee, K., Lee, K. M., Kim, D., & Yoon, S. S. (2017). Molecular determinants of the thickened matrix in a dual-species *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(21), e01182-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01182-17>
- Levin, B. R., & Antia, R. (2001). Why we don't get sick: The within-host population dynamics of bacterial infections. *Science*, 292(5519), 1112–1115. <https://doi.org/10.1126/science.1058879>
- Levitus, M., Rewane, A., & Perera, T. B. (2023). Vancomycin-resistant enterococci. In StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513233/>
- Little, B. J., Blackwood, D. J., Hinks, J., Lauro, F. M., Marsili, E., Okamoto, A., et al. (2020). Microbially influenced corrosion—Any progress? *Corrosion Science*, 170, 108641. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2020.108641>
- Liu, H., Zhu, J., Hu, Q., & Rao, X. (2016). *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, 50, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.07.006>
- Liu, Y., Long, S., Wang, H., & Wang, Y. (2024). Biofilm therapy for chronic wounds. *International Wound Journal*, 21(2), e14667. <https://doi.org/10.1111/iwj.14667>
- Löffler, M. W., Schuster, H., Bühler, S., & Beckert, S. (2013). Wound fluid in diabetic foot ulceration: More than just an undefined soup? *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 12(2), 113–129. <https://doi.org/10.1177/1534734613489989>
- López-Jiménez, L., Fusté, E., Martínez-Garriga, B., Arnabat-Domínguez, J., Vinuesa, T., & Viñas, M. (2015). Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Lasers in medical science*, 30(5), 1519–1526. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1749-y>

- Macdonald, K. E., Jordan, C. Y., Crichton, E., Barnes, J. E., Harkin, G. E., Hall, L. M. L., & Jones, J. D. (2020). A retrospective analysis of the microbiology of diabetic foot infections at a Scottish tertiary hospital. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 218. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4923-1>
- Madsen, J. S., Burmølle, M., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 183–195. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x>
- Mah, T. F. (2012). Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(9), 1061–1072. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>
- Mariani, F., & Galvan, E. M. (2023). *Staphylococcus aureus* in polymicrobial skin and soft tissue infections: Impact of inter-species interactions in disease outcome. *Antibiotics*, 12(7), 1164. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071164>
- Mariani, F., Juarez, G. E., Barberis, C., Veiga, F., Vay, C., & Galvan, E. M. (2023). Interspecies interactions in mixed-species biofilms formed by *Enterococcus faecalis* and Gram-negative bacteria isolated from polymicrobial diabetic foot ulcers. *Biofouling*, 39(5), 579–590. <https://doi.org/10.1080/08927014.2023.2236949>
- Mathur, A., Parihar, A. S., Modi, S., & Kalra, A. (2023). Photodynamic therapy for ESKAPE pathogens: An emerging approach to combat antimicrobial resistance (AMR). *Microbial pathogenesis*, 183, 106307. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106307>
- McDermott, K., Fang, M., Boulton, A. J. M., Selvin, E., & Hicks, C. W. (2023). Etiology, epidemiology, and disparities in the burden of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*, 46(1), 209–221. <https://doi.org/10.2337/dci22-0043>
- Mottola, C., Mendes, J. J., Cristino, J. M., Cavaco-Silva, P., Tavares, L., & Oliveira, M. (2016). Polymicrobial biofilms by diabetic foot clinical isolates. *Folia Microbiologica*, 61(1), 35–43. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0401-3>
- Namba, A. M., Santos, E. L. S., Garcia, M. T., Ribeiro, F. C., Figueiredo-Godoi, L. M. A., Rossoni, R. D., & Junqueira, J. C. (2022). Farnesol as a potentiator of antimicrobial

photodynamic inactivation on *Enterococcus faecalis*. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 39, 102928. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102928>

Nazari, M., Bahrami, A., & Jahanian, F. (2025). Innovative non-antibiotic strategies for combating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in diabetic foot infections. Current Microbiology, 82(9), 384. <https://doi.org/10.1007/s00284-025-04349-0>

Nunez, N., Derré-Bobillot, A., Trainel, N., Lakisic, G., Lecomte, A., Mercier-Nomé, F., Cassard, A. M., Bierne, H., Serror, P., & Archambaud, C. (2022). The unforeseen intracellular lifestyle of *Enterococcus faecalis* in hepatocytes. Gut Microbes, 14(1), 2058851. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2058851>

OMS. Organización mundial de la Salud (2024) Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

Packer, C. F., Ali, S. A., & Manna, B. (2023). Diabetic foot ulcer. In StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499887/>

Park, Y., Simionato, M. R., Sekiya, K., Murakami, Y., James, D., Chen, W., Hackett, M., Yoshimura, F., Demuth, D. R., & Lamont, R. J. (2005). Short fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and their role in coadhesion with *Streptococcus gordonii*. Infection and Immunity, 73(7), 3983–3989. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.3983-3989.2005>

Pérez-Laguna, V., García-Luque, I., Ballesta, S., Pérez-Artiaga, L., Lampaya-Pérez, V., Rezusta, A., & Gilaberte, Y. (2020). Photodynamic therapy using methylene blue, combined or not with gentamicin, against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 31, 101810.

Perez, A. C., Pang, B., King, L. B., Tan, L., Murrah, K. A., Reimche, J. L., Wren, J. T., Richardson, S. H., Ghandi, U., & Swords, W. E. (2014). Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence in vivo. Pathogens and Disease, 70(3), 280–288. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12129>

- Pontes, D. G., Silva, I. T. D. C. E., Fernandes, J. J., Monteiro, A. F. G., Gomes, P. H. D. S., Ferreira, M. G. M., Lima, F. G., Correia, J. O., Santos, N. J. N. D., & Cavalcante, L. P. (2020). Microbiologic characteristics and antibiotic resistance rates of diabetic foot infections. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 47, e20202471. <https://doi.org/10.1590/0100-6991e-20202471>
- Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Pantel, A., Schuldiner, S., Sotto, A., & Lavigne, J. P. (2020). Biofilms in diabetic foot ulcers: Significance and clinical relevance. *Microorganisms*, 8(10), 1580. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101580>
- Pouget, C., Gustave, C. A., Ngba-Essebe, C., Laurent, F., Lemichez, E., Tristan, A., Sotto, A., Dunyach-Rémy, C., & Lavigne, J. P. (2021). Adaptation of *Staphylococcus aureus* in a medium mimicking a diabetic foot environment. *Toxins*, 13(3), 230. <https://doi.org/10.3390/toxins13030230>
- Prochnow, E. P., Martins, M. R., Campagnolo, C. B., Santos, R. C., Villetti, M. A., & Kantorski, K. Z. (2016). Antimicrobial photodynamic effect of phenothiazinic photosensitizers in formulations with ethanol on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 13, 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.08.008>
- Purevdorj-Gage, B., Costerton, W. J., & Stoodley, P. (2005). Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology*, 151(Pt 5), 1569–1576. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27536-0>
- Ramsey, M. M., Rumbaugh, K. P., & Whiteley, M. (2011). Metabolite cross-feeding enhances virulence in a model polymicrobial infection. *PLoS Pathogens*, 7(3), e1002012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002012>
- Ranjan, A., Shaik, S., Nandanwar, N., Hussain, A., Tiwari, S. K., Semmler, T., Jadhav, S., Wieler, L. H., Alam, M., Colwell, R. R., & Ahmed, N. (2017). Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from skin and soft tissue and other extraintestinal infections. *mBio*, 8(4), e01070-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01070-17>

- Rendueles, O., & Ghigo, J. M. (2015). Mechanisms of competition in biofilm communities. *Microbiology Spectrum*, 3(3), AM-0009-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AM-0009-2014>
- Rendueles, O., Travier, L., Latour-Lambert, P., Fontaine, T., Magnus, J., Denamur, E., & Ghigo, J. M. (2011). Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides. *mBio*, 2(3), e00043-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00043-11>
- Rittmann, B. E. (2018). Biofilms, active substrata, and me. *Water Research*, 132, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.043>
- Røder, H. L., Olsen, N. M. C., Whiteley, M., & Burmølle, M. (2020). Unravelling interspecies interactions across heterogeneities in complex biofilm communities. *Environmental Microbiology*, 22(1), 5–16. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14834>
- Ronqui, M. R., de Aguiar Coletti, T. M., de Freitas, L. M., Miranda, E. T., & Fontana, C. R. (2016). Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 158, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.036>
- Rubilar-Huenschman, M., Ortega-Villanueva, C., González, I. A., & Palavecino, C. E. (2024). The Effect of Photodynamic Therapy on *Enterococcus* spp. and Its Application in Dentistry: A Scoping Review. *Pharmaceutics*, 16(6), 825. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16060825>
- Ruffin, M., & Brochiero, E. (2019). Repair process impairment by *Pseudomonas aeruginosa* in epithelial tissues: Major features and potential therapeutic avenues. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 182. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00182>
- Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
- Sachdeva, C., Satyamoorthy, K., & Murali, T. S. (2024). *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic allies and adversaries in the world of polymicrobial infections. *Critical Reviews in Microbiology*, 1–20. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2024.2397359>

- Saeed, K., Esposito, S., Akram, A., Ascione, T., Bal, A. M., Bassetti, M., Cernelutti, A., Chan, M., Davis, J., Dryden, M., Farhan, M. F. M., Fernando, S., Gottlieb, T., Gould, I., Yildiz, M., Lye, D. C., Pagliano, P., Poole, S., Pottinger, P. S., International Society of Antimicrobial Chemotherapy. (2020). Hot topics in diabetic foot infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(6), 105942. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105942>
- Sahoo, K., & Meshram, S. (2024). Biofilm formation in chronic infections: A comprehensive review of pathogenesis, clinical implications, and novel therapeutic approaches. *Cureus*, 16(10), e70629. <https://doi.org/10.7759/cureus.70629>
- Satpathy, A. S., Patnaik, B., & Mohapatra, K. C. (2024). Prospective observational study of microbiology of infected diabetic foot ulcers in a tertiary-care hospital. *Cureus*, 16(10), e71705. <https://doi.org/10.7759/cureus.71705>
- Schwarz, S., West, T. E., Boyer, F., Chiang, W. C., Carl, M. A., Hood, R. D., Rohmer, L., Tolker-Nielsen, T., Skerrett, S. J., & Mougous, J. D. (2010). *Burkholderia* type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathogens*, 6(8), e1001068. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001068>
- Seneviratne, C. J., Yip, J. W., Chang, J. W., Zhang, C. F., & Samaranayake, L. P. (2013). Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Archives of oral biology*, 58(10), 1327–1334. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.06.017>
- Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F., & Hengge, R. (2013). Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio*, 4(2), e00103-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00103-13>
- Seth, A., Attri, A. K., Kataria, H., Kochhar, S., Seth, S. A., & Gautam, N. (2019). Clinical profile and outcome in patients of diabetic foot infection. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 9(1), 14–19. https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR_278_18
- Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L., & Aalinkeel, R. (2023). Microbial biofilm: A review on formation, infection, antibiotic resistance, control

measures, and innovative treatment. *Microorganisms*, 11(6), 1614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms1106161>

Shettigar, K., Bhat, D. V., Satyamoorthy, K., & Murali, T. S. (2018). Severity of drug resistance and co-existence of *Enterococcus faecalis* in diabetic foot ulcer infections. *Folia microbiologica*, 63(1), 115–122. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0547-2>

Singh, N., & Lilge, L. (2025). Light-based therapy of infected wounds: A review of dose considerations for photodynamic microbial inactivation and photobiomodulation. *Journal of Biomedical Optics*, 30(3), 030901. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.30.3.030901>

Soares, J. A., Soares, S. M. C. S., de Jesus Tavares, R. R., de Castro Rizzi, C., Vaz Rodrigues, S. C. G., Maia Filho, E. M., Brito-Júnior, M., Pereira, R. D., Magalhães, P. P., & de Macêdo Farias, L. (2018). Exploring different photodynamic therapy parameters to optimize elimination of *Enterococcus faecalis* in planktonic form. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 22, 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.03.009>

Songca, S. P., & Adjei, Y. (2022). Applications of antimicrobial photodynamic therapy against bacterial biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3209. <https://doi.org/10.3390/ijms23063209>

Spichler, A., Hurwitz, B. L., Armstrong, D. G., & Lipsky, B. A. (2015). Microbiology of diabetic foot infections: From Louis Pasteur to “crime scene investigation”. *BMC Medicine*, 13, 2. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0232-0>

Stokes, J. M., Lopatkin, A. J., Lobritz, M. A., & Collins, J. J. (2019). Bacterial metabolism and antibiotic efficacy. *Cell Metabolism*, 30(2), 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.06.009>

Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K., Tajima, A., Iwase, T., & Mizunoe, Y. (2013). *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *Journal of Bacteriology*, 195(8), 1645–1655. <https://doi.org/10.1128/JB.01672-12>

- Sun, Y., Dowd, S. E., Smith, E., Rhoads, D. D., & Wolcott, R. D. (2008). In vitro multispecies Lubbock chronic wound biofilm model. *Wound Repair and Regeneration*, 16(6), 805–813. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00434.x>
- Suryaletha, K., John, J., Radhakrishnan, M. P., George, S., & Thomas, S. (2018). Metataxonomic approach to decipher the polymicrobial burden in diabetic foot ulcer and its biofilm mode of infection. *International Wound Journal*, 15(3), 473–481. <https://doi.org/10.1111/iwj.12888>
- Tan, C. A. Z., Lam, L. N., Biukovic, G., Soh, E. Y.-C., Toh, X. W., Lemos, J. A., & Kline, K. A. (2022). *Enterococcus faecalis* antagonizes *Pseudomonas aeruginosa* growth in mixed-species interactions. *Journal of Bacteriology*, 204(7), e00615-21. <https://doi.org/10.1128/jb.00615-21>
- Tanner, W. D., Atkinson, R. M., Goel, R. K., Toleman, M. A., Benson, L. S., Porucznik, C. A., & VanDerslice, J. A. (2017). Horizontal transfer of the *bla*NDM-1 gene to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 364(8), fnx048. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx048>
- Thaarup, I. C., & Bjarnsholt, T. (2021). Current in vitro biofilm-infected chronic wound models for developing new treatment possibilities. *Advances in Wound Care (New Rochelle)*, 10(2), 91–102. <https://doi.org/10.1089/wound.2020.1176>
- Thanganadar Appapalam, S., Muniyan, A., Vasanthi Mohan, K., & Panchamoorthy, R. (2021). A study on isolation, characterization, and exploration of multiantibiotic-resistant bacteria in the wound site of diabetic foot ulcer patients. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 20(1), 6–14. <https://doi.org/10.1177/1534734619884430>
- Tolker-Nielsen, T., & Molin, S. (2000). Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology*, 40(2), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s002480000057>
- Van den Bossche, S., De Broe, E., Coenye, T., Van Braeckel, E., & Crabbé, A. (2021). The cystic fibrosis lung microenvironment alters antibiotic activity: Causes and effects. *European Respiratory Review*, 30(161), 210055. <https://doi.org/10.1183/16000617.0055-2021>

Vazquez, N. M. (2024). Estudio de la actividad antibiofilm de metabolitos secundarios de plantas medicinales contra aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de San Martín.

Vazquez, N. M., Moreno, S., & Galván, E. M. (2022). Exposure of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* biofilms to 1,8-cineole leads to bacterial cell death and biomass disruption. *Biofilm*, 4, 100085. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2022.100085>

Vecchio, D., Gupta, A., Huang, L., Landi, G., Avci, P., Rodas, A., & Hamblin, M. R. (2015). Bacterial photodynamic inactivation mediated by methylene blue and red light is enhanced by synergistic effect of potassium iodide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), 5203–5212. <https://doi.org/10.1128/AAC.00019-15>

Veerachamy, S., Yarlagaadda, T., Manivasagam, G., & Yarlagaadda, P. K. (2014). Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 228(10), 1083–1099. <https://doi.org/10.1177/0954411914556137>

Vergison, A. (2008). Microbiology of otitis media: A moving target. *Vaccine*, 26(Suppl 7), G5–G10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.006>

Villa, F., Marchandin, H., Lavigne, J.-P., Schuldiner, S., Cellier, N., Sotto, A., & Loubet, P. (2024). Anaerobes in diabetic foot infections: Pathophysiology, epidemiology, virulence, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 37(3), e0014323. <https://doi.org/10.1128/cmr.00143-23>

Wang, D., Kuzma, M. L., Tan, X., He, T. C., Dong, C., Liu, Z., & Yang, J. (2021). Phototherapy and optical waveguides for the treatment of infection. *Advanced drug delivery reviews*, 179, 114036. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114036>

Warrier, A., Mazumder, N., Prabhu, S., Satyamoorthy, K., & Murali, T. S. (2021). Photodynamic therapy to control microbial biofilms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 33, 102090. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102090>

- Wolska, K. I., Grudniak, A. M., Rudnicka, Z., & Markowska, K. (2016). Genetic control of bacterial biofilms. *Journal of Applied Genetics*, 57(2), 225–238. <https://doi.org/10.1007/s13353-015-0309-2>
- Wong, J. J., Ho, F. K., Choo, P. Y., Chong, K. K. L., Ho, C. M. B., Neelakandan, R., Keogh, D., Barkham, T., Chen, J., Liu, C. F., & Kline, K. A. (2022). *Escherichia coli* BarA-UvrY regulates the *pks* island and kills Staphylococci via the genotoxin colibactin during interspecies competition. *PLoS Pathogens*, 18(9), e1010766. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010766>
- Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., & Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65>
- Xu, W., Fang, Y., & Zhu, K. (2024). Enterococci facilitate polymicrobial infections. *Trends in Microbiology*, 32(2), 162177. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.07.010>
- Yang, S. M., Lee, D. W., Park, H. J., Kwak, M. H., Park, J. M., & Choi, M. G. (2019). Hydrogen Peroxide Enhances the Antibacterial Effect of Methylene Blue-based Photodynamic Therapy on Biofilm-forming Bacteria. *Photochemistry and photobiology*, 95(3), 833–838. <https://doi.org/10.1111/php.13056>
- Yang, Z., Hu, X., Zhou, L., He, Y., Zhang, X., Yang, J., Ju, Z., Liou, Y. C., Shen, H. M., Luo, G., Hamblin, M. R., He, W., & Yin, R. (2021). Photodynamic therapy accelerates skin wound healing through promoting re-epithelialization. *Burns & Trauma*, 9, tkab008. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkab008>
- Zada, L., Anwar, S., Imtiaz, S., Saleem, M., & Shah, A. A. (2024). In vitro study: methylene blue-based antibacterial photodynamic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 108(1), 169. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13009-5>
- Zafer, M. M., Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. M., Ghosh, S., Bornman, C., & Elfaky, M. A. (2024). Biofilm-mediated infections by multidrug-resistant microbes: a comprehensive exploration and forward perspectives. *Archives of Microbiology*, 206(3), 101. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03826-z>

Zangirolami, A. C., Yerra, K. R., Yakovlev, V. V., Blanco, K. C., & Bagnato, V. S. (2024). Combined Antibiotic and Photodynamic Therapies in *Pseudomonas aeruginosa*: From Synergy to Antagonism. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 13(12), 1111. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13121111>

Zhang, J., Zhao, Y., Zhao, X., Zhang, J., & Jing, L. (2024). Efficacy and safety of red and infrared light in the adjunctive treatment on diabetic foot ulcers: A systematic review and meta-analysis. *Complementary therapies in clinical practice*, 57, 101906. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2024.101906>

Zhao, G., Hochwalt, P. C., Usui, M. L., Underwood, R., Singh, P. K., James, G., et al. (2010). Delayed wound healing in diabetic (db/db) mice with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm challenge: A model for the study of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 18, 467–477. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00608.x>