



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Desarrollo de nuevas estrategias para tratamiento y seguimiento de infecciones bacterianas superficiales empleando terapias asistidas por luz

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

Roberto Sebastián Tomás

Directores de tesis: Dra. Adriana Gabriela Casas
Director Adjunto: Dr. Leandro Ariel Mamone
Consejera de Estudios: Dra. Mariana Piuri

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)
UBA-CONICET, Hospital de Clínicas General José de San Martín

Buenos Aires, 2025

Desarrollo de nuevas estrategias para tratamiento y seguimiento de infecciones bacterianas superficiales empleando terapias asistidas por luz.

RESUMEN

Las infecciones bacterianas por *Staphylococcus aureus* representan un desafío terapéutico debido a la creciente resistencia antibiótica. Este estudio evaluó terapias basadas en luz como alternativas de tratamiento mediante un enfoque que abarcó modelos *in vitro* de biopelículas e *in vivo* de abscesos cutáneos en ratones.

Se investigaron tres modalidades: Terapia Fotodinámica antimicrobiana (TFDA) con ácido 5-aminolevulínico (ALA) y hexil éster (H-ALA), Terapia Fototérmica (TFT) con radiación infrarroja cercana, y fotobiomodulación (FBM) con luz roja.

In vitro, la combinación TFT-TFDA mostró efecto sinérgico, reduciendo la viabilidad bacteriana 3-4 log para ALA y 4-6 log para H-ALA mediante incremento en la síntesis de porfirinas y desestabilización de la matriz extracelular.

En modelos murinos, TFDA con ALA redujo significativamente el tamaño de abscesos y la carga bacteriana. Las porfirinas derivadas de ALA se localizaron preferentemente en zonas infectadas, mientras H-ALA mostró mayor retención en la piel topicada. Contrariamente a los resultados *in vitro*, TFT no potenció el efecto de TFDA *in vivo*.

En heridas no infectadas, TFDA inhibió la cicatrización mientras la luz roja la aceleró.

Estos hallazgos sugieren que TFDA con ALA representa una alternativa prometedora para el tratamiento de infecciones, mientras la fotobiomodulación favorece la cicatrización de heridas.

Development of new strategies for the treatment and monitoring of superficial bacterial infections using light-assisted therapies

ABSTRACT

Superficial bacterial infections caused by *Staphylococcus aureus* represent a therapeutic challenge due to increasing antibiotic resistance. This study evaluated light-based therapies as treatment alternatives through an approach encompassing *in vitro* biofilm models and *in vivo* murine cutaneous infection models.

Three modalities were investigated: antimicrobial photodynamic therapy (APDT) with 5-aminolevulinic acid (ALA) and hexyl ester (H-ALA), photothermal therapy (PTT) with near-infrared radiation, and photobiomodulation (PBM) with red light.

In vitro, the PTT-APDT combination showed synergistic effects, reducing bacterial viability by 3-4 log for ALA and 4-6 log for H-ALA through increased porphyrin synthesis and destabilization of the extracellular matrix.

In murine models, APDT with ALA significantly reduced abscess size and bacterial load. ALA-derived porphyrins preferentially localized in infected areas, while H-ALA showed greater local retention in the skin. Contrary to *in vitro* results, PTT did not significantly enhance APDT's effect *in vivo*.

In non-infected wounds, APDT inhibited healing while red light accelerated it. These findings suggest that APDT with ALA represents a promising alternative for MRSA infections, while photobiomodulation promotes healing of non-infected wounds.

These findings suggest that APDT with ALA represents a promising alternative for *S. aureus* infections, while photobiomodulation may promote healing.

Palabras claves

Terapia Fotodinámica; Terapia Fototémica; fotobiomodulación; infecciones; ácido 5-aminolevulínico; teragnosis; fotodiagnóstico; *Staphylococcus aureus*

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer especialmente a la Dra. Adriana Casas por sus consejos, su dedicación y su guía en los primeros pasos de mi carrera científica. Agradezco, también, al Dr. Leandro Mamone por su orientación, así como su disponibilidad para la discusión de experimentos y resultados. Ambos me acompañaron y aconsejaron, haciéndome sentir respaldado de la mejor manera a lo largo de toda mi carrera de doctorado.

No quiero dejar de mencionar a la Dra. Gabriela Di Venosa y al Dr. Daniel Saenz, quienes siempre estuvieron a disposición para acompañarme y aconsejarme al igual que mis directores. Son cuatro excelentes investigadores y grandes personas que me enseñaron y formaron profesionalmente en estos seis años de carrera.

Quiero hacer una mención especial a Vanina Ripoll, a quien le agradezco toda la ayuda brindada y su predisposición a la hora de apoyarnos con el material de laboratorio.

No puedo dejar de mencionar a mis compañeros del CIPYP, cuyas pacientes explicaciones me iniciaron en el trabajo de laboratorio, que era totalmente desconocido para mí. Me divertí mucho realizando este trabajo; gracias por generar un ambiente tan ameno y familiar.

Agradezco también a mi pareja, la Dra. Natalia Marrochi, por su amor y su apoyo en los últimos años de mi carrera.

Por supuesto, agradezco también a mis padres, así como al resto de mi familia y amigos, por el apoyo incondicional brindado a lo largo de la carrera.

Agradezco también a todo el equipo profesional del CIPYP por darme el espacio para realizar mi tesis y a la UBA por brindarme la formación académica que hizo posible este trabajo.

Por último, quiero agradecer a CONICET por otorgarme la beca que permitió que me doctorara en tiempo y forma. Agradezco también a la Agencia por aportar los subsidios necesarios para llevar a cabo el trabajo experimental.

A mis hijos Ramsés y Mai para que sepan que los sueños se pueden alcanzar y que la única lucha que se pierde es la que se abandona.

Índice general

Abreviaturas	10
Introducción	12
1. Bacterias	13
1.1 Generalidades	13
1.2 Bacterias resistentes a antibióticos	14
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.1 Generalidades	15
2.2 Relevancia clínica de <i>S. aureus</i>	16
2.3 Biopelícula de <i>S. aureus</i>	16
2.4 Resistencia a antibióticos en <i>S. aureus</i>	17
2.5 Cepas de <i>S. aureus</i> empleadas en esta tesis	19
3. Estrategias terapéuticas actuales	19
3.1 Antibióticos de uso clínico frente a <i>S. aureus</i>	19
3.2 Metodología actual para abordar la curación de infecciones: curetaje, antibióticos, y técnicas más modernas	20
4. Fundamentos biológicos de la infección cutánea	21
4.1 La piel, sus partes, proceso de cicatrización y cura de infecciones	21
4.2 Cicatrización de heridas y pie diabético	25
4.3 Modelos de infección	26
4.4 Rol del sistema inmune en la infección: citoquinas	27
5. Terapia Fotodinámica	30
5.1 Fundamentos de la Terapia Fotodinámica antimicrobiana	30
5.1.1 Conceptos generales y antecedentes históricos	30
5.1.2 Mecanismos de acción fotofísicos y fotoquímicos de la TFD	31
5.1.3 Terapia Fotodinámica antimicrobiana	32
5.1.4 Fotosensibilizantes en TFDA	37
5.2 La ventana fototerapéutica y penetración tisular de la luz en TFDA	39
5.3 Especificidad celular y mecanismos de acción de los FS	39
5.4 Fuentes de luz para TFDA	42
5.5 Ácido 5-aminolevulínico y derivados para TFDA	44
5.5.1 Ácido 5-aminolevulínico como pro-fotosensibilizante para la TFDA	44
5.5.2 Derivados del ALA: Hexil-ALA	45
6. Detección y seguimiento de infecciones por fluorescencia a partir de ALA	46
7. Terapia Fototérmica mediante NIR	48
7.1 Conceptos generales	48

7.2 Modalidades de radiación continua y pulsada en la TFT	49
8. Fotobiomodulación	50
9. Conclusiones generales de terapias fotoasistidas por luz visible e infrarroja	52
9.1 Ventajas de las terapias fotoasistidas	52
9.2. Limitaciones y desafíos de las terapias fotoasistidas en el tratamiento de infecciones	53
 Hipótesis y Objetivos	 55
1. Hipótesis	56
2. Objetivo General	56
3. Objetivos específicos	56
 Materiales y métodos	 60
1.Reactivos	60
2. Ensayos <i>in vitro</i>	60
2.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivos	60
2.2 Cultivos planctónicos	60
2.3 Cultivos de biopelículas	61
2.4 Tratamientos mediados por luz de los cultivos	61
2.4.1 Fuentes de luz empleadas en TFDA	61
2.4.2 Fuente de luz empleada en TFT	63
2.4.2.1 Determinación de incremento de temperatura en PBS irradiado con láser de 980nm	63
2.5 Determinación de bacterias viables	64
2.6 Determinación de la estabilidad de ALA luego de TFT y calentamiento	64
2.7 Extracción y cuantificación de porfirinas	64
2.8 Análisis de porfirinas por microscopía confocal de fluorescencia	65
2.9 Procesamiento de imágenes de microscopio confocal de fluorescencia	65
2.9.1 Cuantificación de fluorescencia en imágenes de microscopía	66
2.10 Modelo de decontaminación de implantes empleando TFDA a partir de ALA	67
2.11 Análisis estadístico	67
3.Ensayos <i>in vivo</i>	68
3.1 Ratones CF-1	68
3.2 Procedimientos de anestesia	68
3.2.1 Anestesia por isofluorano	68
3.2.2 Anestesia por ketamina/xilacina	68
3.3 Modelo de absceso cutáneo	68
3.4 Seguimiento de infecciones por fluorescencia	69
3.4.1 Administración de ALA y H-ALA tópica y sistémica	69
3.4.2 Adquisición de imágenes de fluorescencia	70

3.4.2.1 Configuración de filtros y espectros de fluorescencia de estándares de porfirinas	71
3.4.3 Procesamiento de imágenes para estimación y cuantificación de la fluorescencia en ratones topcados con ALA y H-ALA	71
3.4.4 Imágenes de fluorescencia de porfirinas <i>in vivo</i>	71
3.4.5 Extracción, cuantificación y determinación del tipo de porfirinas sintetizadas a partir de ALA y H-ALA	72
3.4.6 Observación microscópica de la distribución de porfirinas sintetizadas a partir de ALA en muestras de abscesos	72
3.5 Tratamientos lumínicos en abscesos	72
3.5.1 Tratamiento con ALA-TFDA en abscesos	72
3.5.2 Terapia Fototérmica <i>in vivo</i>	73
3.5.3 Tratamientos combinados TFT con ALA-TFDA <i>in vivo</i>	73
3.6 Modelo de heridas no infectadas y tratamientos con TFDA y TFT	74
3.7 Evaluación del tratamiento por seguimiento del área de los abscesos y heridas no infectadas	74
3.8 Conteo de UFC en abscesos (carga bacteriana) y estudios histológicos	75
3.9 Cuantificación de citoquinas producidas en los abscesos tratados con ALA-TFDA y TFT	75
4. Análisis estadístico	76
Resultados	77
Capítulo I: Efecto de ALA-TFDA y TFT <i>in vitro</i> en <i>S. aureus</i>	78
I.1 Puesta a punto de condiciones para TFT y TFDA <i>in vitro</i>	79
I.2 Tratamiento combinado de TFTc y ALA-TFDA en biopelículas de <i>S. aureus</i> RN6390	83
I.3 Ensayos realizados sobre biopelículas ST5-SCCmecI	88
I.4 Combinación de TFTc y H-ALA-TFDA	90
I.5 Ensayos de ALA-TFDA y TFT en placas de titanio	91
I.6 Localización de porfirinas en las biopelículas por microscopía confocal de fluorescencia	92
I.7 Discusión	97
Capítulo II: Desarrollo de los modelos de abscesos y heridas no infectadas	102
II.1 Modelo de absceso cutáneo	103
II.2 Modelo de infiltrado inflamatorio estéril	104
II.3 Modelo de herida no infectada por raspado con bisturí	105
II.4 Modelo de heridas no infectadas por punch para biopsia	107
II.5 Discusión	108

Capítulo III: Fotodiagnóstico y localización de porfirinas derivadas de ALA en infecciones por *S. aureus*

	111
III. 1 Optimización de sistemas de detección de fluorescencia	111
III.1.1 Caracterización de filtros ópticos	112
III.1.2 Evaluación comparativa de filtros para la visualización de porfirinas <i>in vivo</i>	113
III.2 Caracterización de la fluorescencia en tejidos infectados	114
III.2.1 Distribución de porfirinas en abscesos subcutáneos	114
III.2.2 Localización microscópica de porfirinas en tejidos infectados	115
III.3 Cinética de acumulación de porfirinas en tejidos infectados	116
III.3.1 Comparación entre la síntesis de porfirinas a partir de ALA y H-ALA en abscesos	117
III.4 Caracterización espectroscópica de las porfirinas sintetizadas en los abscesos	119
III.5 Migración de porfirinas entre tejidos	120
III.6 Detección y migración de porfirinas en abscesos estériles	122
III.7 Optimización del sistema IVIS para detección de porfirinas	123
III.8 Discusión	127

Capítulo IV: Estudios *in vivo*: ALA-TFDA, luz sola y TFT sobre abscesos cutáneos

	131
IV.1 ALA-TFDA sobre abscesos cutáneos empleando diferentes dosis lumínicas	131
IV.2 Procesos biológicos involucrados en la resolución de abscesos mediada por ALA-TFDA y luz sola	138
IV.2.1 Evaluación de la viabilidad bacteriana luego de ALA-TFDA	138
IV.2.2 Análisis histológicos de infecciones tratadas con ALA-TFDA y luz sola	139
IV.2.3 Efecto de la ALA-TFDA sobre el sistema inmune: cuantificación de citoquinas	141
IV.2.4 Análisis y balance de resultados obtenidos con ALA-TFDA y luz	143
IV.3 Tratamiento de TFT en abscesos	144
IV.3.1 Puesta a punto de parámetros de TFT empleados y determinación de temperatura sobre la piel de ratón	144
IV.3.2 Efecto de la TFT sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA en los abscesos	146
IV.3.3 Tratamiento de abscesos con TFT	147
IV.4 Combinación de TFT y TFDA en el tratamiento de abscesos cutáneos de <i>S. aureus</i>	149

IV.4.1 Progresión del área de las heridas producidas por abscesos de <i>S. aureus</i> , tratadas con combinación de TFT y TFDA	149
IV.4.2 Determinación de citoquinas luego de tratamiento de los abscesos con TFTc y TFTp en combinación con ALA-TFDA	150
IV.4.3 Análisis de resultados de TFT y combinación con ALA-TFDA	151
IV.5 Discusión	153
Capítulo V: ALA-TFDA y TFT sobre heridas no infectadas	160
V.1 Acción de la ALA-TFDA y la TFT sobre heridas no infectadas generadas por raspado con bisturí	160
V.1.1 Efectos de la ALA-TFDA sobre heridas no infectadas generadas por raspado con bisturí	161
V.1.2 Efectos de la TFTc sobre heridas no infectadas generadas por raspado con bisturí	162
V.1.3 Análisis de efectos de la ALA-TFDA y TFTc sobre heridas no infectadas generadas por raspado con bisturí	166
V.2 Efectos de la ALA-TFDA sobre heridas no infectadas generadas por incisión con punch para biopsia	167
V.2.1 Análisis de resultados de los efectos de la ALA-TFDA sobre heridas no infectadas, generadas por incisión con punch para biopsia	170
V.3 Discusión	171
Capítulo VI: Efecto de la luz roja sobre las heridas no infectadas (fotobiomodulación)	174
VI.1 FBM con luz roja sobre heridas no infectadas realizadas con bisturí	174
VI.2 FBM con luz roja sobre heridas no infectadas realizadas con punch de biopsia	178
VI.3 Resumen y análisis de resultados	179
VI.4 Discusión	179
Discusión	183
Conclusiones Generales	190
Apéndice	195
Bibliografía	201
Abreviaturas	

ALA: Ácido 5-aminolevulínico
ALAD: Ácido-aminolevulínico deshidratasa
ATP: Adenosín trifosfato
BAP: Proteínas asociadas a biopelícula
CpIII: Coproporfirina III
CSLM: Microscopía confocal de barrido láser
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FBM: Fotobiomodulación
H-ALA: Hexil éster del ácido 5-aminolevulínico
IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina 1
IL-1 β : Interleuquina 1 beta
IL-6: Interleucina 6
IL-10: Interleuquina 10
IVIS: Sistema de imagen *in vivo* (In Vivo Imaging System)
FS: Fotosensibilizante, fotosensibilizantes
M-ALA: Metil éster del ácido 5-aminolevulínico
MIC: Concentración mínima inhibitoria
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina
NIR: Radiación infrarroja cercana (Near-infrared radiation)
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos
PBP: Proteína fijadora de penicilina
PBGD: Porfobilinógeno deaminasa
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PNAG: Polisacárido poli-N-acetil β -1,6 glucosamina
PpIX: Protoporfirina IX
PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones
PVL: Panton-Valentine
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SCCmec: Casete cromosómico estafilocócico mec
SVC: Variantes de colonia pequeña (small colony variants)
TAPP: 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina
TFD: Terapia Fotodinámica
TFDA: Terapia Fotodinámica antimicrobiana
TFT: Terapia Fototérmica
TFTc: Terapia Fototérmica en modo continuo
TFTp: Terapia Fototérmica en modo pulsado
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TSA: Agar tripteína de soja

TSB: Caldo tripteína de soja

UFCs: Unidades formadoras de colonias

UV: Ultravioleta

Introducción

1. Bacterias

1.1 Generalidades

Las bacterias son microorganismos procariotas, y pueden dividirse en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas. Esta clasificación se basa en su reacción a la coloración de Gram, la cual refleja diferencias estructurales entre ambos tipos (Figura 1). Las bacterias Gram positivas poseen una gruesa pared celular compuesta principalmente por peptidoglicanos, situada externamente a la membrana citoplasmática. Esta pared cumple una función esencial al prevenir la lisis osmótica de la célula. En contraste, las bacterias Gram negativas presentan una estructura más compleja, con dos membranas celulares (interna y externa) y un espacio periplásmico intermedio que alberga una pared celular más delgada que la de las Gram positivas.

Las bacterias presentan una gran versatilidad en sus formas de vida. En particular, si bien pueden existir como células planctónicas, de vida libre y dispersas, su forma predominante y ecológicamente más relevante en la naturaleza, es formando biopelículas. Una biopelícula se define como una comunidad estructurada de microorganismos, embebida en una matriz extracelular autoproducida de sustancias poliméricas, que normalmente se encuentra adherida a una superficie biótica o abiótica (Costerton et al., 1999; Nazar, 2007).

La capacidad de formar biopelículas confiere a las bacterias ventajas adaptativas cruciales, como una mayor protección contra factores de estrés ambientales (deshidratación, pH extremo, agentes tóxicos), incremento en la resistencia a la respuesta inmune del hospedador y, notablemente, una tolerancia drásticamente incrementada a los agentes antimicrobianos, que puede ser hasta 1000 veces superior en comparación con sus contrapartes planctónicas. La formación de biopelículas favorece la persistencia y diseminación de infecciones, facilitando la colonización de nuevos tejidos (Davis, 2003; Costerton et al., 1999).

Las infecciones asociadas a biopelículas representan un desafío significativo para la salud pública, ya que constituyen aproximadamente el 80% de todas las infecciones bacterianas en humanos (Percival et al., 2012; Salisbury et al., 2018; Davies, 2003).

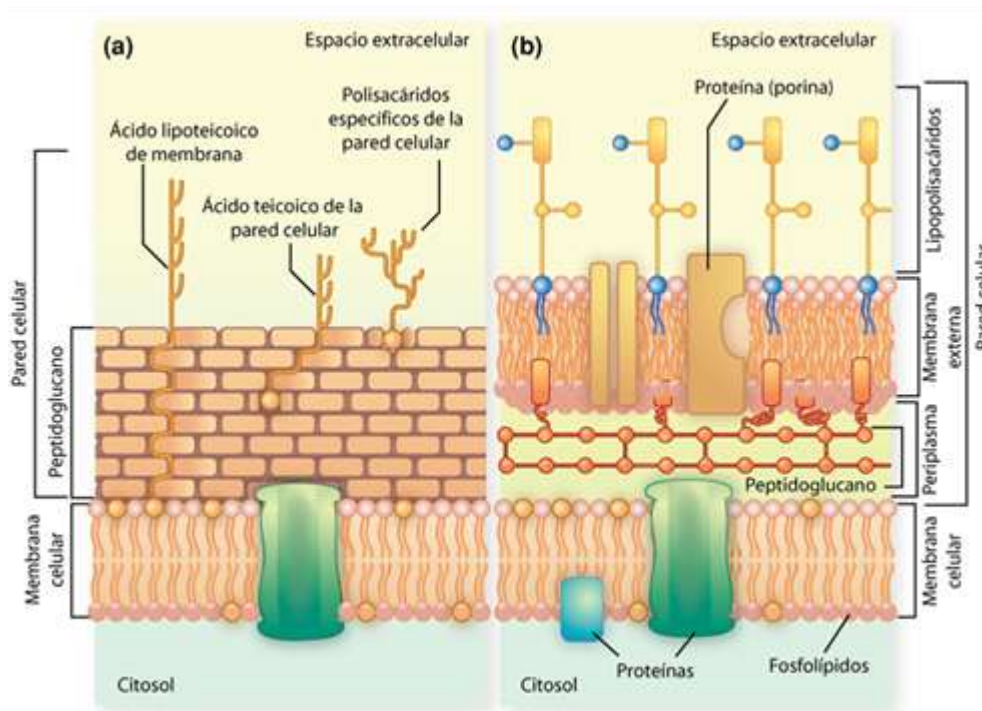


Figura 1: Diferencias estructurales y bioquímicas de las envolturas bacterianas. A) Gram positivas. B) Gram negativas. Adaptado de Karp et al., 2015.

1.2 Bacterias resistentes a antibióticos

Actualmente, la creciente resistencia de las bacterias a los antibióticos es uno de los desafíos clínicos más importantes a nivel mundial. El término "ESKAPE" surge a partir de la inicial de las siguientes especies bacterianas: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y cepas de *Enterobacter*, las cuales son consideradas las “super bacterias” del siglo XXI. Diversas cepas de las especies microbianas pertenecientes al grupo ESKAPE pueden “escapar”, en mayor o menor grado, al efecto de los antibióticos que se emplean normalmente en la clínica para controlar infecciones (Kurosu et al., 2022; Maisch, 2015).

Recientemente, la OMS ha reportado alerta sobre 12 especies de bacterias, frente a las cuales se requiere con urgencia el desarrollo de nuevos compuestos antibióticos. En este informe, se describen tres categorías de patógenos: de prioridad crítica, alta y media, según la urgencia y necesidad de nuevos antibióticos (Tabla 1). Sin embargo, la cantidad total de antibióticos efectivos contra estos patógenos continúa disminuyendo, lo que nos conduce a un futuro en el que los antibióticos ya no serán herramientas eficaces en el tratamiento de infecciones bacterianas (WHO, 2024; Kashef et al., 2017).

Tabla 1: Lista de patógenos priorizados por la OMS

CATEGORÍA DE PRIORIDAD DE PATÓGENOS	
Prioridad 1: Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacteriaceae</i> , todos resistentes a carbapenémicos.
Prioridad 2: Alta	<i>Enterococcus faecium</i> , resistente a vancomicina. <i>Staphylococcus aureus</i> , resistente a la meticilina con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina. <i>Helicobacter pylori</i> , resistente a la claritromicina. <i>Campylobacter spp.</i> , resistente a las fluoroquinolonas. <i>Salmonellae</i> , resistente a las fluoroquinolonas. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a las cefalosporinas y a las fluoroquinolonas.
Prioridad 3: Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , sin sensibilidad a penicilina. <i>Haemophilus influenzae</i> , resistente a la ampicilina. <i>Shigella spp.</i> , resistente a las fluoroquinolonas.

La resistencia de ciertos microorganismos a los antibióticos de uso común es una preocupación importante en las infecciones nosocomiales, ya que dificulta el tratamiento de las mismas y puede llevar a mayores tasas de morbi/mortalidad a los pacientes afectados.

2. *Staphylococcus aureus*

2.1 Generalidades

S. aureus es una bacteria Gram positiva, miembro de la familia Micrococcaceae dentro del phylum Firmicutes. Sus células son esféricas (0.5-1.5 µm de diámetro) y se agrupan en racimos irregulares. Es un microorganismo anaerobio facultativo, que forma colonias lisas, elevadas, y de color dorado. Suele producir una microcápsula de naturaleza polisacárida. Es una bacteria sésil, que no forma esporas. El color amarillo distintivo de sus colonias (y por el cual recibe su nombre la especie: aureus, dorado en latín), es atribuido a la presencia del pigmento carotenoide, estafiloxantina (Lowy, 1998).

S. aureus forma parte de la microbiota humana (especialmente en piel y mucosas), comportándose comúnmente como comensal. Este microorganismo vive en armonía con el huésped sin causar ninguna patología, sin embargo, si las barreras dérmicas y/o mucosas contenedoras de *S. aureus* se rompen, puede causar una amplia gama de infecciones si encuentra condiciones favorables para proliferar (Lowy, 1998).

2.2 Relevancia clínica de *S. aureus*

Además de causar infecciones en la piel y tejidos blandos, *S. aureus* tiene la capacidad de generar infecciones graves, tanto agudas como crónicas, en pacientes hospitalizados y en la comunidad en general, debido a su alto potencial invasivo (Waldvogel, 2000). Las infecciones causadas por este microorganismo tienden a ser recurrentes o persistentes, incluso en presencia de anticuerpos específicos y tratamientos antimicrobianos a los que la bacteria es inicialmente susceptible (de Jong et al., 2019).

Las infecciones bacterianas intrahospitalarias, conocidas como infecciones nosocomiales, son un problema de gran importancia en los entornos de atención médica a nivel mundial, y representan uno de los principales problemas sanitarios para la humanidad, según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2021).

S. aureus es considerado el principal agente etiológico de las infecciones de tejidos blandos adquiridas en la comunidad y es la causa más común de bacteriemias nosocomiales en muchos países de América Latina y el Caribe, incluyendo a Argentina (PAHO 2020; Di Gregorio et al., 2023).

En nuestro país, aproximadamente el 20% de los pacientes que se someten a cirugía contraen al menos una infección nosocomial por *S. aureus*, lo que incrementa la morbilidad, la mortalidad, la duración de la estancia hospitalaria y los costos asociados al tratamiento. Este patógeno también causa otras infecciones de relevancia clínica, como celulitis, endocarditis, osteomielitis y síndrome de shock tóxico. Las principales fuentes de infección son las personas infectadas y los portadores asintomáticos (Sakr et al., 2018).

Dado que el ser humano es el principal reservorio de este microorganismo oportunista (principalmente cavidades nasales y piel), juega un papel central en su transmisión. En particular, los trabajadores de la salud, al ser en su mayoría portadores nasales asintomáticos, representan una de las vías más comunes de diseminación de cepas de *S. aureus* hacia la comunidad (en particular resistentes a antibióticos) (Gustavo et al., 2023).

2.3 Biopelícula de *S. aureus*

La bacteria *S. aureus* es una bacteria especialmente formadora de biopelículas, una característica que le confiere una gran capacidad de causar infecciones recalcitrantes, al favorecer su capacidad patogénica y el desarrollo de resistencias a tratamientos antimicrobianos. Sus biopelículas están compuestas generalmente por una matriz

extracelular de polisacáridos, proteínas y ADN extracelular, que le proporcionan un entorno protector. Esta matriz, además, les otorga a los microorganismos una mayor adhesión a las superficies y mayor cohesión entre sí (Arciola et al., 2018).

La formación de la biopelícula en *S. aureus* se produce de forma similar a la de la mayoría de los microorganismos. Comienza con dos fases claves: i) inicialmente, las células se adhieren a la superficie, gracias a adhesinas (proteínas de adhesión) presentes en la pared celular; ii) posteriormente, las células se multiplican y crean una estructura madura de múltiples capas conectadas por polisacáridos extracelulares. Durante la maduración, se forma una capa de *slime* que protege a las bacterias.

El crecimiento bacteriano dentro de la matriz está limitado por el acceso a nutrientes, además de otros factores como el pH, oxígeno, fuentes de carbono y osmolaridad. Cuando la biopelícula alcanza la madurez en su desarrollo, entra en un equilibrio dinámico, donde las capas externas pueden romperse y liberar bacterias, que se dispersan para colonizar nuevas superficies (Costerton et al., 1999; Cecilia et al., 2013).

A diferencia de otras bacterias, *S. aureus* puede formar biopelículas tanto en superficies bióticas (tejidos humanos, implantes médicos) como abióticas (catéteres, prótesis), utilizando una gran variedad de moléculas de adhesión. Además, sus biopelículas se caracterizan por una notable heterogeneidad fenotípica, albergando subpoblaciones de células persistentes y variantes de colonias pequeñas, que son metabólicamente inactivas y, por ende, altamente tolerantes a los antibióticos y a la respuesta inmune del hospedador (Arciola et al., 2018; Guo et al., 2022).

2.4 Resistencia a antibióticos en *S. aureus*

S. aureus ha desarrollado y adquirido la capacidad para evadir la acción de múltiples antimicrobianos, lo que convierte a infecciones comunes en infecciones de difícil manejo y alto riesgo. La aparición de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina y antibióticos β -lactámicos en general (MRSA), se dio inicialmente en entornos hospitalarios y luego, estas cepas se expandieron a la comunidad, donde causan infecciones graves en individuos sin exposición previa a centros de salud. La resistencia no se limita a un único grupo de fármacos, dado que muchas cepas exhiben multirresistencia, y desafían las opciones terapéuticas disponibles en la actualidad (Chambers & Deleo, 2009; WHO, 2021; PAHO, 2021).

Los principales mecanismos que explican la resistencia de *S. aureus* a agentes β -lactámicos son:

1) Hiperproducción de β -lactamasa. Estas enzimas extracelulares son capaces de hidrolizar el enlace betalactámico, inactivando el efecto de los antibióticos β -lactámicos por degradación.

2) Presencia de proteínas PBPs (penicillin binding protein) modificadas. Las PBPs son enzimas que catalizan la formación de enlaces cruzados entre los polisacáridos del peptidoglicano, el principal componente de la pared celular bacteriana. Los antibióticos β -lactámicos tienen la capacidad de unirse a estas enzimas impidiendo su función, y por lo tanto inhibiendo la síntesis de pared celular. La presencia de genes que codifican a PBPs mutantes, con la capacidad de catalizar correctamente la síntesis de pared, pero que no se unen a β -lactámicos, confiere resistencia a los microorganismos.

Aunque, se destaca que existen otros mecanismos (que pueden coexistir con los anteriores) que contribuyen a la multiresistencia, como: sistemas de transporte activo (bombas de eflujo) que expulsan el antibiótico fuera de la célula bacteriana; blancos de antibióticos modificados (topoisomerasas o ribosomas, por ejemplo); u otras enzimas con la capacidad de degradar compuestos antibióticos (Pahissa, 2009; García et al., 2019; Murray, 2006; Gonzales et al., 2005; Cervantes-Garcia et al., 2014).

El segundo mecanismo enumerado, la síntesis de PBPs modificadas, representa el mecanismo de resistencia a β -lactámicos más importante y epidemiológicamente relevante (Lade & Kim 2023). La resistencia bacteriana en este caso, se debe a la presencia del gen *mecA*, que codifica para la proteína de unión a penicilina 2A (PBP2A), que tiene una baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos, lo que permite que la bacteria pueda sintetizar pared celular, aun en presencia de este tipo de antibióticos. El gen *mecA* se encuentra en el casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), un elemento genético móvil que se propaga entre diferentes cepas de *S. aureus*. Existen 6 tipos de SCC*mec* numerados del I al VI que difieren en tamaño y composición y dan características de resistencia diferentes a las cepas MRSA (Lakhundi & Zhang, 2018; Liu et al., 2016; García et al., 2019; Robert et al., 2023).

El uso intensivo de antibióticos, como las cefalosporinas, contribuyó a la propagación de cepas MRSA (Weber et al., 2003). Como se mencionó anteriormente, el principal mecanismo de transmisión de la resistencia a meticilina en *S. aureus* es el intercambio horizontal de genes (sobre todo el casete cromosomal *mec*) mediado por elementos genéticos de tipo móviles como plásmidos, transposones y secuencias de inserción (Liu et al., 2016a y Liu et al., 2016b).

Las infecciones con cepas MRSA, se asocian con mayores tasas de morbilidad y mortalidad. A nivel mundial, mueren al menos 700,000 personas cada año debido a

enfermedades provocadas por estos microorganismos multirresistentes, lo que representa una crisis de salud pública que impulsa el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Bellis., et al 2024; WHO, 2021; PAHO, 2021).

2.5 Cepas de *S. aureus* empleadas en esta tesis

En nuestro trabajo experimental, se han utilizado dos cepas representativas de *S. aureus*:

1) La cepa RN6390, es una de las cepas más utilizadas en investigación básica por su amplia circulación y exhaustiva caracterización genética. Esta cepa MSSA, ha sido fundamental para el entendimiento de los mecanismos moleculares de virulencia (Novick & Geisinger, 2008). Su uso permite evaluar la respuesta a terapias en el contexto de una infección *in vivo*, proporcionando una base de comparación para tratamientos llevados a cabo en otros sistemas experimentales.

La inclusión de cepas MRSA en estudios experimentales resulta importante para evaluar la eficacia de nuevas estrategias terapéuticas (David & Daum, 2010; Otto, 2013). Por lo tanto, empleamos una cepa representativa de las MRSA:

2) La cepa MRSA: ST5-SCCmecI, comúnmente denominada “clon chileno-cordobés”, la cual posee el gen *mecA*, el cual le confiere resistencia a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, incluidas las penicilinas semisintéticas como la meticilina.

El clon chileno-cordobés es principalmente una cepa asociada a infecciones hospitalarias en Argentina, Brasil, Uruguay y Chile (Medina et al., 2013, Di Gregorio et al., 2023). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la epidemiología de esta cepa, al igual que la tendencia general de las otras MRSA, se ha modificado. Si bien el clon chileno-cordobés es un ejemplo clásico de cepa asociada a infecciones hospitalarias, en los últimos años se ha observado su diseminación a la comunidad (Sola et al., 2002; Martinez et al., 2019; Martinez et al., 2023; Egea et al., 2014)

3. Estrategias terapéuticas actuales

3.1 Antibióticos de uso clínico frente a *S. aureus*

Entre las opciones de mayor eficacia y menor riesgo para tratar infecciones de MSSA, se encuentran antibióticos β -lactámicos como Oxacilina y Cloxacilina, o las cefalosporinas Cefazolina y Cefalexina. En particular, los tratamientos con Clindamicina,

Trimetoprima/sulfametoxazol, y Doxiciclina/Minociclina, son empleados especialmente para infecciones de piel y tejidos blandos (Ryvak et al., 2020).

En cuanto al tratamiento de cepas MRSA, la vancomicina ha sido durante décadas el tratamiento de elección, aunque su eficacia ha disminuido con el surgimiento de cepas con sensibilidad reducida, o inclusive, resistencia completa (Hassoun et al., 2022). Adicionalmente, su baja penetración en tejidos, especialmente en biopelículas bacterianas, y su potencial nefrotoxicidad limitan su utilidad en determinados escenarios clínicos (Holmes et al., 2013).

Los antibióticos alternativos como linezolid, daptomicina y ceftarolina presentan sus propias limitaciones. El linezolid, aunque eficaz en infecciones de piel y tejidos blandos, está asociado a mielosupresión y neuropatía con uso prolongado (Alghamdi et al., 2022). La daptomicina no puede utilizarse en infecciones pulmonares debido a su inactivación por el surfactante pulmonar, y se han reportado cepas con sensibilidad reducida tras tratamientos prolongados (Fowler et al., 2006). Por su parte, las nuevas cefalosporinas con actividad anti-MRSA como ceftarolina también enfrentan la emergencia de resistencias, aunque a menor ritmo que los antibióticos convencionales (De Oliveira et al., 2020).

El arsenal terapéutico se ha ampliado con lipoglucopéptidos de acción prolongada (dalbavancina, oritavancina), pero su elevado costo y experiencia clínica limitada restringen su uso generalizado. Además, las opciones terapéuticas para infecciones complicadas, especialmente aquellas asociadas a biopelículas o focos de difícil acceso para los antibióticos convencionales, siguen siendo subóptimas (Khatib et al., 2022).

3.2 Metodología actual para abordar la curación de infecciones: curetaje, antibióticos, y técnicas más modernas

Los principios terapéuticos fundamentales en el manejo de heridas infectadas incluyen desbridamiento quirúrgico o enzimático del tejido necrótico, y control de la carga microbiana mediante antimicrobianos tópicos o sistémicos (Norman et al., 2016). El desbridamiento elimina tejido infectado que sirve como nicho para la proliferación microbiana y reduce significativamente la carga bacteriana, especialmente en presencia de biopelículas (Schultz et al., 2003; Wolcott et al., 2010).

Los agentes antimicrobianos tópicos más ampliamente utilizados incluyen iodóforos (povidona yodada), clorhexidina, plata iónica o nanocrystalina, polihexametileno biguanida, y soluciones superoxidadas, cada uno con espectro antimicrobiano,

mecanismos de acción y toxicidad característicos, (Schultz et al., 2017; Wolcott et al., 2016). La terapia antimicrobiana sistémica está indicada en presencia de infección invasiva con celulitis perilesional, linfangitis, bacteriemia o sepsis, seleccionándose el antibiótico en función del antibiograma o la epidemiología local (Norman et al., 2016).

Otras estrategias terapéuticas avanzadas, para heridas complejas, que han sido validadas en modelos murinos incluyen productos de ingeniería tisular como: sustitutos dérmicos y epidérmicos, aplicación de factores de crecimiento recombinantes, terapias celulares con células madre mesenquimales, y plasma rico en plaquetas. Estos tratamientos tienen costos más elevados que los tratamientos convencionales y son un ejemplo de los costos asociados al tratamiento de heridas complejas, que podrían evitarse mediante un tratamiento efectivo frente a microorganismos resistentes y formadores de biopelículas (Eming et al., 2014; Larouche et al., 2018).

4. Infecciones cutáneas

4.1 La piel, sus partes, proceso de cicatrización y tratamiento de infecciones

La piel constituye el órgano más extenso del cuerpo, representando aproximadamente el 16% del peso corporal total en humanos y entre 12-15% en ratones (Wong et al., 2016; Pasparakis et al., 2014). La estructura cutánea en ambas especies está organizada en tres capas principales diferenciadas: epidermis, dermis y capa subepidérmica, cada una con características histológicas y funcionales específicas, aunque con diferencias que deben considerarse al establecer modelos translacionales (Gudjonsson et al., 2007).

La epidermis murina, considerablemente más delgada que la humana (Figura 2), constituye un epitelio estratificado queratinizado compuesto principalmente por queratinocitos organizados en cuatro estratos (basal, espinoso, granuloso y córneo). La densidad folicular es notablemente mayor en el ratón con ciclos de crecimiento piloso sincronizados, a diferencia del patrón asincrónico humano, característica relevante al evaluar la cicatrización en modelos experimentales (Driskell & Watt, 2015).

La dermis, situada inmediatamente debajo, consiste en un tejido conectivo denso e irregular, rico en colágeno y elastina (producidos por fibroblastos dérmicos). Es más delgada y menos compleja en el ratón que en humanos. En esta capa se encuentran los anexos cutáneos (folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas).

La capa subepidérmica o tejido subcutáneo funciona como soporte mecánico y fuente de reservas energéticas, compuesta fundamentalmente por adipocitos organizados en lóbulos separados por tabiques de tejido conectivo, con rica vascularización e inervación, aunque

la proporción de tejido adiposo subcutáneo respecto al total corporal es menor en el ratón comparado con humanos (Pasparakis et al., 2014).

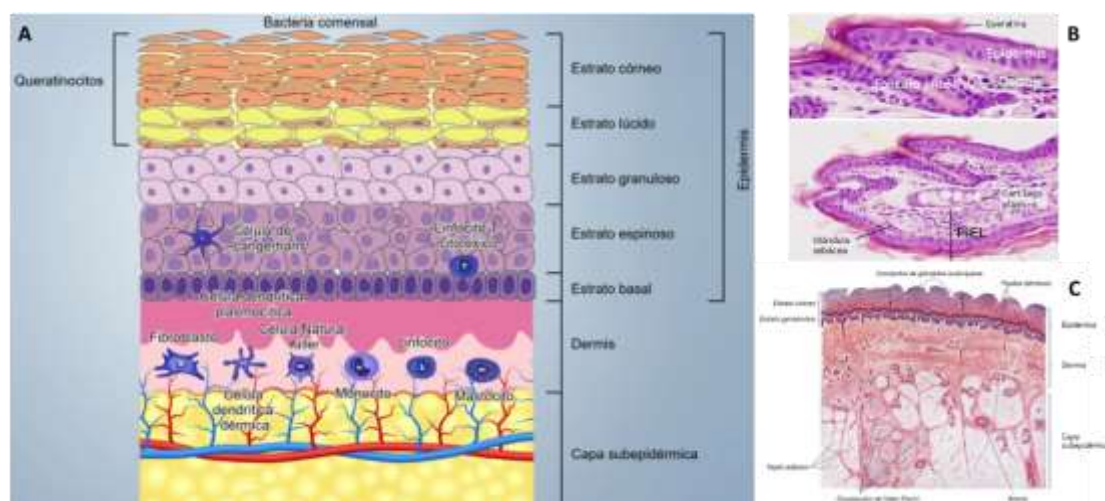


Figura 2: Anatomía de la piel de ratón y humano

A) Esquema general detallado de la piel de mamíferos mostrando las diferentes capas de la epidermis, la dermis y la capa subepidérmica, con los diversos tipos celulares presentes. Adaptado de Martelli et al., 2017. B) Cortes histológicos de piel de ratón teñidos con hematoxilina-eosina mostrando la epidermis, dermis y estructuras anexas. Adaptado de Megías et al., 2023 C) Corte histológico de piel humana con las tres capas principales estructuras características. Adaptado de Balderas Cordero., 2020.

Cuando la integridad de la piel se ve comprometida por lesiones traumáticas, quirúrgicas o patológicas, se activa un complejo proceso de cicatrización altamente coordinado que tradicionalmente se describe en cuatro fases que pueden superponerse en el tiempo: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (Figura 3). El proceso en ratones y humanos sigue patrones homólogos, pero de duraciones diferentes (Eming et al., 2017).

La fase de hemostasia se inicia inmediatamente tras la lesión en ambas especies, con la formación de un coágulo de fibrina mediante la activación plaquetaria y la cascada de coagulación, liberándose al medio factores de crecimiento (Gurtner et al., 2008; Dunn et al., 2013).

La fase inflamatoria es más breve y menos intensa en el ratón, donde puede resolverse en 2-3 días, comparado con los 5-7 días en heridas humanas no complicadas. Esta fase se caracteriza en ambas especies por la infiltración secuencial de neutrófilos y macrófagos que eliminan microorganismos, detritos celulares y tejido necrótico mediante fagocitosis y liberación de proteasas, ROS y citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α . (Chen et al., 2015; Eming et al., 2017).

La fase proliferativa en el ratón comienza aproximadamente luego de 1-2 días post-lesión (vs. 3-5 días en humanos) y se extiende hasta el día 7-10, comprendiendo tres procesos fundamentales: formación de tejido de granulación, reepitelización y neovascularización. Una diferencia crucial en el modelo murino es el mecanismo predominante de cierre de heridas, que ocurre principalmente por contracción (lo que significa que el tejido circundante se contrae para reducir el tamaño de la herida y luego se repara con tejido de granulación y epitelización) debido a la presencia del músculo panículo carnoso (ausente en humanos), mientras que en humanos se produce directamente la granulación y reepitelización (Zomer & Trentin, 2018).

La finalización de esta fase proliferativa se marca por un evento clave: la caída de la costra. Este momento es importante en la cicatrización ya que indica que la reepitelización se completó, es decir, que una nueva capa de piel ha cubierto totalmente la herida y desplazado la costra. Como resultado, la herida ya no requiere protección externa, ya que está cubierta por tejido epitelial nuevo, señalando así el inicio de la fase de remodelación del proceso de cicatrización.

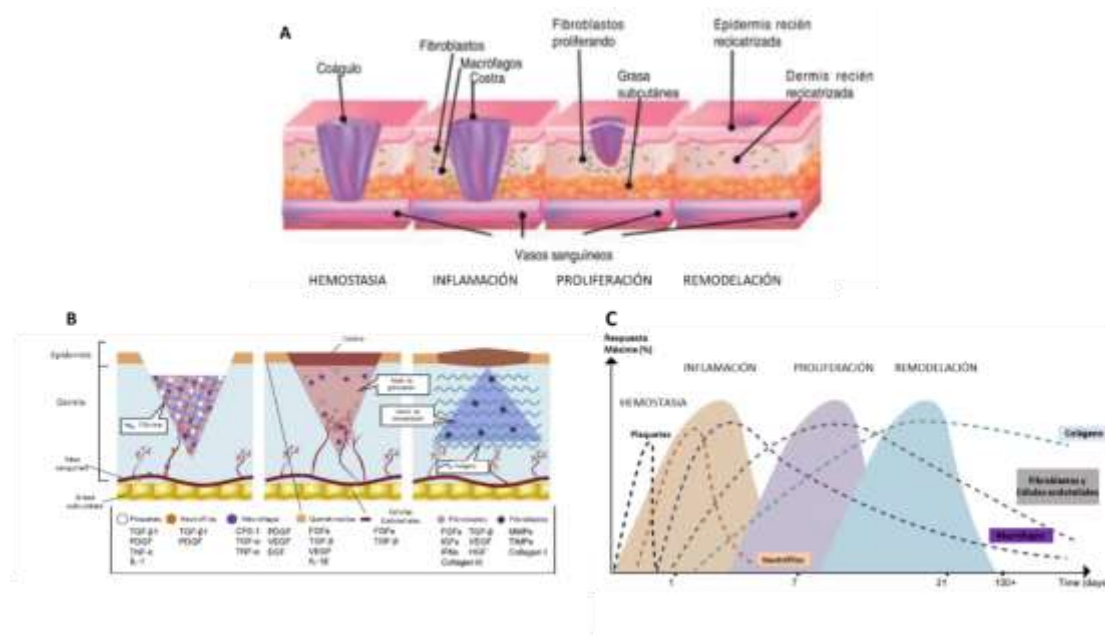


Figura 3: Fases del proceso de cicatrización de heridas:

Proceso de cicatrización cutánea: fases, componentes celulares y respuesta temporal. A) Representación esquemática de una herida cutánea durante las diferentes fases de cicatrización, mostrando los principales tipos celulares involucrados: fibroblastos, macrófagos, costra hemostática, y la reorganización tisular. Las fases se indican temporalmente como hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. Adaptado de Dominguez Saavedra & Hernandez Galvan, 2021. B) Detalle de los eventos moleculares y celulares durante las fases de cicatrización, incluyendo la expresión de factores de crecimiento principales y la participación de diferentes poblaciones celulares. (C) Cinética de la cicatrización, mostrando los cambios temporales en

diferentes componentes (colágeno, fibroblastos, células endoteliales, neutrófilos), evidenciando las fases superpuestas del proceso reparativo. Adaptado de Zomer & Trentin, 2018.

Paralelamente, los queratinocitos del borde de la herida pierden sus anclajes hemidesmosómicos, desprendiéndose así de la membrana basal (capa de tejido conectivo inmediatamente por debajo del epitelio), y adquiriendo movilidad (mediada por reorganización del citoesqueleto), lo que les permite migrar sobre la matriz provisional, que finalmente será reemplazada por tejido de granulación. Este proceso está facilitado por la expresión de integrinas y metaloproteinasas de matriz. La caída de la costra marca el final de la fase proliferativa y el inicio de la fase de remodelación del proceso de cicatrización. Este evento indica que la reepitelización se completó, es decir, que una nueva capa de piel ha cubierto totalmente la herida y desplazado la costra. Como resultado, la herida ya no requiere protección externa, ya que está cubierta por tejido epitelial nuevo.

La fase final de remodelación puede completarse en 2-3 semanas en ratón, en contraste con los 6-24 meses en humanos. En esta fase se produce la reorganización y maduración del tejido cicatricial, aumentando su resistencia y funcionalidad. Los procesos clave incluyen la producción y remodelación de colágeno, la estabilización de la vascularidad y la apoptosis de las células innecesarias en el tejido nuevo (Xue & Jackson, 2015; Chen et al., 2015).

La presencia de microorganismos en las heridas representa un continuo que abarca desde la contaminación transitoria hasta la infección invasiva. La inmunidad innata representa la primera línea defensiva en ambas especies, constituida por barreras físicas (estrato córneo, uniones estrechas entre queratinocitos, etc.), péptidos antimicrobianos, el sistema del complemento y células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos.

Los queratinocitos en ambas especies expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que inician cascadas de señalización que culminan en la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y péptidos antimicrobianos, aunque con diferencias en la distribución, densidad y especificidad de estos receptores entre ratones y humanos (Nestle et al., 2009).

Las heridas crónicas típicamente presentan una microbiota polimicrobiana compleja, donde coexisten bacterias aerobias y anaerobias en comunidades microbianas estructuradas o biopelículas, confiriendo mayor resistencia a antimicrobianos y al sistema inmune del huésped (Wolcott et al., 2016). Entre los patógenos más frecuentemente aislados en heridas infectadas en humanos destacan: *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Streptococcus pyogenes, *Escherichia coli* y especies anaerobias como *Bacteroides fragilis* y *Peptostreptococcus spp.*

4.2 Cicatrización de heridas y pie diabético

Una herida o lesión cutánea ocurre cuando la integridad física de los tejidos de la piel es alterada por algún estímulo que proviene del exterior o del interior, y puede provocar la entrada de microorganismos al sitio y provocar infección. Las heridas pueden clasificarse según su tiempo de evolución en agudas o crónicas. Las heridas agudas son aquellas que siguen un proceso de reparación ordenado, restaurando la integridad anatómica y funcional en un período predecible, generalmente entre 2 y 4 semanas. A diferencia de las agudas, se consideran heridas crónicas aquellas que no muestran signos de curación luego de un periodo de entre 4 y 6 semanas. La cronicidad de una lesión cutánea es el resultado de un conjunto de factores que interfieren con el proceso de cicatrización normal, entre ellos: deficiencias en la vascularización de la piel, enfermedades sistémicas, la edad del paciente, y fundamentalmente, la presencia de microorganismos infecciosos en la herida (desencadenantes de inflamación prolongada y patológica) (Dehkordi et al., 2019).

La reparación de la barrera cutánea está usualmente comprometida en individuos con diabetes, síndrome metabólico, fallo renal crónico y en ancianos, debido a que las capacidades de re-epitelización y revascularización están mermadas. En estos individuos la aparición de heridas crónicas es frecuente, siendo las úlceras por presión y las venosas las más frecuentes (Gonzalez et al., 2016).

En Argentina, la prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2 es del 12,7%. Entre las personas con menores ingresos del área metropolitana de Buenos Aires, la prevalencia asciende al 15,5% (Ministerio de Salud de la Nación Argentina, 2019). El pie diabético es una complicación que presenta del 15 al 25% de los pacientes con diabetes mellitus a lo largo de su vida. Se caracteriza por la presencia de úlceras, infecciones y/o gangrena en los pies, asociadas a neuropatía y/o enfermedad vascular periférica. Estas lesiones pueden ser causadas por una combinación de factores como daño en los nervios, daño en los vasos sanguíneos, infecciones y traumatismos. Una vez que aparecen, las mismas demandan un abordaje multidisciplinario y a menudo se requiere internación, que suele ser prolongada y costosa (Carro et al., 2019). El riesgo de muerte a los 5 años para un paciente con una úlcera del pie diabético es de 2 a 5 veces mayor que para un paciente sin úlcera, y la estadística de muertes a 5 años luego de una amputación mayor es de hasta el 70% (Armstrong et al., 2023).

4.3 Modelos de infección

El estudio de los modelos de infecciones ha sido fundamental para comprender la interacción huésped-patógeno y para evaluar la eficacia de intervenciones terapéuticas en contextos clínicos. Actualmente, se emplean diversos modelos *in vivo* que reproducen las condiciones de la infección, permitiendo simular aspectos críticos de la patogénesis y la respuesta inmunitaria frente a diferentes microorganismos (Figura 4). En particular, se han desarrollado modelos de infección cutánea mediante inyección subcutánea de bacterias, que generan abscesos y permiten estudiar la progresión de la infección, la inflamación y la cicatrización de las heridas. Por otra parte, la inducción de heridas mediante métodos de abrasión (raspado) o métodos de incisión empleando elementos cortantes ofrecen perspectivas complementarias: mientras que el primero suele generar lesiones con bordes irregulares y cortes definidos a una menor profundidad, el segundo produce heridas más uniformes y profundas, desgarrando la piel. Los diferentes modelos de inducción de lesiones, permiten trabajar con diferentes tipos de infecciones y evaluar así los mecanismos patogénicos y la respuesta al tratamiento en función de las características del tejido afectado.

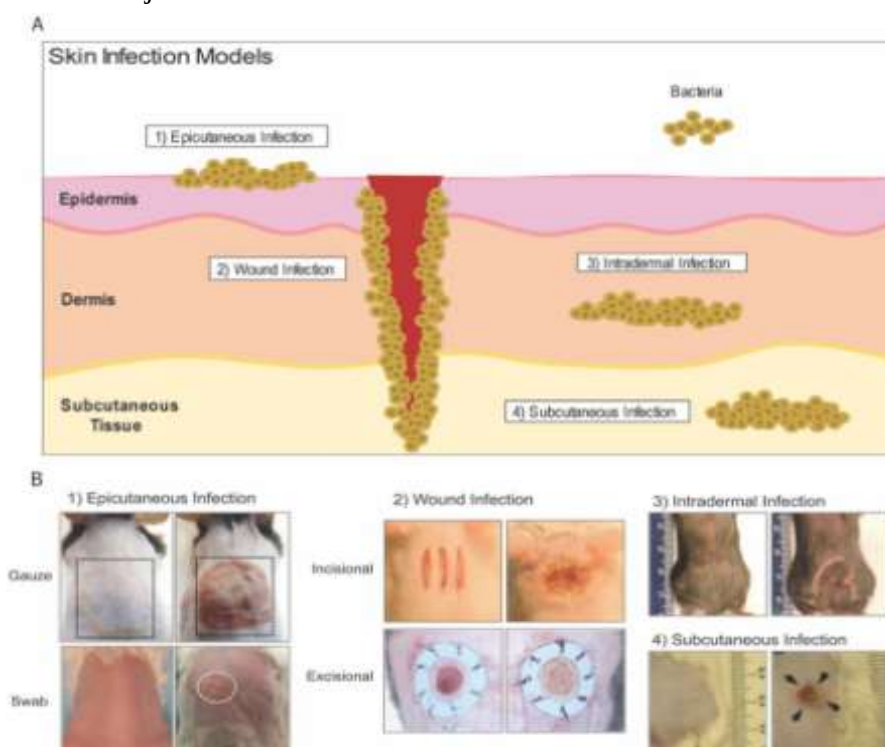


Figura 4: Modelos de infecciones cutáneas y manifestaciones clínicas

A) Modelos de infección cutánea: epidérmica, infección de herida, intradérmica y subcutánea. B) Manifestaciones clínicas correspondientes a cada tipo de infección en el ratón. Adaptado de Youn et al., 2019.

Existe consenso en la comunidad científica acerca de la importancia de utilizar modelos *in vivo* para capturar la heterogeneidad de las infecciones por *S. aureus*. (de Jong et al.,

2019). La reproducción de las condiciones clínicas en modelos experimentales, es crucial para comprender la dinámica de la infección y para desarrollar estrategias terapéuticas adecuadas. La elección del modelo adecuado, es importante para el éxito de los tratamientos y para la extrapolación de los resultados a la práctica clínica (Youn et al., 2020; David & Daum 2010; Turner, 2019;).

Los modelos murinos de infecciones proporcionan ventajas significativas para el estudio de procesos cutáneos: ciclos reproductivos cortos, manipulación genética factible, homogeneidad genética dentro de la cepa, y costos relativamente reducidos. Sin embargo, las diferencias anatómicas, fisiológicas e inmunológicas anteriormente descritas deben considerarse al extrapolar hallazgos experimentales hacia aplicaciones clínicas humanas (Ovchinnikov et al., 2020; Miyachi et al., 2021).

4.4 Rol del sistema inmune en la infección: citoquinas

La respuesta inmune contra *S. aureus* constituye un ejemplo de la compleja interacción entre patógenos y el sistema inmunológico del hospedador. Las citoquinas, proteínas de señalización intercelular, desempeñan un papel fundamental en la orquestación de esta respuesta (Figura 5). Durante la fase inicial de la infección, componentes de *S. aureus* son reconocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) expresados en células del sistema inmune innato, principalmente macrófagos y células dendríticas (Akira et al., 2006). Este reconocimiento desencadena la producción de diversas citoquinas con funciones específicas.

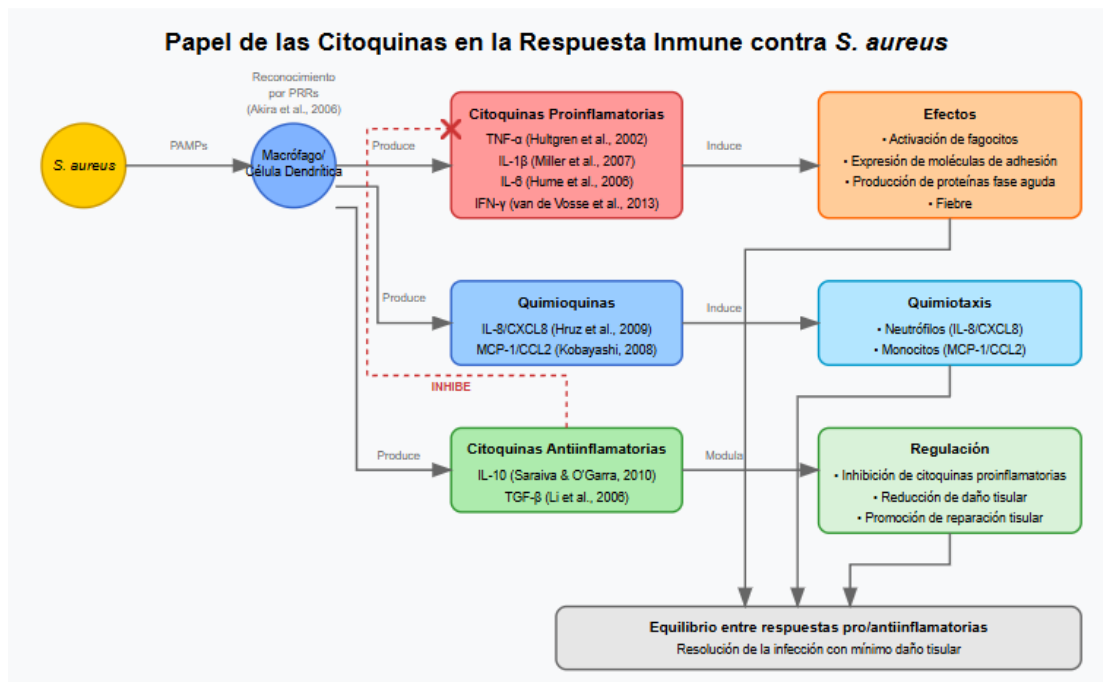


Figura 5: Esquema simplificado del papel de las citoquinas en la respuesta inmune contra *S. aureus*.

Se muestran los distintos pasos tales como el reconocimiento bacteriano, la producción de citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias, quimioquinas y sus efectos reguladores para lograr la resolución de la infección con mínimo daño tisular.

Las citoquinas pro-inflamatorias constituyen el primer eje de defensa contra este patógeno. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) induce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y potencia la actividad fagocítica y microbicida de neutrófilos y macrófagos. Estudios en modelos murinos han evidenciado que deficiencias en la señalización por TNF- α incrementan significativamente la susceptibilidad a infecciones por *S. aureus* y comprometen la formación de abscesos necesarios para contener la infección (Hultgren et al., 2002). La interleuquina-1 β (IL-1 β), por su parte, induce fiebre, estimula la producción hepática de proteínas de fase aguda y facilita el reclutamiento de células efectoras hacia el foco infeccioso, siendo particularmente relevante en la formación de abscesos característicos de las infecciones estafilocócicas (Miller et al., 2007).

Paralelamente, la interleuquina-6 (IL-6) actúa como mediador entre respuestas inmunes innatas y adaptativas, estimulando la producción de inmunoglobulinas por linfocitos B y dirigiendo la diferenciación de subpoblaciones específicas de linfocitos T. Investigaciones experimentales han demostrado que ratones deficientes en IL-6 presentan mayor mortalidad frente a infecciones por *S. aureus*, asociada a una reducida activación de fagocitos y producción de anticuerpos específicos (Hume et al., 2006). El interferón

gamma (IFN- γ), principalmente secretado por células NK y linfocitos T, incrementa la capacidad microbicida de macrófagos y mejora la presentación antigénica, siendo particularmente relevante en infecciones persistentes. Significativamente, pacientes con deficiencias en la vía de señalización del IFN- γ muestran mayor susceptibilidad a infecciones estafilocócicas invasivas (van de Vosse et al., 2013).

La inflamación aguda representa una respuesta inicial inmediata a la infección, y si esta se resuelve rápidamente, es beneficiosa y autolimitada. Se caracteriza por la acumulación extravascular de neutrófilos y edema al inicio de la respuesta. Normalmente, la inflamación aguda, termina cuando el tejido está completamente reparado. En la inflamación crónica, en cambio, la respuesta persiste después de la eliminación de las bacterias, caracterizándose por la presencia de monocitos, macrófagos y linfocitos. La inflamación aguda es beneficiosa contra infecciones y lesiones, y contribuye a la cicatrización de heridas, mientras que la inflamación crónica retarda y dificulta el proceso de curación (Nesi-Reis et al., 2018).

Las quimioquinas, un subgrupo especializado de citoquinas con propiedades quimiotácticas, coordinan el reclutamiento celular hacia el sitio de infección. La IL-8 (CXCL8) y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1/CCL2) dirigen selectivamente la migración de neutrófilos y monocitos, respectivamente. Estos procesos son fundamentales para la contención inicial del patógeno. Ha sido demostrado que toxinas de *S. aureus*, como la α -hemolisina, pueden inducir la expresión de IL-8 en células epiteliales, contribuyendo al reclutamiento neutrofílico y la respuesta inflamatoria (Hruz et al., 2009; Kobayashi, 2008).

Si bien la respuesta proinflamatoria resulta esencial para eliminar el patógeno, su intensidad y duración deben ser estrictamente reguladas para evitar daño tisular excesivo. Las citoquinas antiinflamatorias, principalmente la interleuquina-10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), actúan como moduladores críticos de este balance. La IL-10, producida por múltiples tipos celulares incluyendo macrófagos y linfocitos T reguladores, inhibe la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6, limitando así la amplificación de la cascada inflamatoria (Saraiva & O'Garra, 2010). Complementariamente, el TGF- β reduce la activación de fagocitos y promueve procesos de reparación tisular mediante la estimulación de fibroblastos y la deposición de matriz extracelular (Li et al., 2006).

El equilibrio dinámico entre estos mediadores pro y antiinflamatorios determina en gran medida la evolución clínica de las infecciones por *S. aureus*. Una respuesta insuficiente puede resultar en diseminación bacteriana y sepsis, mientras que una inflamación excesiva o prolongada puede ocasionar daño tisular significativo. El estudio de estas

interacciones inmunológicas, es determinante para el desarrollo de estrategias diagnósticas, pronósticas y terapéuticas frente a infecciones de *S. aureus*.

En cuanto a las diferencias entre ratones y humanos, respecto a la respuesta inmune en heridas cutáneas, la misma presenta algunas pequeñas diferencias en el perfil de receptores implicados en la inmunidad innata y la síntesis de péptidos antimicrobianos. En cuanto a la inmunidad adaptativa celular, la epidermis murina posee una población de células T epidérmicas dendríticas $\gamma\delta$, que son cruciales para la homeostasis cutánea y la reparación, y permiten la regeneración de folículos pilosos en cicatrices, a diferencia de lo que ocurre en humanos. En cuanto a la respuesta humoral, existen pequeñas diferencias en el perfil de citoquinas inflamatorias secretadas por los diferentes tipos celulares (Zomer & Trentin, 2017).

5. Terapia Fotodinámica

5.1 Fundamentos de la Terapia Fotodinámica antimicrobiana

5.1.1 Conceptos generales y antecedentes históricos

La Terapia Fotodinámica (TFD) consiste en combinar luz visible con un agente fotosensibilizante (FS), factores ambos inocuos per se, pero que en presencia de O_2 desencadenan la muerte celular (Weishaupt et al., 1976). Existen reportes de la utilización de terapias basadas en la exposición a la luz solar desde hace más de 3000 años. En el siglo XVIII comenzó a describirse de forma sistemática el efecto de la luz solar sobre el raquitismo, y en 1903 Niels Finsen fue galardonado con el premio Nobel "en reconocimiento a su contribución al tratamiento de enfermedades, en particular lupus vulgaris, mediante radiación lumínica concentrada". Posteriormente, en 1950, Richard Cremer introdujo la fototerapia como tratamiento contra la ictericia en neonatos (Cremer et al., 1958).

El uso de los FS también puede rastrearse hasta la antigüedad, ya que diversas fuentes señalan la utilización de psoralenos para el tratamiento del vitíligo. Los primeros intentos de utilización de la TFD se deben al pionero de la fotobiología, Hermann von Tappeiner, quien además introdujo el término en 1903, en el tratamiento de tumores y enfermedades cutáneas mediante el uso de diversos colorantes, luego de observar accidentalmente la fotosensibilización de cultivos de paramecios con naranja de acridina. No obstante, la historia moderna de la TFD comienza en la década del 70 del siglo XX, con el descubrimiento realizado por Thomas Dougherty de la localización selectiva en el tejido tumoral de derivados de la hematoporfirina (HPD), moléculas capaces de inducir fotosensibilización, y el posterior desarrollo del FS comercial Photofrin (Dougherty et al., 1975, Moan & Peng, 2003).

5.1.2 Mecanismos de acción fotofísicos y fotoquímicos de la TFD

La TFD se fundamenta en la interacción de tres componentes esenciales: un FS, luz visible de una longitud de onda específica y oxígeno molecular. Los mecanismos de acción de la TFD se pueden dividir en dos categorías principales: los mecanismos fotofísicos y los fotoquímicos.

Desde el punto de vista fotofísico, la TFD inicia cuando el FS absorbe la radiación lumínica, lo que provoca su transición desde el estado fundamental hacia un estado excitado singlete. Este estado excitado puede realizar el cruce intersistema, y convertirse en un estado triplete, caracterizado por una vida útil prolongada y una mayor capacidad para interactuar con el oxígeno presente en los tejidos. Esta transición es crucial, ya que determina la eficiencia con la que se transfiere la energía necesaria para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

En cuanto a los mecanismos fotoquímicos, el FS en estado triplete puede participar en dos tipos de reacciones con mecanismos distintos (Figura 6):

1. En el mecanismo tipo I, el FS interactúa directamente con moléculas celulares, transfiriendo electrones o protones y generando radicales libres y otras ROS a través de reacciones de oxidación-reducción.
2. En el mecanismo tipo II, la energía del FS triplete se transfiere directamente al oxígeno molecular, formando oxígeno singlete, una especie altamente reactiva que puede dañar componentes críticos de la célula, como membranas, proteínas y ácidos nucleicos.

Ambos mecanismos fotoquímicos producen daño oxidativo en las células, lo que puede inducir procesos de apoptosis, necrosis o autofagia, dependiendo de la dosis de energía aplicada, la concentración de oxígeno y la sensibilidad del tejido. La eficiencia de la TFD depende de todos estos procesos, y ha sido estudiada en diversos contextos experimentales y clínicos (Hamblin, 2016; de Freitas & Hamblin, 2016).

Estos mecanismos de acción fotofísicos y fotoquímicos constituyen la base para la aplicación selectiva de la TFD en el tratamiento de infecciones, cáncer y otras patologías, al permitir la destrucción focalizada de células metabólicamente activas, y la modulación de la respuesta inflamatoria.

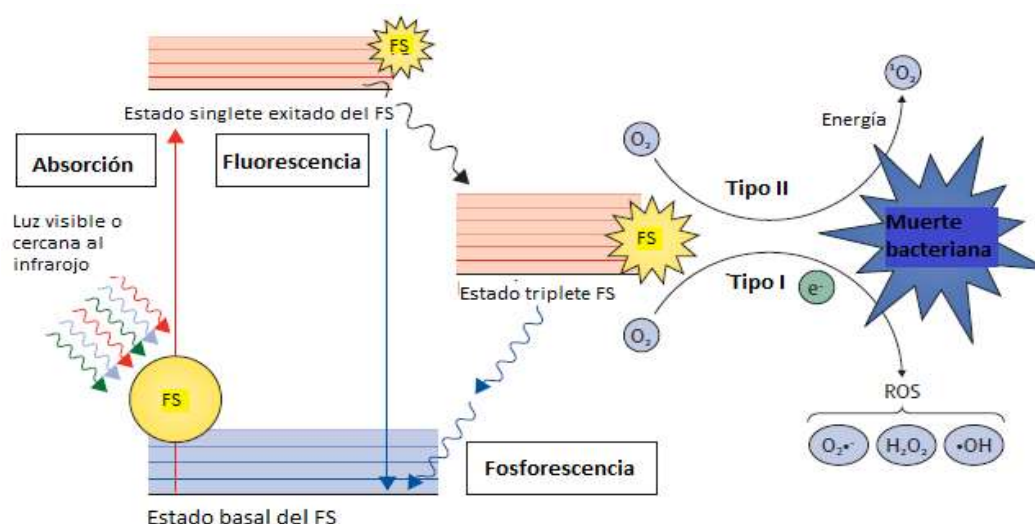


Figura 6: Fotosensibilización bacteriana. Esquema de los mecanismos implicados en la TFDA.

5.1.3 Terapia Fotodinámica antimicrobiana

La Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA) consiste en el uso de la TFD para destruir microorganismos patógenos. Esta técnica ha demostrado ser efectiva para eliminar bacterias, hongos, virus y parásitos.

La TFDA ha sido empleada para el tratamiento de infecciones superficiales, especialmente en el ámbito dermatológico y odontológico, tales como acné, úlceras crónicas, infecciones en quemaduras e infecciones orales, úlceras de decúbito, osteomielitis en pie diabético, entre otras (Figura7) (Jori et al., 2006; Maisch, 2015).

La TFDA constituye una estrategia prometedora frente al creciente problema de la resistencia bacteriana a antibióticos, como se mencionó anteriormente, uno de los principales problemas sanitarios a nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud (Songca & Adjei, 2022). A diferencia de los antibióticos convencionales, la TFDA actúa mediante un mecanismo de daño oxidativo no específico, con un amplio espectro de blancos bioquímicos (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, entre los principales) y, por ende, tiene la capacidad de dañar diversas estructuras celulares (principalmente pared y membrana celular). Esta inespecificidad en el daño generado por la TFDA, dificulta el desarrollo de resistencias por parte de los microorganismos, aun después de múltiples ciclos de tratamiento a dosis subletales. Por otra parte, la TFDA no promueve la resistencia cruzada con otros tratamientos antibacterianos convencionales (Rastelli et al., 2022; Wainwright et al., 2023; Costa & Lima, 2024).

Si bien, como se mencionó en el párrafo anterior, la TFDA es teóricamente efectiva contra todo tipo de bacterias, algunas especies y cepas son más susceptibles que otras. Entre los factores que pueden influir en la sensibilidad frente a la TFDA, se encuentran la expresión génica de proteínas y vías de respuesta frente a estrés, como la activación de bombas de eflujo (que expulsan el FS de la célula) o la producción de enzimas antioxidantes (que neutralizan las ROS), y la modificación de la composición de la pared y membrana celular (Gilaberte et al., 2021; Rapacka-Zdonczyk et al., 2021a).

El paradigma de que las terapias antimicrobianas basadas en luz no generan resistencias, ha sido cuestionado recientemente. Aunque no se han documentado casos de resistencia bacteriana estable frente a la TFDA, el debate ha surgido en la literatura científica, a partir del reporte de que algunas bacterias desarrollaron en condiciones experimentales *in vitro*, tolerancia a estos tratamientos. A diferencia de la resistencia (que implica cambios genéticos heredables que permiten el crecimiento en presencia de un agente antimicrobiano), la tolerancia se refiere a una reducción temporal y reversible, en la susceptibilidad bacteriana (sin modificaciones genéticas permanentes). Las bacterias tolerantes son capaces de sobrevivir a exposiciones transitorias incluso a dosis elevadas del agente antimicrobiano, y esta característica puede estar mediada por factores ambientales o adaptativos. Las células tolerantes suelen encontrarse en un estado no proliferativo durante la exposición al agente antimicrobiano, lo que les permite resistir su efecto letal y reanudar el crecimiento una vez que el mismo finaliza (Rapacka-Zdonczyk et al., 2021b; Balaban et al., 2019; Sulaiman & Lam, 2021).

Como se mencionó en el párrafo anterior, ha sido reportada tolerancia en *S. aureus* frente a TFDA, y también frente a tratamientos con luz azul, luego de exposiciones repetidas a dosis subletales de estos tratamientos. En esta última variante de tratamiento antimicrobiano mediado por luz, se emplea luz azul, especialmente en el rango de 405 a 470 nm, para generar daño oxidativo mediante la excitación de compuestos FS endógenos, presentes en determinadas bacterias (Rapacka-Zdonczyk et al., 2021b; Kruszewska-Naczek et al., 2024). Vale la pena mencionar, que, aunque este hallazgo podría preocupar en términos de eficacia terapéutica, en dichos trabajos también se reportó que las cepas tolerantes a la TFDA o el tratamiento con luz azul, mostraron sensibilidad colateral frente a antibióticos, como la gentamicina y la doxiciclina (Rapacka-Zdonczyk et al., 2021b; Kruszewska-Naczek et al., 2024).

A pesar de lo anteriormente mencionado, se señala una vez más, que aun en las condiciones en que se llevaron a cabo dichos trabajos, no se han reportado casos de aparición de resistencia frente a la TFDA tanto *in vitro*, como *in vivo*. Por otra parte, existen numerosas publicaciones científicas en investigación básica, ensayos clínicos y reportes de casos clínicos, donde se ha demostrado ampliamente que la TFDA es efectiva

contra múltiples patógenos multirresistentes, incluyendo MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* y diversas especies de *Candida* (Alamet al., 2019). Esta capacidad de eliminar microorganismos refractarios a antibióticos, convierte a la TFDA en una alternativa terapéutica de gran importancia a tener en cuenta en el futuro, para el tratamiento de infecciones clínicas (Kruszewska-Naczka et al., 2024; Sabino et al., 2023).

Como se mencionó anteriormente, la formación de biopelículas representa un desafío para combatir las infecciones microbianas, dada su sensibilidad reducida a los antibióticos convencionales y a la respuesta inmune del hospedador. Frente a este problema, la TFDA se presenta como una alternativa promisorio debido su amplio espectro de acción y capacidad de inactivar bacterias metabólicamente inactivas y aletargadas. Sin embargo, la penetración reducida de los FS y el oxígeno, a causa de la barrera física y química que representa la matriz de la biopelícula, son limitantes a tener en cuenta.

La investigación básica en TFDA ha sido llevada a cabo mayoritariamente en modelos *in vitro*, sin embargo, también existe un amplio campo de trabajos realizados sobre modelos *in vivo* en modelos animales, que buscan reproducir el contexto de la infección clínica en pacientes humanos tales como: infecciones en heridas cutáneas, infecciones periodontológicas, leishmaniasis, infecciones por micobacterias, otitis u osteomielitis, entre otras (Maisch, 2015). En cuanto a los estudios clínicos en humanos, han mostrado resultados prometedores, particularmente en el tratamiento de infecciones dermatológicas refractarias a tratamientos convencionales (Gilaberte et al., 2020).

Una limitación clave de la TFDA es la dificultad de la luz para alcanzar el sitio de infección. Con el advenimiento de los láseres, es posible llegar a sitios de otra manera inaccesibles, tales como biopelículas crecidas en implantes y catéteres contaminados; además, puede ser aplicada durante el debridamiento quirúrgico (Perni et al., 2011; Cieplik et al., 2014). Los avances en la tecnología láser han mejorado significativamente la precisión y eficacia de la TFDA, permitiendo el tratamiento de infecciones en localizaciones anatómicas complejas con mínimo daño a los tejidos circundantes (Gnanasekar et al., 2023).

La acción terapéutica de la TFDA en el tratamiento de infecciones, se produce mediante tres vías: el efecto bactericida directo sobre los microorganismos presentes en la infección; el efecto (modulación) sobre la respuesta inmune del huésped frente a la infección; y el efecto sobre la regeneración del tejido dañado (Figura 7). Si bien conceptualmente las vías de acción de la TFDA mencionadas, se postulan por separado, en el contexto de la infección, existe interacción entre los diferentes tipos de efectos, en parte debido a que la eliminación de los microorganismos infectivos y la regeneración tisular son procesos interconectados (Hamblin, 2016).

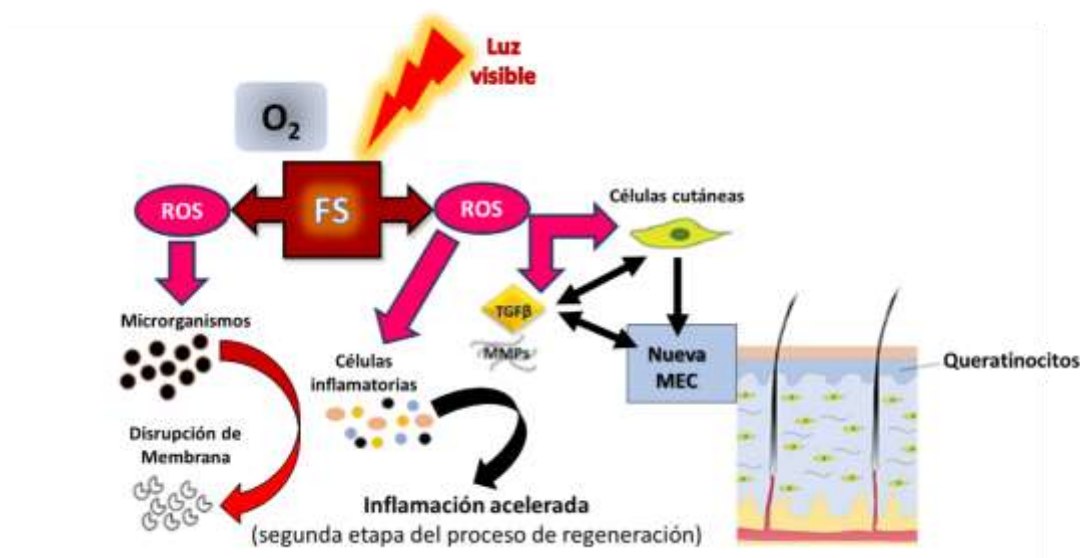


Figura 7. Mecanismo de acción de la TFDA en la cicatrización de heridas cutáneas. La luz visible en presencia de oxígeno activa el fotosensibilizante, generando ROS que inducen: (1) disrupción de la membrana de microorganismos patógenos, (2) activación de células inflamatorias y aceleración de la respuesta inflamatoria, y (3) estimulación de células cutáneas para la producción de factores de crecimiento ($TGF-\beta$), metaloproteinasas de matriz (MMPs) y formación de nueva matriz extracelular (MEC), promoviendo la migración y proliferación de queratinocitos para el cierre de la herida.

En particular, se destaca que los dos últimos efectos mencionados (la capacidad de la TFDA para modular la respuesta inflamatoria y para promover la cicatrización), permiten proponer a la TFDA como terapia dual: antimicrobiana y regenerativa (Almenara-Blasco et al., 2024).

Otro aspecto relevante de la TFDA, es la selectividad del tratamiento, ya que permite dirigir el efecto antimicrobiano específicamente a los sitios de infección (mediante el direccionamiento de la fuente de luz), minimizando el daño a los tejidos sanos circundantes (Costa & Lima, 2024). Esta característica contrasta favorablemente con los tratamientos antibióticos sistémicos, que pueden asociarse con efectos secundarios tóxicos o reacciones alérgicas (Sun et al., 2023).

Si se agrega a lo anterior, la efectividad frente a especies bacterianas resistentes a antibióticos y formadoras de biopelículas, puede considerarse a la TFDA como una técnica alternativa y prometedora para tratar (o complementar tratamientos convencionales) infecciones superficiales causadas por bacterias resistentes en contextos clínicos.

Sin embargo, para que la TFDA alcance su plena madurez clínica, es necesario abordar las lagunas de conocimiento existentes. Si bien los avances *in vitro* son prometedores, la traslación al ámbito clínico demanda la realización de ensayos *in vivo* y estudios clínicos bien diseñados que validen su eficacia, seguridad y optimicen los protocolos de tratamiento en diversas condiciones patológicas (Hu et al., 2018; Kostron et al., 2016; Songca et al., 2022; Wang et al., 2025).

En relación a lo último mencionado, es importante aclarar que el futuro de la TFDA en el manejo de infecciones probablemente no implique el reemplazo completo de tratamientos convencionales, sino su integración estratégica en enfoques multimodales adaptados a los diferentes contextos clínicos:

1. Terapia adyuvante: La combinación de TFDA con antibióticos convencionales ha mostrado efectos sinérgicos, permitiendo reducir dosis y duración de tratamientos antibióticos, minimizando así la presión selectiva y efectos adversos (Keshishyan et al., 2019).
2. Desbridamiento fotónico: El uso de TFDA como adyuvante al desbridamiento mecánico o enzimático de heridas infectadas puede mejorar la eliminación de biopelículas y reducir la carga bacteriana residual, creando condiciones más favorables para la cicatrización (Rapacka-Zdonczyk et al., 2019).
3. Prevención en poblaciones de alto riesgo: Protocolos de descolonización basados en TFDA podrían ofrecer alternativas a la mupirocina en portadores nasales de MRSA, particularmente en contextos de alta prevalencia de resistencia a ese antibiótico (Carvalho et al., 2021).
4. Tratamiento de infecciones recurrentes: En pacientes con infecciones recurrentes por MRSA, donde los mecanismos de persistencia como biopelículas o variantes de colonia pequeña juegan un papel importante, las TFDA podría ofrecer una alternativa para su eliminación (Percival et al., 2019).

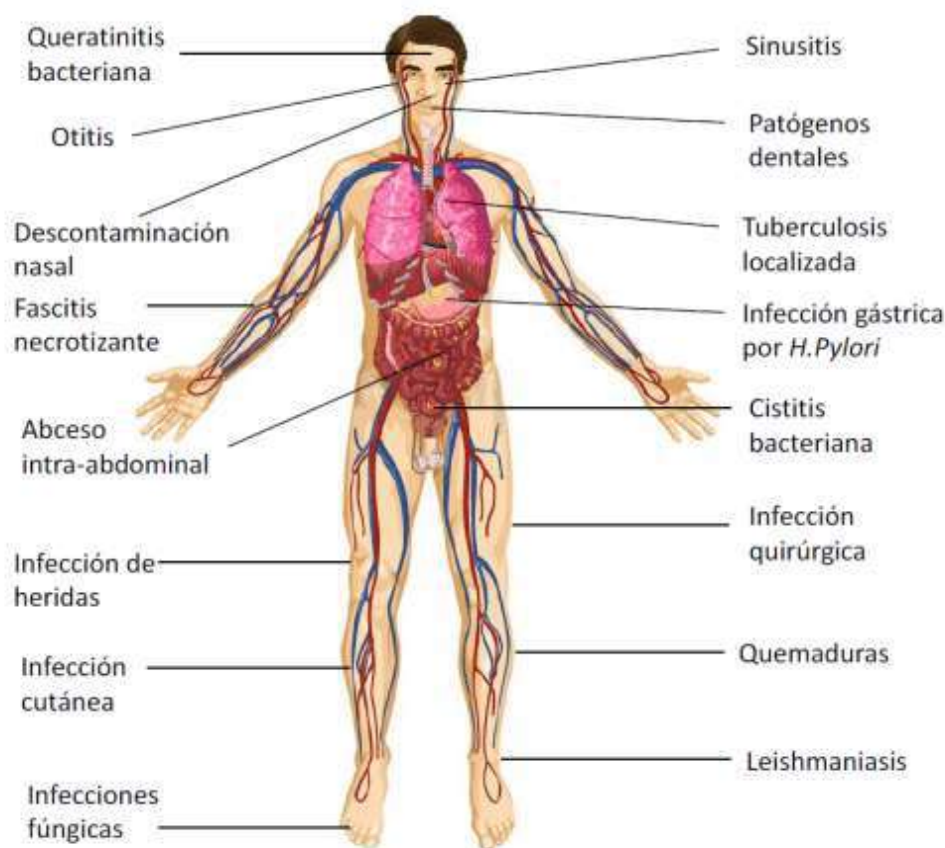


Figura 8: Infecciones propuestas para ser tratadas mediante la TFDA

Esquema simplificado de los principales sitios de infección bacteriana plausibles de ser tratados con TFDA. Adaptado de Murray et al., 2006.

5.1.4 Fotosensibilizantes en TFDA

Las propiedades de los FS desempeñan un papel crucial en la eficiencia del protocolo de fotoinactivación. Un FS ideal, debería poseer las siguientes propiedades: ser un compuesto puro de composición constante, tener un alto rendimiento cuántico en la producción de ROS, no presentar toxicidad en ausencia de luz, acumularse selectivamente en el sitio de irradiación y ser eliminado rápidamente del organismo, para evitar efectos adversos, como la fotosensibilización cutánea.

La investigación básica y clínica ha explorado una vasta gama de FS, clasificándolos a menudo en "generaciones" según su desarrollo y propiedades. Las porfirinas y sus derivados, como la hematoporfirina y sus ésteres, representaron los primeros avances, aunque su acumulación inespecífica limitó su aplicación. Posteriormente, las ftalocianinas y naftalocianinas surgieron como FS de segunda generación, destacando por su fuerte absorción en el rango del rojo e infrarrojo (con aumento en la penetración tisular y la eficiencia fotodinámica). Más recientemente, la investigación se ha centrado en FS

de tercera generación, que buscan superar las limitaciones de sus predecesores mediante estrategias como la funcionalización con ligandos específicos para mejorar la selectividad hacia las células microbianas, la encapsulación en nanopartículas para optimizar su biodisponibilidad y reducir la toxicidad sistémica, o la combinación con otros agentes antimicrobianos para lograr efectos sinérgicos. A pesar de estos avances, los FS actuales aún enfrentan desafíos, como la baja solubilidad acuosa de muchos de ellos (lo que dificulta su formulación y administración), la selectividad limitada entre células microbianas y tejidos del hospedador, y la necesidad de una irradiación precisa y controlada para evitar daños colaterales (Gao et al., 2023; Hamblin et al., 2004; Correia et al., 2021).

En los últimos años, esta búsqueda de mayor eficacia y selectividad de los FS, ha impulsado el estudio de una amplia diversidad de compuestos químicos frente a diferentes microorganismos patógenos de relevancia clínica. Un área de intenso desarrollo ha sido la optimización de los derivados porfirínicos y ftalocianínicos mediante la introducción de sustituyentes que mejoran la solubilidad en agua, la especificidad por microorganismos o la capacidad de generar ROS. En esta línea, se han explorado porfirinas catiónicas y glicosiladas, así como ftalocianinas funcionalizadas con grupos cargados. Paralelamente, ha crecido el interés en los fenotiazínicos, particularmente el azul de metileno y el azul de toluidina, debido a su bajo costo, seguridad establecida en otras aplicaciones médicas y capacidad de absorción en el rango visible. Los cloros y bacteriocloros, derivados de la clorofila, también han sido objeto de estudio. Estos compuestos, con bandas de absorción en el rojo y el infrarrojo cercano, ofrecen una mayor penetración en los tejidos, lo que es crucial para tratar infecciones profundas.

Además, se ha expandido la investigación en FS de origen natural, como la curcumina, y otros compuestos orgánicos con propiedades fotocatalíticas. Por último, se destaca el avance en el desarrollo de sistemas de administración de FS basados en nanotecnología: nanopartículas lipídicas, poliméricas o metálicas (como las de oro o plata), así como sistemas basados en estructuras “metal-orgánicas”. Estas formulaciones, no solo mejoran la solubilidad y la biodisponibilidad de los FS, sino que también permiten la entrega dirigida al sitio de la infección y la liberación controlada, superando muchas de las limitaciones habituales de los FS “libres”. Sin embargo, también encuentran limitaciones, como la dificultad para penetrar eficazmente en los sitios de infección, especialmente en el caso de las infecciones bacterianas que forman biopelículas; toxicidad intrínseca de algunos nanomateriales (o de sus productos de degradación); y la estabilidad y escalabilidad de la producción de dichos compuestos (Cieplik et al., 2018; Gao et al., 2023; Ghorbani et al., 2018; Thomas-Moore et al., 2020).

5.2 La ventana fototerapéutica y penetración tisular de la luz en TFDA

La penetración de la luz en los tejidos biológicos también es un elemento determinante en la efectividad de la TFDA en el tratamiento de infecciones. La misma es dependiente de las propiedades del tejido, pero fundamentalmente de la longitud de onda de la luz empleada. Puede definirse así la "ventana fototerapéutica", un rango de longitudes de onda del espectro electromagnético donde la luz penetra más profundamente en los tejidos. Esta ventana se sitúa en el rango de 600 a 900 nm, abarcando partes del rojo visible y el infrarrojo cercano. Esto se debe a que por debajo de los 600 nm existe una alta absorción y dispersión por cromóforos endógenos presentes en los tejidos (principalmente hemoglobina y melanina), mientras que por encima de los 900 nm la principal limitante es la creciente absorción de la luz por el agua. Los FS con máximos de absorción en esta región (600–900 nm), son ideales para aplicaciones de la TFDA en tejidos infectados. Sin embargo, en aplicaciones de la TFDA sobre superficies como implantes o prótesis, pueden emplearse FS con máximos de absorción que no necesariamente se encuentren en ese rango de longitudes de onda (Cieplik et al., 2018; Hamblin et al., 2004; Nyman et al., 2004).

Si bien no hay una única "profundidad máxima" de la luz en los tejidos, ya que varía considerablemente según la longitud de onda y el tipo de tejido, la penetración máxima para el rojo visible (600-700 nm aprox.) en la piel, por ejemplo, puede ser del orden de 1 a 10 mm (alcanzando tejidos subcutáneos). Al desplazarse hacia el infrarrojo cercano (700-900 nm aprox.), la penetración aumenta significativamente, pudiendo alcanzar de 30 a 70 mm en tejidos con baja absorción de sangre y alto contenido de grasa (como el músculo o el tejido mamario). En mucosas, se ha reportado hasta 6.5 mm (Jacques et al., 2013).

En cuanto a las fuentes de luz y la penetración en los tejidos, los avances tecnológicos de las últimas décadas, han permitido el desarrollo de dispositivos como endoscopios, fibras ópticas, o difusores, que permiten irradiar tejidos y órganos internos, minimizando el daño a los tejidos circundantes, y ampliando el rango de empleo de la TFDA (Maczyszyn et al., 2023).

5.3 Especificidad celular y mecanismos de acción de los FS

Dado que la vida media de los ROS, generados durante la TFDA, es relativamente corta, el sitio de daño producido por estas especies dependerá de la localización del FS a partir del cual son generados. Por lo tanto, las interacciones que el compuesto FS sea capaz de establecer con los diferentes componentes celulares o tisulares, determinarán el blanco

molecular de la TFDA. Principalmente los diferentes FS pueden: localizarse en la pared celular, localizarse en membranas lipídicas, o ser capaces de atravesar las barreras celulares de los microorganismos y localizarse en el citoplasma.

Debido a sus diferencias estructurales, las bacterias Gram positivas son más sensibles a la TFDA que las Gram negativas (Figura 1). Esto se debe a que las bacterias Gram negativas poseen una barrera externa compuesta por múltiples capas (glicocálix, lipopolisacáridos, bicapa lipídica externa, etc.), que dificulta la penetración del FS (Demidova et al., 2005).

Se ha demostrado que los FS catiónicos son particularmente eficaces en la eliminación de biopelículas de bacterias Gram positivas como *S. aureus* y *S. epidermidis* (Gad, 2004).

Tabla 2: Clasificación de compuestos FS comúnmente empleados en TFDA según origen y estructura química.

Clasificación	Tipo de FS	Características	Ejemplos
Estructuras de tetrapirrol	- Porphirinas - Clorinas - Ftalocianinas	Son compuestos heterocíclicos-macrocíclicos que constan de cuatro pirroles. Con hasta ocho cargas positivas y actúan predominantemente mediante un mecanismo de tipo II, con rendimientos cuánticos de oxígeno singlete entre 0,5 y 0,8. Presentan un máximo de absorción intensa a 405 nm (banda de <i>Soret</i>) y picos más pequeños a longitudes de onda superiores a 500 nm (bandas Q).	- Derivados de Hematoporphirinas - TMPyP⁴⁺ 5,10,15,20-tetrakis (1-metil-4-piridinio) porfirina tetra (p-toluensulfonato)
Colorantes sintéticos	- Derivados de fenotiazinio - Tintes fluorescentes de xanteno - Derivados de fenalenonas - Compuestos de metales de transición	Son compuestos con una estructura aromática. Con rendimiento cuántico de oxígeno singlete solubles en solventes polares y no polares. Son fotoestables.	- Azul de metileno - Cloruro de 3,7-bis (dimetilamino) - Fenotiazin-5-io] o el azul de toluidina [3-amino-7-(dimetilamino) -2-metilfenotiazin- Cloruro de 5-io] - Nuevos: Nuevo azul de metileno, azul de dimetilmetileno. - Rosa de bengala, eosina y eritrosina. - Tintes de BODIPY.

			- SAPYR
Productos naturales	- Derivados de la riboflavina - Derivados de la curcumina	Derivados de riboflavina: Presenta un esqueleto hidroxicarbonado con varios grupos funcionales, dotando a la molécula de un comportamiento químico característico, soluble en agua y en disolventes orgánicos. Poseen grupos cromóforos y es, por lo tanto, fotosensible. La degradación fotoquímica a través de luz visible ocurre mediante especies reactivas de oxígeno. Este procedimiento se da a través de la llamada transferencia fotogenerada al oxígeno molecular y transferencia energética a ROS. Derivados de curcumina: La curcumina es un compuesto natural que presenta características distintivas como FS. Posee una banda de absorción entre 420 y 480 nm, siendo más activa principalmente entre 405 y 435 nm, por lo que se activa con luz azul. Máximo de absorción a 460 nm y emisión por fluorescencia a 550 nm. Soluble en solventes orgánicos y requiriendo la presencia de oxígeno molecular para generar ROS. No es tóxica, posee propiedades antiinflamatorias y antibacterianas.	- Riboflavina (vitamina B2). - Curcumina - (1E, 6E-1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) - 1,6-heptadieno-3,5-diona)

Entre los FS aprobados para su uso en la práctica clínica, se encuentran el azul de metileno, el azul de toluidina, y el verde de indocianina. Siendo los dos primeros compuestos mencionados, los de uso más generalizado. Estos dos compuestos pertenecen a las fenotiazinas, moléculas planas, tricíclicas y aromáticas, de color azul y carga positiva intrínseca. Su máximo de absorción se encuentra entre los 600 y 680 nm. La Tabla 3 presenta ejemplos de aplicación de estos FS y los países donde su uso está autorizado (Longo et al., 2011, Rastelli et al., 2022).

Tabla 3: Algunos FS antimicrobianos comercializados mundialmente (Longo et al, 2011; Rastelli et al., 2022)

FS	Infección tratada	País	Compañía comercializadora
Derivados fenotiacínicos	Enfermedad periodontal	Canadá, EE.UU.	Periowave, OREO
Derivados fenotiacínicos	Infección dental	Alemania, Italia	Helbo, Cumdente
Azul de metileno	Infección dental, Oncomicosis	Brasil, EE.UU.	Aptivalux, Photodisinfection
Derivados fenotiacínicos	Infección dental	Reino Unido, España	DenFotex, DMC Equipment
Azul de toluidina	Infección periodontal, Endodoncia	Dinamarca, Suecia	CMS Dental (FotoSan 630)
Derivados fenotiacínicos	Úlceras de pierna infectada	Reino Unido, Francia	Photopharmica, Photobiomed
Azul de metileno	Infecciones fúngicas	Brasil, India	PDT Pharma, Photomedicine
Curcumina	Infecciones orales	EE.UU., Japón	Curolux, PhotoBiotech

5.4 Fuentes de luz para TFDA

Los avances en optoelectrónica han transformado el campo de la TFD, permitiendo el desarrollo de diferentes fuentes de luz que ofrecen diferentes ventajas según el contexto clínico (Figura 8).

Las principales fuentes de luz utilizadas en TFDA son:

- Dispositivos de emisión láser.** Proporcionan luz monocromática y coherente con alta intensidad. Se utilizan láseres de diodo, de argón y de Nd:YAG, dependiendo de la longitud de onda requerida;
- Lámparas de luz halógena o incandescente.** Emiten un amplio espectro de luz y pueden filtrarse para seleccionar la longitud de onda deseada. Son más accesibles que los láseres, pero generan más calor.

- c) **Lámparas de xenón y plasma.** Empleadas por su alta intensidad lumínica y amplio espectro.
- d) **Diodos emisores de luz (LEDs).** Son una alternativa económica y portátil, con emisión en rangos específicos de longitud de onda. Presentan la ventaja de generar menos calor que las lámparas incandescentes y ser más económicas que los dispositivos láser.
- e) **Luz solar.** Representa una fuente de luz natural, económica y ampliamente accesible, lo que la convierte en una buena opción en regiones con recursos limitados o para el tratamiento de infecciones superficiales. Dado que su espectro abarca desde el ultravioleta, pasando por el visible, hasta el infrarrojo, es necesario emplear filtros para eliminar o atenuar las longitudes de onda perjudiciales.

Ningún tipo de fuente de luz es intrínsecamente superior para todos los casos, por lo que la elección de la fuente lumínica apropiada dependerá de la dosis lumínica a suministrar, del tipo de FS empleado, y de la localización del tejido o sitio a irradiar, entre otros factores (Maczyszyn et al., 2023).

Los dispositivos láser constituyen la principal manera de irradiar sitios donde sólo es posible acceder mediante arreglos de fibras ópticas, debido a la calidad del haz y la potencia de salida obtenida en estos equipos. La utilización de difusores de luz de distintas formas junto con microlentes, permiten generar haces colimados uniformes, que tornan adecuados a estos dispositivos para la iluminación directa de sitios accesibles (piel, cavidad oral). Las lámparas incandescentes convencionales, en cambio, no pueden ser acopladas a fibras ópticas, pero es posible, acoplarlas a guías ópticas líquidas que permiten suministrar la luz de forma precisa, por lo que, considerando su menor costo y complejidad, estos sistemas pueden ser preferibles, en determinadas situaciones, a los dispositivos láser (Brancaleon y Moseley, 2002). Los LEDs han ganado popularidad como alternativa a los láseres para el tratamiento de áreas superficiales más grandes, ya que son más económicos, no requieren mantenimiento especializado y han demostrado eficacia clínica comparable en ciertos contextos, particularmente en aplicaciones dermatológicas y odontológicas (Almenara-Blasco et al., 2024; Li et al., 2023). Recientemente, el desarrollo de OLEDs (diodos orgánicos emisores de luz) flexibles ha abierto nuevas posibilidades para tratamientos adaptables a superficies corporales irregulares, permitiendo potencialmente terapias ambulatorias más cómodas para el paciente (Samuel et al., 2019).

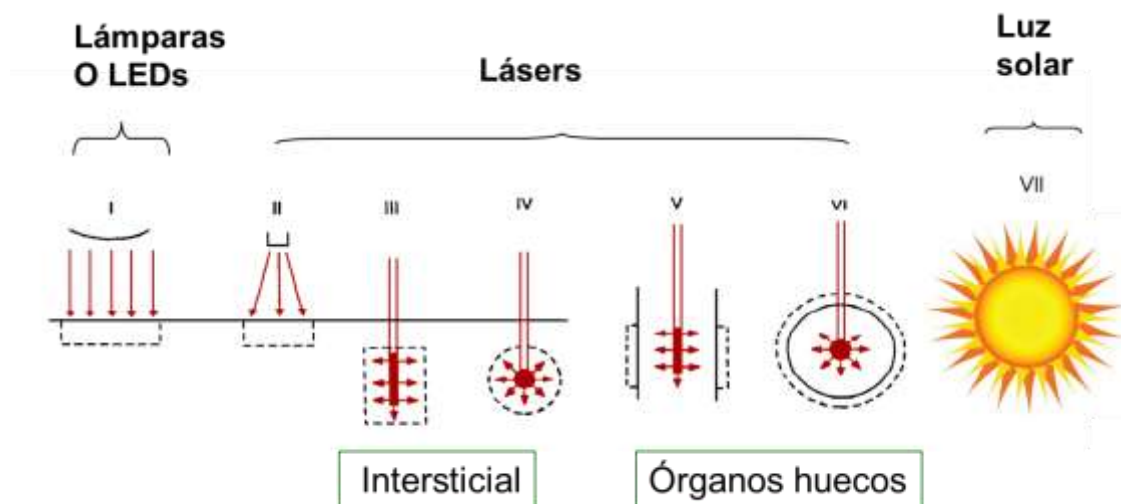


Figura9: Fuentes de luz empeladas en TFD y TFDA

5.5 Ácido 5-aminolevulínico y derivados para TFDA

5.5.1 Acido 5-aminolevulínico ALA como pro-fotosensibilizante para la TFDA

El ácido 5-aminolevulínico (ALA) es el precursor en la vía de síntesis de las porfirinas (parte de la biosíntesis del hemo). El ALA no es un FS en sí mismo, pero, dado que durante la síntesis del hemo se producen intermediarios fotosensibilizantes, el ALA ha sido ampliamente empleado como profármaco en la TFD).

En células eucariotas, y la mayoría de las células microbianas, la administración exógena de ALA, conduce a la acumulación de protoporfirina IX (PpIX), un intermediario en la síntesis del hemo, con actividad fotosensibilizante (Figura 9). Sin embargo, en determinados grupos de bacterias, dentro de las cuales se encuentran las Gram positivas, la biosíntesis del hemo se produce por una vía alternativa, donde el principal intermediario con actividad fotosensibilizante que se acumula, es la coproporfirina III (CpIII) (Allison & Sibata, 2008; Dailey et al., 2015; Dailey et al., 2017).

La ventaja terapéutica del ALA radica en su selectividad, ya que los microorganismos (especialmente bacterias y hongos) y las células tumorales y otras células proliferativas suelen tener una mayor capacidad (o vías metabólicas alteradas) para acumular intermediarios con actividad fotosensibilizante, que las células sanas del hospedador. Además, estos compuestos FS generados endógenamente se eliminan de forma natural del organismo, lo que reduce la toxicidad sistémica y el riesgo de fotosensibilidad prolongada en el paciente (efecto secundario común con algunos FS exógenos). Esta característica ha sido aprovechada en diversos contextos clínicos, desde el tratamiento de

cánceres superficiales hasta la inactivación de microorganismos patógenos. En cuanto a su uso clínico, el ALA es utilizado para el tratamiento de algunos tipos de tumores, y se encuentra aprobado por la Administración de medicamentos y Alimentos del gobierno de EEUU, la FDA (Hamblin et al., 2016; Koffi et al., 2014; Songca & Adjei, 2022).

Ha sido demostrado que la concentración de ALA y el tiempo de incubación en oscuridad (período en el que las porfirinas fotosensibilizantes son producidas y acumuladas), son variables críticas para la acumulación de FS y, por ende, para la eficacia del tratamiento (Allison & Sibata, 2008; Bohm et al., 2020; Wang et al., 2017).

En particular nuestro grupo, ha presentado evidencia de que el ALA puede ser un buen pro-FS tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, en estado planctónico o formando biopelículas (Bohm et al., 2020).

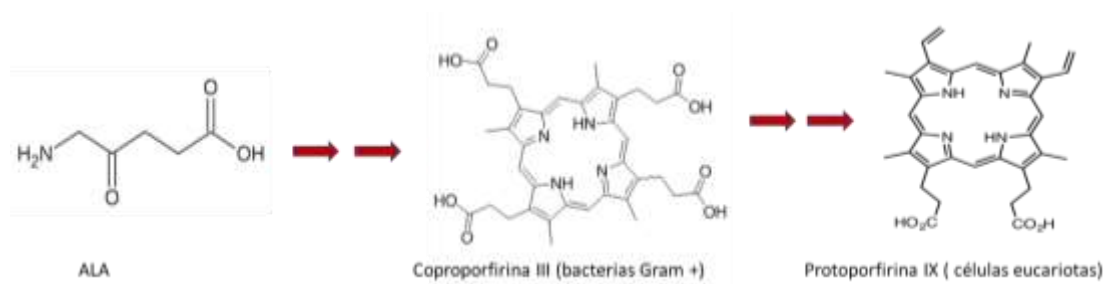


Figura 10: Camino biosintético simplificado de porfirinas

5.5.2 Derivados del ALA: Hexil-ALA

Para aumentar la biodisponibilidad del ALA, se han desarrollado distintos derivados que posean mayor liposolubilidad.

En particular, derivados del ALA obtenidos por esterificación con moléculas orgánicas, son capaces de aumentar la fluorescencia *in vivo* en tumores respecto a la obtenida empleando ALA. Por otra parte, uno de estos derivados, ALA hexil éster (H-ALA), fue aprobado por la FDA de EEUU para su uso en la fotodetección de cáncer de vejiga, y en Europa, para el tratamiento de algunos tipos de cánceres de piel, sin embargo, su uso se encuentra restringido a aplicaciones superficiales debido a la toxicidad intrínseca que posee al ser administrado sistémicamente (Casas, 2020).

Existen escasos reportes sobre el uso del H-ALA en el área de TFDA. Fotinos y colaboradores estudiaron la acción bactericida de diversos derivados del ALA en *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, y concluyeron que el H-ALA no presentaba una buena actividad fotosensibilizante debido a la toxicidad intrínseca en oscuridad. Por otra parte,

empleando un modelo de heridas en ratón infectadas con *S. aureus* y *E. coli*, Sajjad y colaboradores, informaron una mayor tasa de curación, luego del tratamiento con H-ALA-TFDA, lo que sugiere un efecto beneficioso en la regeneración de tejidos, sin registrarse efectos adversos en parámetros fisiológicos tras el tratamiento tópico (Fotinos et al., 2008; Sajjad et al., 2021).

6. Detección y seguimiento de infecciones por fluorescencia a partir de ALA

Las técnicas radiológicas actualmente utilizadas para la localización de infecciones y para orientar la toma de muestras y resección del tejido infectado presentan limitaciones en cuanto a especificidad, ya que únicamente detectan cambios generales asociados a la respuesta inflamatoria. Esto ha impulsado el interés en métodos alternativos que utilicen marcadores de fluorescencia para la detección de infecciones bacterianas, aunque en la literatura aún existe un escaso número de trabajos que exploren el uso de porfirinas para este propósito (Al Mohajer et al., 2014; Gotthardt et al., 2013; Signore et al., 2010; Welling et al., 2019).

En este contexto, la fluorescencia bacteriana ha emergido como una herramienta diagnóstica que permite la visualización en tiempo real de la colonización en heridas o infecciones clínicas (Rennie et al., 2017). En particular, la emisión de luz violeta (405 nm) de baja intensidad, permite excitar fluoróforos endógenos presentes en determinadas bacterias, permitiendo detectar señales de fluorescencia roja o cian como indicadores pronósticos de infección. Por ejemplo, en una serie de casos realizada por Hill y colaboradores, se detectó fluorescencia endógena en heridas superficiales de pacientes infectados: el tejido colagenoso emitió una fluorescencia verde, *S. aureus* productora de porfirinas mostró fluorescencia roja y *Pseudomonas aeruginosa*, productora de pioverdina, exhibió fluorescencia cian. No obstante, este método se limita a aquellas bacterias que producen moléculas fluorescentes en las capas más superficiales de la piel (Hill et al., 2018; Welling et al., 2019).

En este contexto, la detección de la señal de fluorescencia de porfirinas endógenas sintetizadas a partir de ALA, ha surgido muy recientemente y con escasos reportes, como una herramienta para el diagnóstico de infecciones. El ALA puede inducir la acumulación de, principalmente PpIX en células eucariotas (sobre todo en tejidos con elevada actividad metabólica, como ocurre en células infectadas e inflamatorias) y múltiples especies de microorganismos; o bien, inducir la acumulación de otras porfirinas, tales como la CpIII, en algunas especies bacterianas como *S. aureus*. Al excitarse con longitudes de onda de alrededor de 400 nm (pico de mayor absorción en porfirinas), las diferentes porfirinas acumuladas, emiten fluorescencia roja, permitiendo la detección de las áreas afectadas.

Este método ha sido propuesto recientemente para identificar infecciones subclínicas o latentes en las que las técnicas diagnósticas convencionales pueden fallar. Sin embargo, los desafíos asociados al diagnóstico y desbridamiento de heridas infectadas mediante detección de fluorescencia inducida por ALA, incluyen: la limitada penetración de la luz violeta (de excitación) en los tejidos, la variabilidad en los niveles de porfirinas entre microorganismos, y la presencia de bacterias que no las producen (Li et al., 2022, Sahu et al., 2024).

Sahu y colaboradores, consiguieron visualizar la carga bacteriana en un modelo de herida superficial tras la inoculación tópica con una cepa MRSA. La fluorescencia de las porfirinas permitió diferenciar entre heridas infectadas y no infectadas, detectando una carga bacteriana clínicamente relevante. Aunque el patrón de fluorescencia variaba según el tiempo de incubación con ALA y el tiempo post-infección, la heterogeneidad en la fluorescencia se correlacionó con los resultados obtenidos mediante tinción de Gram, sugiriendo la presencia de focos de biopelícula. La ausencia de fluorescencia roja en el tejido de granulación tratado con ALA, destacó la selectividad de esta técnica (Sahu et al., 2024).

En congruencia con lo anterior, ha sido reportado, en un modelo murino de heridas abrasivas, que la aplicación de ALA permitió visualizar una biopelícula polimicrobiana, a partir de la emisión de fluorescencia roja brillante (bajo irradiación con luz azul). En este caso, la biopelícula estuvo compuesta por *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *S. aureus* (microorganismos productores de fluoróforos), junto a *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (microorganismos que no emitieron fluorescencia en esas condiciones). Estos resultados, demuestran que el ALA es capaz de facilitar la identificación precisa de focos de infección. Esto podría resultar de gran utilidad para orientar el desbridamiento, la fototerapia dirigida y la evaluación de los resultados del tratamiento (Li et al., 2022).

Finalmente, Wang y colaboradores demostraron que el diagnóstico por fluorescencia asistido por ALA es efectivo para identificar tanto lesiones verrugosas como subclínicas, así como infecciones latentes por HPV, proponiendo esta técnica como una herramienta útil en el manejo de verrugas genitales. Además, el ALA ha sido empleado simultáneamente para la visualización y tratamiento del acné (Serini et al., 2019) y las caries dentales (Lashkari et al., 2019; Wang et al., 2008).

La teragnosis es la integración estratégica de diagnóstico y terapia en una sola plataforma tecnológica, que permite la identificación de dianas moleculares específicas mediante técnicas de imagen diagnóstica y su posterior tratamiento dirigido utilizando el mismo

sistema molecular o uno químicamente relacionado. De esta manera, se ha propuesto al ALA como un agente promisorio en la teragnosis de infecciones bacterianas.

7.Terapia Fototérmica mediante NIR

7.1 Conceptos generales

La Terapia Fototérmica (TFT) involucra el uso de láseres que emiten radiación en el infrarrojo cercano (NIR, del inglés near-infrared radiation) para alcanzar efectos biológicos. Aunque coloquialmente se habla de luz infrarroja, técnicamente se trata de radiación por tratarse de la región no visible del espectro electromagnético.

La TFT puede dañar a las bacterias mediante efectos térmicos directos, debidos a la absorción de los fotones NIR por las moléculas de agua, lo cual lleva al incremento de la energía vibracional de las mismas, y, en consecuencia, el aumento de la temperatura en el medio celular. Alternativamente, los fotones pueden ser absorbidos por cromóforos específicos dentro o fuera de la bacteria, generando ROS que dañan componentes celulares como la membrana o la matriz de la biopelícula, en un proceso denominado efecto no térmico de la TFT. Los efectos fototérmicos generalmente requieren temperaturas superiores a 45 °C para reducir la viabilidad bacteriana. No obstante, se ha reportado que incluso dosis moderadas de NIR pueden alterar la membrana celular bacteriana, aumentando su susceptibilidad a otros agentes antimicrobianos. Además, la radiación NIR puede modificar el crecimiento bacteriano, dependiendo de varios factores como la longitud de onda empleada, la dosis, la fluencia, la potencia, el tiempo de irradiación, la modalidad del tratamiento, y la cepa bacteriana. Por ejemplo, se ha descrito que el crecimiento de *E. coli* puede verse inhibido o estimulado dependiendo de las condiciones de exposición (Lambert et al., 2022; Zhang et al., 2019).

La efectividad de la TFT en la eliminación de biopelículas bacterianas ha sido reportada por varios autores. En estos trabajos, se argumenta que los efectos se producen tanto por el calentamiento del agua presente en el sistema (efectos térmicos directos, y formación de microburbujas que romperían la estructura de la biopelícula), como por la absorción de cromóforos internos bacterianos (citocromo C o diferentes pigmentos), que contribuirían a los efectos térmicos, pero además podrían generar ROS. Si bien la TFT al ser empleada a dosis bajas, induce reducciones de viabilidad bajas o inclusive nulas, ha sido reportado que al combinarse con otros tratamientos antimicrobianos tales como antibióticos u ondas de choque, puede conseguirse incrementar el daño producido por los mismos (Krespi et al., 2009; Krespi et al., 2011; Neuman et al., 1999; Sennhenn-Kirchner et al., 2007).

En relación al uso combinado de la TFT con un segundo tratamiento antimicrobiano, nuestro grupo ha obtenido resultados utilizando irradiación láser de 980 nm (que nunca elevó la temperatura por encima de los 45°C). Con la TFT llevada cabo en estas condiciones, se registraron daños en la estructura de la biopelícula de *S. aureus*, con la consecuente liberación al medio líquido de microorganismos presentes en ella. Si bien la reducción de la viabilidad de las bacterias debido a la TFT fue leve, estos efectos destabilizantes sobre la biopelícula aumentaron la captación del FS por parte de las bacterias e incrementaron el daño producido por la TFDA (empleando luz visible) que se llevó a cabo a continuación. Si bien esta estrategia de combinación de tratamientos mediados por irradiaciones (NIR y luz visible) incrementó el daño sobre las bacterias, la interacción entre ambos tratamientos (TFT y TFDA) dependió del FS empleado. Al emplear como FS una porfirina sintética tetracatiónica o el compuesto natural curcumina, los efectos de reducción de viabilidad bacteriana fueron sinérgicos, mientras que, al emplear azul de toluidina, los efectos fueron aditivos (Gándara et al., 2017; Mamone et al., 2024).

7.2 Modalidades de radiación continua y pulsada en la TFT

La TFT empleando dispositivos láser puede realizarse de dos formas: irradiando con un haz continuo o pulsado. En el modo continuo de la TFT (TFTc), el láser emite radiación de manera ininterrumpida durante todo el período de tratamiento, lo que permite una transferencia constante de energía a los tejidos. En esta modalidad el calentamiento es constante, al igual que la entrega de energía al tejido blanco.

Por otro lado, el modo pulsado de la TFT (TFTp) implica la emisión intermitente de radiación, alternando períodos de emisión (pulsos) con intervalos de descanso. Esta modalidad permite la disipación parcial del calor durante los intervalos entre pulsos, lo que puede reducir el daño térmico a los tejidos circundantes, obteniéndose aumentos de temperatura más “lentos” que en la modalidad continua. Además, el modo pulsado ofrece la posibilidad de administrar picos de potencia más elevados sin aumentar significativamente la temperatura media del tejido, lo que puede generar efectos fotomecánicos adicionales, como ondas de presión transitoria que contribuyen a la disrupción física de biopelículas bacterianas (Anderson et al., 1983; Vogel et al., 2003; Xu et al., 2021; Zhao et al., 2023).

La elección entre estas modalidades depende de varios factores, incluyendo el objetivo terapéutico específico y la tolerancia térmica del tejido diana. Estudios comparativos han demostrado que la irradiación en modo pulsado puede resultar más efectiva para la

penetración de agentes terapéuticos a través de barreras biológicas con menor daño térmico (Khatri et al., 2007). Trabajando con biopelículas bacterianas, Soukos y colaboradores, observaron que la irradiación pulsada con láser NIR generaba microcavitaciones transitorias que perturbaban la integridad estructural de la matriz, aumentando la accesibilidad de agentes antimicrobianos (Soukos et al., 2015).

En cuanto a la estimulación metabólica y de procesos biológicos, el modo pulsado ha mostrado efectos distintivos. Hashmi y colaboradores han reportaron que la irradiación pulsada de baja frecuencia (de emisión de pulsos) podía inducir respuestas celulares a través de mecanismos no térmicos, incluyendo la activación de vías de señalización sensibles a cambios en los estados redox celulares (Hashmi et al., 2010). Estas observaciones son particularmente relevantes para la optimización de protocolos de TFT destinados a estimular procesos biosintéticos, como la síntesis de porfirinas a partir de los precursores ALA y H-ALA.

Los parámetros del pulso, como la duración, frecuencia y ciclo de trabajo (duty cycle), representan una fuente adicional de variabilidad en los efectos fotobiológicos de la TFTp. Por ejemplo, frecuencias de pulso en el rango de 10-100 Hz han demostrado estimular la producción de ATP mitocondrial en células eucariotas, en lugar de generar daños celulares. Este efecto podría ser aprovechado para potenciar el metabolismo, y consecuentemente, la síntesis y acumulación de FS endógenos previo a la TFDA (Silveira et al., 2009).

Desde una perspectiva clínica, la modalidad pulsada presenta ventajas adicionales para aplicaciones *in vivo*, ya que permite controlar con mayor precisión los efectos térmicos, reduciendo el riesgo de daño a tejidos adyacentes. La implementación de protocolos pulsados optimizados, podría proporcionar un equilibrio favorable entre la eficacia en la disrupción de biopelículas bacterianas, y la prevención del daño térmico en los tejidos del huésped durante la TFT (Bora et al., 2022).

8. Fotobiomodulación

La FBM es un fenómeno caracterizado por la capacidad de la luz, en particular la de longitudes de onda en el rojo e infrarrojo cercano, de modular procesos biológicos en los tejidos. Este efecto está mediado por la absorción de cromóforos intracelulares.

Entre los efectos producidos sobre los tejidos, la FBM puede desencadenar respuestas como la estimulación de la proliferación celular, la diferenciación de células madre, aumento de la producción de ATP en las mitocondrias, y regulación de la inflamación,

dependiendo de parámetros como la potencia, duración y densidad de energía de la irradiación empleada. Estas propiedades han llevado al desarrollo de terapias basadas en luz, con la capacidad de favorecer la regeneración tisular y acelerar la cicatrización de heridas, con reducción del dolor y los procesos inflamatorios (Dompe et al., 2020).

Entre sus aplicaciones clínicas, se destaca el alivio del dolor asociado a neuropatías periféricas, la optimización de la cicatrización en úlceras diabéticas y su potencial contribución a la regulación de niveles glucémicos. Las fuentes lumínicas empleadas en FBM incluyen diodos emisores de luz, sistemas de luz polarizada, dispositivos semiconductores y láseres de diodo. Los efectos terapéuticos son dependientes de las longitudes de onda empleadas en la irradiación.

Por ejemplo, a dosis elevadas sobre heridas en la piel, la luz azul inhibe los procesos de proliferación y migración de queratinocitos, e induce la generación de ROS en el tejido, comprometiendo la función de barrera cutánea e interfiriendo con los procesos de cicatrización. En contraste, la luz roja, mediante efectos fotoquímicos y fototérmicos, potencia la actividad mitocondrial, incrementa la producción energética celular, mejora la perfusión tisular, reduce la respuesta inflamatoria y estimula la síntesis de colágeno y la regeneración celular en el área lesionada, favoreciendo así la cicatrización (Zhang et al., 2024).

La luz roja e infrarroja, son las más frecuentemente empleadas en estudios de cicatrización, utilizando láseres y LEDs. Los sistemas láser típicamente emplean luz roja (600-700 nm) y radiación NIR (700-1100 nm), que presentan elevada capacidad de penetración dérmica y promueven procesos celulares reparativos y regenerativos. Los dispositivos LED ofrecen un amplio rango de longitudes de onda, aunque generalmente proporcionan menor densidad de potencia en comparación con los sistemas láser.

Es importante señalar que mientras las dosis elevadas de NIR desencadenan efectos fototérmicos (TFT), la aplicación de bajas dosis genera respuestas biomoduladoras (de Freitas & Hamblin, 2016; Tsai & Hamblin, 2017).

Adicionalmente, se ha documentado que la irradiación con luz ultravioleta (UV) sobre abscesos cutáneos (ocasionados por *S. aureus*) produce una disminución en las dimensiones de las lesiones, sin reducir la carga bacteriana. Estos resultados se adjudican a efectos proinflamatorios producidos por la irradiación (Cela et al., 2022).

Han sido documentados extensamente los efectos beneficiosos de la FBM empleando NIR en modelos experimentales *in vivo*, particularmente en la cicatrización de heridas. Trabajos llevados a cabo en ratones han demostrado mejoras significativas en la

proliferación celular, la producción de colágeno y la velocidad de cierre de heridas quirúrgicas (Enwemeka et al., 2004; Posten et al., 2005). Específicamente, estudios en ratones con úlceras por presión, revelaron un efecto positivo en la cicatrización, independiente de la temperatura superficial, mientras que, en modelos de quemaduras en ratas, la luz roja e infrarroja aceleró la reparación tisular y la síntesis de colágeno (Kuamoto et al., 2025; Viecei et al., 2024). Estos hallazgos en modelos animales se complementan con estudios preliminares en pacientes humanos, como los reportados por Borges y colaboradores, donde tanto la luz roja e infrarroja fueron beneficiosas en el tratamiento de úlceras de pie diabético (Borges et al., 2004). El uso de la luz roja en el tratamiento de heridas es incipiente y es uno de los objetivos planteados en esta Tesis.

La FBM, aunque no posee efectos bactericidas directos potentes, ha demostrado capacidad para modular la respuesta inmune local, reducir la inflamación y acelerar la cicatrización de heridas infectadas, creando un microambiente menos favorable para la persistencia bacteriana. Esta modalidad terapéutica resulta particularmente valiosa como adyuvante en el manejo de heridas crónicas infectadas por MRSA, donde el control de la inflamación y la regeneración tisular son tan importantes como la reducción de la carga bacteriana (Freitas & Hamblin, 2016).

La necesidad de ampliar la evidencia experimental y la comprensión de los fenómenos implicados en las terapias asistidas por radiaciones, así como, la validación empírica de dichos resultados en sistemas biológicos complejos, impulsa la presente investigación, que busca contribuir al desarrollo de las terapias asistidas por luz como alternativa terapéutica.

9. Conclusiones generales de terapias fotoasistidas por luz visible e infrarroja

9.1 Ventajas de las terapias fotoasistidas

Las terapias basadas en luz ofrecen ventajas potenciales frente a los tratamientos convencionales para infecciones, que se resumen a continuación (Wainwright et al., 2017; García et al., 2021; Zhao et al., 2020):

1. Mecanismo de acción multi-diana: A diferencia de los antibióticos que suelen tener dianas moleculares específicas, la TFDA y la TFT afectan simultáneamente múltiples estructuras celulares, desde membranas y proteínas hasta ácidos nucleicos. Esta característica minimiza el desarrollo de resistencias.

2. Eficacia contra biopelículas: La penetración de la luz y los FS en biopelículas, aunque limitada, resulta suficiente para generar efectos desestabilizadores en la matriz extracelular que potencian la eficacia de tratamientos posteriores.
3. Selectividad relativa: Determinados FS o compuestos precursores de FS, como el ALA, muestran acumulación preferencial en células bacterianas frente a células de mamíferos, que permitirían inactivar microorganismos, limitando el daño a los tejidos circundantes.
4. Efectos inmunomoduladores: Además de sus efectos antimicrobianos directos, la TFDA y la FBM ejercen efectos moduladores sobre la respuesta inmune, favoreciendo la transición desde fases pro-inflamatorias hacia fases regenerativas, aspecto crucial en infecciones crónicas donde la inflamación descontrolada contribuye a la persistencia bacteriana.
5. Efectos localizados: La naturaleza localizada de estas terapias, permite evitar efectos sistémicos adversos, como, por ejemplo, los asociados a los antibióticos.

9.2. Limitaciones y desafíos de las terapias fotoasistidas en el tratamiento de infecciones

A pesar de su potencial, la generalización del uso clínico de terapias mediadas por luz para tratar infecciones microbianas presenta varios desafíos (Sridharan et al., 2021; Hu et al., 2018; Wiehe et al., 2019):

1. Penetración tisular limitada: La luz visible utilizada en TFDA penetra solo unos pocos milímetros en tejidos, limitando su aplicación a infecciones superficiales o accesibles mediante dispositivos de administración de luz. La radiación infrarroja empleada en TFT presenta mayor penetración, aunque sigue siendo insuficiente para infecciones profundas.
2. Estandarización de protocolos: La heterogeneidad en parámetros como tipo y concentración de FS, tiempo de incubación, fuentes de luz, longitudes de onda, fluencias y regímenes de aplicación, dificulta la comparación entre estudios y el establecimiento de protocolos optimizados.
3. Infraestructura tecnológica: La implementación requiere equipamiento específico que puede no estar disponible en todos los centros asistenciales, particularmente en entornos con recursos limitados.
4. Evidencia clínica limitada: Aunque numerosos estudios preclínicos y pequeños ensayos clínicos muestran resultados prometedores, aún se requieren ensayos clínicos controlados a gran escala que demuestren la eficacia y seguridad de estas terapias en diferentes escenarios clínicos.

La necesidad de ampliar la evidencia experimental y la comprensión de los fenómenos implicados en las terapias asistidas por radiaciones, así como, la validación empírica de dichos resultados en sistemas biológicos complejos, impulsa la presente investigación, que busca contribuir al desarrollo de la TFDA como alternativa terapéutica.

Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

La presente investigación se fundamenta en las siguientes hipótesis:

1. La Terapia Fotodinámica antimicrobiana (TFDA) mediada por ácido 5-aminolevulínico (ALA) y su derivado hexilado H-ALA puede inactivar eficazmente biopelículas de *S. aureus*, incluyendo cepas resistentes a meticilina.
2. La Terapia Fototérmica (TFT) con radiación infrarroja cercana puede potenciar el efecto bactericida de la TFDA mediante la desestabilización de la matriz extracelular de la biopelícula y/o el aumento en la producción de porfirinas, produciendo un efecto sinérgico.
3. La eficacia de estas terapias observada *in vitro* puede extrapolarse a modelos *in vivo* de infecciones cutáneas causadas por *S. aureus*.
4. Las terapias basadas en luz pueden modular la respuesta inmune local y favorecer la cicatrización de heridas infectadas, contribuyendo a una resolución más rápida y efectiva de las infecciones.

2. Objetivo general

Desarrollar y evaluar nuevas estrategias terapéuticas basadas en luz para el tratamiento y seguimiento de infecciones bacterianas superficiales causadas por *Staphylococcus aureus*.

3. Objetivos específicos

Evaluar la eficacia *in vitro* de la TFDA mediada por ALA y H-ALA contra biopelículas de *S. aureus* MSSA y MRSA.

- Determinar las condiciones óptimas de tratamiento (concentración de fotosensibilizadores, tiempo de incubación, dosis de luz).
- Cuantificar la producción de porfirinas a partir de ALA y H-ALA en las biopelículas bacterianas.
- Evaluar la viabilidad bacteriana tras la aplicación de TFDA bajo diferentes parámetros de tratamiento.

Investigar el posible efecto sinérgico entre TFT y TFDA en la inactivación de biopelículas de *S. aureus* *in vitro*.

- Establecer los parámetros óptimos de TFT (potencia, modo continuo vs. pulsado, tiempo de irradiación) que no comprometan la viabilidad de células eucariotas.
- Determinar si la aplicación de TFT incrementa la producción de porfirinas a partir de ALA y H-ALA.
- Evaluar si la combinación TFT-TFDA produce mayor reducción de viabilidad bacteriana que cada terapia por separado.
- Analizar mediante microscopía la distribución de porfirinas en biopelículas tratadas con TFT.

Desarrollar y caracterizar modelos murinos de infecciones cutáneas por *S. aureus* y de heridas no infectadas.

- Establecer modelos de abscesos cutáneos infectados con *S. aureus* viable e inactivado térmicamente.
- Implementar modelos de heridas superficiales no infectadas mediante diferentes metodologías (raspado con bisturí, incisión por punch).
- Caracterizar la progresión natural y resolución de las lesiones en cada modelo.

Evaluar el potencial del ALA y H-ALA como agentes de fotodiagnóstico para la detección de infecciones bacterianas *in vivo*.

- Determinar la cinética de acumulación de porfirinas en tejidos infectados tras la aplicación de ALA y H-ALA.
- Identificar la distribución tisular de las porfirinas mediante estudios de fluorescencia macroscópica y microscópica.
- Optimizar los parámetros de adquisición de imágenes para la visualización de fluorescencia *in vivo*.

Determinar la eficacia de la TFDA, TFT y su combinación en el tratamiento de abscesos cutáneos por *S. aureus* *in vivo*.

- Evaluar el efecto de diferentes dosis lumínicas de TFDA sobre la resolución de abscesos.
- Cuantificar la carga bacteriana en los tejidos infectados a diferentes tiempos post-tratamiento.
- Aplicar TFT en modo continuo y pulsado, y su combinación con TFDA, evaluando su impacto en la evolución de las infecciones.

-Analizar los efectos de las terapias sobre el sistema inmune local mediante la cuantificación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

Estudiar los efectos de la TFDA y TFT sobre la cicatrización en modelos de heridas no infectadas.

- Comparar los efectos de ambas terapias en diferentes modelos de heridas no infectadas.
- Evaluar la evolución y el aspecto macroscópico de las heridas tras la aplicación de los tratamientos.
- Determinar las condiciones óptimas de tratamiento para cada tipo de herida.

Materiales y métodos

1. Reactivos

Se empleó ALA de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). El H-ALA se preparó mediante el método de Takeya (Takeya, 1992), haciendo reaccionar ALA con hexanol en presencia de cloruro de tionilo, obteniéndose el H-ALA como sal clorhidrato (HCl), tal como fue descrito en Casas et al. (1999). Las soluciones de ALA y H-ALA se prepararon en agua estéril. Los estándares de porfirinas se obtuvieron de Frontier Scientific (Logan, UT). Todos los solventes y reactivos restantes empleados fueron de grado analítico y se usaron sin purificación adicional.

2. Ensayos *in vitro*

2.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivos

Las bacterias se cultivaron en caldo tripteína de soja (TSB - DIFCO, EE. UU.) y se almacenaron en 20% de glicerol a -20 °C hasta su uso. Para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) se realizaron cultivos en agar tripteína de soja (TSA - DIFCO, EE. UU.). Las cepas bacterianas utilizadas fueron RN6390 (Horsburgh et al., 2002) sensible a meticilina y ST5-SCCmecImetilino-resistente. Esta última, es una de las cepas resistentes de mayor incidencia en las infecciones nosocomiales de nuestro país (Di Gregorio et al., 2023). Para generar los cultivos de las diferentes cepas, en primer lugar, se inocularon 3 ml de TSB con bacterias provenientes de una única colonia (crecida en TSA), y el cultivo se incubó durante 20 h (*overnight*) en agitación moderada (150-200 rpm) a 37°C. A partir de estos cultivos, se obtuvieron los cultivos frescos empleados para llevar a cabo los diferentes ensayos con bacterias en suspensión (cultivos planctónicos), y biopelículas tal como se describe a continuación.

2.2 Cultivos planctónicos

Los cultivos planctónicos se realizaron inoculando TSB con una alícuota de cultivo *overnight* (1:25) hasta alcanzar la fase estacionaria. Luego se incubó la suspensión a 37°C y agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,7 (fase exponencial de crecimiento). A continuación, se centrifugó el cultivo a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C, y se lavó dos veces con PBS (pH 7,4) estéril y el pellet de bacterias final obtenido, se re-suspendió empleando el mismo buffer. Finalmente, se sembraron 500 µl de esta suspensión de bacterias en pocillos de placas de poliestireno de 24 pocillos, estériles y se emplearon inmediatamente para implementar los distintos tratamientos.

Estas condiciones se utilizaron tanto para los ensayos de viabilidad bacteriana como para los de cuantificación de producción de porfirinas.

2.3 Cultivos de biopelículas

Para la formación de biopelículas, una alícuota de cultivo *overnight* se inoculó (1/100) en medio TSB suplementado con glucosa al 0,25%. Se inocularon 500 µl de este cultivo, en pocillos de placas de cultivo estériles de poliestireno (24 pocillos) con fondo plano. Luego de 24 h de incubación estática a 37°C se pudo corroborar la formación de las biopelículas en el fondo del pocillo. Las biopelículas formadas se lavaron 3 veces con PBS para desechar las bacterias no adheridas, y se mantuvieron en PBS para llevar a cabo los tratamientos. Similar proceso se realizó cuando las biopelículas crecieron sobre placas de titanio autoclavado o cubreobjetos estéril (microscopía confocal de fluorescencia). En todos los casos se emplearon biopelículas de 24 h de desarrollo.

2.4 Tratamientos mediados por luz de los cultivos

Tanto los cultivos planctónicos como las biopelículas formadas sobre las distintas superficies se incubaron a 37°C en oscuridad en ausencia o presencia de ALA o su derivado H-ALA (durante este período se espera que los microorganismos sintetizen porfirinas a partir de los precursores). A continuación, los tratamientos de TFDA y control de irradiación se realizaron durante diferentes tiempos y a distintas potencias, según la fuente de luz utilizada y el esquema experimental seleccionado (ver secciones 2.4.1). Los tratamientos establecidos fueron: bacterias expuestas al pro-fotosensibilizante sin iluminar; bacterias sólo expuestas a la luz y bacterias sin tratamiento (control).

En el caso de la aplicación del tratamiento TFT, la radiación lumínica se entregó inmediatamente después de administrar el pro-fotosensibilizante (ALA o H-ALA) y a continuación se realizó la incubación en oscuridad mencionada previamente.

2.4.1 Fuentes de luz empleadas en TFDA

Para la aplicación de la TFDA se utilizaron dos tipos de fuentes lumínicas. La primera fue una luz no-coherente que consistió en un arreglo de dos focos halógenos de tungsteno ELH (500 W, General Electric Co., Cleveland, OH, EE.UU.) dispuestas a 25 cm de distancia de las muestras. La energía total entregada fue de $151,1 \pm 1,7 \text{ J/cm}^2$ (irradiación durante 60 min). La placa multiwell con los cultivos tratados fue colocada, como se

muestra en la Figura 1, sobre una superficie de vidrio entre dos botellas de agua, para disipar el calor producido por las lámparas y eliminar así, las contribuciones de la radiación infrarroja. La iluminación se llevó a cabo desde arriba de las placas. Estas botellas fueron reemplazadas cada 20 min, para evitar el aumento de temperatura en los cultivos bacterianos.



Figura 1: Fuente de luz no coherente para TFDA: lámparas halógenas

La otra fuente de luz empleada consistió en un dispositivo láser (luz coherente) de longitud de onda 635 nm (Lumiia S.A., Argentina) acoplado a una fibra óptica con difusor plano, como muestra la Figura 2. Los tratamientos se llevaron a cabo empleando una fluencia de $280\text{J}/\text{cm}^2$ y tiempos de exposición entre 2 y 15 min. En este caso, las placas conteniendo las bacterias se iluminaron desde abajo.

La medición de potencia de las diferentes fuentes lumínicas se llevó a cabo utilizando un medidor de potencia con un sensor PM10 (Fieldmaster Coherent USA).

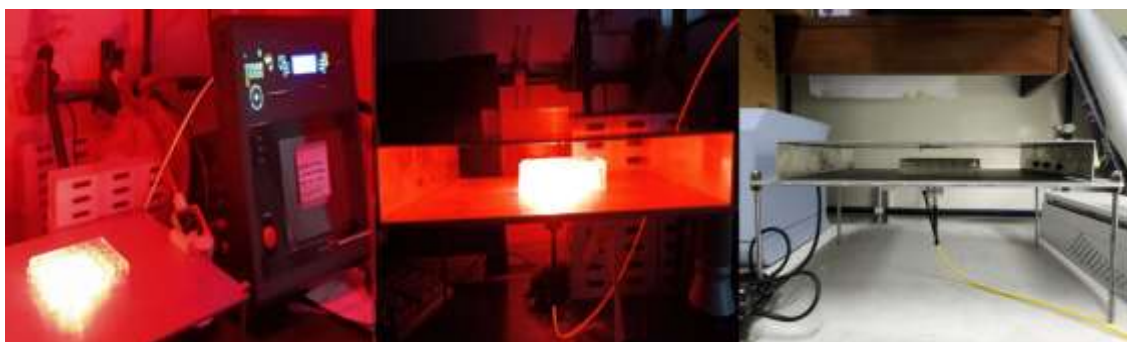


Figura 2: Fuente de luz coherente para TFDA: láser 635 nm

2.4.2 Fuente de luz empleada en TFT

Para llevar a cabo la TFT, se utilizó un láser NIR de diodo LumiiiaSonoBeam (Lumiia SA, Argentina) con una longitud de onda de 980 nm y una composición de InGaAsP. La fibra óptica del láser posee un tamaño de núcleo de 600 μm y una apertura numérica de 0,22, lo que garantiza uniformidad del punto de menos de $\pm 15\%$ (Figura 3). La energía del láser se moldeó utilizando una lente biconvexa ($f = 25\text{ mm}$, $D = 15\text{ mm}$, Thorlabs Inc., New Jersey, EE. UU.). Esta configuración aseguró una densidad de energía constante a lo largo del diámetro del punto de iluminación, lo que resultó en un patrón de irradiación uniforme en un área transversal de 18 mm de diámetro. Este sistema facilitó la iluminación de los pocillos desde abajo. El láser se empleó en modo continuo o pulsado empleando distintos tiempos, potencias y frecuencias que serán detallados en la sección correspondiente de Resultados (ver sección I.1 de Capítulo I). La medición de potencia se llevó a cabo utilizando un medidor de potencia Coherent FieldMax II, equipado con un sensor Coherent PM150-50C (Coherent, Santa Clara, EE. UU.).



Figura 3: Fuente de luz NIR para TFT: láser 980 nm

2.4.2.1 Determinación de incremento de temperatura en PBS irradiado con láser de 980nm

El incremento de temperatura se determinó en 500 μl de PBS colocado en un pocillo de una placa de 24 wells y monitoreando la temperatura con un multímetro marca UNI-T

modelo UT70A. Se tomaron medidas cada 10 s por triplicado en cada caso para construir los perfiles de aumento de temperatura para cada esquema de irradiación evaluado.

2.5 Determinación de bacterias viables

Para determinar las UFC/ml en el cultivo bacteriano se realizó una suspensión inicial de bacterias en PBS, a partir de la disrupción y homogenización de la biopelícula, raspando el fondo de cada pocillo con la punta de un tip estéril amarillo. La mezcla resultante se pipeteó repetidamente para disgregar la biopelícula y liberar las bacterias atrapadas en la matriz extracelular, asegurando así una suspensión homogénea. A partir de la suspensión inicial, se realizaron diluciones seriadas en PBS estéril. Finalmente, se sembraron 20 μ l de cada dilución sobre placas de TSA. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en aerobiosis y oscuridad. Seguidamente se contaron las colonias desarrolladas en las gotas correspondientes a las diluciones en las que se observó un número de entre 6 y 60 colonias por gota. Se realizaron duplicados de cada dilución para asegurar la precisión de los resultados.

Igual procedimiento se llevó a cabo para los cultivos planctónicos, los cuales no requirieron el paso adicional de disrupción.

2.6 Determinación de la estabilidad de ALA luego de TFT y calentamiento

La determinación de ALA se realizó según el método de Mauzerall y Granick (1956). Se mezclaron 0,5 ml de buffer acético-acetato 1M pH 4,6 conteniendo la muestra de ALA, con 0,05 ml de acetil acetona y el sistema se calentó 10 min en un baño a 100° C. Luego de enfriar, se mezcló el producto de reacción, con igual volumen del reactivo de Ehrlich y a los 8 min se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a 555 nm.

2.7 Extracción y cuantificación de porfirinas

La extracción de porfirinas sintetizadas a partir de ALA y H-ALA se realizó a partir de una modificación del método empleado por Cox y Charles (Cox & Charles, 1973). En primer lugar, se separaron las bacterias del PBS mediante centrifugación a 13000 rpm durante 10 min a 4 °C. Al sobrenadante (PBS) se colocó directamente en 2 ml de HCl 5% para cuantificar las porfirinas extracelulares, que han sido liberadas al medio.

Los precipitados de bacterias se resuspendieron en 2 ml de una solución de acetato de etilo: ácido acético glacial (4:1, v/v) y se incubaron a 4°C durante 24 h en agitación. Los restos bacterianos se eliminaron por centrifugación a temperatura ambiente y a la fase orgánica se le agregaron 2 ml de HCl 5%; se agitó la mezcla hasta definirse las dos fases y se conservó la fase acuosa para la determinación de porfirinas.

Una vez extraídas las porfirinas producidas a partir de los diferentes tratamientos, se determinaron los espectros de fluorescencia y se cuantificaron las unidades de fluorescencia en un espectrofluorómetro Perkin Elmer modelo LS55 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.). La longitud de onda de excitación fue de 406nm y la emisión se registró en el intervalo de 550-750nm, registrándose un máximo en 597 nm para el patrón de CpIII, que se empleó como estándar de referencia.

2.8 Análisis de porfirinas por microscopía confocal de fluorescencia

Las biopelículas se sembraron sobre cubreobjetos estériles colocados en placas multiwells y se trataron con 1 mM de ALA y TFT bajo las condiciones descritas anteriormente (ver sección 3.1.3). Después de 1 h de incubación a 37°C en oscuridad, los cubreobjetos se fijaron con formaldehído 4% en PBS y se montaron sobre portaobjetos en medio de montaje antidecoloración ProLong. Las biopelículas se observaron por microscopía confocal de barrido láser (CSLM) empleando un microscopio confocal Zeiss LSM880 (Airyscan). El filtro de excitación fue de 540 nm y para la emisión se utilizó un filtro de paso de banda de 540-700 nm. Se tomaron secciones ópticas de 1,2 μ m, y para cada muestra se adquirieron imágenes de tres campos seleccionados al azar. Las imágenes se procesaron utilizando un software elaborado en lenguaje Python.

2.9 Procesamiento de imágenes de microscopio confocal de fluorescencia

Se aplicó un proceso de estimación y reducción de ruido sobre cada imagen mediante la transformada wavelet discreta utilizando el filtro Daubechies db4 en dos niveles de descomposición (Luisier et al. 2009). En todos los casos, se atenuó la subbanda diagonal de alta frecuencia (HH2) correspondiente al segundo nivel de descomposición con un factor de 0,25, para reducir componentes de ruido preservando los detalles de cada imagen. Luego, las imágenes de control de cada tratamiento se restaron píxel a píxel y capa por capa de las imágenes de las muestras con ALA, y se aumentó el nivel de brillo en la misma proporción a todas las imágenes para mejorar la visualización. Posteriormente, se creó una proyección tridimensional donde el plano xy contiene la matriz bidimensional (mapa de bits), y el componente z almacena la información de

profundidad proyectada para cada píxel de la suma de cada imagen sin el aumento del brillo. La amplitud en el eje z representa entonces la intensidad normalizada de los píxeles, indicando la cantidad de fluorescencia emitida por las muestras para cada capa en su conjunto, es decir, en toda la biopelícula. Este proceso se repitió para cada pila de imágenes adquiridas para cada tratamiento evaluado, calculando en cada caso el área total bajo la curva.

1.9.1 Cuantificación de fluorescencia en imágenes de microscopía

Para cuantificar la fluorescencia en biofilms obtenidas mediante microscopía confocal, se implementó un enfoque de análisis dual: (1) una reconstrucción tridimensional basada en la suma total de intensidades a lo largo del eje Z, y (2) un análisis estratificado de las diferentes regiones del biofilm (basal, media y apical). El principal desafío metodológico radicó en la disponibilidad de una única secuencia de imágenes por ensayo, imposibilitando el cálculo convencional de desviación estándar basado en réplicas biológicas.

Para superar esta limitación y obtener estimaciones sólidas de la variabilidad en las mediciones de intensidad de fluorescencia, se implementó la técnica de bootstrap espacial (Efron & Tibshirani, 1994). Esta aproximación estadística no paramétrica permite estimar la distribución de un estadístico mediante el remuestreo con reemplazo de los datos disponibles, tratando la heterogeneidad espacial intrínseca de la muestra como fuente de variabilidad.

El bootstrap espacial se fundamenta en principios estadísticos sólidos aplicables al análisis de imágenes biológicas, donde cada región espacial de una imagen puede considerarse como una observación semi-independiente (Dunn et al., 2011). Esta aproximación permite caracterizar la heterogeneidad intrínseca del biofilm y estimar la incertidumbre asociada a las mediciones sin necesidad de múltiples adquisiciones independientes.

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

1. Obtención de imágenes mediante microscopía confocal de fluorescencia y reducción de ruido utilizando transformada wavelet.
2. Análisis dual:
 - Proyección completa: Generación de una proyección sumando todas las intensidades en el eje Z.
 - Análisis estratificado: Selección de imágenes representativas de las regiones basal, media y apical del biofilm.

3. Cálculo del área bajo la curva de intensidad para cada proyección como medida cuantitativa de la fluorescencia.
4. Aplicación del bootstrap espacial con 1000 iteraciones para cada imagen analizada (proyección total y secciones individuales).
5. Para cada iteración de bootstrap, cálculo del área bajo la curva correspondiente.
6. Determinación del intervalo de confianza del 95% a partir de la distribución de valores obtenidos.

El bootstrap espacial es particularmente adecuado para este tipo de análisis estratificado, ya que permite caracterizar la heterogeneidad específica de cada región del biofilm (Bridier et al., 2011; Heydorn et al., 2000). La aplicación de esta técnica tanto a la proyección completa como a las secciones individuales proporciona una visión integral de la distribución espacial de la fluorescencia y su variabilidad asociada. La elección de 1000 iteraciones garantiza una estimación robusta de la distribución del estadístico, mientras que el intervalo de confianza del 95% proporciona un rango en el que se espera que esté contenido el verdadero valor con alta probabilidad (Carpenter & Bithell, 2000).

2.10 Modelo de descontaminación de implantes empleando TFDA a partir de ALA

Se emplearon placas de titanio (material empleado usualmente en implantes odontológicos) de 10 x 20 x 1 mm, que fueron provistas por el Grupo de Biomateriales del Centro de Investigación y Desarrollo en Mecánica del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI). Como se mencionó anteriormente (sección 2.3), las biopelículas se desarrollaron sobre las placas de titanio y se realizaron los tratamientos correspondientes, utilizando las mismas condiciones que en los ensayos sobre placas de poliestireno. La viabilidad bacteriana luego de los tratamientos se determinó mediante recuento de colonias (ver sección 2.5).

2.11 Análisis estadístico

Luego de testeo de normalidad por el test de Kolmogorov-Smirnov, se utilizó ANOVA de una y dos vías, según corresponda, seguido de la prueba post hoc de Tukey para determinar la significancia de las diferencias entre medias obtenidas a partir de los diferentes tratamientos. Los tratamientos se realizaron por duplicado en 3 experimentos independientes. Los datos se graficaron como la media $\pm$ SD. En todos los casos, las pruebas estadísticas se realizaron con el software GraphPad (versión 5.0; GraphPad Prism). Se consideraron como significativos, en todos los casos, los valores de $p < 0,05$.

3. Ensayos *in vivo*

3.1 Ratones CF-1

Se emplearon ratones CF-1 machos de entre 8 y 10 semanas de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Todos los ratones utilizados fueron criados en condiciones óptimas respetando las condiciones de instalaciones, albergue, alimentación, enriquecimiento ambiental, manipulación, manejo y eutanasia humanitaria recomendados, con protocolo aprobado por el Comité Institucional para el uso y cuidado de los animales de laboratorio (CICUAL-Facultad de Medicina-UBA) RESCD- EX-2023-01716330- -UBA-DMEA#FMED.- LA, cumpliendo con las normativas internacionales como la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, bajo los principios de reemplazo, reducción y refinamiento (Hubrecht & Carter, 2019).

3.2 Procedimientos de anestesia

3.2.1 Anestesia por isoflurano

Para la inmovilización de los ratones para tratamiento con láser 980 nm y para la realización de las heridas por bisturí y por punch, se sostiene brevemente el ratón y se acerca a la cabeza un tubo de ensayo de 10 ml conteniendo un algodón embebido en 750 µl de isoflurano. Durante los 90 s de anestesia, el tubo de ensayo se aleja de la cabeza del ratón de manera que la concentración efectiva luego de la inducción de anestesia es menor a 7,5% de isoflurano.

3.2.2 Anestesia por ketamina/xilacina

Para procedimientos de larga duración tales como la iluminación con láser 635 nm y TFDA, los ratones recibieron una inyección i.p. de 100 mg/Kg de ketamina (Ketalar, Pfizer) y 5mg/kg de xilacina (Rompún, Bayer). En estas condiciones los animales permanecen anestesiados por un período de aproximadamente 25 a 30 min.

3.3 Modelo de absceso cutáneo

Los abscesos se indujeron siguiendo el método de Volpe et al. (2020). El costado de cada ratón CF-1 fue rasurado una maquina corta pelo inalámbrico WINCO W820. y luego se

inyectó una suspensión de 10^8 UFCs de bacterias *S. aureus* RN6390 en 100 μ l de PBS de forma subcutánea empleando una jeringa hipodérmica de 1 ml Neojet y aguja hipodérmica estéril G27 (0,4 x 13 mm) Bremen. El día posterior a la inoculación y el día subsiguiente (días 1 y 2) los ratones recibieron tramadol 2 mg/kg en el agua de bebida para evitar dolor. A las 48 h post inyección de bacterias, se pudo corroborar el establecimiento de la infección mediante la observación de un absceso en la zona inyectada. El 100% de los ratones desarrolló abscesos. Los mismos se generaron en la hipodermis, invadiendo progresivamente tanto la dermis como la fascia. A las 48 h, tiempo al cual se realizaron los tratamientos, la infección progresaba hasta la epidermis, sin observarse presencia de hemorragia en la mayoría de los casos. Dada la complejidad de los tejidos afectados, se trata de un modelo de infección de piel y partes blandas, pero para su simplificación, nos referiremos al mismo como “absceso cutáneo” durante el desarrollo de esta Tesis.

3.4 Seguimiento de infecciones por fluorescencia

3.4.1 Administración de ALA y H-ALA tópica y sistémica

A las 48 h post inoculación de las bacterias continuación, los ratones fueron topificados con el pro-FS sobre el absceso o la piel normal control. Para la aplicación del ALA se empleó un pincel suave con el cual se topificaron 1,5 mg de ALA en 25 μ l de solución fisiológica (ALA 60 mg/ml) o cantidades equimolares de H-ALA, frotando la zona con el pincel durante 30 segundos, o hasta la observación de la absorción de la solución. Esta concentración de ALA se eligió basándose en estudios previos de nuestro grupo y en los productos médicos de ALA comercializados (Casas et al., 1999; Alacare apósito médico, folleto).

Además de la administración del ALA de forma tópica, se realizaron ensayos administrando este pro-FS de forma intraperitoneal (i.p.) empleando 1,5 mg de ALA en 200 μ l de solución fisiológica.

Una vez aplicado el ALA o H-ALA, los ratones se mantuvieron en oscuridad y solo fueron iluminados brevemente con lámpara de Wood. Se tomaron fotos para proceder al análisis de imágenes de la fluorescencia. Luego de alcanzado el tiempo de máxima fluorescencia, los animales se sacrificaron en cámara de CO₂, se extrajeron los abscesos, y se tomaron imágenes de la fluorescencia producida en la zona interna que alojaba los abscesos.

Finalmente, los tejidos escindidos fueron pesados y empleados para la extracción química de porfirinas (ver sección 3.4.5), y obtención de muestras para visualización en microscopía de campo claro y de epifluorescencia (ver sección 3.4.6).

Se realizaron tratamientos control topiando el ALA y H-ALA sobre la piel sana rasurada. Además, se emplearon ratones control infectados y topiados con solución fisiológica, de manera de tener los valores basales de las distintas técnicas de adquisición y cuantificación de fluorescencia.

3.4.2 Adquisición de imágenes de fluorescencia

Luego de topicar ALA y H-ALA sobre las pieles rasuradas con y sin abscesos (control piel normal), se llevó a cabo la observación de la fluorescencia emitida por las porfirinas a distintos tiempos. Se utilizó como fuente de excitación una lámpara de Wood (Spectroline, modelo EA-160/FE, Westbury, New York, EE.UU., con máximo en 365 nm) y se adquirieron imágenes mediante una cámara digital Sony DSC-H55 de 14,1 megapíxeles de resolución espacial. El dispositivo de excitación y adquisición de imágenes se montó tal como muestra la Figura 4, manteniendo las distancias entre la cámara y los tejidos a fotografiar estrictamente constantes. Para aumentar la resolución en contraste de cada imagen se utilizaron dos tipos de filtros analógicos: un papel celofán color magenta y otro de poliéster rojo.

Además de la zona de la piel topiada, luego de ser sacrificados, se capturó la fluorescencia de la porción interna de los abscesos y pieles de cada ratón.

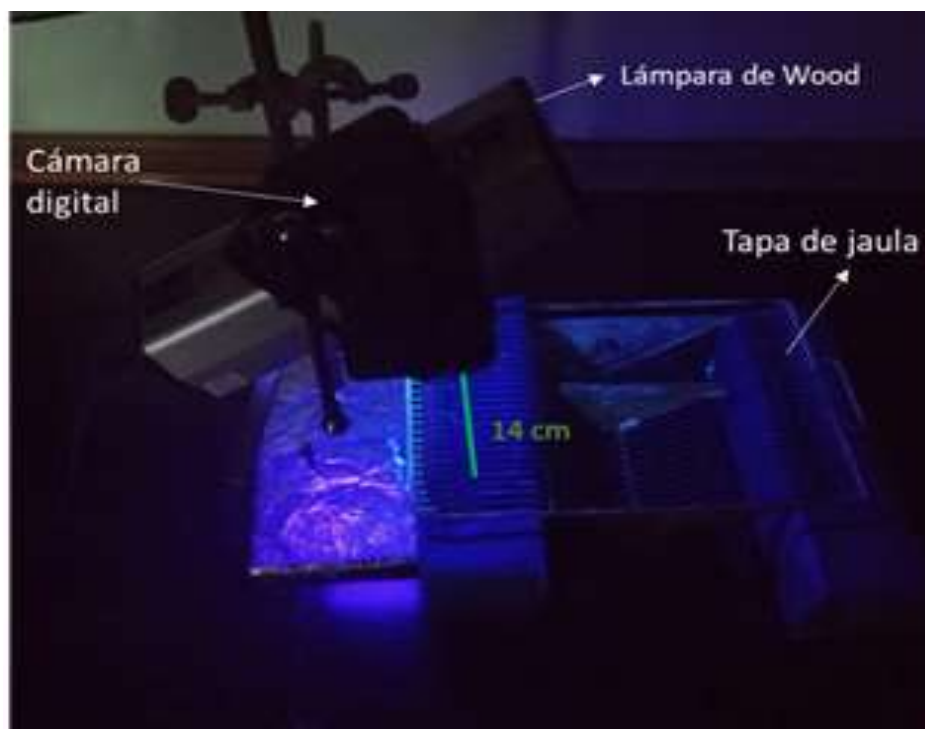


Figura 4: *Adquisición de imágenes de fluorescencia de ratones tratados con ALA y H-ALA.*

3.4.2.1 Configuración de filtros y espectros de fluorescencia de estándares de porfirinas

Se tomaron los espectros de transmisión de un filtro de película de poliéster recubierto con tinte rojo (ámbar oscuro) (E-Colour+ #022, Rosco, Reino Unido) y de papeles de celofán magenta con un espectrofotómetro UV-visible Lambda 265 (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.). Además, se tomaron los espectros de emisión de fluorescencia de los estándares de CpIII y PpIX con un fluorómetro Perkin Elmer LS55, utilizando una excitación de 410 nm e interponiendo los filtros mencionados.

3.4.3 Procesamiento de imágenes para estimación y cuantificación de la fluorescencia en ratones topicados con ALA y H-ALA

Se desarrolló una herramienta para la evaluación de la fluorescencia en los tejidos topicados con ALA a partir de la segmentación de la porción del tejido fluorescente y posterior cálculo del valor del área integrada de la capa roja y azul correspondiente al área segmentada. Para dicho propósito se elaboró en nuestro laboratorio un algoritmo en lenguaje de programación Python, cuyo funcionamiento básico implicó en primer lugar, la descomposición de la imagen en sus tres canales de color RGB (rojo, verde y azul). Luego, se generó una imagen binaria mediante la aplicación del algoritmo de segmentación por otsu adaptativo, estableciendo el mejor umbral para separar el fondo de la zona fluorescente de la imagen resultante de la diferencia entre los canales rojo y azul. Esta resta de canales se utilizó para resaltar la región de interés a segmentar. Posteriormente, se realizó una operación de multiplicación píxel a píxel entre la imagen original y la máscara binaria obtenida a partir de la segmentación. Finalmente, se calculó la intensidad promedio y la desviación estándar de los valores de los píxeles en el canal rojo y azul dentro de la región segmentada y se multiplica por el área fluorescente correspondiente.

3.4.4 Imágenes de fluorescencia de porfirinas *in vivo*

Se utilizó un sistema de imagen *in vivo* IVIS Spectrum CT (Revvity, Waltham, MA) para la obtención de imágenes de fluorescencia en ratones. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (Forane, Baxter). Se realizó la separación espectral de las señales de fluorescencia de las porfirinas y del fondo mediante la grabación de secuencias de imágenes utilizando los siguientes pares de filtros de excitación/emisión: 430/620 nm, 535/620 nm, 570/620 nm, 570/640 nm y 605/660 nm. La fluorescencia de fondo del instrumento se eliminó utilizando la herramienta de sustracción adaptativa de fondo de

fluorescencia. El procesamiento espectral (es decir, la separación de señales) se realizó de acuerdo con los protocolos establecidos por el fabricante, utilizando el software *Living Image*, versión 4.3.1.

3.4.5 Extracción, cuantificación y determinación del tipo de porfirinas sintetizadas a partir de ALA y H-ALA

Se tomaron muestras de los abscesos previamente topicados con la solución de ALA y H-ALA, se pesaron y homogenizaron en un dispersor de tejidos ULTRA-Turrax (Ika, Alemania). Como solvente se empleó una solución de acetato de etilo: ácido acético glacial (4:1) y las porfirinas fueron extraídas con HCl 5% y cuantificadas mediante fluorometría (fluorómetro Perkin Elmer LS55) según protocolo previamente descrito por nuestro grupo de trabajo (Di Venosa et al., 2006). Luego de ser cuantificadas, se analizaron los espectros de fluorescencia de las porfirinas extraídas y se compararon con las de los estándares de PpIX y CpIII, empleando λ de excitación de 410 nm y de emisión de 597 nm para CpIII y 604 para PpIX.

3.4.6 Observación microscópica de la distribución de porfirinas sintetizadas a partir de ALA en muestras de abscesos

Una porción de los abscesos se incluyó en medio de montaje para crióstato OCT, y se cortó el tejido en secciones de 10 μ m con crióstato Leica CM 1850 (Leica Biosystems, IL, EE. UU.) de la Cátedra de Histología, Facultad de Medicina, UBA, para su posterior observación en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 (excitación 545 nm) con un objetivo 10x y toma de fotografías con una cámara Olympus Q5. Seguidamente, se fijaron las muestras con formaldehído 4% y se tiñeron con hematoxilina-eosina para identificar las estructuras por microscopía de campo claro.

3.5 Tratamientos lumínicos en abscesos

3.5.1 Tratamiento con ALA-TFDA en abscesos

Se inocularon bacterias *S. aureus* RN6390 de manera subcutánea en ratones CF-1 según el modelo descrito en 3.3. A las 48 h de la inyección, los ratones se topicaron con un pincel con 1.5 mg de ALA en 25 μ l de solución fisiológica sobre los abscesos y fueron mantenidos en oscuridad. Luego del tiempo de incubación en oscuridad al que se registró el máximo de acumulación de porfirinas, determinado según el apartado 3.4.3, los ratones

fueron anestesiados con ketamina/xilacina. La irradiación de los tejidos infectados se realizó empleando un láser de 635 nm (Lumiia), colocando la salida de la fibra óptica a una distancia de la piel que permitía iluminar toda la herida de los animales. Se emplearon diferentes potencias lumínicas en el rango de 70 - 600 mW de salida, y los ratones se irradiaron durante 20 min.

Se incluyeron en el diseño experimental, controles de piel normal tratados con ALA-TFDA, que fueron evaluados macro y microscópicamente. Asimismo, se incluyeron abscesos con los siguientes tratamientos: i) ALA sin irradiar, ii) luz luego de topicación con PBS, iii) no irradiados topicados con PBS (control).

3.5.2 Terapia Fototérmica *in vivo*

En una primera etapa, para llevar a cabo la TFT, se realizaron diferentes esquemas de entrega de energía empleando el láser Lumiia de 980 nm en modo continuo y pulsado, manteniendo siempre la temperatura por debajo de los 42°C, temperatura máxima tolerable en la piel (Bora et al., 2022). Se irradiaron los abscesos en modo continuo en 1 a 5 dosis de luz, refrigerando la piel entre cada dosis con 3 s de disparo de spray refrigerante (Algispray, Casasco, Argentina). También se utilizó un esquema de entrega de dosis en modo pulsado empleando ancho de pulso de 50 ms y frecuencia de 4Hz. Esto permitió evitar el uso del spray refrigerante, limitando el uso del mismo, al comienzo de la irradiación en modo pulsado. Las dosis de TFT se pusieron a punto con mediciones de temperatura mediante un multímetro UNI-T modelo UT70A, apoyado sobre la superficie de la piel del ratón y se corroboraron mediante la inserción de la misma en una incisión en la piel del ratón. Los ratones se anestesiaron con isoflurano durante toda la sesión de TFT (total de 90 s). Los detalles de tiempos y potencias empleados, se describen en la sección correspondiente de Resultados.

3.5.3 Tratamientos combinados TFT con ALA-TFDA *in vivo*

Para la combinación de las fototerapias se empleó isoflurano como anestesia durante TFT y xilacina/ketamina para la aplicación de la TFDA. La TFT fue realizada inmediatamente después de la topicación con ALA (o solución fisiológica), mientras que la TFDA se realizó 4 h luego de la topicación con ALA. Las condiciones de irradiación, topicación y controles fueron las mismas que las descritas en los apartados correspondientes (3.5.1 y 3.5.2)

3.6 Modelo de heridas no infectadas y tratamientos con TFDA y TFT

En este caso, luego de rasurar la zona los animales fueron anestesiados por inhalación de isofluorano y se les realizaron heridas superficiales en la piel mediante cortes y raspado con bisturí curvo sobre una superficie de aproximadamente 1 cm² según el método descrito en Guo et al. (2013). Luego de 1 hora de realizadas las heridas, se llevó a cabo el mismo procedimiento de topicación de ALA e irradiación explicado en el apartado 3.5, utilizando el mismo esquema experimental.

Se empleó además un segundo modelo de herida no infectada mediante punch de biopsia de piel. Para eso se empleó un punch estéril de 5 mm Sovereign®. Sobre los ratones anestesiados y rasurados, se aplicó presión con el punch, girándolo en sentido horario y antihorario hasta que sienta que ha perforado todo el espesor de la piel, y se extrajo cuidadosamente la dermis, tejido subcutáneo y se extendió la lesión hasta el panículo carnoso (Rowland et al., 2023). En este caso, la topicación se realizó con 1,5 mg de ALA disuelto en 25 mg de crema Nivea.

Para el tratamiento con TFT de las heridas de bisturí y punch, se aplicó TFTc y TFTp luego de una hora de la realización de las mismas, realizando dicho protocolo bajo inducción de anestesia por isofluorano tal como se describe en la sección 3.5.2.

3.7 Evaluación del tratamiento por seguimiento del área de los abscesos y heridas no infectadas

Desde el día de los tratamientos y hasta la resolución completa, se monitoreó a diario el tamaño de cada herida y absceso mediante medición con calibre y adquisición de imágenes de la zona afectada, para evaluar enrojecimiento, secreción, existencia de costra y evaluación de resolución de las lesiones.

Al finalizar el experimento, los ratones se sacrificaron en cámara de CO₂. Para el cálculo de las áreas de los abscesos y heridas se empleó la fórmula $(x * y) * \pi / 4$ para los modelos de absceso, de herida por bisturí y para el modelo de punch de biopsia, donde x es la máxima dimensión de la herida e y la mínima dimensión que se ubica a 90° de la primera (Jørgensen et al., 2016).

Finalmente, se normalizó cada área dividiendo este valor por la superficie de la herida al inicio del tratamiento (área relativa), y se generó un gráfico de la progresión del tamaño relativo de las heridas en el tiempo, hasta su resolución completa. El tiempo de resolución

de la herida, fue tomado como el día al cual el tejido cicatricial no superaba un diámetro mayor de 3 mm. Como parámetro adicional, se tomó el tiempo de caída de la costra. Los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO₂ al terminar el período de seguimiento.

3.8 Conteo de UFC en abscesos (carga bacteriana) y estudios histológicos

A diferentes tiempos posteriores al tratamiento de ALA-TFDA sobre los abscesos, se sacrificaron ratones representativos y se realizaron homogenatos en PBS de los abscesos completos empleando un homogeneizador de tejidos ULTRA-TURRAX (IKA, Alemania). En los casos en los que se observaron diferencias entre los tamaños de absceso, se tomó una porción de tejido igual a la del absceso de mayor tamaño, de manera de igualar lo máximo posible el peso de tejido homogeneizado. Se tomaron, en condiciones de esterilidad, una alícuota de los homogenatos para realizar el recuento de las UFC y se pesaron los tejidos a fin de relativizar las UFC por mg de tejido.

Asimismo, se empleó una porción de los abscesos para realizar análisis histológicos. Para ello se fijó en fomaldehído 4%, se incluyeron en parafina y se realizó la tinción con hematoxilina-eosina y Giemsa. Se analizó el infiltrado celular, la integridad de la piel y del tejido subcutáneo. Los preparados se observaron en un equipo EVOS M7000 Imaging System (Thermo Fischer Scientific) empleando una magnificación 4X y en un microscopio Olympus BX51 empleando aumentos 10X y 100X.

3.9 Cuantificación de citoquinas producidas en los abscesos tratados con ALA-TFDA y TFT

Para evaluar los efectos de las terapias lumínicas sobre el sistema inmune, se extrajeron los abscesos de ratones a distintos tiempos post-tratamiento y se realizó la cuantificación de citoquinas pro y anti-inflamatorias a diferentes tiempos. Los abscesos se homogeneizaron en dispersor ULTRA-TURRAX utilizando un buffer Tris 50 mM, pH 8, conteniendo 0.1% de Tritón X-100, 5 mM EDTA y 34 µg/ml de PMSF. Se cuantificaron las interleuquinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 mediante ELISA (BD OptEIA™ Mouse IL-6 ELISA Set), previa normalización por contenido de proteínas. Los resultados fueron expresados por mg de tejido y mg de proteína.

4. Análisis estadístico

Luego de testeo de normalidad por el test de Kolmogorov-Smirnov, se utilizó ANOVA de una o dos vías, según el caso, seguido de la prueba post hoc de Tukey para determinar la significancia de las diferencias entre medias obtenidas a partir de los diferentes tratamientos. En el caso de no cumplir con la normalidad, se aplicaron los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis y test U de Mann-Whitney. El número mínimo de animales por tratamiento fue de un mínimo de 3 por punto, en experimentos por duplicado, salvo que se especifique lo contrario en las leyendas de las Figuras. Los datos se grafican como la media $\pm$ SD. En todos los casos, las pruebas estadísticas se realizaron con el software GraphPad (versión 5.0; GraphPad Prism). Se consideraron como significativos, en todos los casos, los valores de $p < 0,05$.

Resultados

Capítulo I: Efecto de ALA-TFDA y TFT *in vitro* en *S. aureus*

En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos *in vitro* durante la implementación de la TFT y TFDA, así como su combinación, tanto en cultivos planctónicos como en biopelículas de *S. aureus*. A partir de estos resultados, además, se determinarán las condiciones para llevar a cabo en los capítulos siguientes, la TFDA y TFT en un modelo *in vivo* de ratón.

En trabajos previos, habíamos encontrado que dosis altas de TFT aumentaron la efectividad de la TFDA mediada por los FS azul de toluidina y la porfirina sintética tetracationica 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimetilaminopropoxi) fenil]porfirina (TAPP) en biopelículas de *S. aureus* (Gándara et al., 2017; Mamone et al., 2024). La radiación empleada en estos casos había sido proveniente de un láser de 980 nm, en modo continuo, empleando una potencia de 7.5 W/cm² durante 30 s, totalizando una energía de 225 J/cm², de manera que el aumento transitorio de la temperatura del medio llegaba a un máximo de 46 °C ($\Delta T = 21.5^{\circ}\text{C}$). Además de mejorar la penetración de TAPP, la TFT dispersó las biopelículas e indujo fisuras en la matriz de las mismas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y para reducir el posible daño térmico causado por la TFT en células eucariotas, en el presente estudio aplicamos dosis bajas de radiación infrarroja, asegurándonos de que las temperaturas nunca excedieran los 37 °C. Adicionalmente, planteamos emplear condiciones subletales de TFDA, de manera de abordar la problemática de las cepas de bacterias que son poco sensibles a la inactivación fotodinámica. Este esquema experimental minimiza el efecto bactericida de ambas terapias por separado, de manera de hacer foco exclusivamente en el efecto sinérgico entre TFDA y TFT. Además, a diferencia de los trabajos anteriores, en lugar de utilizar un FS exógeno, empleamos los pro-FS ALA y su derivado H-ALA, que generan la síntesis endógena de porfirinas con actividad FS.

Por lo tanto, en el presente Capítulo, nos propusimos evaluar el impacto de la TFT en la penetración de ALA y H-ALA a través de biopelículas de *S. aureus* y determinar cómo influye la TFT a bajas dosis en la eficacia de la TFDA y en la síntesis de porfirinas. Para este fin, empleamos una cepa de *S. aureus* sensible (RN6390) y otra resistente a meticilina (ST5-SCCmecI).

El Capítulo está dividido en seis secciones principales. En la primera sección, se presentan los resultados del análisis preliminar para la puesta a punto las condiciones de irradiación y aplicación de la TFDA y la TFT sobre biofilms de *S. aureus* RN6390. En la segunda, se

estudió la combinación de ambas terapias en biopelículas y en cultivos planctónicos de la misma cepa. En la tercera sección, se aplicaron los procedimientos bajo las condiciones establecidas en la primera sección, sobre la cepa ST5-SCCmecI. En la cuarta sección se evaluó el uso del H-ALA en la TFDA sola o en combinación con TFT. En la quinta sección, se analizaron los resultados de la aplicación de ALA-TFDA y TFT sobre biopelículas creciendo sobre placas de titanio, con el fin de evaluar su potencial como estrategia de descontaminación en implantes de uso médico u odontológico. En estas secciones, los parámetros evaluados fueron la viabilidad bacteriana y la síntesis de porfirinas. Finalmente, en la sexta sección, se muestran los resultados de la localización de porfirinas en biopelículas de *S. aureus* RN6390 mediante microscopía confocal de fluorescencia.

I.1 Puesta a punto de condiciones para TFT y TFDA *in vitro*

El desarrollo de esta primera sección se basó en investigaciones previas que demostraron la eficacia del tratamiento con ALA-TFDA utilizando lámparas halógenas para fotosensibilizar cultivos planctónicos y biopelículas de *S. aureus* ATCC25923 (Bohm et al., 2020). Sin embargo, para el tratamiento fotodinámico de biopelículas de la cepa RN6390, la ALA-TFDA no fue eficaz empleando las condiciones previamente seteadas (1 h de incubación con ALA 1 mM e iluminación con 151 J/cm² con lámparas halógenas). En la Figura I.1-A se muestra la puesta a punto de la dosis de luz siempre incubando previamente las muestras durante 1 h con ALA, y se observó que en rangos de iluminación desde 1 h (151 J/cm²) a 2 h (302 J/cm²), no se produjo una fotoinactivación bacteriana significativa. Por otro lado, empleando tiempos de incubación con ALA de 1 a 2 h seguido de iluminación de 1 h, no se observaron diferencias significativas en el conteo de UFCs, mientras que con 3 h de incubación sí hubo una leve reducción de 1 log respecto al control sin iluminar (Figura I.1-B). Cabe destacar que empleando tiempos largos de incubación e iluminación, se produce una alta tasa de crecimiento bacteriano a pesar de que las biopelículas se encuentran manteniéndose en PBS-glucosa, por lo cual no es conveniente extender los períodos experimentales.

Empleando una fuente de luz láser, que proporciona una energía de 280 J/cm² en un tiempo de 10 min, se obtuvieron reducciones de 2 log luego de exponer los cultivos a ALA 1 mM durante 1 h (Figura I.2). Esto demuestra que, a pesar de la baja sensibilidad de esta cepa a la TFDA, es posible inducir fotosensibilización ajustando las condiciones de fotosensibilizante y luz. Sin embargo, para la combinación de ALA-TFDA y TFT, se emplearán en los siguientes capítulos, condiciones subletales del tratamiento fotodinámico, es decir 1 h de incubación con ALA y 1 h de iluminación con lámparas halógenas (151 J/cm²).

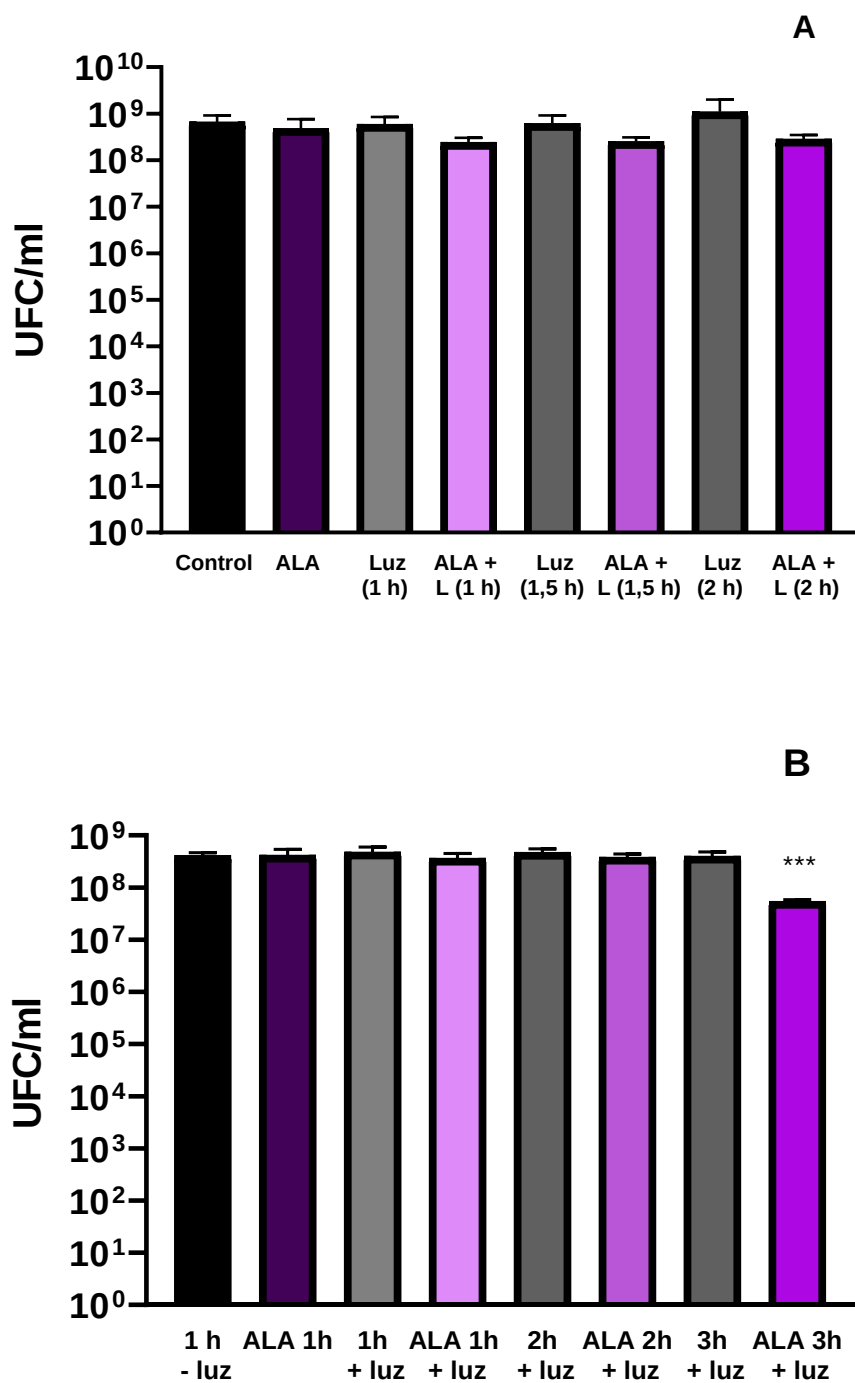


Figura I.1: Efectos del tiempo de incubación con ALA y el tiempo de iluminación en la viabilidad de biopelículas de RN6390

A) Viabilidad bacteriana al incubar durante 1 h las biopelículas con ALA 1 mM e iluminar con lámparas halógenas por un tiempo de 1 h a 2 h (151 J/cm^2 a 302 J/cm^2). B) Viabilidad bacteriana al incubar las biopelículas con ALA 1 mM durante periodos de 1, 2 y 3 h, seguidos de iluminación

(L) durante 1 h. *** $p < 0.001$ en comparación con el tratamiento con ALA. ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey.

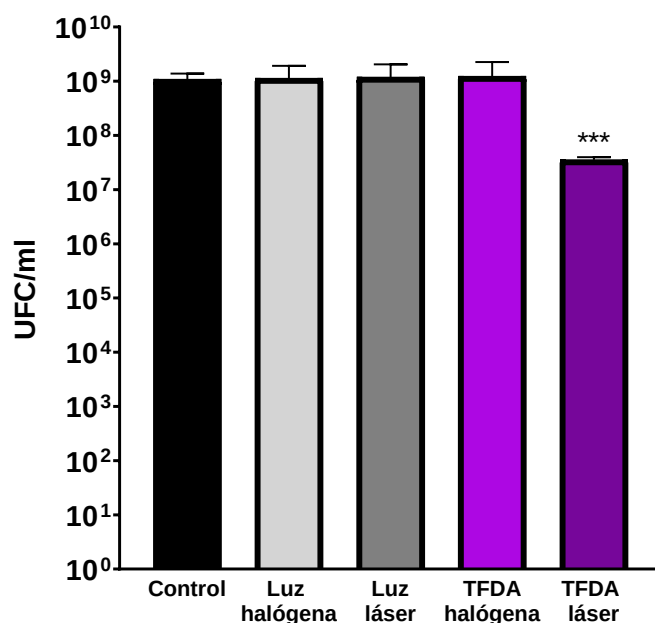


Figura I.2: Efecto de la ALA-TFDA en biopelículas RN6390 empleando distintas fuentes de luz

Viabilidad bacteriana luego de la ALA-TFDA con lámparas halógenas (151 J/cm^2) y láser de 635 nm (280 J/cm^2) sobre biopelículas de *S. aureus* RN6390 de 24 h de desarrollo. Se incluyeron tratamientos con luz sola y controles sin tratamiento. *** $p < 0.001$ en comparación con el tratamiento con luz. ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey.

A partir de estos resultados, se planteó la posibilidad de combinar la ALA-TFDA con la TFT. Para ello, se establecieron las condiciones óptimas de la TFT, considerando estrictamente la temperatura máxima aceptable de 37°C , partiendo de 24°C .

En una primera etapa realizamos mediciones de la temperatura del PBS en función del tiempo de irradiación con el láser de 980 nm en modo TFTc y TFTp empleando distintos anchos de pulso y frecuencias. No se observó un aumento significativo de temperatura para frecuencias inferiores a 4 Hz a los tiempos de irradiación empleados. Por ello, se presentan sólo los resultados obtenidos con frecuencias de 4 Hz y anchos de pulso de 50 y 100 ms, los cuales representan el rango medio y máximo de irradiación permitido por el equipo.

De esta manera, al irradiar PBS con el láser de 980 nm en modo continuo a una potencia de $4,3 \text{ W/cm}^2$, se observó la mayor velocidad de incremento de temperatura, alcanzándose

una temperatura máxima de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ después de 68 s de irradiación, lo que representó un incremento de temperatura de 13°C , partiendo de una inicial de 24°C . Temperaturas similares se obtuvieron con períodos de iluminación más largos utilizando el láser a igual potencia pero en modo pulsado (4 Hz de frecuencia) variando el ancho de pulso: 170 s de irradiación para ancho de pulso de 100 ms y 340 s de irradiación para pulsos de 50 ms (Figura I.3). Todas las condiciones de irradiación descritas, suministraron la misma dosis total de energía, 292 J/cm^2 .

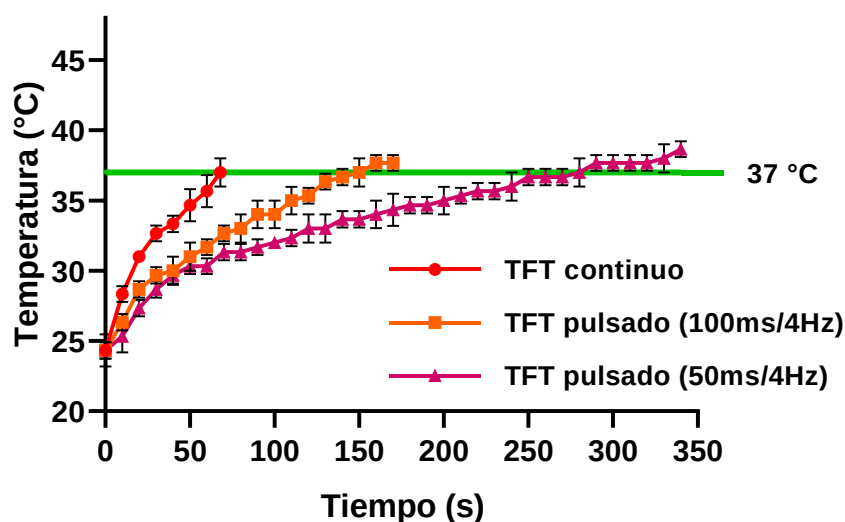


Figura I.3: Aumento de temperatura de PBS por la irradiación con el láser de 980 nm en diferentes modalidades

Temperatura registrada al irradiar con el láser de 980 nm sobre de 500 μl de PBS empleando diferentes modos de irradiación (continuo o pulsado). La potencia empleada fue siempre de $4,3 \text{ W/cm}^2$. Se representan los promedios de 3 mediciones $\pm\text{SD}$.

Si bien las tres condiciones propuestas implicaron un aumento de hasta 13°C en la temperatura durante la TFT, se seleccionaron las condiciones de modo continuo y de modo pulsado con ancho de pulso 50 ms y 4 Hz de frecuencia de manera de emplear una forma rápida (68 s) de aplicación y una más lenta (340 s) donde se puede controlar mejor el incremento de la temperatura. Se comprobó, además, que, bajo estas condiciones, la viabilidad de las biopelículas de *S. aureus* RN6390 no se vio afectada (Figura I.4).

En las secciones siguientes de este Capítulo (*in vitro*) se se realizará la TFTc empleando una potencia de 4.3 W/cm^2 y un tiempo de irradiación de 68 s. Los parámetros de TFTc y TFTp se retomarán más adelante en los Capítulos IV y VI, donde en los ensayos *in vivo*, la aplicación de TFTp cobra relevancia biológica.

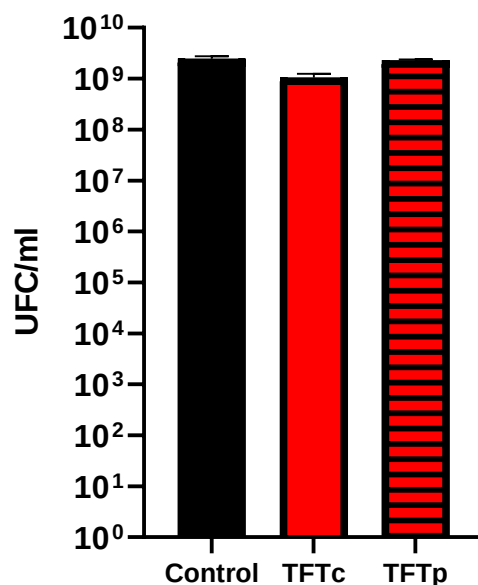


Figura I.4: Efecto de TFTc y TFTp sobre biopelículas de *S. aureus* RN6390

Las biopelículas se irradiaron con láser de 980 nm (292 J/cm^2) en modo continuo durante 68 s y en modo pulsado (50ms de irradiación a 4 Hz de frecuencia) durante 340 s. Se determinaron las UFC/ml. Control: biopelículas sin tratamiento.

I.2 Tratamiento combinado de TFTc y ALA-TFDA en biopelículas de *S. aureus* RN6390

Las biopelículas de *S. aureus* RN6390 se trataron secuencialmente con TFT y ALA-TFDA, tal como se muestra en la Figura 1.5.

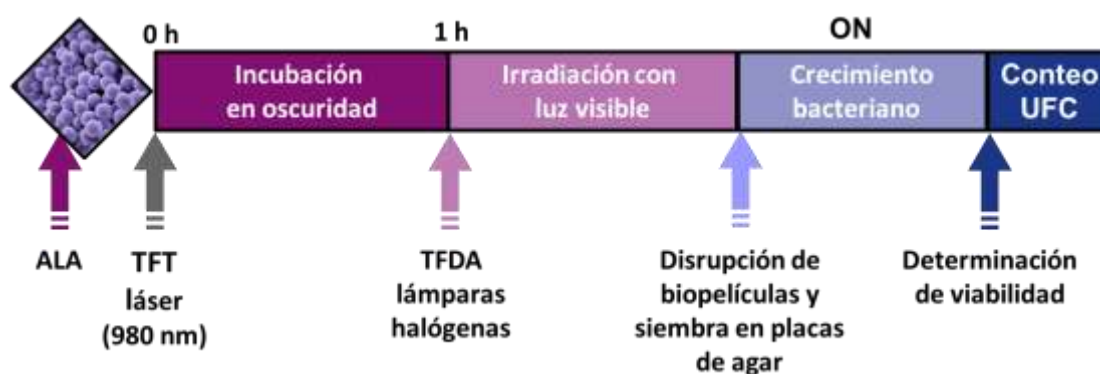
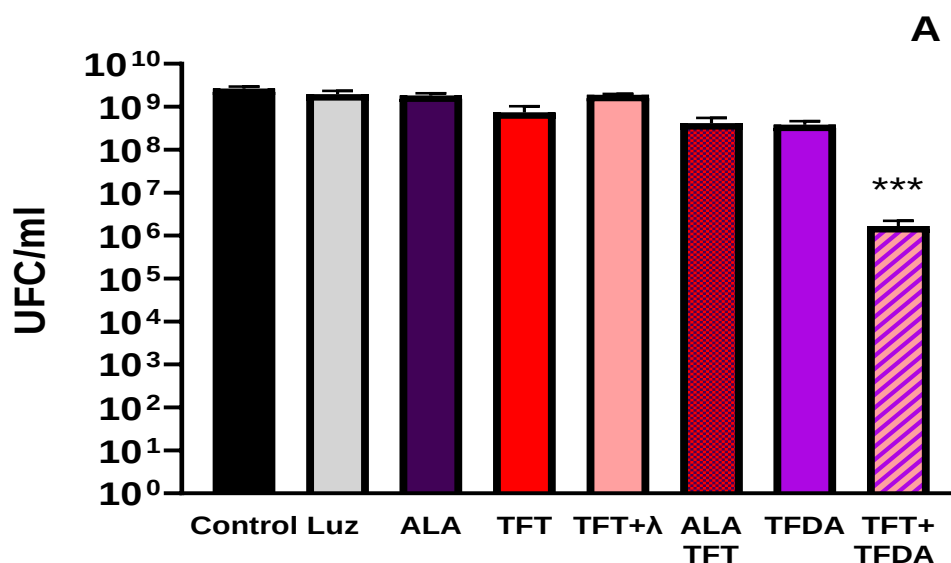


Figura I.5: Esquema experimental para TFT y ALA-TFDA sobre biopelículas

Esquema del procedimiento experimental utilizado para evaluar el efecto combinado de TFT y TFDA en biopelículas. Las biopelículas se incuban con ALA en PBS, y se irradian con láser de

980 nm (TFT). Posteriormente, se incuban durante 1 h (en oscuridad), y a continuación se realiza la TFDA (irradiación con luz visible). Finalmente, las biopelículas se disgregan para liberar las bacterias, se realizan diluciones seriadas y se siembran en placas de agar TSA para cuantificar las colonias tras incubación overnight.

Si bien la TFTc y ALA-TFDA por sí solas no redujeron significativamente las UFCs de las biopelículas de *S. aureus* RN6390, la combinación de la TFT después de la incubación con ALA mejoró significativamente la respuesta de la TFDA, obteniéndose una reducción de 3 log de UFC/ml (Figura I.6-A). En línea con esta respuesta mejorada de la TFDA luego de la aplicación de la TFTc, hubo un aumento significativo tanto en las porfirinas intracelulares como extracelulares cuando la irradiación se realizó después de la adición de ALA (Figura I.6-B). Por el contrario, cuando el ALA se colocó después de la TFT, la síntesis de porfirinas en la biopelícula fue significativamente menor, pero se observó un aumento en los niveles de porfirinas liberadas al medio extracelular, explicándose este fenómeno por la liberación de porfirinas al medio.



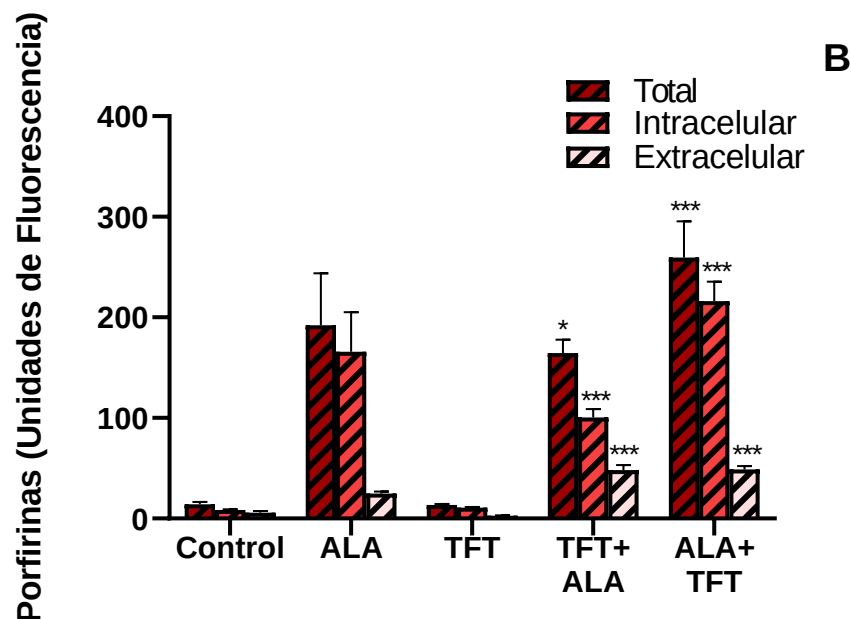


Figura I.6: Viabilidad y síntesis de porfirinas en biopelículas de *S. aureus* RN6390 luego del tratamiento con TFTc y ALA-TFDA

A) Viabilidad de biopelículas de 24 h de desarrollo, tratadas con 1 mM de ALA, seguida de TFTc (292 J/cm²) y posterior incubación de 1 h antes de la TFDA (151 J/cm²). Se incluyeron controles con luz, ALA en la oscuridad, TFTc y combinaciones de estas condiciones. *** $p < 0.001$ respecto a TFDA. ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey.

B) Porphirinas totales, intracelulares y extracelulares, tras el tratamiento con ALA 1 mM, incubación de 1 h, con o sin la aplicación de TFTc, tanto antes como después de la exposición a ALA. Los resultados se expresan como la cantidad de porfirinas intra y extracelulares (en unidades de fluorescencia) sintetizadas por todas las bacterias presentes bajo las condiciones descritas en A). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ en comparación con ALA. ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey.

Para profundizar el efecto producido por la TFTc sobre la síntesis de porfirinas, se analizó su aumento en función de la concentración de ALA y el impacto de calentar el medio de cultivo. Cuando las biopelículas de RN6390 se expusieron a diferentes concentraciones de ALA seguidas de TFTc, se observó un incremento significativo en los niveles de porfirinas, desde 0,5 mM, en comparación con aquellas biopelículas solo incubadas con ALA. Además, con la concentración más alta de ALA (1 mM), los cultivos tratados con la TFTc mostraron una mayor liberación de porfirinas al medio, que se correlaciona con el aumento en la síntesis intracelular de porfirinas (Figura I.7). Para examinar el impacto del aumento de temperatura alcanzado durante la TFTc, se precalentó el buffer PBS con ALA de 24 a 37°C antes de introducirlo en los cultivos de biopelículas, los cuales fueron incubados a oscuras a 37°C durante 1 h. Bajo estas condiciones, los niveles de porfirinas intracelulares y extracelulares resultaron más de dos veces menores

en comparación con los de los cultivos no tratados cuando la concentración de ALA fue igual o mayor a 0,5 mM. Es importante destacar que el ALA no se altera con los aumentos de temperatura dentro de los rangos empleados en estos ensayos (prueba de Ehrlich, Materiales y Métodos ítem 2.6) (resultados no mostrados).

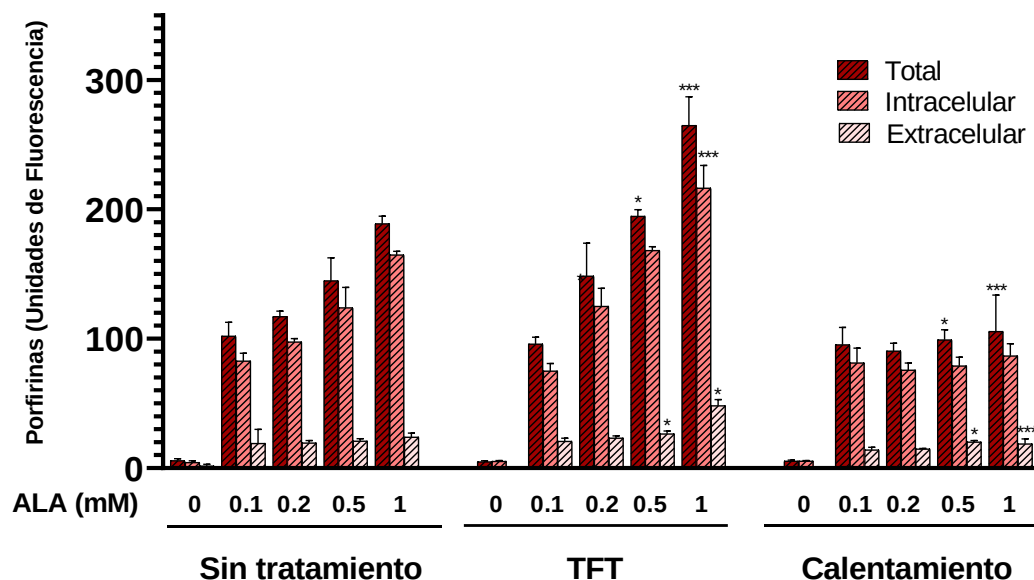


Figura I.7: Síntesis de porfirinas a partir de ALA en biopelículas de *S. aureus* RN6390 después de TFTc o calentamiento del medio

Porfirinas totales, intracelulares y extracelulares en biopelículas de *S. aureus* RN6390 luego de adicionar al medio ALA, y realizar el TFTc (292 J/cm²), seguido de incubación en oscuridad de 1 h a 37°C. Se realizó un control del calentamiento del medio producido por el TFTc, empleando medio estéril, precalentado en incubador térmico a la temperatura máxima alcanzada durante el TFTc. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, en comparación con el control correspondiente no tratado, ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey.

Para probar la hipótesis de que la TFTc mejora la penetración de ALA a través de la matriz de la biopelícula sin afectar directamente la penetración en las células bacterianas, realizamos estudios con la aplicación secuencial de TFDA y TFTc en cultivos planctónicos de *S. aureus* RN6390 (Figura I.8-A). En estos cultivos, la TFDA redujo la viabilidad bacteriana en 3 log; sin embargo, esta disminución no fue incrementada, sino más bien disminuida, por la aplicación previa de la TFTc. Esta reducción de 1 log en la eficacia de la ALA-TFDA combinada con TFTc probablemente se deba al menor contenido de porfirinas intracelulares, lo cual no se correlaciona con niveles extracelulares más altos, como muestra la Figura I.8-B.

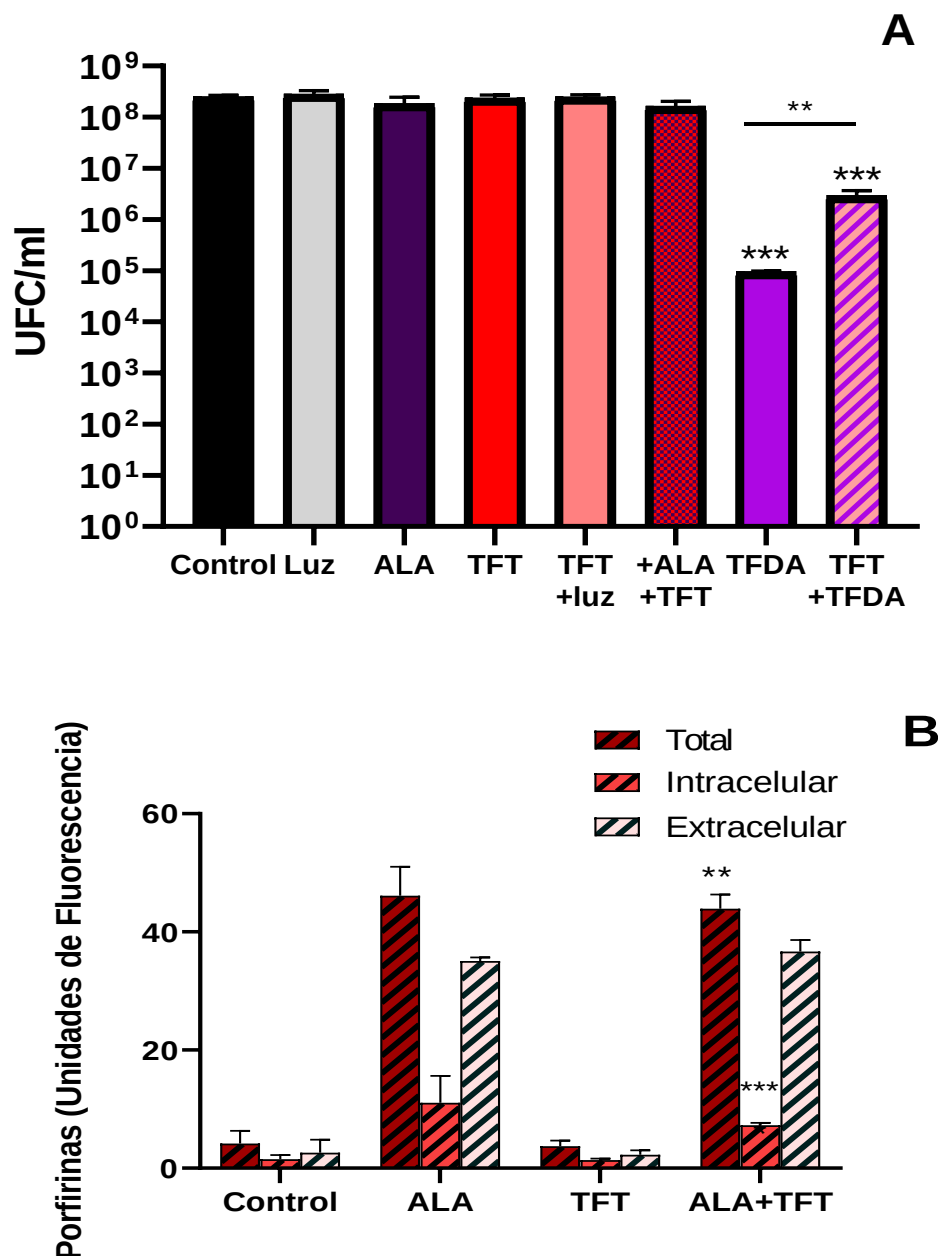


Figura I.8: Viabilidad y síntesis de porfirinas en cultivos planctónicos de *S. aureus* RN6390 luego del tratamiento con TFTc y ALA-TFDA

A) Viabilidad de cultivos planctónicos de *S. aureus* RN6390 tratados con 1 mM de ALA, seguido de TFTc (292 J/cm²) y posterior incubación de 1 h con ALA antes de la iluminación con TFDA (151 J/cm²). Se incluyeron controles de luz, ALA en la oscuridad, TFTc y combinaciones de estas condiciones. ****p*<0.001 en comparación con el tratamiento con ALA y ***p*<0.01 comparando TFDA con TFT-TFDA (ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey). B) Porphirinas totales, intracelulares y extracelulares, luego de agregado de ALA 1 mM, tratamiento con TFTc e incubación de 1 h en oscuridad. Los datos se expresan como la cantidad de porfirinas (unidades de fluorescencia) sintetizadas por todas las bacterias presentes en las condiciones descriptas en A) ***p*<0.01; ****p*<0.001; en comparación con el control correspondiente no tratado, ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey.

I.3 Ensayos realizados sobre biopelículas ST5-SCCmecI

La susceptibilidad a la combinación de las terapias TFT+TFDA se observó también al ser aplicadas sobre biopelículas de la cepa *S. aureus* ST5-SCCmecI, identificada como MRSA. Mientras que TFTc y TFDA por sí solas no afectaron significativamente el número de colonias, como se había corroborado anteriormente, la combinación de ambos tratamientos resultó en una disminución de 4 log, mostrando un efecto bactericida superior al obtenido con la cepa sensible a meticilina (Figura I.9-A). En este caso, la TFTc produjo un aumento en las porfirinas sintetizadas a partir de ALA tanto intra como extracelularmente (Figura I.9-B), pero este aumento no fue significativamente mayor al producido en la cepa MSSA. Esta mayor susceptibilidad de la cepa MRSA podría deberse a cambios en la permeabilidad de su membrana o a alteraciones metabólicas desarrolladas como parte de sus mecanismos de resistencia, que podrían hacerla más vulnerable al efecto combinado de las terapias aplicadas.

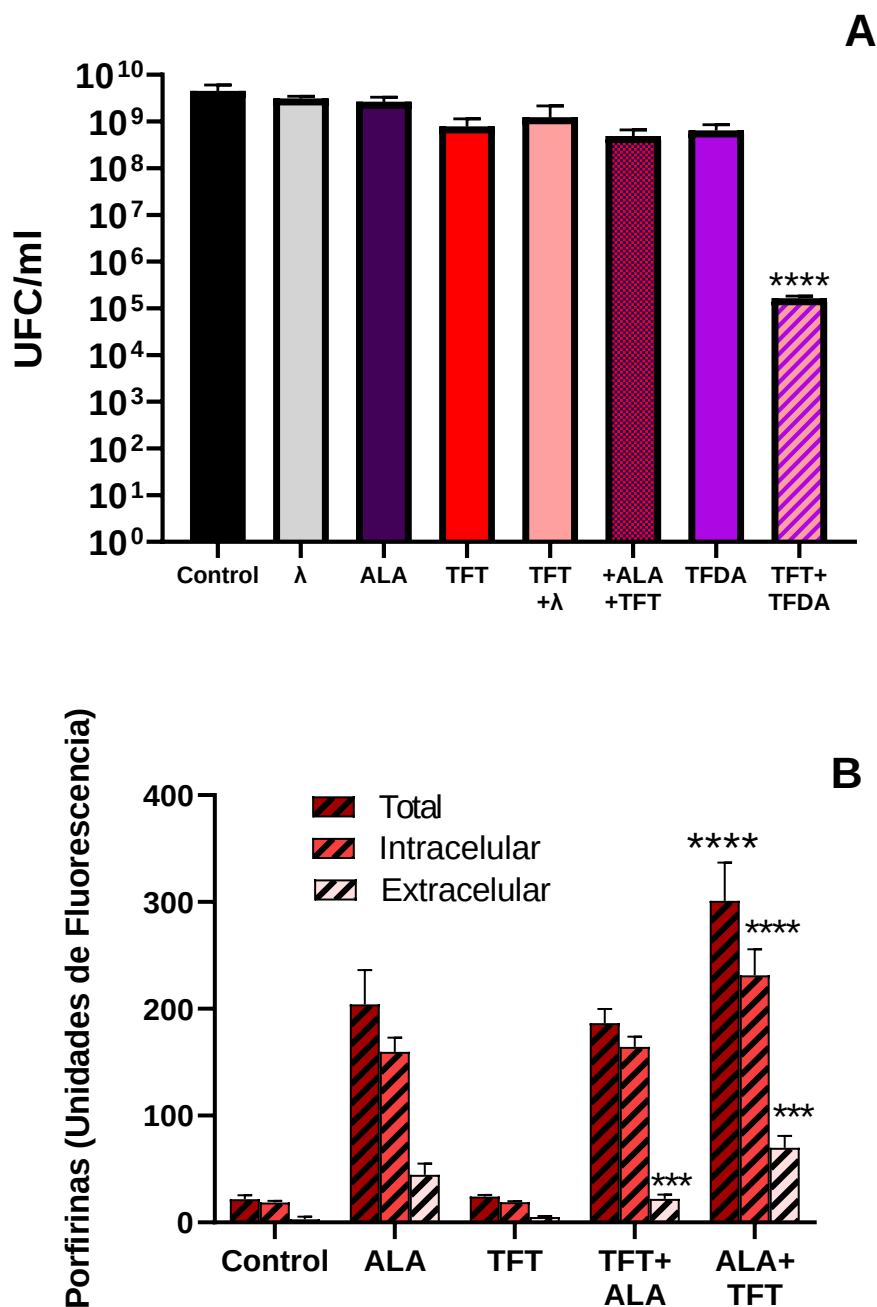


Figura I.9: Viabilidad y síntesis de porfirinas en biopelículas de *S. aureus* ST5-SCCmecI luego del tratamiento con TFTc y ALA-TFDA

A) Viabilidad de biopelículas tratadas con ALA 1 mM, seguido de TFTc (292 J/cm²) y posterior incubación de 1 h en oscuridad antes de la TFDA (151 J/cm). *****p* < 0.0001 en comparación con TFDA. ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey.

B) Porphirinas sintetizadas tras el tratamiento con ALA 1 mM, con o sin TFTc, seguido de incubación en oscuridad de 1 h. Los datos se expresan como la cantidad intracelular, extracelular y total de porfirinas (en unidades de fluorescencia) sintetizadas por todas las bacterias presentes bajo las condiciones descritas en A). ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001, ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey

I.4 Combinación de TFTc y H-ALA-TFDA

Se investigó entonces la posibilidad de aplicar la TFTc para mejorar la penetración del H-ALA a través de las biopelículas (Figura I.10). El H-ALA es un derivado lipofílico de ALA, lo que le otorga mayor facilidad para atravesar membranas biológicas. Sin embargo, su uso se encuentra limitado por su toxicidad en oscuridad, por lo cual resulta de interés potenciar su acción con tratamientos combinados, empleando concentraciones bajas del mismo.

Los resultados mostraron que mientras que H-ALA-TFDA por sí solo tuvo un impacto mínimo en la viabilidad de las biopelículas de *S. aureus* RN6390, la aplicación de TFTc en los cultivos tratados con H-ALA indujo una disminución de 2 log en las UFCs. Además de la aplicación combinada de la TFDA y TFTc resultó en una notable reducción de 4 log en las UFCs. Esta reducción superó la disminución de 3 órdenes observada previamente al utilizar ALA como fotosensibilizante.

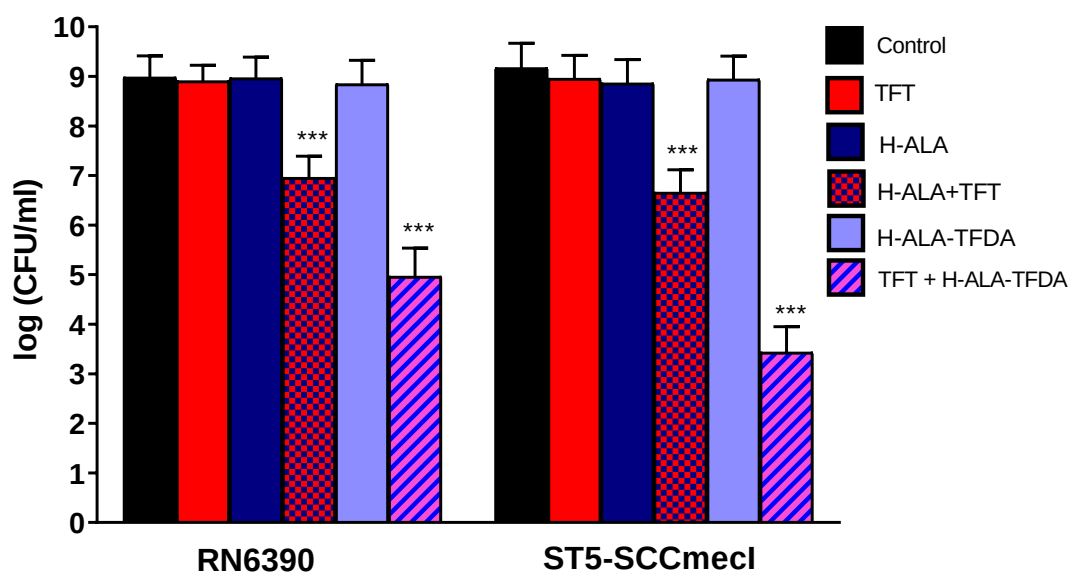


Figura I.10: Tratamiento de biopelículas de *S. aureus* RN6390 y ST5-SCCmecI con H-ALA-TFDA, con o sin TFTc

Viabilidad de biopelículas tratadas con H-ALA 1 mM, seguido de TFTc (292 J/cm²) y una incubación posterior de 1 h con H-ALA antes de la TFDA (152 J/cm²). Se incluyeron controles sin tratamiento, TFTc sola, H-ALA solo y combinaciones con TFDA y TFTc. *** $p < 0,001$ en comparación con H-ALA. ANOVA de unavía con prueba post hoc de Tukey.

De manera similar, la cepa ST5-SCCmecI no mostró una respuesta significativa a H-ALA-TFDA por sí sola; sin embargo, la aplicación de la TFTc en biopelículas tratadas con H-ALA provocó una disminución 2 log en las UFCs. En consecuencia, la TFTc aumentó la disminución de la viabilidad de los cultivos inducidas por H-ALA-TFDA en

6 log, superando la disminución de 4 órdenes inducida por los tratamientos ALA-TFDA combinada con TFTc.

Mientras que a concentraciones menores o iguales a 0,5 mM de H-ALA la síntesis de porfirinas no se vio alterada ni por la TFTc ni por el calentamiento, a 1 mM ambos tratamientos redujeron notablemente la cantidad de porfirinas intra y extracelulares formadas (Figura I.11).

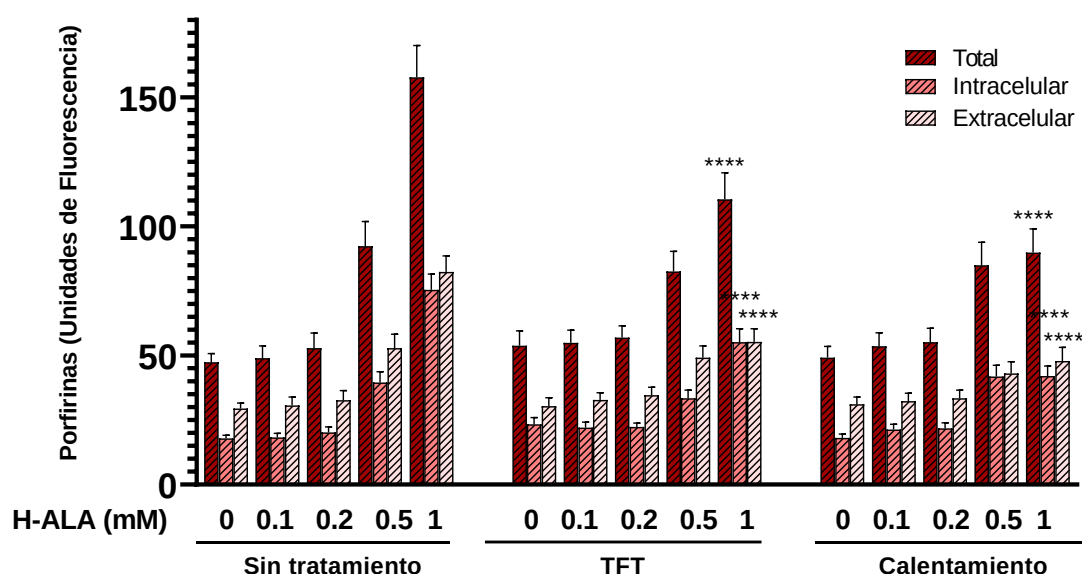


Figura I.11: Síntesis de porfirinas a partir de H-ALA en biopelículas de *S. aureus* RN6390 después de TFTc o calentamiento del medio.

Las biopelículas se incubaron con H-ALA y se trataron con TFTc (292 J/cm²) seguido de incubación de 1 h a 37°C en oscuridad. Se incluyó un control del calentamiento del medio producido por el TFTc, empleando PBSestéril, precalentado en incubador térmico a la temperatura máxima alcanzada durante elTFTc. **** $p < 0,0001$ en comparación con el control correspondiente sin tratar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con la prueba post hoc de Tukey.

I.5 Ensayos de ALA-TFDA y TFT en placas de titanio

Tomando el modelo de descontaminación de superficies de titanio (Bohm et al., 2020), se decidió probar el TFT y TFDA en biopelículas crecidas sobre placas de titanio. Utilizando las condiciones puestas a punto en las secciones anteriores, se realizó la combinación de ALA-TFDA y TFT. Bajo estas condiciones, la temperatura del medio ascendió de 24 a 51°C ($\Delta T=27^\circ\text{C}$), y la temperatura medida directamente sobre la placa de titanio ascendió a 58°C empleando el modo continuo del láser 980 nm. Empleando el láser en modo pulsado, el ascenso de la temperatura del medio fue de 24 a 46° C ($\Delta T=23^\circ\text{C}$), mientras que la medición sobre la placa arrojó un valor de 53°C.

La fotoinactivación generada por la combinación de la TFTc o TFTp y la ALA-TFDA produjo una disminución de más de 4 logs en la viabilidad bacteriana respecto al control sin tratamiento (Figura I.12), independientemente del modo continuo o pulsado. Las terapias mediadas por luz empleadas independientemente no indujeron cambios en la viabilidad bacteriana.

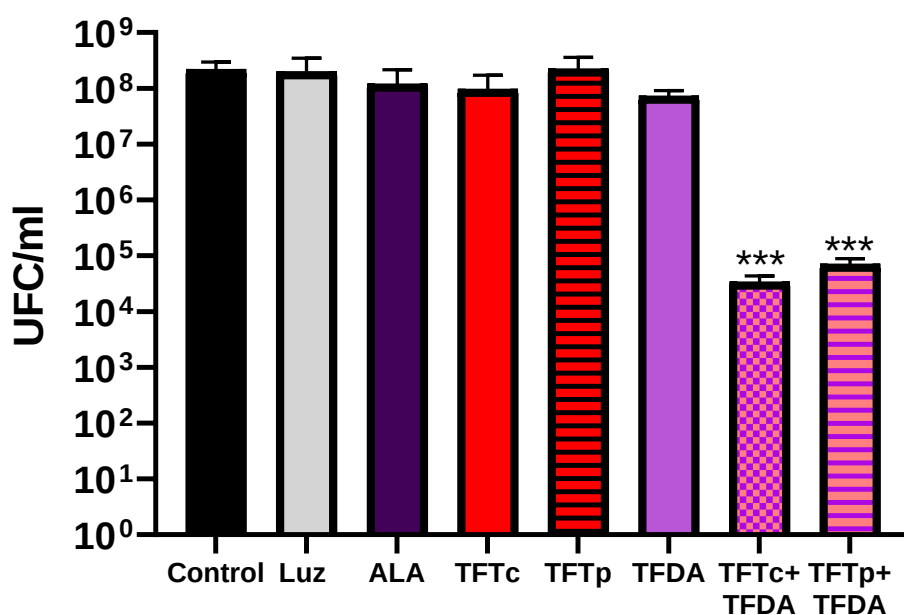


Figura I.12: Efecto de la TFT y ALA-TFDA sobre la viabilidad de biopelículas de *S. aureus* RN6390 crecidas sobre superficies de titanio

Viabilidad de biopelículas crecidas durante 24 h sobre superficies de titanio, e incubadas 1 h con 1 mM de ALA, tratadas o no tratadas con TFTc y TFTp, y posterior iluminación (151 J/cm²). Se empleó TFTc y TFTp (50 ms y 4 Hz) siempre con una misma dosis final de energía (292 J/cm²). También se incluyeron controles de luz, ALA en la oscuridad, y TFT. ****p* < 0.001 en comparación con el tratamiento con ALA. ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey.

I.6 Localización de porfirinas en las biopelículas por microscopía confocal de fluorescencia

Se observó la localización de porfirinas mediante microscopía confocal de fluorescencia, en biopelículas tratadas con ALA y posterior aplicación de TFTc. Las imágenes adquiridas fueron acondicionadas para su observación y cuantificación. Para ello se le realizó un proceso de eliminación de ruido de Poisson típico de las imágenes de fluorescencia mediante transformada wavelet Daubechies db4 de 2 niveles (Luisier et al. 2009) y una posterior reconstrucción con umbralizado suave simple, atenuando los coeficientes de la subbanda HH del segundo nivel de descomposición (ver sección 2.9.1 de Materiales y

Métodos) como se muestra en la Figura I.13. Como puede apreciarse, el ruido aparece como un moteado de alta intensidad que tapiza toda la imagen, sobre todo en las zonas más intensas. Esta técnica de mejoramiento resultó ser efectiva para reacondicionar las imágenes y poder cuantificar de forma más precisa la intensidad de fluorescencia debida a los tratamientos.

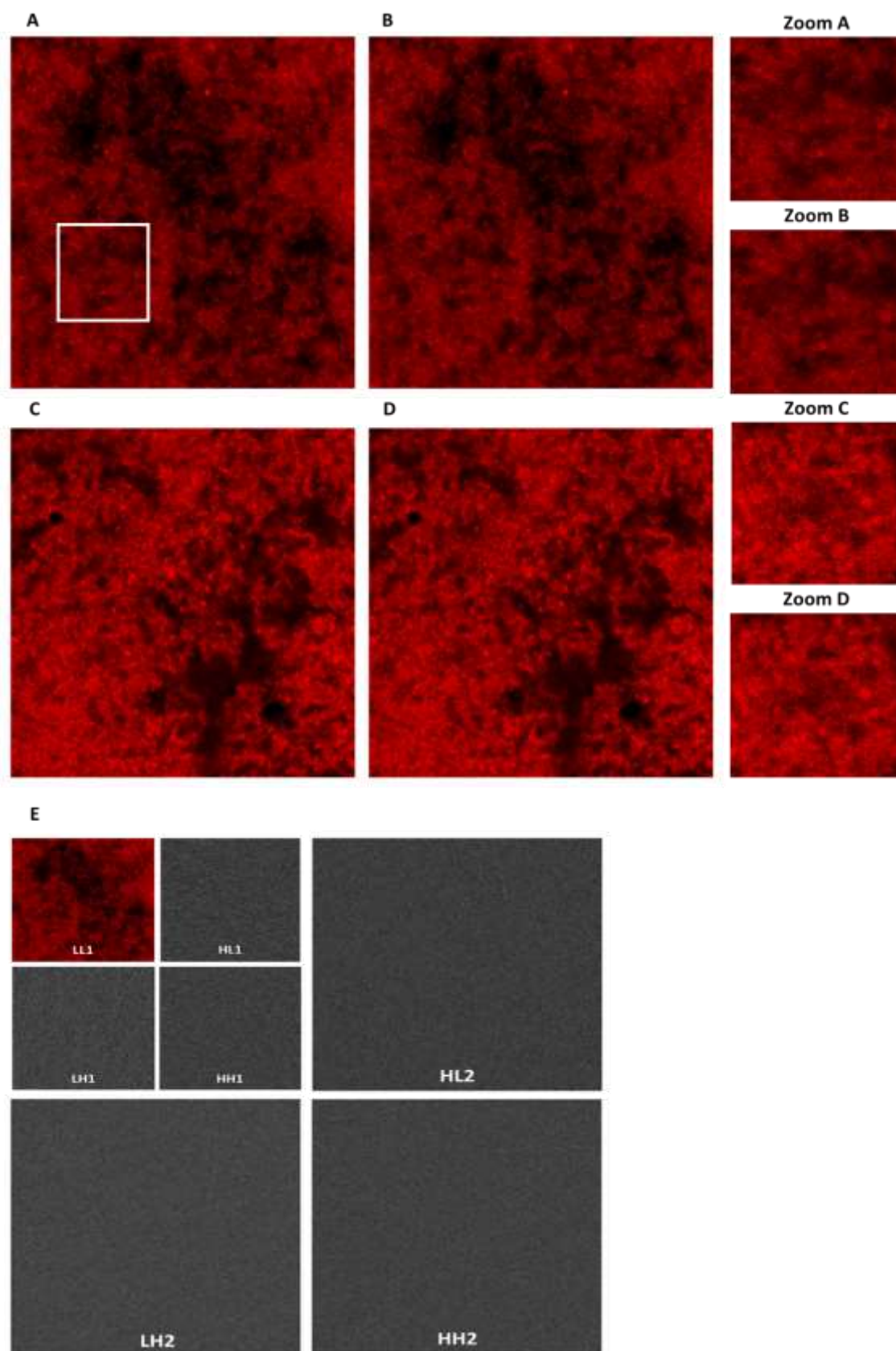


Figura I.13: Eliminación de ruido de las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia
A) Imagen original de la biopelícula incubada con 1mM ALA; B) imagen A sin ruido; C) imagen original ALA + TFTc, D) imagen C sin ruido. Para todas las imágenes se muestra el zoom en la porción indicada. E) Muestra, en escala de grises de los coeficientes wavelet para cada subbanda

en cada nivel de descomposición particular para la imagen original del stack 10 de la biopelícula incubada con ALA. Se identifica la subbanda HH2 a atenuar para realizar la eliminación del ruido de Poisson.

En la Figura I.14 es posible visualizar el aumento de la fluorescencia de porfirinas inducido por TFTc en biopelículas tratadas con ALA. En las imágenes capturadas desde las secciones basal, media y superior de las biopelículas tratadas con TFTc, observamos un mayor contenido de porfirinas que se distribuyó uniformemente a lo largo de la estructura de la biopelícula.

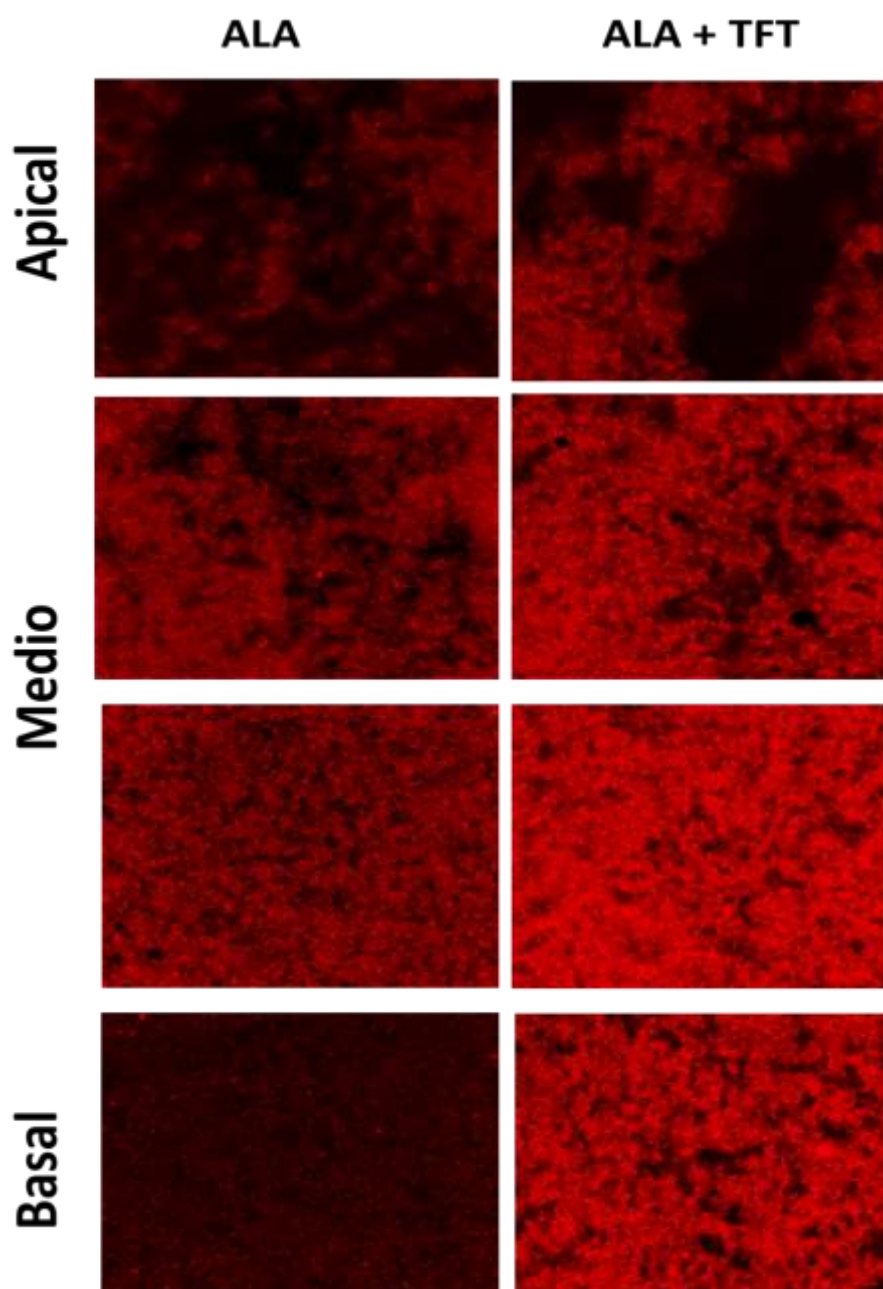
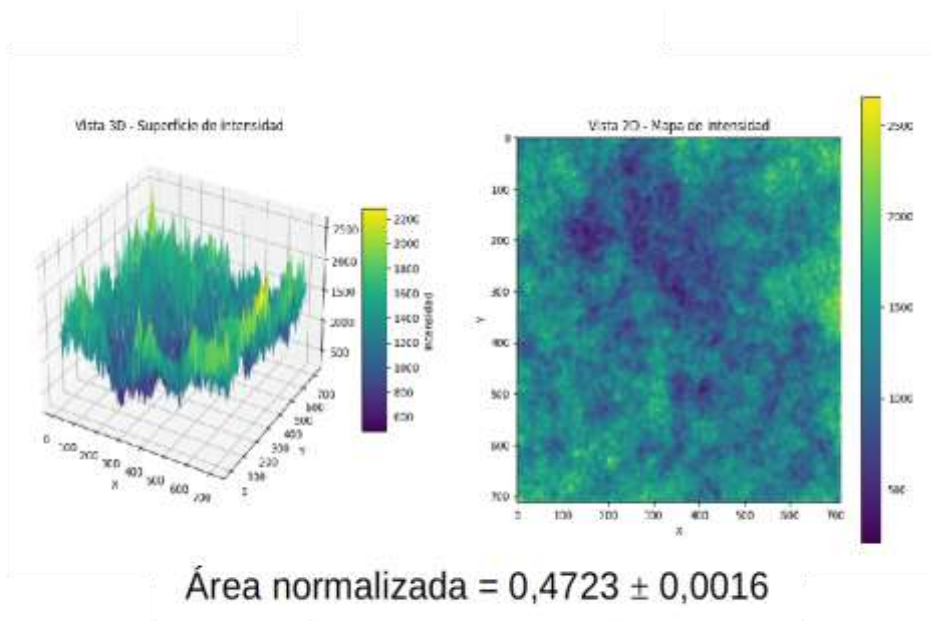


Figura I.12: Distribución de porfirinas en biopelículas de *S. aureus* RN6390 tratadas con ALA y TFTc

Las biopelículas de 24 h de desarrollo fueron expuestas a 1 mM de ALA, con o sin el tratamiento posterior de TFTc (292 J/cm²), seguido de una incubación de 1 h. Se muestra una fotografía representativa de cada tratamiento para las regiones basal, media y apical de la biopelícula.

Finalmente, para cuantificar la fluorescencia de las imágenes se graficó el nivel de intensidad normalizado de los píxeles en la coordenada z, elaborando un gráfico de la imagen en 3D para poder visualizar el nivel de fluorescencia a partir del cálculo del área total bajo la curva, para toda la pila de imágenes superpuestas de cada muestra (Figura I.13) y para cada imagen seleccionada de la porción basal, media y apical correspondiente (Figura A1) (ver sección 2.9.1 de Materiales y Métodos). El área resultante es una métrica relativa que describe el contenido acumulado de la intensidad en términos normalizados, por lo que son valores relativos adimensionales que van entre 0 y 1. Se puede observar un aumento en el área bajo la curva de intensidades totales de fluorescencia en las biopelículas tratadas con TFTc inmediatamente después de exponerlas al ALA ($0.4723 \pm 0,0016$ ALA vs $0.6095 \pm 0,0025$ TFTc), mostrando un aumento significativo ($p < 0,0001$) que representa un 30% de incremento en la intensidad de fluorescencia para la muestra analizada tratada con ALA-TFTc. Estos resultados se corresponden con el aumento producido en la síntesis de porfirinas extraídas químicamente y cuantificadas en las secciones anteriores. Además, la contribución a la intensidad total acumulada es menor en las zonas apicales y va aumentando a medida que se avanza en la profundidad del biofilm, tanto para las biopelículas tratadas con ALA como con ALA+TFTc (Figura A1). Esto da cuenta de una menor densidad de bacterias en la zona superior de las biopelículas en comparación con las zonas más basales. En las 3 zonas definidas (basal, media y apical), se observaron diferencias significativas en la cuantificación de unidades de fluorescencia, siendo esta señal mayor en el tratamiento ALA + TFTc que en el de ALA sólo ($p < 0,05$).

ALA



ALA + TFT

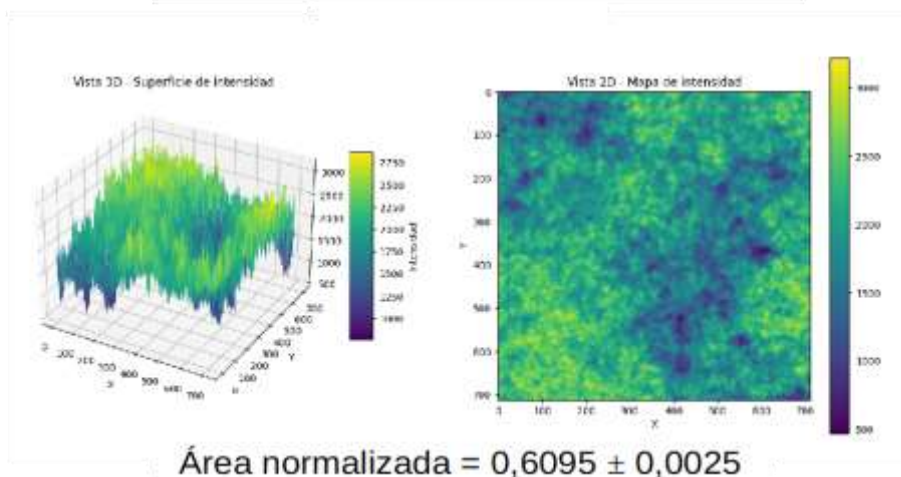


Figura I.13: Gráficos 3D y 2D de la suma de la fluorescencia de los stacks obtenidos por CLSM, de las biopelículas de *S. aureus* RN6390 tratadas con ALA, con o sin tratar con TFTc

Gráfico de área bajo la curva de la suma de todos los stacks de las biopelículas tratadas con ALA y ALA + TFTc. En el eje Z de los gráficos 3D (paneles de la izquierda) se muestran los valores de fluorescencia (profundidad de píxel) normalizados, obtenidos a partir de la suma de imágenes de cada zona. Los gráficos 2D (paneles de la derecha) muestran la distribución espacial de los valores de intensidad para visualizar las diferencias entre los tratamientos y las zonas evaluadas.

I.7 Discusión

En el presente estudio, la TFT potenció el efecto bactericida de la TFDA mediada por el precursor de porfirinas ALA, y su derivado, H-ALA en biopelículas de *S. aureus*.

En el caso del ALA, esta mejora puede atribuirse en parte al incremento en la síntesis de porfirinas. Esto no se replica mediante efectos solo térmicos, ya que el calentamiento de

una solución de ALA a 37°C y su adición a la biopelícula (previamente en medio con temperatura inicial de 24°C), no reprodujo los resultados obtenidos con TFT.

Al emplear el H-ALA, la TFT mostró un efecto aún más pronunciado sobre la TFDA (a pesar de que se sintetizan menos porfirinas en comparación con ALA). La disminución en la viabilidad observada fue de 4 log para RN6390 y de 6 log para STC-SCCmecI. Dado que H-ALA es un fármaco hidrofóbico con un logD de 1.83883 en contraste con ALA, de naturaleza hidrofílica (logD=-1.51692) (Uehlinger et al., 2000), es plausible que el H-ALA pueda quedar atrapado en la membrana o pared bacteriana, resultando en inestabilidad, tal como se ha observado en trabajos previos en células eucariotas (Perotti et al., 2004). Postulamos que H-ALA, en combinación con TFDA y TFT, podrían potencialmente desestabilizar la membrana bacteriana de manera independiente, lo que llevaría a una disminución en la viabilidad.

La intensidad del efecto de la aplicación combinada de TFT con ALA-TFDA dependió de la cepa utilizada, resultando en una disminución de 3 log y 4 log en la viabilidad de las cepas RN6390 y STC-SCCmecI, respectivamente. Este efecto bactericida es igual o superior a los 3 log propuestos por algunos autores como criterio para considerar un nuevo tratamiento antibacteriano (Cieplik, 2014).

En investigaciones previas, se mostraron efectos aditivos al combinar TFT con TFDA mediado por azul de toluidina (Gándara et al., 2017), y efectos sinérgicos cuando se empleó el FS porfirínico TAPP (Mamone et al., 2024) en biopelículas de *S. aureus*. En este último caso, el efecto observado se relacionó directamente con un incremento en el contenido del FS por bacteria, y las condiciones de la TFT fueron tales que la temperatura del medio llegaba a un máximo de 46 °C ($\Delta T = 21.5^\circ\text{C}$). Además de mejorar la penetración de TAPP, la TFT había dispersado las biopelículas e inducido fisuras en la matriz de las mismas. Considerando estos antecedentes, en esta Tesis optamos por aplicar dosis bajas de radiación infrarroja para minimizar el posible daño térmico inducido por la TFT en células eucariotas, asegurándonos de que la temperatura no superara los 37 °C. Además, propusimos utilizar condiciones subletales de ALA-TFDA con el fin de abordar el desafío que representan las cepas bacterianas con baja sensibilidad a la activación fotodinámica.

Para la puesta a punto de las condiciones de TFT, se empleó un láser de 980 nm (4,3 W/cm²) durante 68 s en modo continuo y 170 y 340 s en modo pulsado, obteniéndose aumentos similares de las temperaturas del medio con ambas modalidades, razón por la cual se continuó con los experimentos del resto del capítulo empleando solo el modo continuo, y se retomó la comparación de TFTc y TFTp en la parte del trabajo *in vivo*.

Cuando se utilizaron placas de titanio, como superficie de crecimiento de la biopelícula, las temperaturas obtenidas empleando el modo continuo en la TFT indujeron aumentos de 27°C en el medio de cultivo, mientras que el incremento fue de 21° C cuando se empleó el modo pulsado. Sin embargo, la TFT no llegó a causar inactivación bacteriana en estas condiciones, aunque sí se observó la inactivación de 3 logs de UFCs en biopelículas de *S. aureus* RN6390 cuando se cambió dicho tratamiento con ALA-TFDA.

Es importante señalar que, sin embargo, la TFDA puede ajustarse para inducir la muerte bacteriana. La sustitución de la fuente de luz no-coherente (que aún a 302 J/cm² no indujo efecto bactericida), por una fuente de luz coherente como el láser de 635 nm (a 280 J/cm²), demostró que es posible lograr una acción de la TFDA mejorándola calidad y potencia de la luz activadora del proceso. De manera similar, aumentando el tiempo de exposición al ALA de 1 a 3 h, fue posible inducir una fotoinactivación de 1 log luego de iluminación con lámparas halógenas.

A diferencia de la subletalidad de las condiciones empleadas de ALA-TFDA en biopelículas, dicha terapia *per se* fue eficaz en el tratamiento de cultivos planctónicos, resultando en una reducción de 3 log en UFC de *S. aureus* RN6390, y la TFT no potenció la efectividad de la TFDA. Esto apoya la hipótesis de que la radiación NIR mejora la penetración del ALA a través de la matriz de la biopelícula, ya que en bacterias en suspensión no se incrementa la síntesis de porfirinas. Contrariamente, la producción de porfirinas a partir de ALA se redujo levemente tras la exposición de cultivos planctónicos a TFT.

La TFT permitió fotosensibilizar a las bacterias contenidas dentro de la matriz de la biopelícula. Este incremento de la acción bactericida de la TFDA mediada por NIR, podría atribuirse a la desestabilización de la membrana y/o pared celular inducida por los efectos subletales de la TFT, lo que podría hacer a los microorganismos más susceptibles a los efectos fotooxidativos de la TFDA.

Al trabajar con la cepa STC-SCC-mecI (MRSA), la reducción de la viabilidad al combinar TFDA-TFT fue de 4 log, mayor a los 3 log obtenidos con el mismo tratamiento en la cepa RN6390 (MSSA), aun cuando la cantidad de porfirinas sintetizadas, a partir de ALA, fue similar en ambas cepas. La variabilidad en la respuesta entre diferentes cepas de *S. aureus* ha sido reportada previamente (Kossakowska, et al., 2013), sin correlación clara entre los patrones de resistencia a antibióticos o factores de virulencia y el grado de respuesta a la TFDA. Esta discrepancia indica que hay otros factores, además de la simple acumulación de FS, que influyen en la eficacia del tratamiento. Estos factores pueden incluir la activación de bombas de eflujo (exclusión del FS de la célula bacteriana), la producción de enzimas antioxidantes (que neutralizan las ROS), cambios en la

composición de la pared celular o la membrana celular, y la capacidad de desarrollar biopelículas (Rapacka-Zdończyk et al., 2021a).

Por otra parte, en el presente trabajo, resultó de especial interés la cantidad de porfirinas intracelulares generadas a partir de ALA a 1 mM, que fue el doble de la producida por su éster (H-ALA) en concentraciones equimolares. Además, la relación de porfirinas intracelulares a extracelulares fue de 1:1 para H-ALA, mientras que para ALA fue de 8:1, lo que probablemente explica una mayor liberación de porfirinas de la biopelícula debido a la desestabilización inducida por el hexil éster de ALA.

El calentamiento del medio (PBS) con ALA o H-ALA de 24 a 37°C no replicó el efecto de la radiación NIR en la TFDA. En estudios previos, también observamos que precalentar TAPP-PBS a 46°C no alteró significativamente la eficacia de TAPP-TFDA, lo que sugiere que tanto efectos térmicos como no térmicos contribuyen a la acción de la radiación NIR sobre las biopelículas (Mamone et al., 2024).

Proponemos que la cinética del aumento de temperatura dentro de la biopelícula, causada específicamente por la radiación NIR empleada, lleva a su desestabilización sin comprometer (*per se*) la viabilidad de los microorganismos, pero facilitando la entrada de ALA. Adicionalmente, esta desestabilización podría promover la liberación de una mayor proporción de bacterias que pasarían a un estado planctónico, y por ende quedarían más expuestas a los efectos de la TFDA, tal como se ha demostrado en estudios previos utilizando condiciones de TFT más intensas (Mamone et al., 2024).

La observación de la distribución de porfirinas por microscopía confocal de fluorescencia, confirmó una mayor acumulación de las mismas a lo largo de toda la biopelícula tratada con ALA y TFT en comparación con la que no recibió tratamiento NIR. Este aumento de fluorescencia se observó en todas las capas del cultivo, observándose siempre mayor acumulación en las zonas más basales debido a la presencia de una mayor biomasa en este sector.

Cabe mencionar que bajo las condiciones de luz actuales utilizadas en la TFDA, tanto ALA como H-ALA fotoinactivaron eficazmente, células de adenocarcinoma mamario murino LM3 (Perotti et al., 2004). Dado el potencial de este tratamiento en combinación con desbridamiento para la eliminación de biopelículas, es importante considerar que el tejido que alberga las bacterias también se vería afectado durante el proceso, en una eventual implementación de estos tratamientos en infecciones.

En general, nuestros resultados respaldan el uso de la TFT para potenciar la TFDA al mejorar la penetración de los pro-FS ALA y H-ALA, en cepas tanto sensibles como

resistentes a meticilina, haciendo que la TFDA sea más efectiva para el tratamiento de biopelículas.

Capítulo II: Desarrollo de los modelos de abscesos y heridas no infectadas

A partir de los resultados obtenidos en el Capítulo I, se propuso avanzar en la aplicación de las terapias mediadas por luz en modelos *in vivo*. Para ello se implementaron distintos modelos de heridas superficiales y abscesos cutáneos que resultan de interés para estudiar independientemente la acción de dichas terapias sobre la cicatrización de heridas y su acción bactericida.

Se pusieron a punto dos tipos de modelos de heridas: superficiales no infectadas, y abscesos cutáneos. Dentro de estos últimos, se probó un modelo infeccioso (inyección de bacterias viables), y otro de infiltrado inflamatorio estéril (con bacterias inactivadas). Los modelos de heridas no infectadas representan modelos de heridas agudas en los cuales se puede estudiar el proceso de cicatrización sin la complejidad añadida de una infección activa. Por otra parte, el modelo de abscesocutáneo infeccioso, representa un modelo de infección de piel y partes blandas donde evaluar los mecanismos de invasión bacteriana, y de la respuesta inmune, y sobre el cual se puede estudiar la acción de las terapias mediadas por luz.

Los modelos de heridas no infectadas simulan el escenario de heridas agudas, mientras que las infectadas representarían una aproximación a heridas crónicas colonizadas o infectadas. Si bien técnicamente no se consideran crónicas, dado que el ratón resuelve la infección en un corto plazo, estos modelos siguen siendo útiles como aproximación experimental a ese tipo de condiciones clínicas.

Este capítulo está dividido en cuatro secciones. En la primera, se presenta la puesta a punto del modelo de absceso cutáneo a partir de una inyección subcutánea de una suspensión de bacterias *S. aureus*. En la segunda, se presenta una variante del primer modelo, que consiste en una inyección subcutánea de las mismas bacterias, pero previamente inactivadas por calor. En las tercera y cuarta secciones, se muestra la puesta a punto de los modelos de heridas no infectadas, realizadas con bisturí (modelo incisional) o con punch para biopsia de piel (modelo escisional), respectivamente. A partir de esta puesta a punto, se elegirán los modelos que serán empleados para el estudio de la TFDA y la TFT.

II.1 Modelo de absceso cutáneo

El día de la infección se rasuraron los ratones y en los flancos rasurados se inyectaron subcutáneamente 100 µl de una suspensión conteniendo 10^8 bacterias *S. aureus* de la cepa RN6390 en PBS, según se detalla en Materiales y Métodos sección 3.3 (Guo et al., 2013).

Se definió como tiempo inicial (tiempo 0), las 48 h post infección. A este tiempo de establecida la infección, se realizarán los diferentes tratamientos. El mismo se eligió debido a que a este tiempo, los abscesos presentaron un tamaño adecuado como para evidenciar la eficacia de los tratamientos, siendo el área promedio de los abscesos de $250 \pm 30 \text{ mm}^2$. Cabe destacar que hasta estas primeras 48 h, los abscesos permanecieron cerrados, mientras que a tiempos posteriores se observó disrupción de las capas más superficiales de la piel (dermonecrosis) y generación de costras en algunos casos. En la Figura II.1 se muestra la progresión temporal de los abscesos.

Para la puesta a punto del modelo se inyectaron suspensiones de 10^7 , 10^8 , 10^9 y 10^{10} bacterias tanto en ratones CF-1 como en BALB/c para comparar sus respuestas y elegir la cepa murina que fuera un mejor modelo para el análisis *in vivo* de las diferentes estrategias terapéuticas. Se eligió la concentración de 10^8 bacterias inyectadas en ratones machos CF-1 de 8 a 10 semanas, por ser una concentración subletal luego de un ensayo de dosis respuesta *in vivo* y basado también en reportes previos (Volpe et al., 2020). Los abscesos inducidos sobre ratones de esta cepa exocriada resolvieron las infecciones en un tiempo adecuado como para poder evidenciar diferencias en los efectos de los tratamientos, a diferencia de los de la cepa BALB/c que presentaron tiempos de resolución más prolongados que habrían dificultado la evaluación comparativa de los tratamientos. La variabilidad del tamaño inicial de las heridas fue del 16 % ($236.8 \pm 39.3 \text{ mm}^2$)

Se tomó registro de los tamaños de los abscesos mediante los dispositivos descritos en la sección 3.7 de Materiales y Métodos. Como se observa en la Figura II.1 A, entre el día 1 y 2 se presenta el máximo tamaño del absceso, y a partir del día 3 comienza la retracción del tejido infectado y la resolución espontánea de la herida. En este gráfico de progresión temporal, se puede observar la variabilidad del tamaño de la lesión entre individuos, que es del 35 al 55% dependiendo del día de evolución.

Entre los días 2 y 4, se evidenció una mayor inflamación y la presencia de enrojecimiento en los bordes de la herida, junto con el desarrollo progresivo de costras. La aparición y el desprendimiento de esta última es un evento clave en la evolución de la herida, ya que su pérdida, observada al día 12.2 ± 1.3 , se presentó como una fase previa a la resolución final del proceso de cicatrización. En algunos casos, tras el desprendimiento de la costra,

se registró la aparición de secreción transparente y/o amarillenta, lo que sugiere la persistencia de inflamación en la zona afectada. El tiempo de cierre de los abscesos, que se definió como el tiempo al cual el tejido cicatricial tuvo un diámetro menor o igual a 3 mm, fue de $27,12 \pm 1,48$ días.

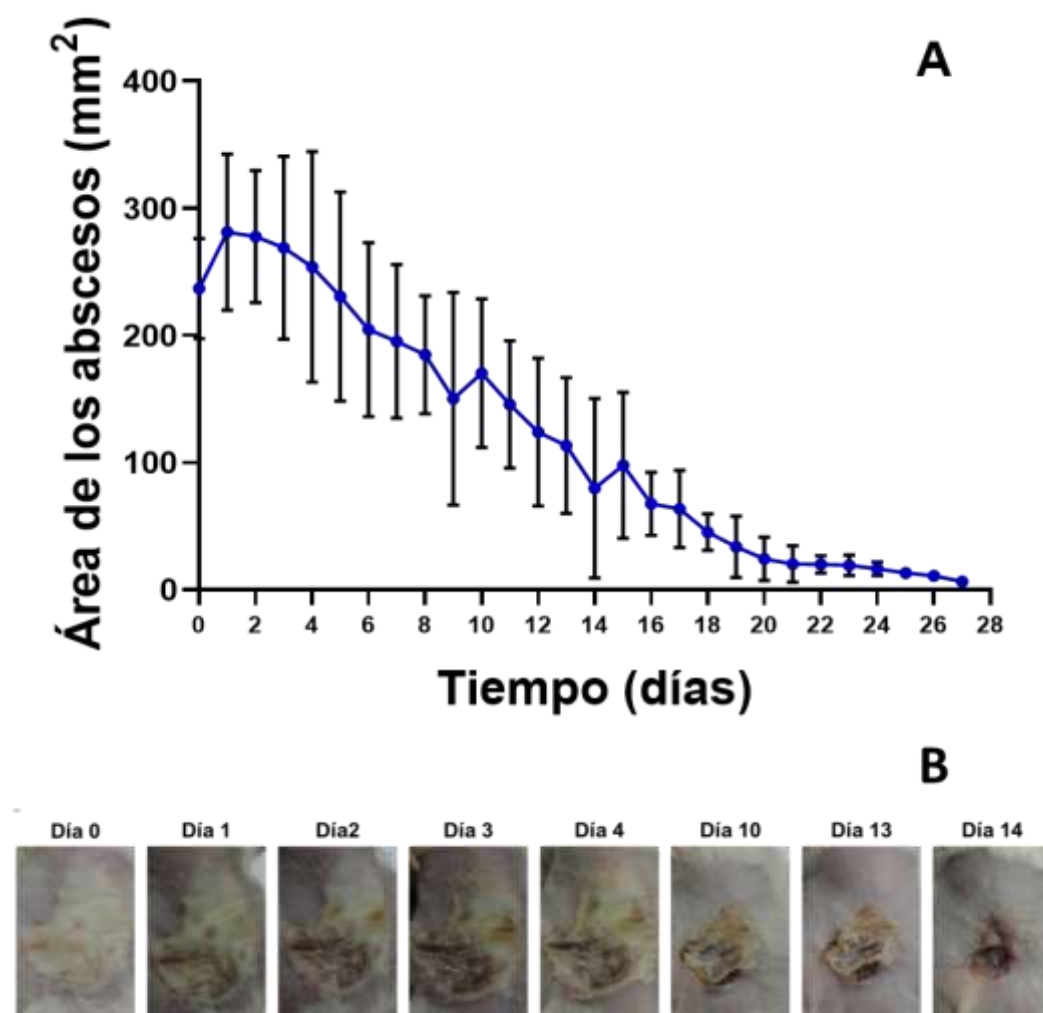


Figura II.1: Abscesos cutáneos inducidos mediante inyección de una suspensión de *S. aureus* RN6390 en ratones CF-1

A) Progresión temporal del área de los abscesos, media $\pm$ SD de 6 ratones, luego de establecida la infección (48 h luego de la inoclación de bacterias= día 0). B) Fotografías de la progresión de un absceso representativo tomadas a diferentes tiempos.

II.2 Modelo de infiltrado inflamatorio estéril

Se desarrolló un modelo experimental de infiltrado inflamatorio estéril como respuesta a la inyección de una suspensión de bacterias inactivadas. Para este propósito, se inyectaron ratones con 100, 200 y 300 μ l de una suspensión de 10^8 bacterias inactivadas *S. aureus*

RN6390. Se realizaron tres ciclos de calentamiento a 65°C durante 10 min y la inactivación total se corroboró por siembra en TSA (Gómez et al. 2002).

A las 24 horas post-inyección, se observaron las respuestas inflamatorias locales. Los ratones inyectados con 200 μ l y 300 μ l desarrollaron una zona de inflamación en el sitio de inoculación, mientras que aquellos inyectados con 100 μ l no presentaron ninguna reacción observable (Figura II.3). Posteriormente, se sacrificaron los ratones y se realizó el hisopado en la porción interna de la piel, corroborando la ausencia de bacterias viables. A partir de estos resultados, se decidió emplear el inóculo de 300 μ l, debido a que indujo una respuesta visiblemente mayor que los demás inóculos para la evaluación de fluorescencia descrita en la sección 5 del Capítulo III.



Figura II.3 Infiltrado inflamatorio estéril inducido por inyección subcutánea de una suspensión de *S. aureus* inactivada por calor

*Las imágenes muestran la zona de inoculación en ratones inyectados con 100 μ l, 200 μ l, y 300 μ l de una suspensión inactivada de 10^8 de *S. aureus* RN6390 a las 24 horas post-inyección.*

II.3 Modelo de herida no infectada por raspado con bisturí

Sobre el flanco previamente rasurado del ratón, se realizó una serie de cortes longitudinales y transversales, con bisturí estéril sobre la piel, y luego un raspado homogéneo, barriendo toda la zona herida previamente. Se tuvo especial cuidado en realizar cortes suaves y poco profundos intentando no llegar a la hipodermis. Los animales fueron anestesiados con isoflurano durante el procedimiento (Guo et al, 2013). El tamaño inicial de las heridas fue de $168.3 \pm 50.6 \text{ mm}^2$, siendo 30% el porcentaje de

variación. Los tratamientos de heridas para este modelo se realizaron luego de 1 h de la generación de la lesión (modelo de herida aguda).

En la Figura II.4 se muestran las imágenes de la progresión de las heridas en el tiempo. Se trata de heridas de resolución más rápidas que la de los abscesos, con tiempos promedio de caída de costra de $10,30 \pm 1,03$ días, mientras que el tiempo de cierre de las heridas fue de 9 ± 1 días. En este modelo, la variación del tamaño a lo largo del tiempo fue de entre el 17 y el 35%. El tiempo de cierre se definió como el tiempo al cual el tejido cicatricial midió en su dimensión mayor, menos de 3 mm.

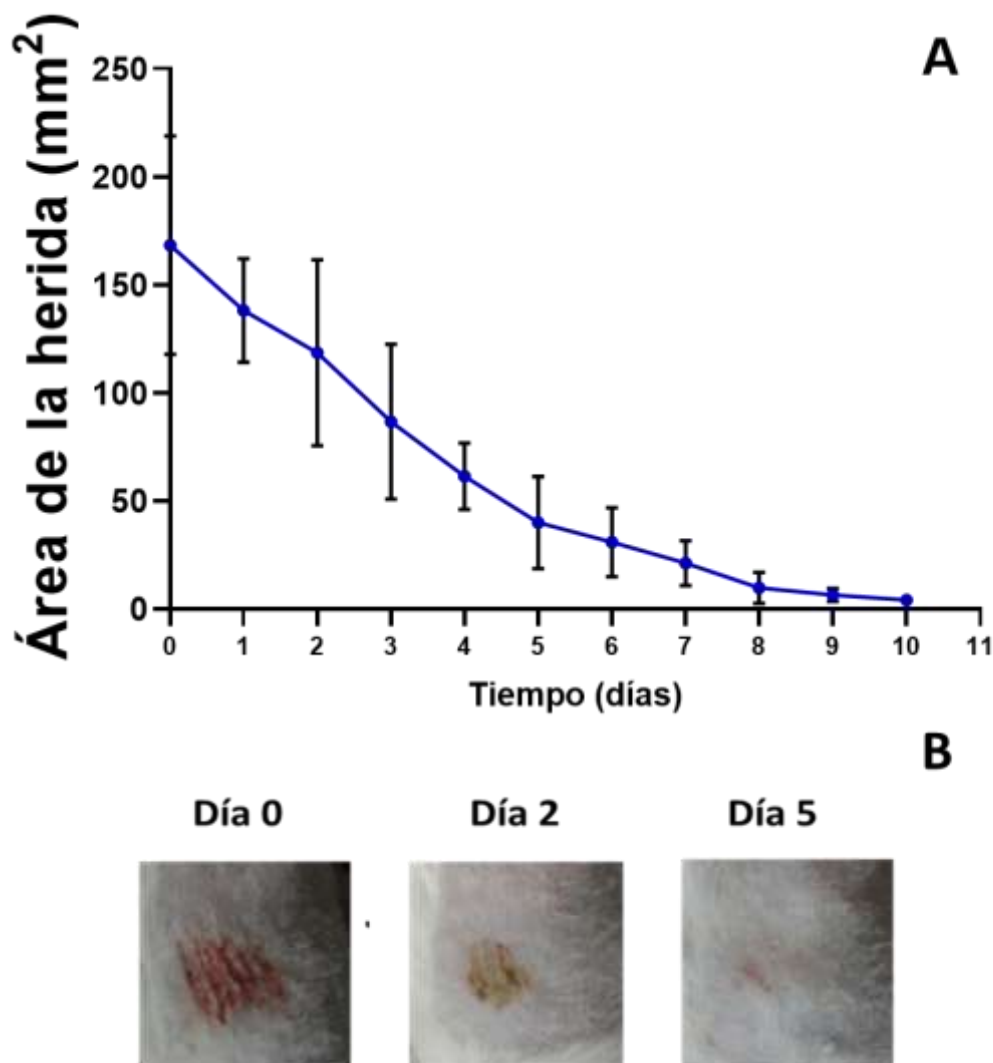


Figura II.4: Progresión temporal de heridas no infectadas inducidas por bisturí
A) Progresión temporal de heridas, media $\pm$ SD de 3 ratones. B) Fotografías de una herida representativa

II.4 Modelo de heridas no infectadas por punch para biopsia

En esta sección se describe el desarrollo de un modelo de herida no infectada generado mediante la extracción de una porción de piel utilizando un punch estéril para biopsias de piel de 5 mm de diámetro (Rowland et al., 2023).

Utilizando el punch de biopsia, se extrajo cuidadosamente la dermis, tejido subcutáneo, y se extendió la lesión hasta el panículo carnoso. Este procedimiento aseguró que las heridas fueran uniformes en tamaño y profundidad al inicio del tratamiento, encontrándose una dispersión en el tamaño inicial del 6%. Como se muestra en la Figura II.5, la variación de la progresión del tamaño de la herida a lo largo del tiempo, tuvo una variabilidad del 12 al 36%. Los tiempos de caída de costra y de cierre de herida fueron de 6 ± 1 y $10,30 \pm 0,57$ días respectivamente. El cierre de herida se definió como el tiempo al cual el tejido cicatricial tuvo un diámetro menor o igual a 3 mm.

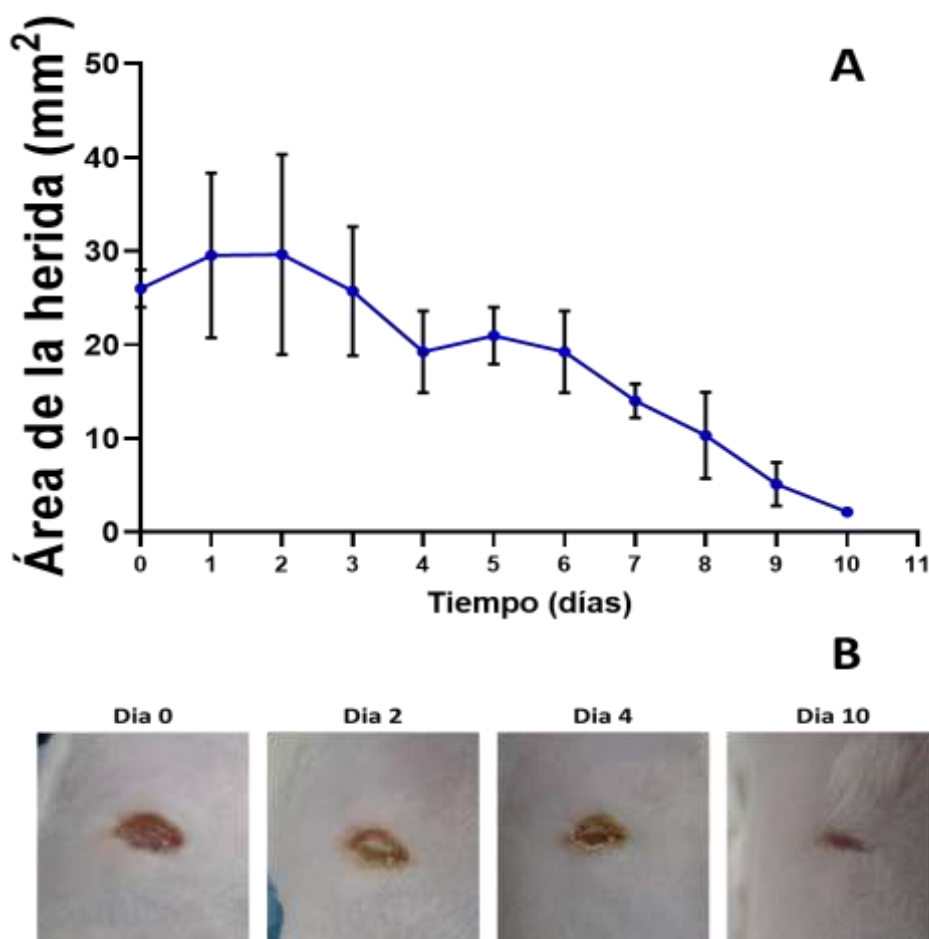


Figura II.5: Progresión temporal de heridas no infectadas inducidas por punch para biopsia

A) Progresión temporal del área de las heridas, media $\pm$ SD de 3 ratones. B) Fotografías de una herida representativa.

II.5 Discusión

Existen diferentes modelos de heridas en animales descritos en la literatura, incluidos los modelos incisionales, excisionales, de quemaduras, y modelos de tejido de granulación. En un modelo de herida excisional, la cicatrización ocurre desde los márgenes de la herida. Este tipo de modelo permite la evaluación de los mecanismos de cicatrización, incluyendo la epitelización, la formación de tejido de granulación, la formación de cicatrices, la contracción y la angiogénesis (Galiano et al., 2004).

Los ratones elegidos en este trabajo para trabajar en abscesos y heridas no infectadas fueron de la cepa CF-1. Los mismos provienen de la línea exogámica Swiss, los cuales poseen una alta variabilidad genética, lo que los convierte en un modelo útil en estudios de biomedicina. Al ser una cepa exocriada, la diversidad genética les permite ser más representativos de una población general. Sin embargo, se trata siempre de modelos de infección autocontrolada, que no termina de representar la problemática de infecciones crónicas en humanos, pero que se emplea como aproximación válida (Zak et al., 1999).

Las infecciones por *S. aureus* en humanos pueden ocurrir en sitios donde la función de barrera de la piel ha sido comprometida (infecciones de heridas o del sitio quirúrgico) o sin aparentes rupturas, por ejemplo, en los folículos pilosos (foliculitis), como lesiones ampollas o superficiales (impétigo), profundas (forúnculos) o abscesos confluyentes (carbunco cutáneo) (Lowy, 1998). El modelo de absceso cutáneo propuesto emula infecciones profundas tales como forúnculos, y a pesar de involucrar estructuras de tejido conectivo, adiposo y muscular, para su simplificación, a lo largo de esta tesis lo denominaremos “absceso cutáneo”.

S. aureus puede inducir un amplio espectro de enfermedades en ratones, similar a lo observado en humanos, aunque la dosis infecciosa necesaria para producir una patología específica varía considerablemente. Tanto ratones endogámicos inmunocompetentes como ratones exocriados pueden utilizarse como modelos de enfermedad, aunque la cantidad de bacterias necesarias para inducir infección puede variar en un factor de 10 a 100, las respuestas inmunes y la susceptibilidad a infecciones suele ser diferentes debido a la diversidad genética (Enriquez et al., 2020; Martin et al., 2017).

Volpe y colaboradores (2020) emplearon la cepa CF-1 en estudios de abscesos cutáneos de *S. aureus* cepa MW2, mientras que otros autores prefirieron la cepa BALB/c (Nippe et al., 2011). Por otra parte, la piel de los ratones CF-1 adultos es más gruesa que la de ratones de similar edad BALB/c, por lo cual los consideramos más adecuados para realizar experimentos de infecciones cutáneas, acercándose un poco más, aún con las limitaciones existentes, a la piel humana.

La selección apropiada del modelo de herida es crucial para la validez y relevancia de los estudios de cicatrización. Nuestros resultados respecto a los tiempos de cierre entre los modelos de bisturí y punch, concuerda con lo reportado por Masson-Meyers y colaboradores, quienes señalan que ambos métodos proporcionan condiciones adecuadas para estudiar los procesos fundamentales de la reparación tisular, incluyendo la hemostasia, inflamación, formación de tejido granular y reepitelización, aunque con diferencias importantes en la contracción de la herida y la formación de cicatriz (Masson-Meyers et al., 2020).

Si bien la menor variabilidad del tamaño inicial en las heridas por punch ha sido documentada en diversos estudios como una ventaja cuando se requiere estandarización (Ansell et al., 2014; Rowland et al., 2023), este mismo aspecto puede representar una limitación para estudios que buscan replicar la heterogeneidad inherente a las heridas clínicas. Como señalan Masson-Meyers y colaboradores, las heridas realizadas con bisturí presentan una variabilidad controlada que reproduce mejor las condiciones reales de lesión cutánea encontradas en la clínica (Masson-Meyers et al., 2020).

El tiempo de cierre de herida fue en promedio similar para las heridas inducidas por bisturí y por punch, mientras que el tiempo de caída de costra fue 3 días menor en el modelo de punch. Estas diferencias pueden explicarse por la geometría circular de las heridas por punch, que favorece una maduración más rápida del tejido epitelial periférico y una contracción más uniforme, como ha sido señalado en la bibliografía sobre modelos de infección cutánea (Youn et al., 2020). Sin embargo, esta aparente ventaja no necesariamente se correlaciona con una mejor calidad en la organización del colágeno o en la resistencia mecánica final del tejido regenerado (Ansell et al., 2014).

Youn y colaboradores (2020) destacan que los modelos de herida por bisturí, específicamente las incisiones por bisturí, permiten una evaluación más precisa de la cicatrización cuando se pretende estudiar el proceso completo de curación, incluyendo la fase de remodelación (Youn et al., 2020). Adicionalmente, se ha demostrado que las heridas generadas con bisturí muestran una respuesta que se asemeja más a lo observado en humanos, con expresión de genes relacionados con la inflamación y la remodelación de la matriz extracelular (Rittié et al., 2016).

Tal como se mencionó anteriormente, una diferencia crucial entre el modelo murino y el humano, es el mecanismo predominante de cierre de heridas. En ratones ocurre principalmente por contracción debido a la presencia del músculo panículo carnoso (ausente en humanos), mientras que en humanos predomina la reepitelización (Zomer & Trentin, 2018).

Considerando todo lo anteriormente mencionado, seleccionamos el modelo de herida por bisturí como el más representativo y adecuado, para continuar con el trabajo experimental en heridas no infecciosas llevado a cabo en las siguientes etapas de esta Tesis.

Capítulo III: Fotodiagnóstico y localización de porfirinas derivadas de ALA en infecciones por *S. aureus*

El diagnóstico preciso y temprano de infecciones bacterianas sigue siendo un desafío en la práctica clínica. La visualización de infecciones mediante técnicas de fluorescencia representa una alternativa prometedora a los métodos convencionales, ofreciendo la posibilidad de identificar y delimitar con mayor precisión los focos infecciosos. El ALA ha emergido como un precursor metabólico de las porfirinas particularmente útil en este ámbito, ya que su acumulación preferencial en tejidos con alta actividad metabólica, como células bacterianas o inflamatorias, permite la generación de fluorescencia detectable.

Este Capítulo se divide en siete secciones principales, donde se explora sistemáticamente la optimización y aplicación de técnicas de fotodiagnóstico basadas en ALA para la detección de infecciones por *S. aureus* en un modelo murino. Iniciamos con la selección y caracterización de filtros ópticos para mejorar la visualización de la fluorescencia, seguido por el análisis de la distribución de porfirinas en los tejidos infectados, tanto a nivel macroscópico como microscópico. Posteriormente, investigamos la cinética de acumulación de porfirinas comparando el ALA con su derivado lipofílico, H-ALA, y caracterizamos espectroscópicamente las porfirinas generadas en los tejidos. Asimismo, analizamos la capacidad de migración de estos compuestos entre tejidos infectados y no infectados, y finalmente, exploramos la optimización de sistemas de imágenes *in vivo* (IVIS) para la detección no invasiva de infecciones mediante fluorescencia. Los resultados presentados contribuyen al desarrollo de metodologías de diagnóstico más precisas para infecciones bacterianas, con potencial aplicación en la práctica clínica.

III.1 Optimización de sistemas de detección de fluorescencia

La detección efectiva de la fluorescencia derivada de porfirinas presentes en tejidos infectados, requiere la optimización de los sistemas de captura de imágenes para maximizar la relación señal-ruido y mejorar la visualización de los focos infecciosos. En esta sección, se abordan los aspectos técnicos fundamentales para la optimización de la detección de fluorescencia *in vivo*, comenzando con la selección y caracterización de filtros ópticos apropiados, seguido por una evaluación comparativa de su eficacia en la detección de porfirinas en el modelo de absceso de *S. aureus*.

III.1.1 Caracterización de filtros ópticos

Con el objetivo de optimizar la imagen fotográfica de la fluorescencia obtenida *in vivo*, se llevó a cabo la evaluación de diferentes filtros colocados entre el tejido y la cámara durante la irradiación con luz UV (máximo de excitación de las porfirinas). La detección de la fluorescencia se llevó a cabo empleando una lámpara de Wood que emite una longitud de onda máxima de 365 nm. La luz de excitación (azul/violeta) retrodispersada es filtrada por el filtro de emisión, de modo que la cámara captura el contraste de fluorescencia generado por una acumulación localmente mayor de porfirinas en el tejido objetivo.

Al emplear los espectros de emisión de fluorescencia de estándares de CpIII y PpIX, se identificaron tres picos alrededor de 430, 600 y 650 nm al excitar las porfirinas a 365 nm (Figura III.1- A y B).

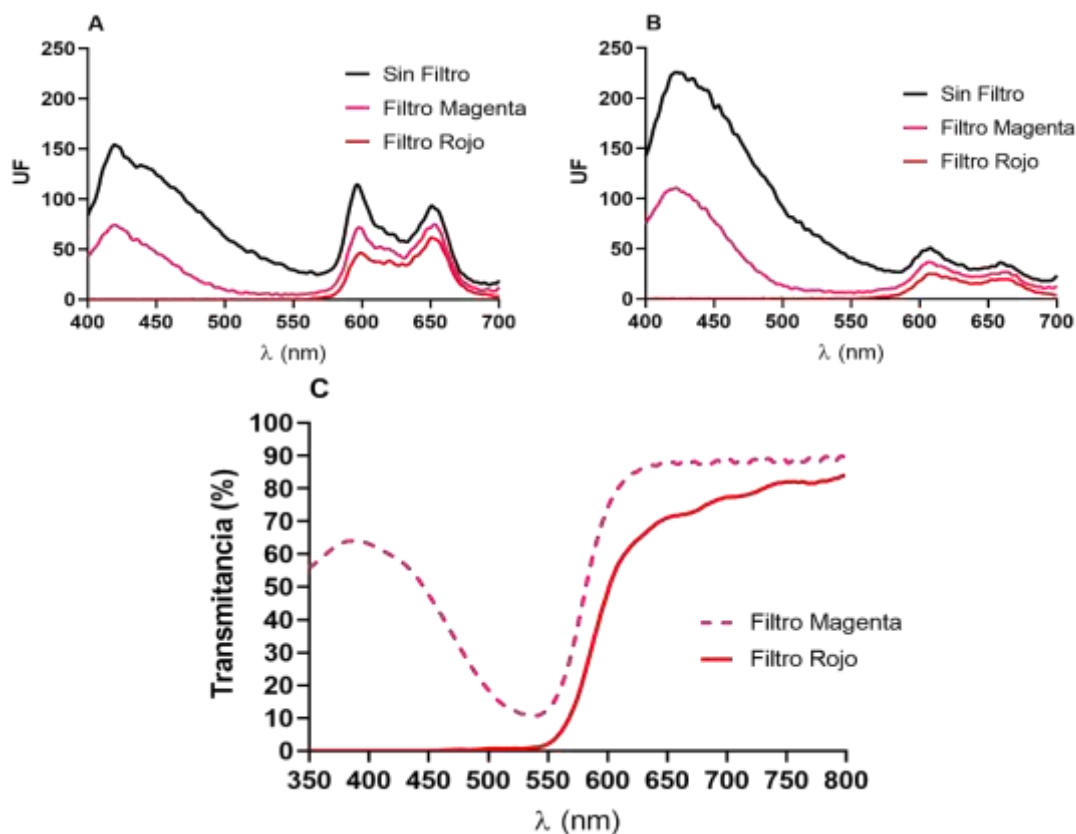


Figura III.1: Detección de emisión de fluorescencia de porfirinas empleando filtros ópticos
Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones de A) CpIII, y B) PpIX, excitadas a 365 nm en presencia de filtros rojo o magenta. C) Espectros de transmitancia de los filtros utilizados (ver Sección 3.4.2.1 en Materiales y Métodos).

III.1.2 Evaluación comparativa de filtros para la visualización de porfirinas *in vivo*

Los resultados obtenidos al detectar la fluorescencia emitida, *in vivo*, en piel de ratón topitada con solución de ALA (60 mg/ml), indicaron que el filtro magenta fue el más apropiado para mejorar las imágenes fotográficas, en comparación con el filtro rojo, o la ausencia de filtros (Figura III.2). Esto se explica por el hecho de que el filtro magenta permite el paso de la fluorescencia emitida en la región de 400 nm, además de la correspondiente a 600 nm, a diferencia del filtro rojo, que solo permite el paso de la luz a partir de 600 nm (Figura III.1-C). Esta característica del filtrado fue especialmente relevante, al comienzo de la incubación con ALA, ya que cuanto más bajos los niveles de porfirinas, mayor contraste en la imagen era requerido para detectar su fluorescencia. Los controles de abscesos topitados con PBS, mostraron autofluorescencia apenas detectable, incluso con el uso de filtros. Por otra parte, la detección de fluorescencia en pieles no infectadas, tras la aplicación de la solución de ALA, también se vio mejorada con el filtro magenta (Figura III.2).

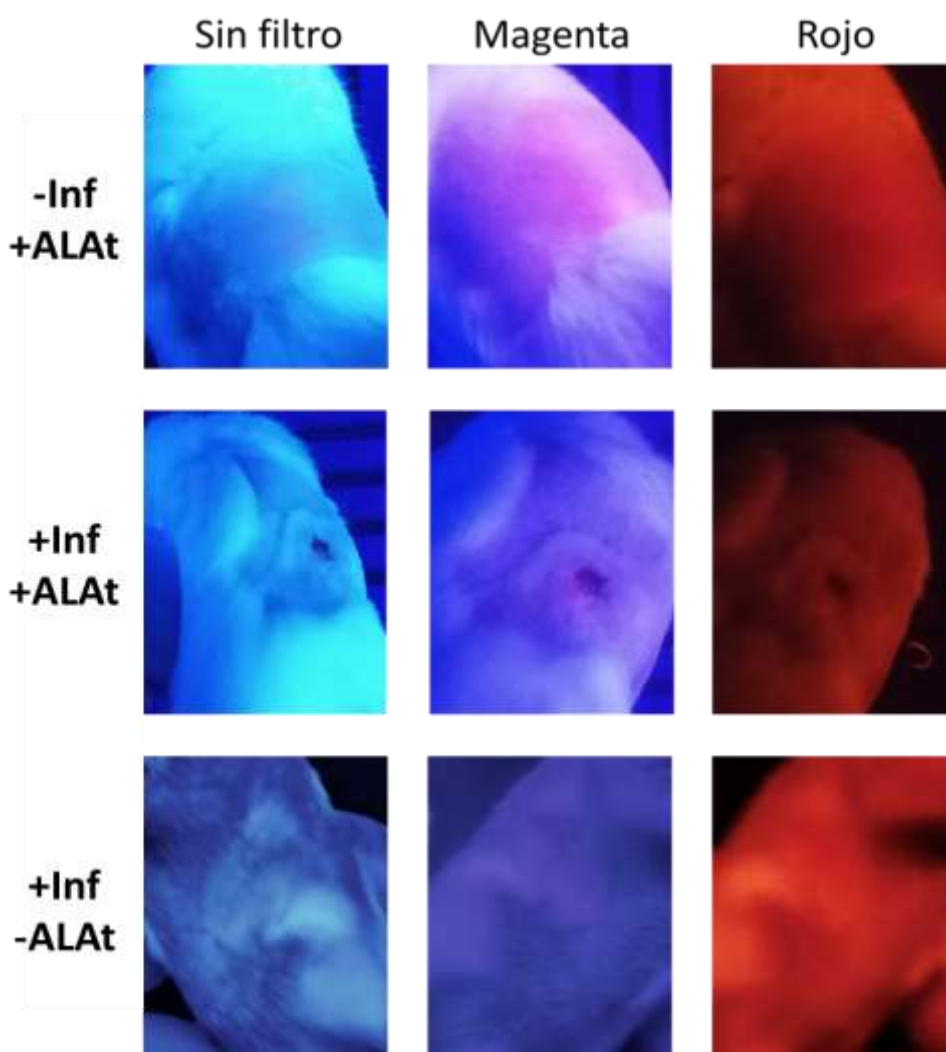


Figura III.2: Fluorescencia de porfirinas en abscesos y pieles no infectadas tratadas tópicamente con ALA. Adquisición de imágenes con filtros.

Ratones infectados (+Inf) o no infectados (-Inf) fueron tratados tópicamente con ALA (+ALAt) o PBS estéril (-ALA). La fluorescencia fue documentada luego de 2 h de incubación en oscuridad, empleando una lámpara de Wood y filtrosópticos (rojo y magenta).

III.2 Caracterización de la fluorescencia en tejidos infectados

Una vez establecido el filtro para la detección de fluorescencia, se procedió a caracterizar la distribución y localización de porfirinas en abscesos de *S. aureus*. El objetivo es conocer los patrones de acumulación de porfirinas derivadas del ALA en el contexto de la infección bacteriana y determinar su utilidad como biomarcador diagnóstico. Se examinó la distribución macroscópica de las porfirinas en abscesos subcutáneos y se realizó un análisis microscópico para determinar la localización específica en los tejidos.

III.2.1 Distribución de porfirinas en abscesos subcutáneos

Utilizando el filtro magenta, se intentó esclarecer la utilidad de la fluorescencia de las porfirinas formadas a partir de ALA en la detección de infecciones. Mientras que la fluorescencia fue intensa y claramente visible a las 3 h después de la aplicación en la piel no infectada, la superficie de los abscesos no presentó fluorescencia en absoluto o mostró fluorescencia en parches, siendo la fluorescencia superficial más claramente visible en la periferia de la zona de la infección (Figura III.3).

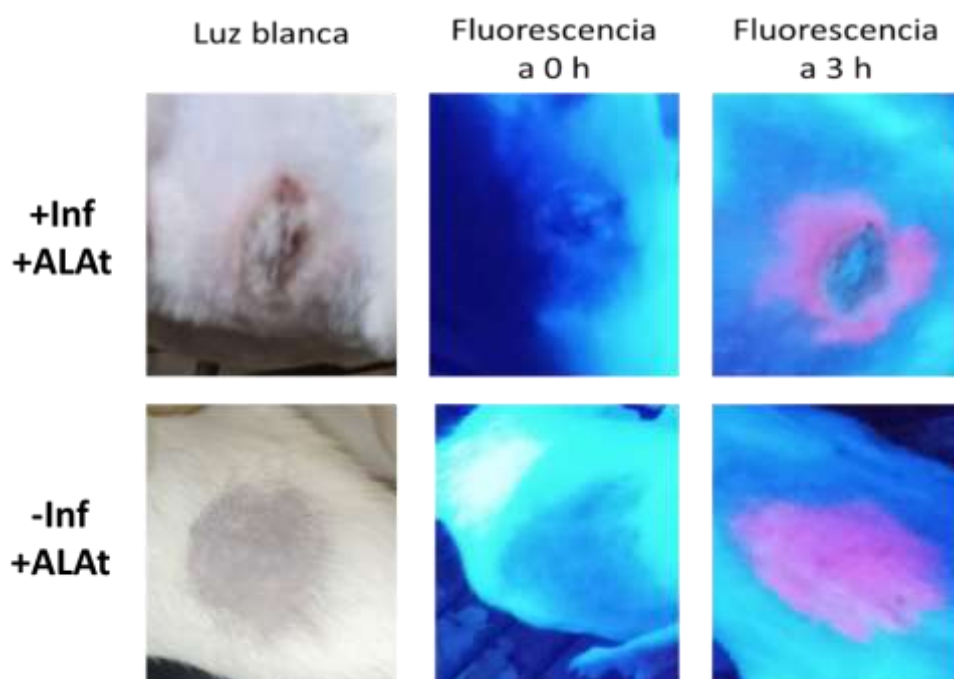


Figura III.3: Fluorescencia de porfirinas en superficie de la piel de abscesos y pieles no infectadas, tratadas tópicamente con ALA.

Ratones infectados (+Inf) o no infectados (-Inf) fueron tratados tópicamente con ALA (+ALAt). Se tomaron imágenes bajo iluminación con luz blanca. La fluorescencia a las 0 y 3 h se documentó excitando con lámpara de Wood e interponiendo filtro magenta.

III.2.2 Localización microscópica de porfirinas en tejidos infectados

se observaron los abscesos por microscopía, y se comprobó que la fluorescencia magenta se localizó en las capas internas del mismo: tejido subcutáneo y músculo esquelético. En estas áreas, se observó una notable acumulación de células polimorfonucleares y bacterias, dado que el sitio de infección era subcutáneo (Figuras III.4 y III.5). Por otro lado, la inspección de pieles no infectadas reveló que el ALA tópico, no indujo fluorescencia en estas mismas capas internas (Figura III.4).



Figura III.4: Detección de fluorescencia de porfirinas sintetizadas a partir de ALA, en la superficie y cara interna de la piel de abscesos

Fotografías de fluorescencia tras la excitación de porfirinas con lámpara de Wood e interposición del filtro magenta en abscesos (+Inf), o piel sana (-Inf) 3 h después de la aplicación tópica de ALA (ALAt), o en controles infectados tratados con solución salina (+Inf-ALAt).

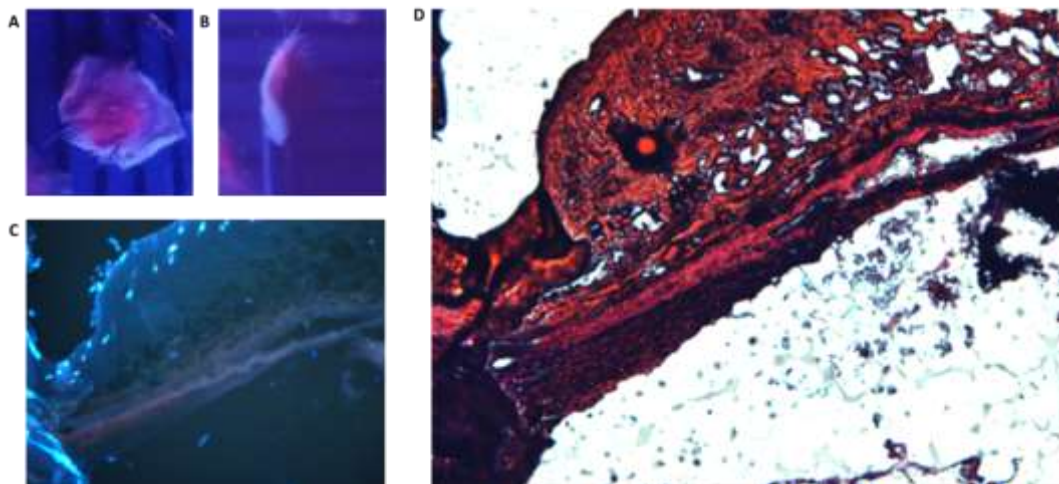


Figura III.5: Fluorescencia de porfirinas sintetizadas a partir de ALA, en la cara interna de los abscesos

Imágenes obtenidas luego de 3 horas de incubación en oscuridad, luego de la aplicación tópica de ALA. Imágenes de fluorescencia, obtenidas empleando lámpara de Wood y filtro magenta, en A) cara interna de la piel en la zona del absceso, B) corte transversal del mismo, y C) Crio-sección de la piel (corte transversal). D) tinción de contraste con H-E de corte transversal del absceso (aumento 4X).

III.3 Cinética de acumulación de porfirinas en tejidos infectados

La eficacia del fotodiagnóstico basado en ALA depende de la velocidad de acumulación de porfirinas, y de la elección del agente precursor de las mismas. En esta sección, se investiga la cinética de formación de porfirinas en tejidos infectados, comparando la eficacia del ALA, con la de su derivado lipofílico H-ALA, como precursores de porfirinas. Adicionalmente, se realiza una caracterización espectroscópica de las porfirinas generadas para identificar su naturaleza química y correlacionarla con los procesos metabólicos específicos de las células del huésped y las de *S. aureus*.

III.3.1 Comparación entre la síntesis de porfirinas a partir de ALA y H-ALA en abscesos

Para indagar sobre la cinética de acumulación de porfirinas a partir de ALA en las capas más internas de los abscesos, determinamos las porfirinas totales localizadas en estos tejidos, a diferentes tiempos de incubación luego de topicar con ALA. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante extracción química de las porfirinas, y detección de la fluorescencia en las caras interna y externa de los abscesos. Por otra parte, se realizaron determinaciones similares, pero topicando con solución de H-ALA los abscesos, con el fin de determinar si sus propiedades lipofílicas favorecían la penetración en el tejido y generaban una mayor síntesis de porfirinas que el ALA. Por último, estos resultados también se compararon con aquéllos obtenidos tras inyectar intraperitonealmente una solución de ALA. La administración sistémica de H-ALA no fue factible debido a su toxicidad inherente.

Los resultados se muestran en la Figura III.6-A, donde puede observarse el aumento dependiente del tiempo en la síntesis de porfirinas dentro de los abscesos en tiempos desde 30 min a 3 h. Cuatro horas después de la aplicación tópica de ALA, los niveles de porfirinas alcanzaron 133 ± 21 ng por gramo de tejido. Ni el H-ALA tópico, ni la inyección sistémica de ALA incrementaron este valor luego de las 4 h de incubación. El H-ALA indujo niveles ligeramente inferiores de porfirinas (93 ± 7 ng por gramo de tejido), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. La administración sistémica (i.p.) de ALA indujo 117 ± 27 ng de porfirinas/g en la zona del absceso.

Las imágenes de fluorescencia de la piel (Figura III.6-B) revelaron una intensa fluorescencia magenta en la parte interna, con solo una tenue señal superficial, independiente de la prodroga aplicada o la vía de administración.

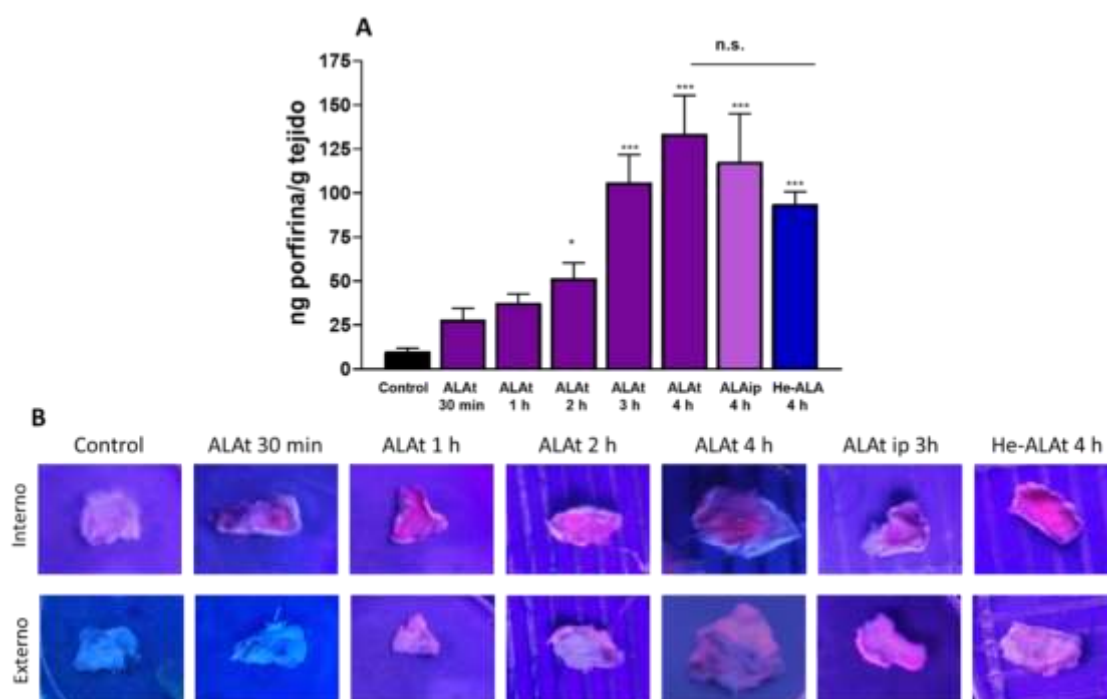


Figura III.6: Síntesis de porfirinas en los abscesos tras el tratamiento con ALA o H-ALA.

Después de la administración tópica (ALAt) o intraperitoneal (ALAip) de ALA y tópica con H-ALA (He-ALAt), los ratones fueron sacrificados y se extrajeron las porfirinas de los abscesos. A) Cuantificación de las porfirinas totales en el tejido, luego de la extracción química de las mismas. B) Imágenes de la fluorescencia tomadas desde la cara interna (imágenes en el panel superior) o externa de la piel infectada (panel inferior), empleando una lámpara de Wood y filtro óptico magenta. ANOVA de una vía con * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ respecto al control. N.s.: no significativa entre los valores analizados.

Las imágenes obtenidas de la cara interna de los abscesos fueron segmentadas mediante el procesamiento de imágenes descrito en la sección 3.4.3 de Materiales y Métodos para luego cuantificar el área integrada de fluorescencia (Figura III.7). La misma fue calculada como el producto de la intensidad media de fluorescencia por el área total fluorescente en píxeles. Los resultados de la cuantificación se correlacionan con la cuantificación de porfirinas luego de su extracción química.

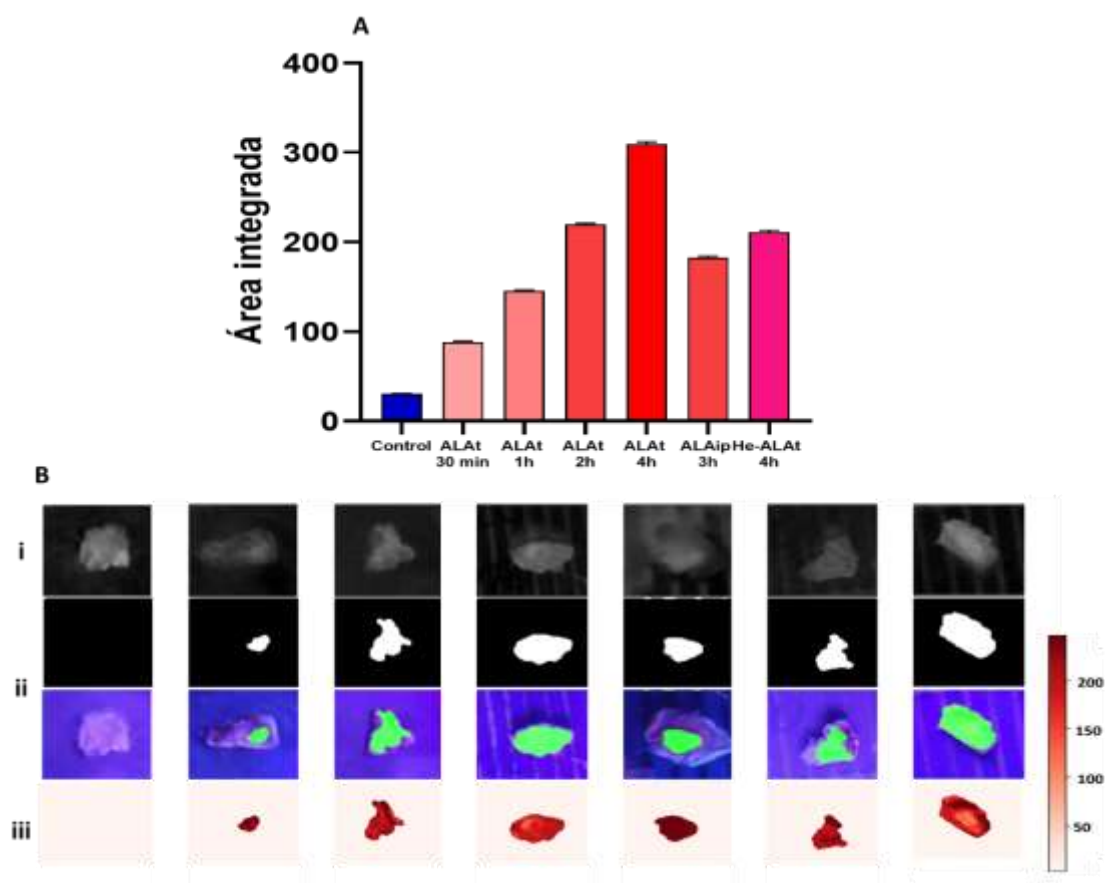


Figura III.7: Cuantificación de fluorescencia a partir del procesamiento de imágenes de la porción interna de los abscesos cutáneos

A) Área integrada de fluorescencia de porfirinas resultante del procesamiento de imágenes de la Figura II.6-B cara interna (ver sección 3.4.3 de Materiales y Métodos). Los datos corresponden al promedio del brillo de las áreas integradas $\pm$ SD. B) Pipeline de procesamiento de las imágenes mostradas en la Figura III.6-B (i) imagen resultante de la resta entre la capa roja y azul, (ii) imagen segmentada (iii) intensidad de los píxeles de la capa roja del área segmentada.

III.4 Caracterización espectroscópica de las porfirinas sintetizadas en los abscesos

Los espectros de emisión de fluorescencia de las porfirinas extraídas de abscesos tratados con ALA se compararon con los estándares de CpIII y PpIX. Los estándares mostraron picos principales a 597 nm y 654 nm, y a 606 nm y 663 nm, respectivamente. Los perfiles de fluorescencia de los abscesos tratados con PBS (control) y de aquellos tratados sistémicamente con ALA fueron consistentes con PpIX. En contraste, los abscesos tratados tópicamente con ALA y extraídos en distintos momentos (30 min a 3 h), así como aquellos tratados tópicamente con H-ALA (3 h), mostraron espectros que coincidían

predominantemente con CpIII. Sin embargo, no se puede descartar la contribución de señales de PpIX (Figura III.8).

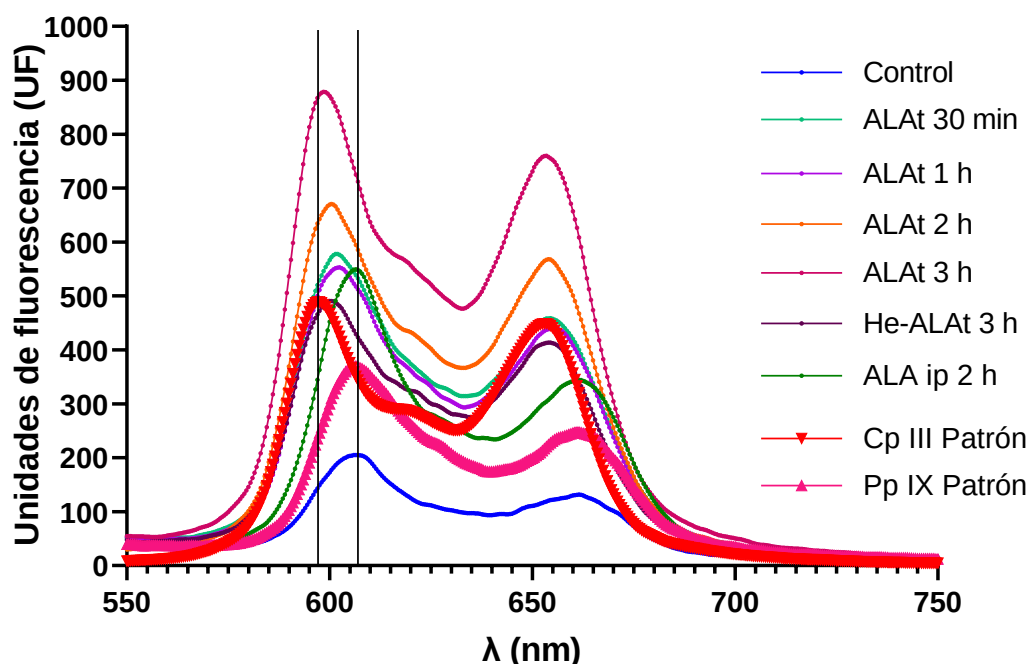


Figura III.8: Espectros de emisión de fluorescencia de porfirinas extraídas de abscesos tratados con ALA o H-ALA

Espectros de fluorescencia (excitación 410 nm) de las porfirinas extraídas de muestras de abscesos tratados tópicamente con ALA o H-ALA, o i.p. con ALA luego de diferentes tiempos. Se muestran los espectros de soluciones estándares de PpIX y CpIII. Las líneas negras verticales marcan los picos característicos de cada patrón de porfirina.

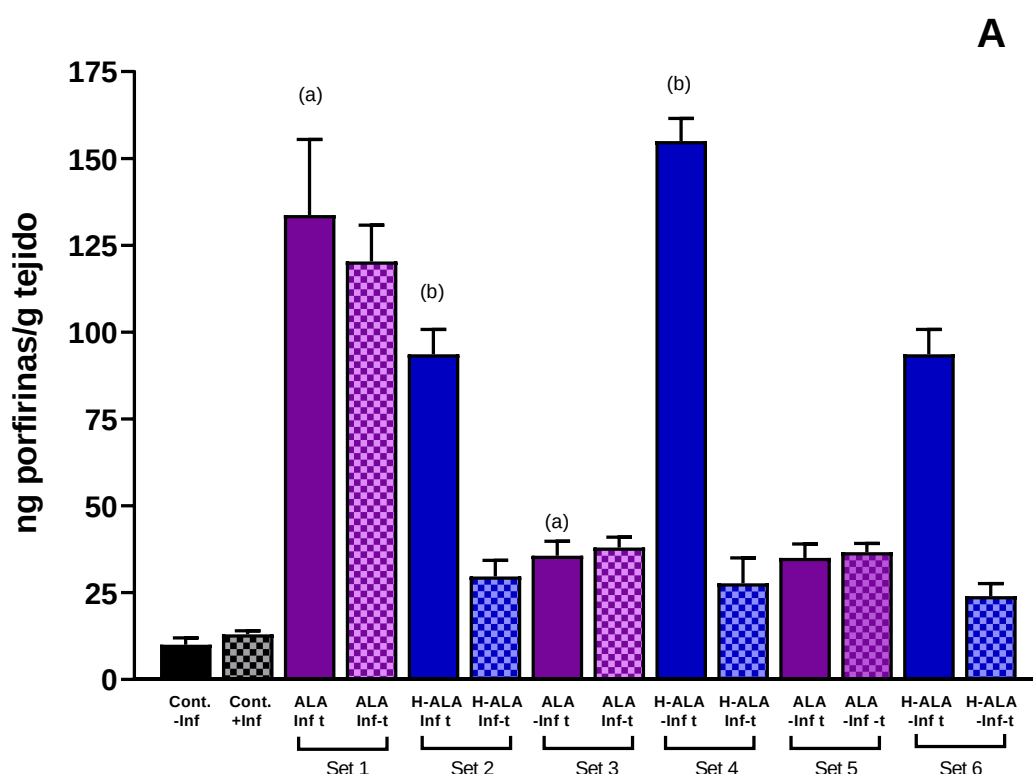
III.5 Migración de porfirinas entre tejidos

La Figura III.9-A ilustra la migración de los pro-FS y/o porfirinas sintetizadas a partir de ALA y H-ALA, entre flancos de un mismo ratón. Los “Set 1 y 2” corresponden a ratones con 2 abscesos (1 en cada flanco), los “set 3 y 4” corresponden a un flanco con absceso y un flanco de piel normal, y los “set 5 y 6” corresponden a ratones sanos, sin abscesos. La migración de porfirinas ya había sido descrita para pieles normales y tumorales en trabajos previos de nuestro grupo (Casas et al., 2002), donde se demostró que el H-ALA se retiene preferentemente en la piel tumoral, mientras que el ALA migra hacia el flanco contralateral. De manera similar, nuestros resultados muestran que el ALA (y/o las porfirinas derivadas del ALA) aplicado en ratones con dos infecciones migra fácilmente entre los sitios infectados (Set 1). Por el contrario, H-ALA exhibe una migración mínima entre áreas infectadas (Set 2).

Cuando ALA se aplica en piel no infectada (-Inf), los niveles de porfirinas generados son significativamente menores en comparación con la piel infectada (a). Las porfirinas sintetizadas a partir de ALA sobre piel normal, aún en bajos niveles, se distribuyen libremente hacia el absceso contralateral (+Inf) (Set 3). En contraste, H-ALA o las porfirinas derivadas de este éster permanecen mayormente retenidas en el sitio de aplicación en piel normal sin infectar, y no migran significativamente hacia el sitio infectado (Set 4).

Adicionalmente, cuando ALA se aplica en piel normal (-Inf), las porfirinas y/o ALA migran libremente a la piel sin infectar contralateral (Set 5). Sin embargo, la aplicación de H-ALA en piel normal sólo resulta en niveles bajos de porfirinas en el absceso contralateral (Set 6). En contraposición al comportamiento observado para ALA, H-ALA demuestra una mayor retención en tejido normal sin infectar en comparación con el tejido infectado (b).

Analizando algunos de los espectros de las porfirinas (Figura III.9-B), observamos como ejemplo, que cuando el absceso recibió ALA y/o porfirinas de la piel contralateral topicada con ALA o H-ALA, como en los sets 3 y 4, las porfirinas acumuladas tuvieron un perfil compatible con el de CpIII, lo cual sugiere que es el ALA y no las porfirinas las que estarían migrando hacia el flanco distante.



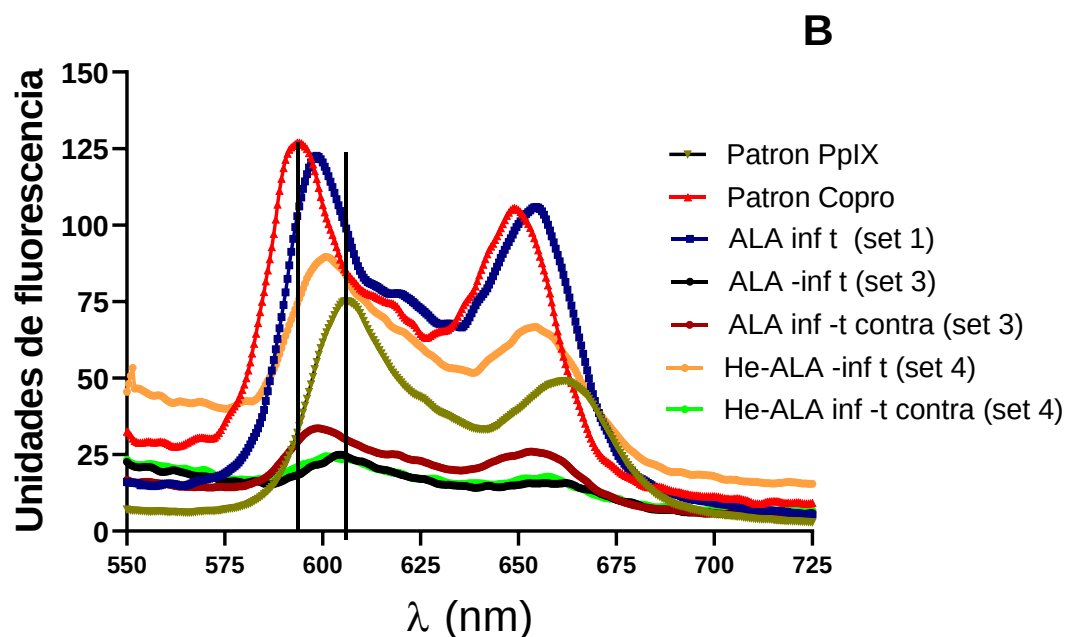


Figura III.9: Migración de porfirinas entre flancos infectados y no infectados tras la aplicación tópica de ALA o H-ALA

Cuantificación de porfirinas extraídas químicamente de abscesos y tejidos no infectados, topicados con ALA o H-ALA (4 h de incubación), en ratones portadores de uno o dos abscesos infectados. Los pro-FS se administraron en el flanco infectado (+Inf) o en el no infectado (-Inf). t: flanco topicado. -t: flanco no topicado. Cont.: Control tratado con solución salina. (a), (b) *** $p < 0.001$, prueba t de Student para la comparación entre muestras de cada set.

III.6 Detección y migración de porfirinas en abscesos estériles

Con el fin de elucidar si la fluorescencia observada en los abscesos se debe mayoritariamente a la síntesis en las bacterias o a la síntesis o acumulación de porfirinas por las células del sistema inmune, se topicaron abscesos estériles, producto de la inyección subcutánea de bacterias inactivadas (ver sección II.2 del capítulo II). Se observó la presencia de fluorescencia magenta tanto en la zona interna como en la externa de los abscesos, y además se comprobó la migración de las porfirinas y/o ALA, al flanco contralateral que alojaba otro absceso estéril y no había sido topicado con ALA (Figura III.10). Ambos flancos sintetizaron perfiles de porfirinas compatibles con PpIX.

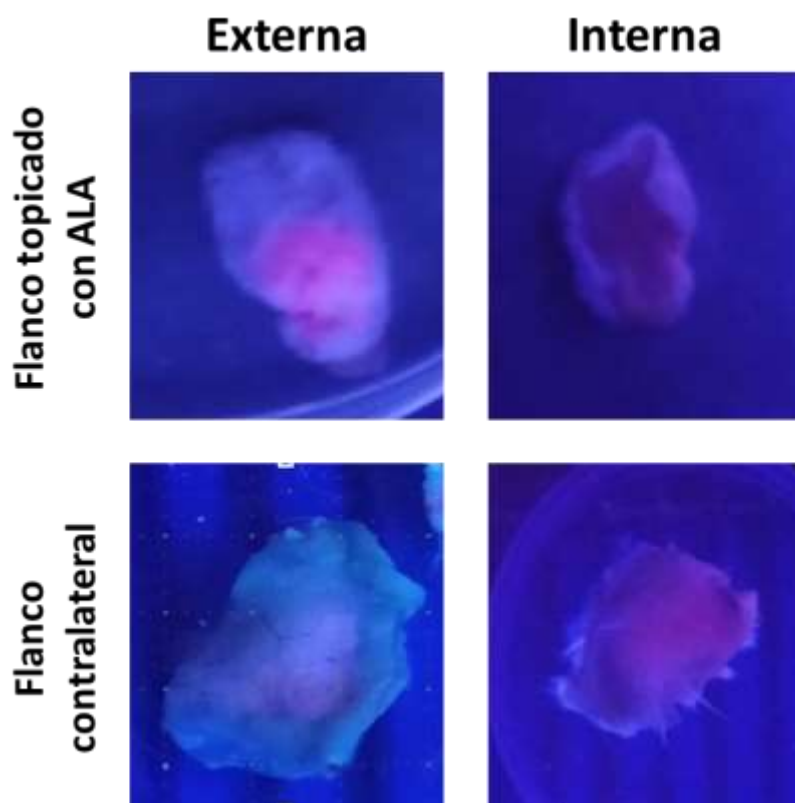


Figura III.10: Fluorescencia de porfirinas presentes en abscesos estériles y migración a absceso contralateral estéril

Imágenes de la fluorescencia observada en piel (cara externa e interna) de abscesos estériles (generados mediante inyección subcutánea de bacterias inactivadas), topicados o no topicados, con solución de ALA. Se indujo la formación de dos abscesos estériles (uno por flanco) por ratón, y se tópicó el ALA en solo uno de los flancos.

III.7 Optimización del sistema IVIS para detección de porfirinas

Dado que no fue posible detectar externamente la fluorescencia de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA en los abscesos tratados, decidimos analizar la posibilidad de analizar las porfirinas de la parte interna del absceso utilizando un sistema de adquisición de imágenes de fluorescencia *in vivo*. Para ello, empleamos el dispositivo IVIS (In Vivo Imaging System) Spectrum CT.

El sistema IVIS no permite la excitación en la región UV del espectro, donde las porfirinas presentan su pico máximo de excitación, por lo tanto, probamos diferentes combinaciones de filtros de excitación en las regiones azul y verde del espectro, y filtros de emisión en las regiones verde y roja. Estas combinaciones se eligieron teniendo en cuenta que las longitudes de onda de excitación más altas tienen una mayor penetración

en los tejidos, y considerando los diferentes picos de emisión de fluorescencia de las porfirinas: CpIII y PpIX.

Se rasuró el flanco derecho de los ratones sanos (sin absceso), y se los topicó con PBS (R1, control) o con ALA (R2). Luego de 4 h, se examinó la fluorescencia empleando los diferentes pares de filtros. Tras examinar un ratón control, y otro tratado con ALA, identificamos que el par de filtros 430/620 nm era el que mejor permitía visualizar la señal de fluorescencia emitida por las porfirinas, ya que en esta configuración el contraste entre las regiones de piel fluorescentes y las no fluorescentes (corroboradas mediante observación empleando luz UV) fue el máximo obtenido. Esto se muestra en la Figura III.11, al comparar las zonas de mayor intensidad de fluorescencia (en color amarillo), y las zonas con emisión de fluorescencia basal (marcadas en rojo oscuro).

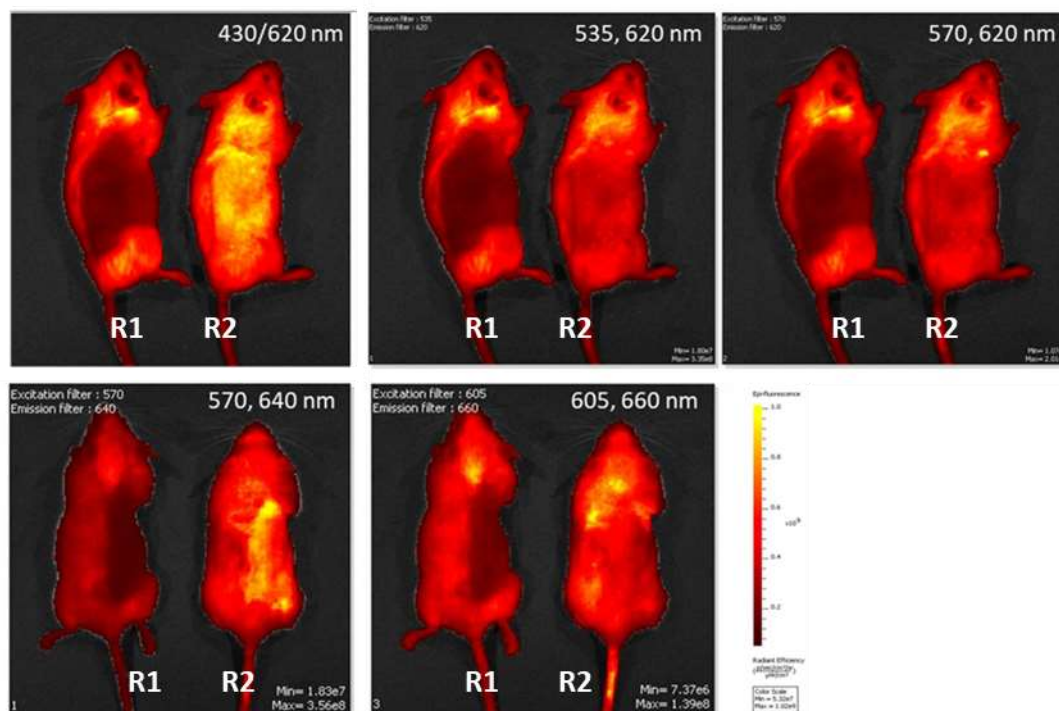


Figura III.11: Configuración de filtros para la detección de señales de fluorescencia de porfirinas derivadas de ALA en ratones no infectados, utilizando IVIS® Spectrum CT

Imágenes de fluorescencia obtenidas a partir de ratones sanos topicados con PBS (R1), o ALA (R2) luego de 4 h. En la parte superior de cada imagen se indican los filtros de excitación/emisión empleados para obtenerla. En el panel de abajo a la derecha, se muestra la escala de colores empleada para indicar la intensidad de fluorescencia (negro, rojo, naranja, amarillo: orden de intensidad creciente).

Luego se empleó la combinación de filtros seleccionada para la adquisición de imágenes de ratones infectados tratados con ALAt (R3), infectados topicados con PBS (R4), no infectados topicados con PBS (R1), e infectados inyectados con ALA i.p. (R5) (Figura

III.12-A). Las fotografías se adquirieron en condiciones automáticas para cada conjunto de animales. Bajo estas condiciones, se observó (panel izq) que la autofluorescencia de los abscesos sin tratar con ALA (R4) era de igual magnitud que la de los tratados con ALA (R3). Cuando en el panel se incluyó un ratón tratado sistémicamente con ALA (R5), observamos que en este caso sí se observó una señal fuerte (amarilla) de fluorescencia en la zona de piel rasurada periférica a la infección, pero no sobre el absceso.

Las muestras de piel y abscesos extraídos de los ratones, se analizaron empleando los mismos filtros en el IVIS, y también se fotografiaron bajo lámpara de Wood para detectar fluorescencia de porfirinas en sus superficies interna y externa (Figura III.12-B).

Los explantes que no fueron topcados con ALA, tanto pieles sanas como abscesos, no mostraron señal de fluorescencia con ninguna de las técnicas empleadas, sin importar el lado del tejido observado. El absceso del ratón tratado con ALA i.p. exhibió fluorescencia intensa en ambas superficies, tanto para la observación con IVIS como para las fotografías empleando la lámpara de Wood. Por su parte, en los abscesos tratados tópicamente con ALA, se observó fluorescencia en la superficie interna del absceso empleando la lámpara de Wood, pero no al emplear el IVIS, demostrando que la primera de las metodologías mencionadas, es más sensible en la detección de porfirinas en este modelo. Mientras que con ninguna de las dos técnicas fue posible detectar señal desde la cara externa de la piel de los abscesos topcados con ALA. Finalmente, al analizar el explante de piel no infectada, topcada con ALA, se observó señal de fluorescencia de porfirinas con ambas técnicas desde la cara externa de la piel, pero no desde la interna (Figura III.12-B).

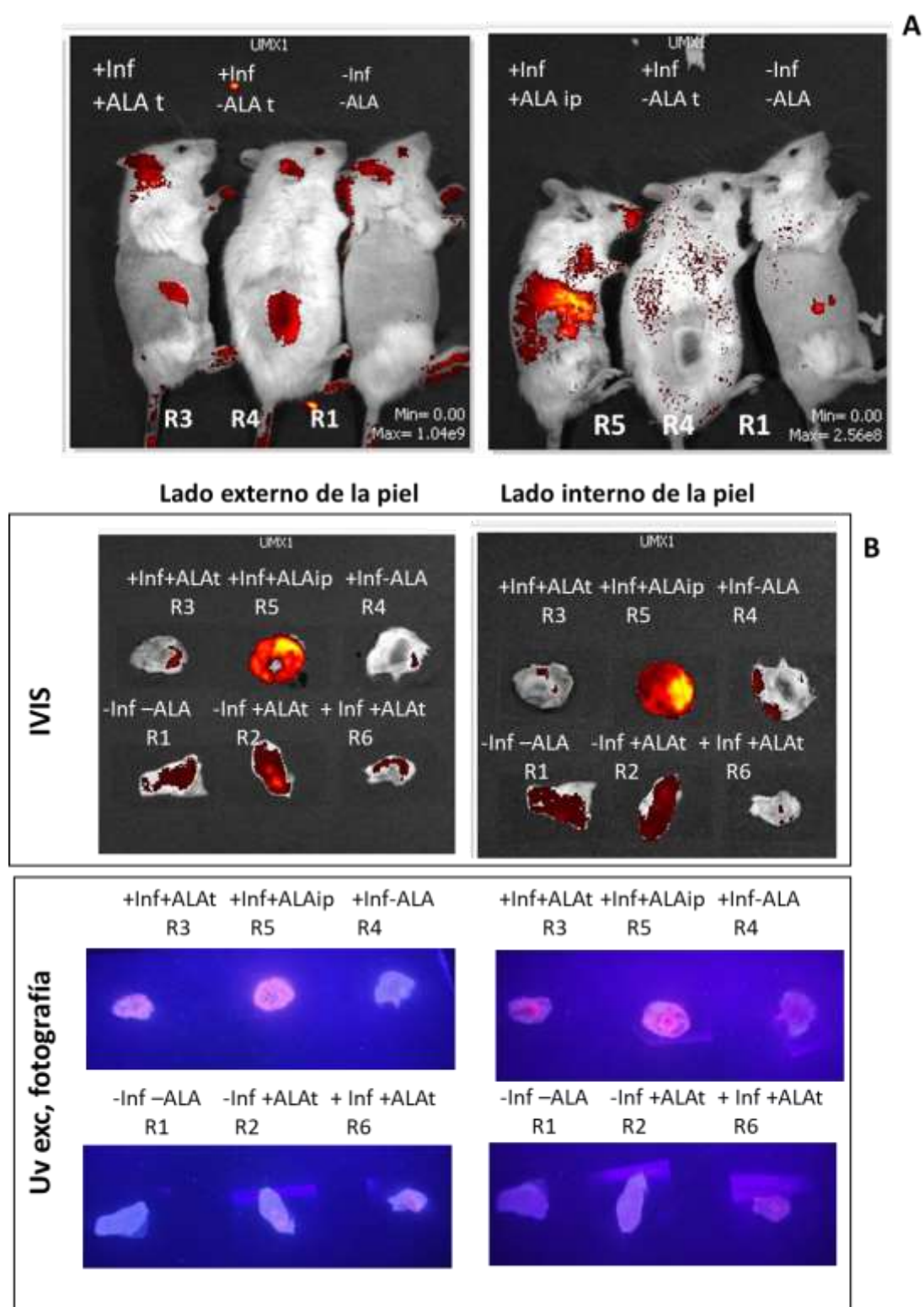


Figura III.12: Imágenes de fluorescencia de porfirinas adquiridas con el IVIS® Spectrum CT en ratones tratados con ALA tópica y sistémica

A) Imágenes obtenidas mediante separación espectral en ratones infectados (+Inf) y no infectados (-Inf) 4 h después de la aplicación tópica de ALA (ALAt), PBS (-ALA), o inyección i.p. de ALA (ALA i.p). B) Imágenes de fluorescencia obtenida ex vivo a partir de las superficies interna y externa de las pieles no infectadas y abscesos de la Figura A, obtenidas por medio del IVIS

(paneles superiores) con filtros de excitación/emisión: 430/620 nm, o mediante fotografía digital (paneles inferiores) empleando un filtro óptico magenta y excitación con lámpara de Wood.

III.7 Discusión

En este Capítulo hemos descripto que la fluorescencia de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA y H-ALA en la zona interna del absceso no puede detectarse desde la superficie de la piel excitándolas con lámpara de Wood (365 nm). Contrariamente, sí pudimos detectar señal de fluorescencia en la parte interna del mismo, luego de la topicación con ambas prodrogas. Este patrón se observó tanto a tiempos cortos (a partir de 30 min desde la topicación) hasta los tiempos máximos empleados (4 h). Estos experimentos fueron planteados hasta las 4 h, debido a que la síntesis de porfirinas llegó a un plateau a este tiempo, de acuerdo a estudios previos donde ha sido informado que, tanto en piel tumoral como normal, el plateau de síntesis de porfirinas se da entre las 3 y las 5 h (Casas et al., 2001, Perotti et al., 2003).

Hemos corroborado que mediante análisis y procesamiento de imágenes obtenidas con cámara fotográfica e interposición de filtro color magenta, es posible obtener una cuantificación de la fluorescencia de las porfirinas similar a la arrojada luego de extracción química de las mismas y cuantificación fluorométrica.

La fluorescencia detectable macroscópicamente desde la cara interna de los abscesos, se observó también por microscopía de fluorescencia, pudiéndose localizar la señal, en las capas más internas de la piel: tejido subcutáneo y músculo esquelético subyacente. En estas áreas, se observó una localización prominente en regiones ricas en células polimorfonucleares y bacterias. Nuestras determinaciones experimentales, se realizan 48 h después de la infección (inyección subcutánea), por ende, una gran cantidad de bacterias con la consecuente concurrencia de células polimorfonucleares del sistema inmune, se encuentran presentes también en las capas inferiores del absceso.

Sahu y colaboradores, han reportado que, en un modelo de infección superficial en ratones, a tiempos cortos (30 min) luego de la aplicación de ALA, la fluorescencia se observa principalmente en el lecho de la herida causada por la infección. Sin embargo, a medida que aumenta el tiempo de incubación (3 h) luego de suministrar el ALA, también comienza a detectarse fluorescencia en la piel circundante (3 h). Los autores hipotetizan que lo observado se debe a que las células inflamatorias tardarían más tiempo en sintetizar PpIX que las bacterias, lo que se vería reflejado en el patrón temporal de emisión de fluorescencia observado en las diferentes zonas del tejido infectado (Howley, 2023; Sahu et al., 2024).

Tal como se ha detallado en la Introducción, la síntesis de porfirinas se produce de manera diferencial en células eucariotas y en *S. aureus*. En particular, en eucariotas, el principal intermediario de síntesis que se acumula es la PpIX, mientras que en *S. aureus* la ruta biosintética no produce PpIX, y su principal intermediario es la CpIII. Teniendo en cuenta estas diferencias, los espectros de porfirinas deberían dar una aproximación de la contribución de las bacterias y de las células del sistema inmune a la fluorescencia observada en los abscesos. En esta Tesis, si bien no fue posible corroborarlo por HPLC, los espectros de las porfirinas sintetizadas a partir del ALA topicado en los abscesos fueron similares tanto a tiempos cortos como largos post-topicación, y fueron mayoritariamente coincidentes con el espectro de CpIII. De manera similar, H-ALA aplicado de manera tópica sobre los abscess, indujo la acumulación de compuestos con espectro de fluorescencia compatible con CpIII, aunque probablemente, pueda existir contribución de PpIX (proveniente de células eucariotas) en la señal detectada.

Vale la pena mencionar que, al analizar las extracciones realizadas a partir de tejidos de abscesos de ratones tratados con ALA sistémico, el espectro de fluorescencia medido, se correspondió con el de PpIX. Esto parecería indicar que, en el infiltrado inmune del absceso, se estarían sintetizando porfirinas, o bien se estarían acumulando porfirinas circulantes.

La síntesis de PpIX por parte de las células del infiltrado inflamatorio y los tejidos del huésped, estaría siendo evidenciada en los ratones con los abscesos estériles (inyectados con bacterias inactivadas), dado que se detectó fluorescencia característica de dicha porfirina en las extracciones llevadas a cabo con esos tejidos. Se ha reportado que estos tipos celulares sintetizan principalmente PpIX, al aumentar la disponibilidad de ALA (Howley et al., 2023).

Dado que los valores de fluorescencia cuantificados a partir de las imágenes de la cara interna de los abscesos, se correlacionan con los valores obtenidos mediante extracción química, hipotetizamos que las capas más superficiales de los abscesos tendrían una capacidad disminuida de síntesis de porfirinas.

Por otra parte, la observación de fluorescencia superficial en la piel de los abscesos “estériles” brinda información acerca de la razón por la cual no se observan porfirinas en la superficie de los abscesos infecciosos. La disrupción de la dermis, con ruptura de fibras colágenas, alta infiltración linfocitaria, edema y presencia de tejido necrótico probablemente conviertan a la zona más superficial del absceso infeccioso, en un área con poca capacidad metabolizante.

Buscando alternativas para mejorar la detección de infecciones mediada por fluorescencia, se empleó el derivado lipofílico del ALA, H-ALA, que había demostrado ser muy promisorio en la penetración a través de las barreras cutáneas en diversos tumores cutáneos (Casas, 2020). Se observó que, mientras el ALA induce una mayor síntesis de porfirinas totales al ser topicado el absceso, que al ser topicado sobre piel sana, el H-ALA induce una mayor acumulación de porfirinas en la piel sana que en la infectada. Esto podría deberse a que el H-ALA quede retenido en las capas más superficiales de la infección, penetrando en células con menor capacidad de sintetizar porfirinas que las bacterias y las células del infiltrado inmune en el tejido infectado.

En cuanto a la selectividad por el tejido infectado y migración entre flancos infectados y no infectados, de los pro-FS empleados, pudimos comprobar que se produjo la migración del ALA (y/o las porfirinas sintetizadas a partir de mismo) desde un flanco infectado al otro flanco infectado contralateral, mientras que el H-ALA permaneció retenido en el absceso topicado, sin mayor capacidad de migrar hacia infecciones distantes. Haciendo un análisis de las porfirinas que migran entre flancos infectados y no infectados, podemos deducir que es el ALA o el H-ALA y no las porfirinas sintetizadas las que se movilizan por el torrente sanguíneo hacia sitios distantes.

Cuando el ALA se topicó sobre la zona no infectada, se observaron bajos niveles de síntesis de porfirinas tanto en el flanco topicado como en la infección contralateral. Cuando H-ALA se aplicó sobre la piel no infectada, no se observó migración de la prodroga ni de las porfirinas a la infección contralateral a pesar de que la cantidad sintetizada fue muy alta en el tejido sano.

Con el objetivo de elucidar si la fluorescencia observada desde la cara interna de las infecciones podía ser detectada desde el exterior con luz de longitudes de onda con mayor penetración en los tejidos que la emitida por la lámpara de Wood, se analizaron animales infectados y no infectados topcados con ALA, empleando longitudes de onda de excitación en el azul, amarillo, verde y rojo, empleando un equipo IVIS. Se determinó que la excitación de las porfirinas empleando luz en la región azul del espectro, y registrando la emisión en el rojo (par de filtros de exc/em de 430/620 nm) fue la combinación óptima para visualizar las porfirinas en las zonas de piel no infectada. Sin embargo, no fue posible visualizar por esta técnica la zona interna fluorescente de la piel infectada, debido a la autofluorescencia intrínseca de los abscesos. Al observar la zona interna de las pieles escindidas, se pudo comprobar que la luz ultravioleta de la lámpara de Wood, indujo mejores imágenes de fluorescencia, que las longitudes de onda en el rango visible.

En conclusión, en este Capítulo hemos encontrado selectividad del ALA y H-ALA por los abscesos cutáneos de *S. aureus*, aunque no se ha podido recoger una señal externa que refleje la cantidad de porfirinas confinadas a la zona interna de los mismos. Esta señal estaría comprendida por porfirinas provenientes de las bacterias y también del infiltrado inflamatorio.

Capítulo IV: Estudios *in vivo*: ALA-TFDA, luz sola y TFT sobre abscesos cutáneos

En este Capítulo se presentan los resultados obtenidos al aplicar ALA-TFDA, TFT y su combinación sobre abscesos cutáneos -modelo de infección de piel y partes blandas- generado por inoculación subcutánea de *S. aureus* RN6390 (ver sección 3.3 de Materiales y Métodos).

Este Capítulo se organiza en cuatro secciones principales. En la primera, se analiza el efecto de la ALA-TFDA y la luz sola en la progresión de los abscesos empleando distintas dosis lumínicas. Las observaciones incluyeron el monitoreo de la progresión temporal de las heridas y el tiempo de resolución de las mismas, en términos de tiempo de cierre de las lesiones y caída de costras.

En la segunda, se analizan los procesos biológicos involucrados en la acción de la TFDA y la luz en la resolución de los abscesos, tales como la carga bacteriana, el análisis histológico post-tratamiento, y la cuantificación de citoquinas involucradas en el proceso.

En la tercera sección se realiza la puesta a punto de la TFT en abscesos, se evalúa el aumento de la temperatura en la zona irradiada, y el impacto de dicho tratamiento sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA.

Finalmente, en la cuarta sección, se estudia el efecto de la TFT y su combinación con ALA-TFDA para el tratamiento de abscesos cutáneos de *S. aureus*.

IV.1 ALA-TFDA sobre abscesos cutáneos empleando diferentes dosis lumínicas

Una vez determinado el tiempo de máxima producción de porfirinas, y analizada su localización en los abscesos (Capítulo III), se procedió a la aplicación del tratamiento fotodinámico a partir de ALA. En primer lugar, se realizaron ensayos para evaluar el efecto de la ALA-TFDA en el modelo *in vivo* de abscesos cutáneos. Se emplearon diferentes dosis lumínicas, variando la potencia del láser de 635 nm, y dejando fijo el tiempo de iluminación en 20 min, ya que este fue el tiempo promedio en el cual los animales permanecían anestesiados (Figura IV.1). El seguimiento del tamaño de la lesión se realizó comparando los tratamientos de ALA-TFDA y luz sola vs los controles topicados con PBS sin iluminar. Los controles de animales tratados con ALA y no iluminados se comportaron de la misma manera que los ratones control (PBS), por lo cual

no se los graficó para facilitar el análisis. El seguimiento de los abscesos fue evaluado en términos del tamaño del área relativa (respecto al tamaño al día 0) y el tiempo de resolución de la herida. Como parámetro adicional, se tomó el tiempo de caída de la costra de cada animal (Figura IV.2)



Figura IV.1: Esquema experimental para ALA-TFDA sobre abscesos

Ratones CF-1 fueron infectados con una suspensión de bacterias *S. aureus* RN6390. A las 48 h se aplicó 1,5 mg de ALA disuelto en PBS de forma tópica sobre la herida, y se esperó 4 h en oscuridad antes de realizar la TFDA con láser de 635 nm (ver secciones 3.4.1 y 3.5.1 de Materiales y Métodos). Se realizaron controles topicados con PBS e irradiados y controles topicados con ALA y mantenidos en oscuridad.

Se observó en los abscesos tratados con ALA-TFDA, una reducción en el área a casi todas las potencias empleadas (Figura IV.2-A). El análisis estadístico de las curvas de progresión de los abscesos se muestra en el Apéndice (Figura A2). La potencia de 160 mW/cm² fue la que demostró reducir significativamente las áreas de los abscesos (respecto al control sin tratar) en la mayor cantidad de días post-tratamiento, siendo los porcentajes de reducción del tamaño relativo de la herida entre un 35 y 50% mayores que el control sin tratar, dependiendo del día que se considere. Por otra parte, potencias menores, como la de 80 mW/cm², mostraron diferencias significativas con el control sin tratar, sólo en los 4 primeros días. Potencias mayores, tales como 240 mW/cm² mostraron curvas de progresión de tamaño de absceso que se diferencian de la curva control a algunos, pero no todos los tiempos, mientras que la máxima potencia empleada, de 320 mW/cm², no produjo diferencias significativas en la reducción temporal de los abscesos, aunque los mismos cerraron antes.

En cuanto al tiempo necesario para el cierre completo de la herida, en los grupos tratados con ALA-TFDA, el mismo fue significativamente más corto que en los controles, para todas las potencias de luz empleadas. En particular, el tiempo de resolución de la herida más corto se obtuvo empleando 160 mW/cm², y fue de $15 \pm 0,7$ días, vs $27,1 \pm 1,5$ días

del control ($p < 0,001$) (Figura IV.2-B). El tiempo de caída de costra también disminuyó significativamente para las 3 mayores potencias empleadas en los grupos tratados con ALA-TFDA. Mientras que la caída fue al día $12,2 \pm 1,3$ en el control, la misma fue entre el día 10 y 11 en los ratones tratados con ALA-TFDA (Figura IV.2-C).

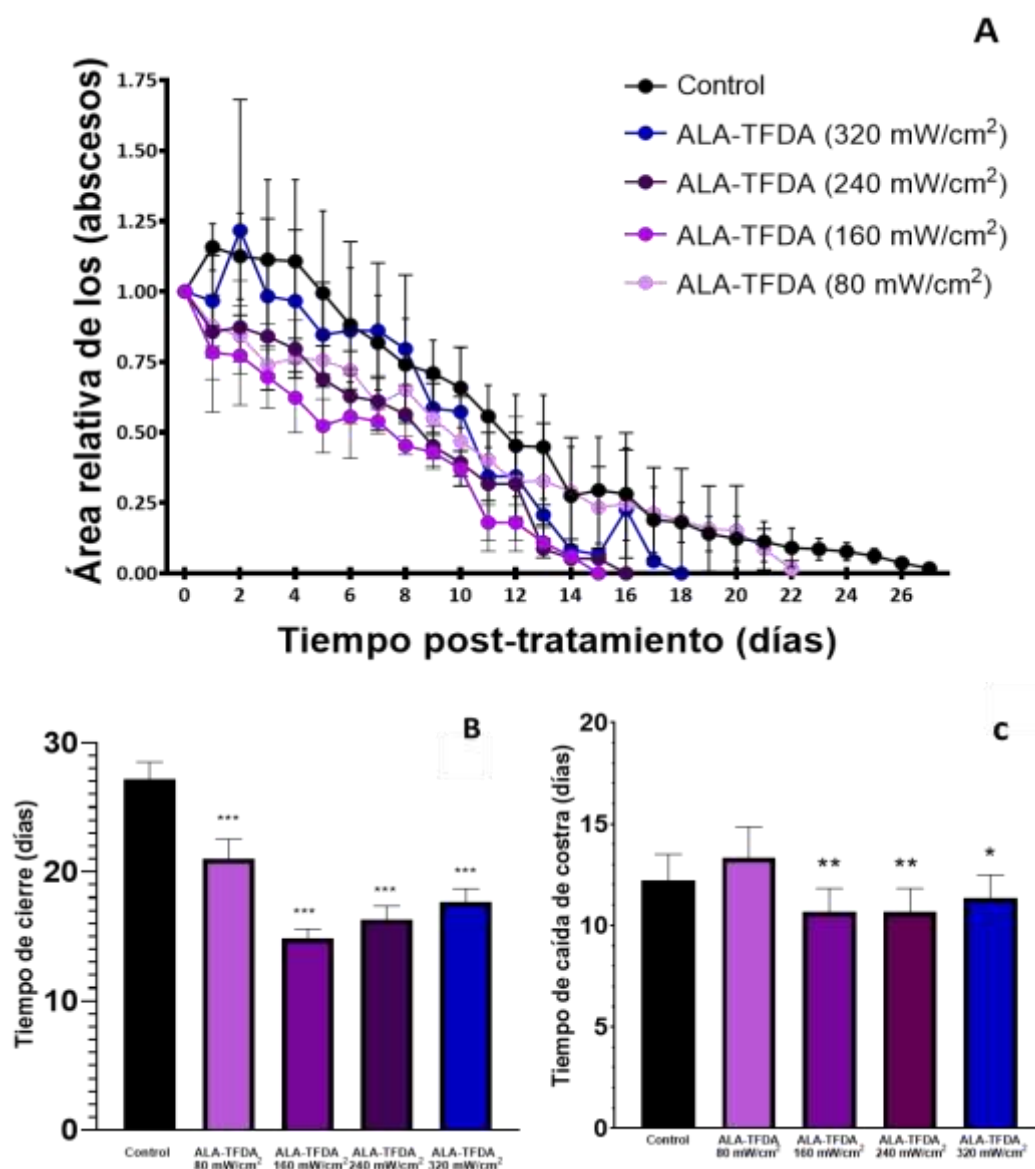


Figura IV.2: Evolución de las heridas causadas por los abscesos, luego de ser tratados con ALA-TFDA

A) Área relativa (al día cero) de las heridas en los días posteriores al tratamiento con ALA-TFDA (con láser rojo, 635 nm) a diferentes potencias. B) Tiempo de resolución de la herida. C) Tiempo de caída de costra. Controles: PBS –luz. Los resultados corresponden a las medias $\pm$ SD de 6 ratones por tratamiento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, ANOVA de dos vías y prueba de comparación post hoc de Tukey en comparación con el control.

Por otra parte, la luz *per se* también tuvo efecto significativo en la reducción del área de los abscesos y en su tiempo de resolución (Figura IV.3). Todas las potencias de luz aplicadas indujeron cambios significativos en las curvas de progresión de los tamaños en algún punto de la curva (Figura A3), aunque las que indujeron los efectos más marcados fueron las de 320 y 240 mW/cm². En cuanto a resolución de las heridas, todas las potencias aceleraron entre 6 y 8 días el tiempo de cierre inicial de $27,12 \pm 1,48$ días, siendo la dosis de 240 mW/cm², la que mejores resultados indujo.

El tiempo de caída de costra, en cambio, no se redujo por los tratamientos con luz. Inclusive, al emplear las dosis de luz de 80 mW/cm² y 160 mW/cm² el tiempo de caída fue significativamente mayor que el del control sin tratar. Para el resto de las potencias de luz empleadas, no se registraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

Al comparar para cada potencia de luz empleada, los efectos del tratamiento ALA-TFDA y controles con luz (-ALA), se observa que a las dosis más bajas de luz empleadas (80 y 160 mW/cm²), la acción de la ALA-TFDA sobre el tamaño de los abscesos no fue significativamente diferente de la de la luz, mientras que sí lo fue al día 2 post tratamiento con 320 mW/cm² y en los días iniciales del tratamiento con 240 mW/cm² (Figura A4).

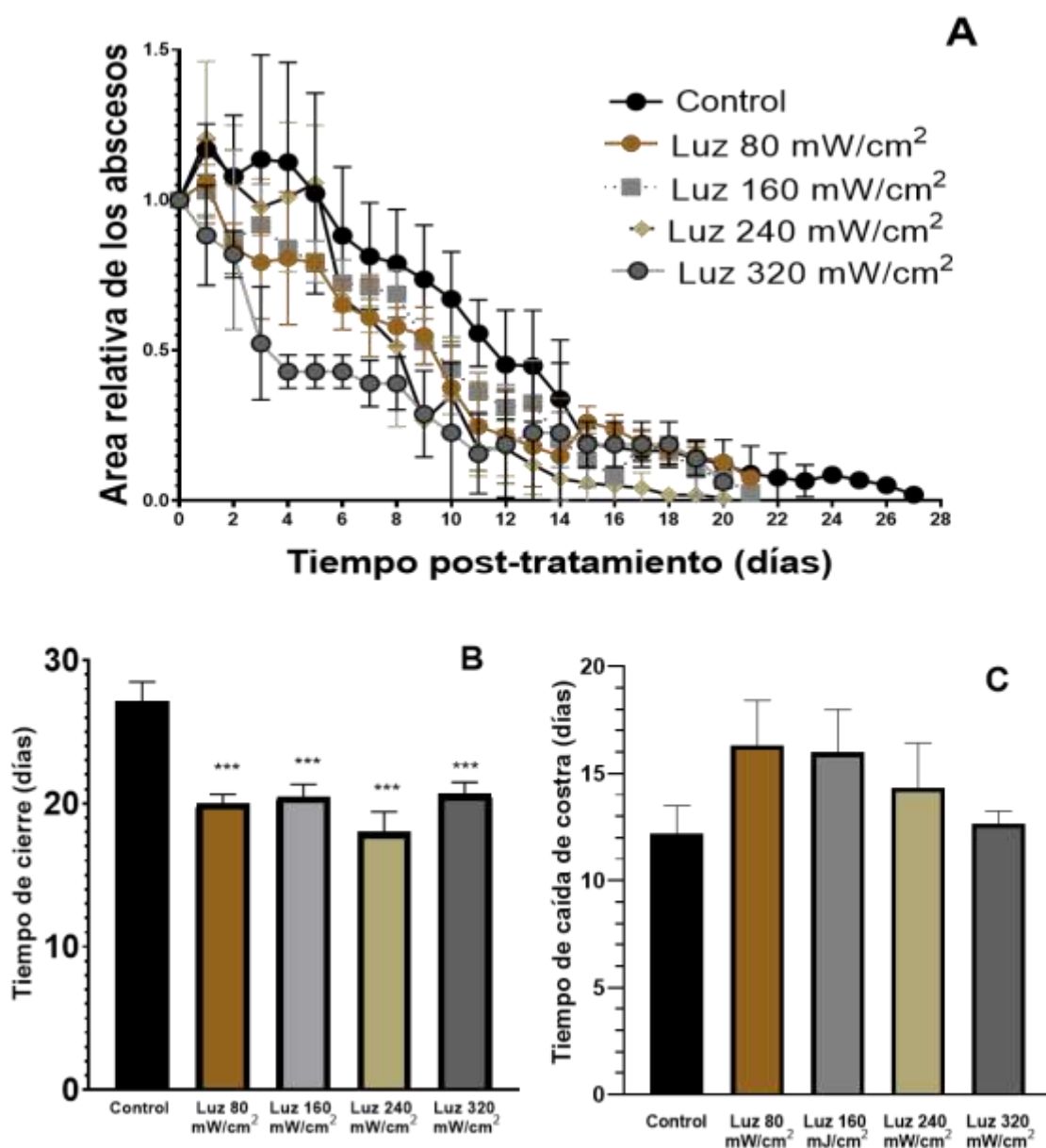


Figura IV.3: Evolución de las heridas causadas por los abscesos, luego de ser tratados con luz (sin ALA)

A) Área relativa (al día cero) de las heridas en los días posteriores al tratamiento con láser rojo de 635 nm (sin ALA) a diferentes potencias. Control: PBS –luz. B) Tiempo de resolución de la herida. C) Tiempo de caída de costra. Los resultados corresponden a las medias $\pm$ SD de 6 ratones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, ANOVA de dos vías y prueba de comparación post hoc de Tukey y comparación con el control.

En la Figura IV.4, a efectos de visualizar mejor los datos, se grafican los tratamientos de ALA-TFDA y luz sola, empleando la potencia lumínica de 160 mW/cm² correspondientes a las Figuras IV.2-A y IV3-A.

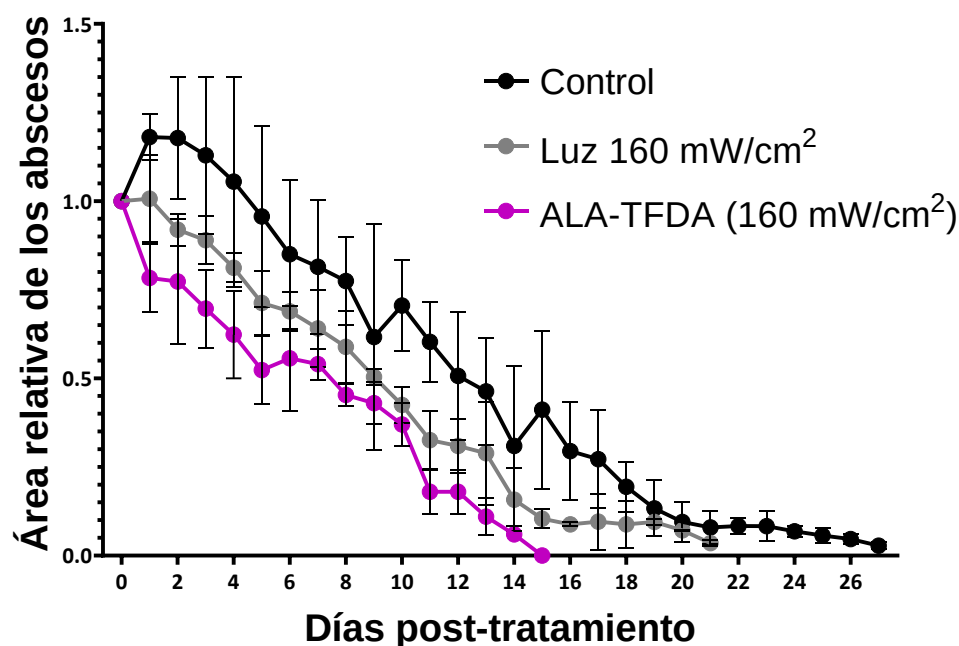


Figura IV.4: Evolución de las heridas causadas por los abscesos, luego de ser tratados con ALA-TFDA y luz sola, empleando 160 mW/cm²

Se grafican resultados ya presentados en las Figuras IV.2-A y IV.3-A para su mejor visualización.

En la Figura IV.4 puede observarse el aspecto macroscópico de los abscesos durante los primeros dos días luego de los tratamientos, el área de las heridas en los abscesos de los ratones control, aumenta alcanzando un máximo en el día 2. Mientras que en los grupos experimentales que reciben tratamientos de luz y de ALA-TFDA, el área de dichas heridas comienza a reducirse inmediatamente después de los tratamientos. A los 14 días, el cierre de la herida es casi completo en los abscesos tratados con ALA-TFDA, mientras que las heridas de los grupos tratados con luz, y los controles sin tratamiento, todavía mantienen heridas abiertas y con signos de inflamación. En estas heridas, aún es visible un borde irregular y zonas que no han cicatrizado completamente con secreción transparente y/o amarillenta, indicando que la infección no ha sido resuelta por completo. Al día 21 ya se observa el cierre de herida en los abscesos tratados con luz, mientras que, en los controles recién se visualiza la resolución al día 27.

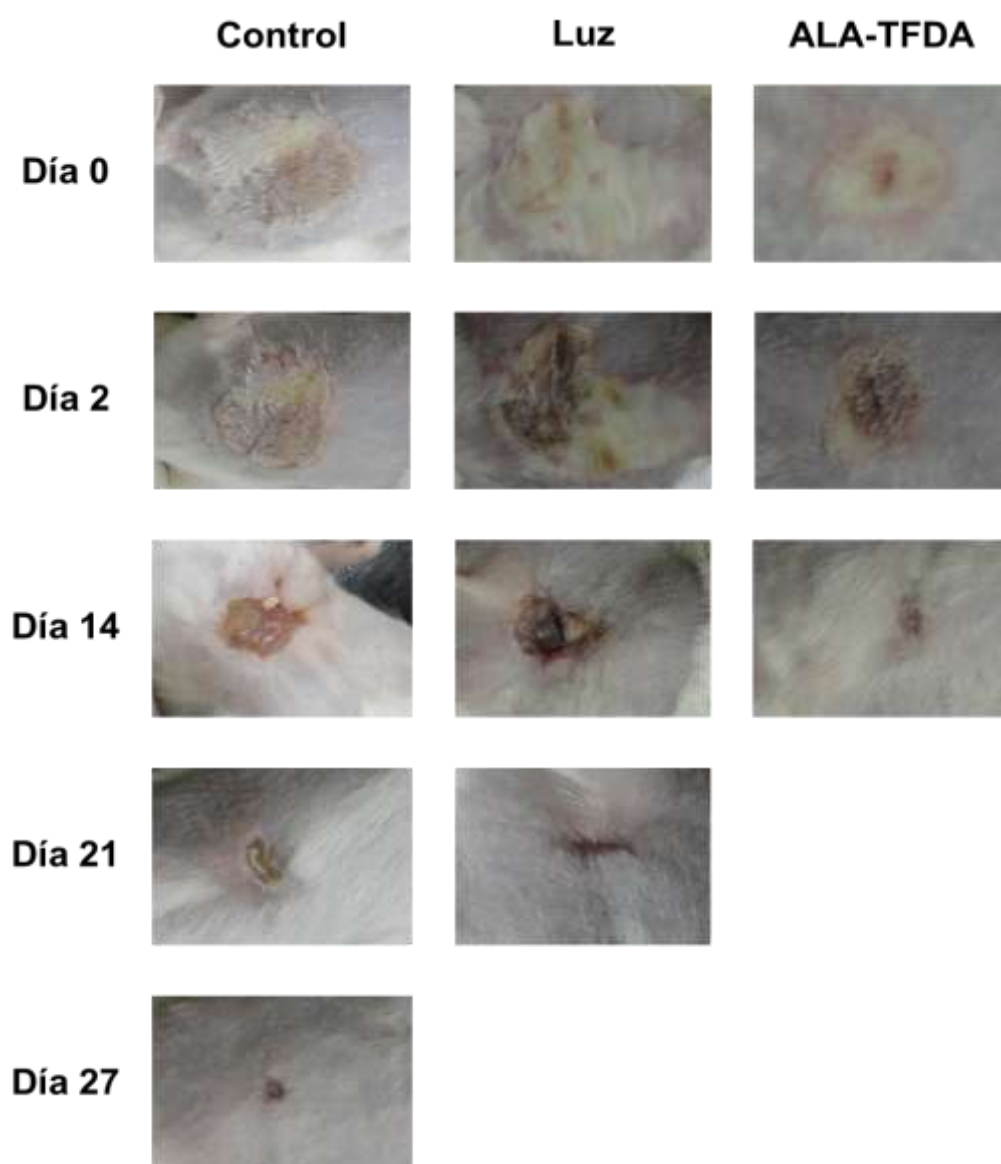


Figura IV.5: Imágenes de la evolución de las heridas causadas por los abscesos luego de los tratamientos con ALA-TFDA y luz sola, empleando 160 mW/cm^2

Imágenes de heridas representativas de los diferentes grupos experimentales, en diferentes días luego de los tratamientos. Control: PBS -luz. Luz: ratones topicados con PBS e irradiados con láser de 635 nm (160 mW/cm^2). ALA-TFDA: ratones topicados con ALA e irradiados con láser de 635 nm (160 mW/cm^2).

IV.2 Procesos biológicos involucrados en la resolución de abscesos mediada por ALA-TFDA y luz sola

IV.2.1 Evaluación de la viabilidad bacteriana luego de ALA-TFDA

Para evaluar el efecto bactericida de la ALA-TFDA, se evaluó la carga bacteriana remanente en las heridas a los días 0, 1, 2, 7 y 14 luego de los tratamientos con ALA-TFDA y luz sola, empleando la potencia de irradiación de 160 mW/cm^2 . Como se observa en la Figura IV.6, a los días 0, 1, 2 y 7, no hubo diferencias significativas en la carga bacteriana entre los diferentes grupos. Sin embargo, al día 14, se evidenció una reducción significativa ($p < 0,001$) en la viabilidad bacteriana en el grupo tratado con ALA-TFDA en comparación con los grupos control y sólo iluminados (Figura IV.5 B).

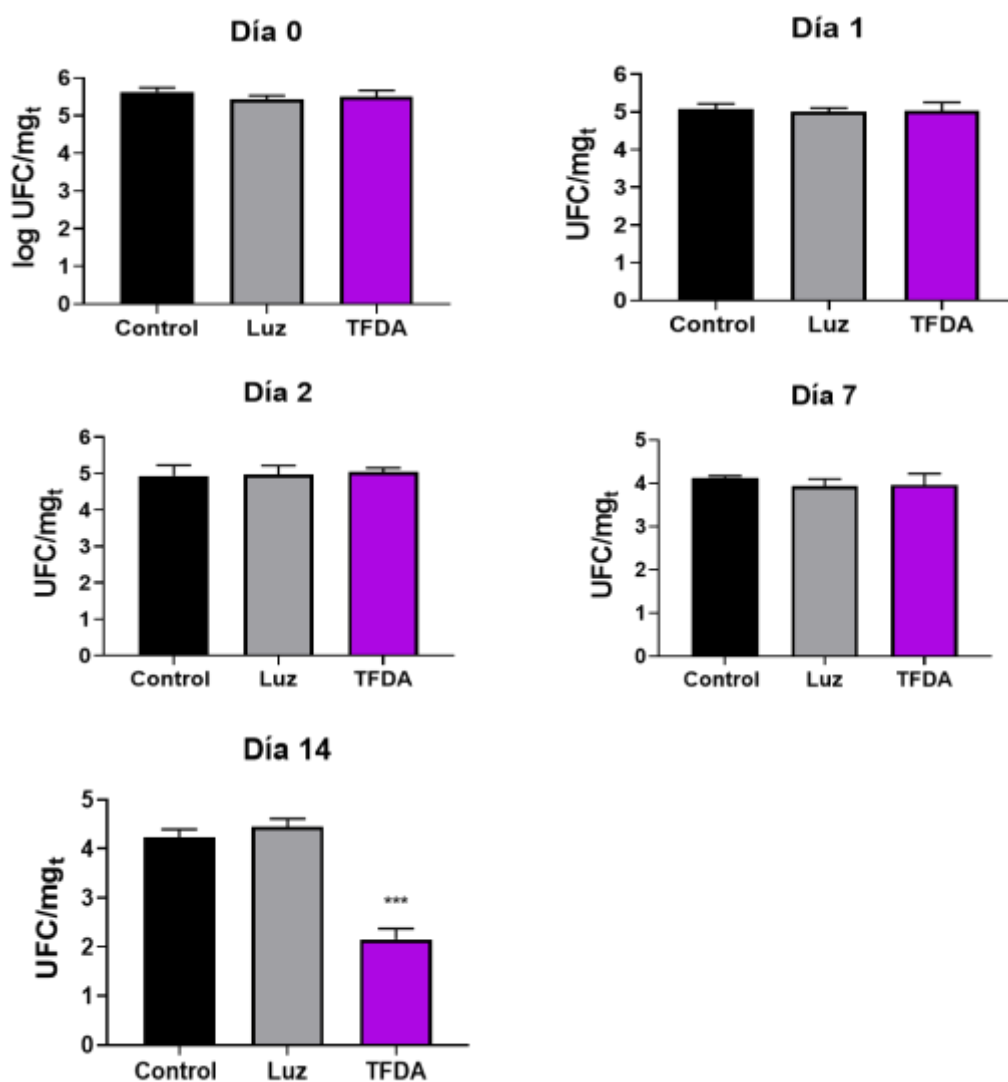


Figura IV.6: Carga bacteriana en abscesos tratados con ALA-TFDA
Carga bacteriana (UFC/mg de tejido infectado) en abscesos tratados con ALA-TFDA o sólo luz (160 mW/cm^2) a diferentes días post tratamiento (0, 1, 2, 7 y 14). Los datos

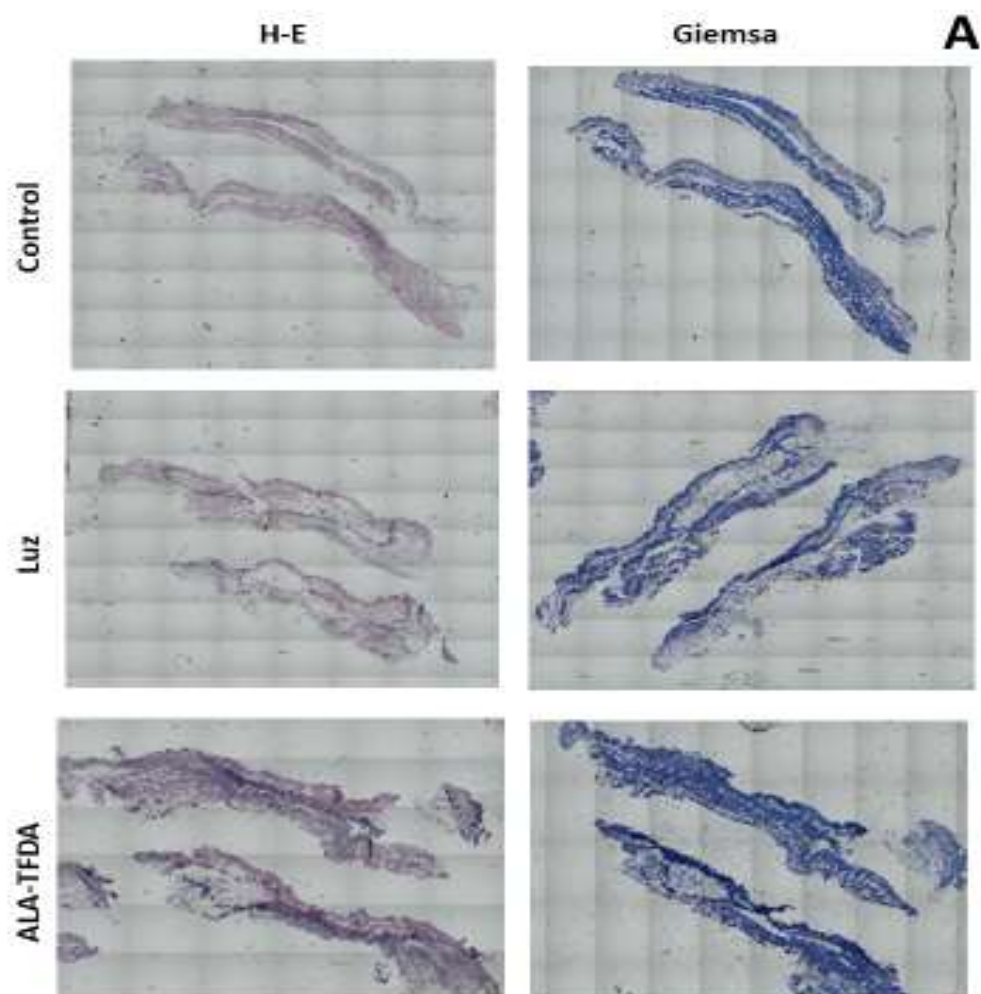
*corresponden a la media $\pm$ SD de 6 ratones por cada tratamiento. *** $p < 0.001$ respecto al control, ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey.*

IV.2.2 Análisis histológicos de infecciones tratadas con ALA-TFDA y luz sola

A continuación, se observaron los cambios histológicos inducidos por la ALA-TFDA y por la luz *per se* en los abscesos, a los 2 días post tratamiento. Se eligió este día para realizar la toma de muestras de tejidos, por ser aquél en el que mayores diferencias se registraron en el tamaño de las áreas de las heridas entre los grupos tratados y el grupo control. Al analizar las imágenes de la tinción de los cortes histológicos con Hematoxilina-Eosina y Giemsa (Figura IV.7), pudo observarse que todos los grupos experimentales presentaron un infiltrado inflamatorio con predominio de neutrófilos en las zonas de piel afectadas por la infección. Tanto el grupo no tratado, como los animales expuestos únicamente al tratamiento con luz presentaron dicho infiltrado inflamatorio de manera difusa en las distintas capas de la piel, observándose presencia de neutrófilos tanto en la dermis (tejido conectivo) como en la hipodermis (tejido adiposo). Este infiltrado de la dermis se continúa aún en zonas externas a la infección. Por su parte, la reacción inflamatoria en los animales expuestos a ALA-TFDA fue mucho mayor, que en la de los ratones expuestos a luz, tal como lo denota la coloración violácea mucho más marcada en la tinción con Giemsa. Este mayor infiltrado se encuentra localizado en la zona de la infección, con menor presencia de células inflamatorias en la zona de la dermis periférica a la infección. Respecto a la profundidad de la reacción inflamatoria, esta es también mucho mayor en el grupo tratado con ALA-TFDA, ya que se puede observar un marcado infiltrado no sólo en la hipodermis, sino también en la capa muscular subcutánea.

El espesor del absceso se presentó aumentado en los ratones tratados con luz y ALA-TFDA respecto al control sin tratar. En cuanto a la regeneración de los tejidos, mientras que en el control se observa una reepitelización incipiente debajo del absceso, este proceso se encuentra más avanzado en los ratones expuestos a luz y a ALA-TFDA. Incluso, en este último grupo mencionado, se puede ver un incipiente desprendimiento de la costra (Figura IV.7-B,10X). La observación de los abscesos con aumento 100X permitió detectar la presencia de infiltrado inflamatorio en las fibras colágenas de la dermis y en el tejido adiposo en las muestras control y tratadas solo con luz, mientras que en el ratón tratado con ALA-TFDA se observa la presencia de tejido de granulación.

Ratones sanos sin infección tratados con ALA-TFDA mostraron macroscópicamente signos transitorios de eritema e inflamación, que se fueron resolviendo luego de 48 h post-tratamiento. Los mismos no fueron analizados microscópicamente.



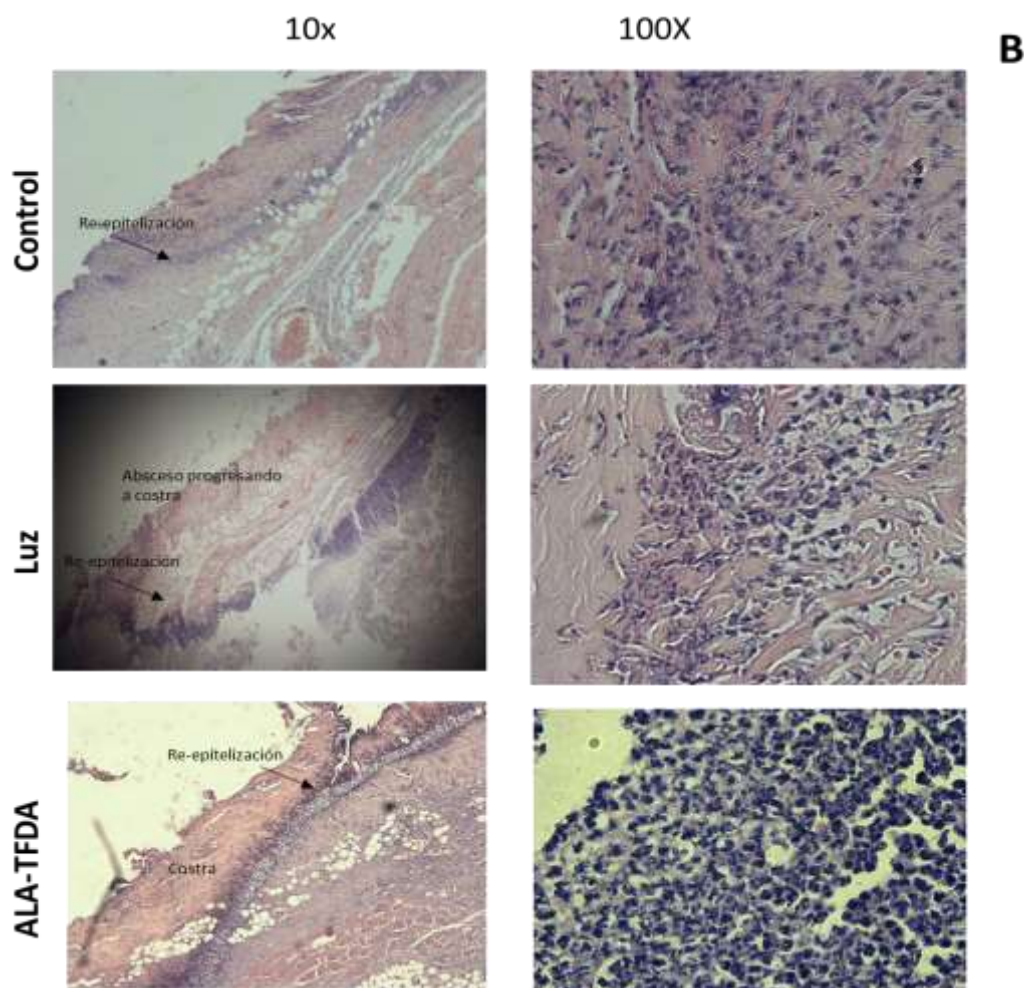


Figura IV.7: Análisis histológico de abscesos tratados con ALA-TFDA y luz (160 mW/cm^2)

Microfotografías de cortes histológicos de abscesos cutáneos de *S. aureus* tratados con ALA-TFDA o luz sola (160 mW/cm^2) tomadas en el día 2 luego de realizados los tratamientos. H-E: muestras teñidas con Hematoxilina-Eosina. Giemsa: muestras teñidas con tinción de Giemsa. A) Aumento 4X. B) Detalles de las imágenes tomados con aumento: 10X y 100X.

IV.2.3 Efecto de la ALA-TFDA sobre el sistema inmune: cuantificación de citoquinas

Se realizaron determinaciones de niveles de citoquinas a los días 2, 7 y 11 post-tratamiento. Estos días se seleccionaron debido a que representan momentos clave en la evolución de los procesos infecciosos e inflamatorios de este tipo de infecciones (Senet., 2008). El día 2 post-tratamiento corresponde a la fase inicial de la respuesta inmune, en la que se espera una activación temprana de mediadores inflamatorios en respuesta a la infección, que dura entre 2 a 3 días en el ratón, y fue el día al que observamos las mayores

diferencias de tamaño de área entre ratones tratados con ALA-TFDA y controles. El día 7 se asocia con la transición entre la fase inflamatoria y la fase de resolución del daño tisular, momento en el cual se pueden detectar cambios en el perfil de citoquinas pro y antiinflamatorias (Xiao et al., 2020), y es el día al cual se observó un aumento del área en los ratones tratados con ALA-TFDA. Finalmente, el día 11 se escogió porque ya se observa caída de costra en algunos controles, lo que evidencia la última fase de cicatrización, donde los niveles de citoquinas pueden reflejar la modulación del sistema inmune inducida en la recuperación del tejido (Werner et al., 2003).

Para los días 7 y 11 post tratamiento, se realizó el seguimiento solo de IL-6, dada su implicancia en la regulación de la respuesta inmune crónica, y su relevancia como marcador de progresión del proceso inflamatorio en modelos experimentales similares (Scheller et al., 2011).

Como se puede observar en la Figura IV.8, los resultados obtenidos muestran una alta dispersión en los datos y un bajo número de muestras por grupo, que no permitieron detectar diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales, para los niveles de citoquinas estudiadas en los días analizados. En esta figura, se muestran los resultados de la determinación de los niveles de las diferentes citoquinas, relativizados por masa de tejido. Resultados similares se obtuvieron relativizando los datos por contenido de proteínas (datos no mostrados).

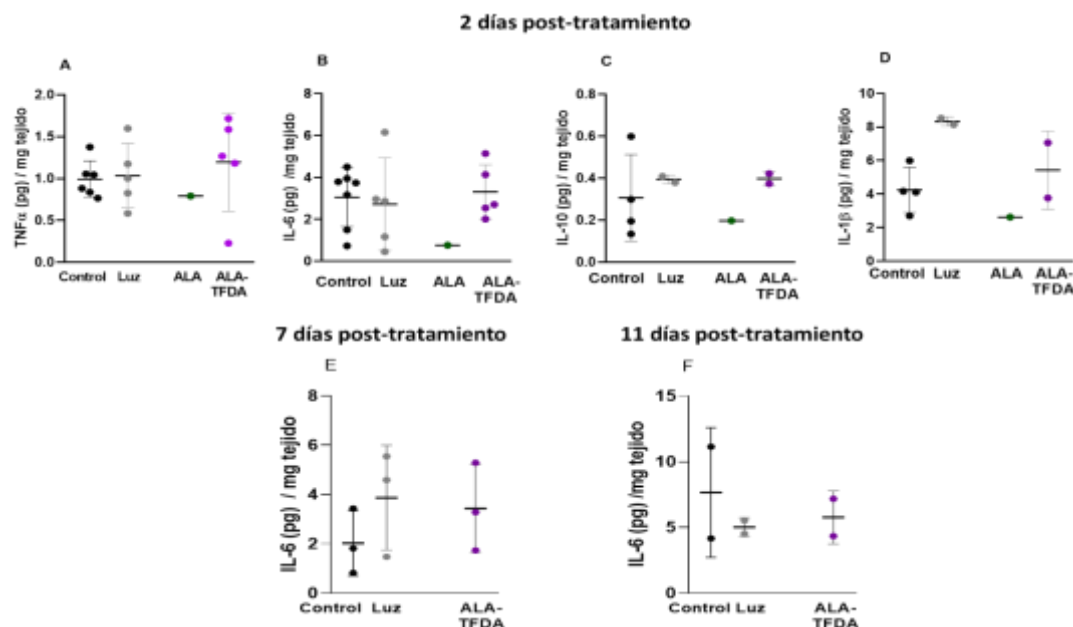


Figura IV.8: Determinación de citoquinas en abscesos tratados con ALA-TFDA, luz y ALA

Niveles de citoquinas en abscesos tratados con TFDA, solo con luz (160 mW/cm^2), solo topicados con ALA (1,5 mg, tópico), y controles sin tratamientos. Determinaciones

llevadas a cabo en el día 2 post tratamientos: A) TNF- α , B) IL-1 β , C) IL-6 y D) IL-10. Determinaciones de IL-6 llevadas a cabo en los días: 7 (E) y 11 (F) 11. Los valores se presentan como media $\pm$ SD de grupos de entre 3 y 6 ratones por tratamiento. Los resultados se expresan en pg de citoquina por mg de tejido. Se aplicó el test de Kruskal Wallis.

IV.2.4 Análisis y de los resultados obtenidos en abscesos tratados con ALA-TFDA y luz

En la Tabla IV.1 se resume el efecto de ALA-TFDA y tratamiento lumínico sobre los distintos parámetros de evolución de los abscesos analizados en este Capítulo. Asimismo, el tratamiento con ALA-TFDA aceleró la reducción del área de los abscesos. Por otra parte, la luz por se disminuyó la progresión de las lesiones, pero no tan marcadamente como en el caso de la TFDA.

La ALA-TFDA con 160 mW/cm² redujo el cierre de heridas de $27.1 \pm 1,4$ a $15,1 \pm 0,7$ días, representando una reducción de 12 días en el proceso. La TFDA con el resto de las potencias también indujo eceleración del proceso de cierre en un grado levemente menor. El tratamiento lumínico también indujo por sí solo cambios facorables sobre este parámetro, acelerando un máximo de 7 días empleando 240 mW/cm².

Respecto a la caída de costra, los ratones del grupo control presentaron un tiempo medio de $12,2 \pm 1,3$ días para este proceso, mientras que el tratamiento con ALA-TFDA, empleando la potencia de 160 mW/cm², redujo este periodo a $10,6 \pm 1,1$ días (reducción del 13%, $p < 0,01$). Resultados similares se obtuvieron con potencias de 240 y 320 mW/cm². Por otra parte, la luz de 80 y 160 mW/cm² prolongaron 4 días el tiempo de caída de la costra, mientras que las potencias más altas no afectaron este parámetro.

Respecto a la carga bacteriana encontrada en los abscesos, el tratamiento con ALA-TFDA fue capaz de reducirla (respecto al control sin tratar), aunque, recién en una etapa tardía del proceso. El tratamiento solo con luz, no mostró diferencias significativas en este parámetro, respecto al control.

Tabla IV.1: Comparación de los efectos de ALA-TFDA y terapia con luz sobre parámetros de cicatrización en abscesos murinos

Comparación de los tiempos de cicatrización y carga bacteriana entre el grupo control y los tratamientos con ALA-TFDA y luz α : [#]160 mW/cm² y ^{##}320 mW/cm².

Tratamientos	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)	UFCs
Control		27,1 ± 1,4	12,2 ± 1,3	
ALA-TFDA	↑	15,1 ± 0,7 [#]	10,6 ± 1,1 [#]	↓
Luz	↑	20,6 ± 0,8 ^{##}	16,0 ± 2,0 ^{##}	=

 Efecto positivo sobre los parámetros indicados y
  efecto negativo

En resumen, dependiendo de la potencia de luz empleada, tanto el tratamiento con ALA-TFDA, como con luz sola, demostraron efectos beneficiosos en la resolución de la infección y la cicatrización, en el modelo murino estudiado. Sin embargo, la ALA-TFDA parece producir mejores efectos, en todos los parámetros evaluados en la Tabla IV.1, incluso requiriendo una menor potencia de iluminación. La terapia de luz acelera significativamente el cierre de la herida, pero retrasa la caída de la costra y no modifica la carga bacteriana, lo que podría limitar su eficacia en tratamientos clínicos. Los resultados sugieren que el tratamiento con ALA-TFDA a 160 mW/cm² representa la mejor opción terapéutica entre las estudiadas, logrando un balance favorable entre la potencia de iluminación aplicada y la eficacia obtenida.

IV.3 Tratamiento de TFT en abscesos

En el Capítulo I se demostró que la TFT mejora *in vitro* la eficiencia de la ALA-TFDA. En el presente capítulo, se intentará testear si dicho fenómeno es extrapolable al modelo de absceso cutáneo *in vivo* de *S. aureus* RN6390.

IV.3.1 Puesta a punto de parámetros de TFT empleados y determinación de temperatura sobre la piel de ratón

En esta sección se presentan los resultados de la puesta a punto de las condiciones para TFTc y TFTp de manera de no elevar la temperatura superficial del ratón por sobre los

42°C, temperatura máxima tolerable en la piel según lo encontrado en bibliografía (Bora et al., 2022).

Se utilizó un láser de 980 nm en modalidad continuo o pulsado, ajustando la potencia y los tiempos de exposición según la dosis final de energía a entregar. En todos los casos, al comienzo del tratamiento se realizó un disparo de spray criogénico en la región a irradiar, que disminuye la temperatura basal de la piel del ratón de 34 a 21°C.

Para TFTc, se aplicaron dosis únicas a una potencia de 11,6 W de salida del láser, lo que representa una densidad de potencia de 1,64 W/cm² entregada en tiempos de 5 s, 10 s y 15 s, de manera que las dosis fueron 8,2 J/cm², 16,4 J/cm² y 24,6 J/cm², respectivamente, con las cuales se alcanzaron temperaturas máximas de 30, 36 y 44°C respectivamente (Figura IV.9-A).

Además, se evaluó la aplicación de múltiples dosis, a una potencia de salida del láser de 5,7 W (densidad de potencia: 0,81 W/cm²) en 3 dosis de 5 s + 2 dosis de 15 s, separadas por intervalos de 10 s (para aplicación de spray criogénico), totalizando 36,8 J/cm² de dosis de energía total entregada a la muestra. En este esquema, la temperatura máxima alcanzada fue de 44°C (Fig. IV.9-B). Mientras que al dividir el tratamiento en 3 dosis de 10 s a una potencia de 0,81 W/cm² (totalizando 24,3 J/cm²) la temperatura máxima fue de 39° (Figura IV.9-C).

En el TFTp, se aplicó un tratamiento con pulsos de 50 ms a una frecuencia de 4 Hz a 1,64 W/cm², durante 50, 100 s y 150 s, entregando dosis totales de 16,4; 32,9 y 49,4 J/cm², respectivamente. En estos esquemas, irradiando incluso durante 100 s, la temperatura de la piel nunca superó los 42°C, mientras que empleando una potencia menor (0,81 W/cm²), la temperatura nunca superó los 33°C en un tiempo de 50 s.

Tanto para TFTc como TFTp, la evaluación macroscópica y microscópica de la piel de los ratones no evidenció alteraciones luego de los tratamientos. A partir de analizar los resultados obtenidos, se seleccionaron como modalidades de irradiación para continuar el trabajo, la TFTc en 3 dosis, junto con la TFTp a 4 Hz, 50 ms de ancho de pulso y 100s de irradiación, debido a que fueron los esquemas que más energía impartieron, manteniendo la temperatura del ratón por debajo de la máxima deseable (42°C).

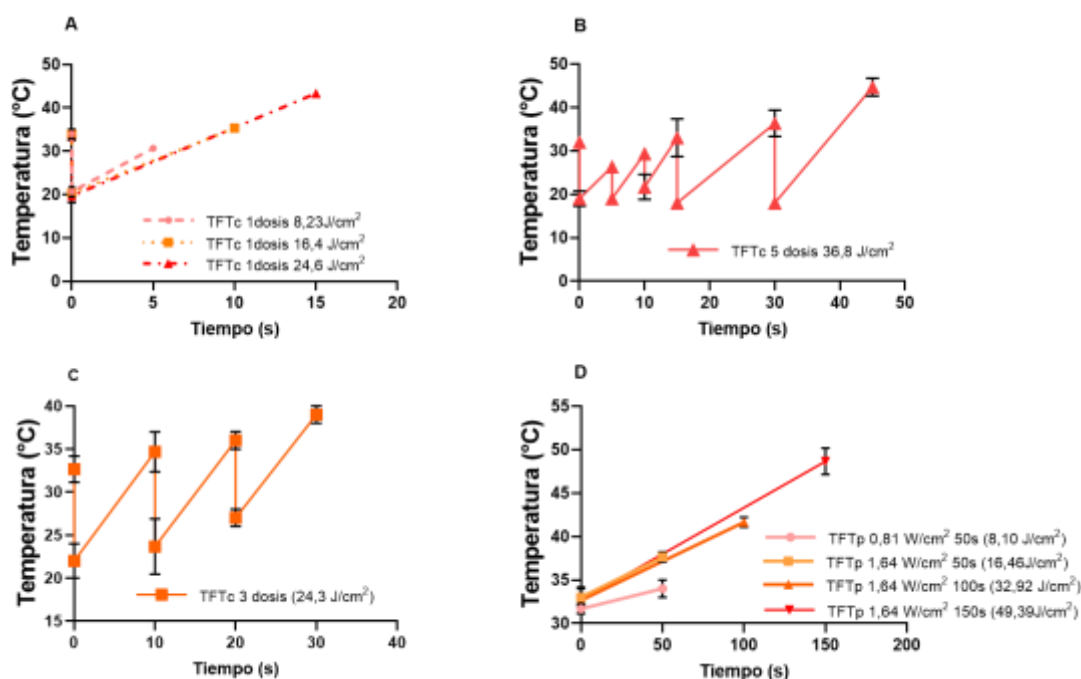


Figura IV.9: Aumento de temperatura de la piel sana de ratón con TFTc y TFTp

A) TFTc en única dosis de 1,64 W/cm² para diferentes tiempos, 5 s, 10 s y 15 s. B) TFTc 5 dosis (3 dosis de 5 s + 2 dosis de 15 s), irradiando con potencia de 0,81 W/cm². C) 3 dosis de 10 s a potencia 0,81 W/cm². D) TFTp a diferentes potencias y tiempos de irradiación. Se grafican las medias $\pm$ SD de 3 ratones por esquema de irradiación.

V.3.2 Efecto de la TFT sobre la síntesis de porfirinas a partir de ALA en los abscesos

En esta sección se muestra la síntesis de porfirinas en abscesos tratados con ALA tópico, seguida de TFT. Tal como se mencionó anteriormente, se emplearon las condiciones de TFTc (3 dosis de 10 s, 0.81 W/cm², ver Figura IV.9-C) y TFTp (50 ms 4Hz 100 s de irradiación, 1,61 W/cm², ver Figura IV.9-D). La Figura IV.10-A muestra las imágenes obtenidas a partir de cortes histológicos de los abscesos, donde se puede observar en el panel de la izquierda, la fluorescencia magenta característica de las porfirinas, ubicada en la zona más profunda de la piel. Esta señal de fluorescencia fue más intensa en los tejidos tratados con TFTc. En este análisis histológico no se incluyó la terapia TFTp debido a que los experimentos *in vitro* previos se habían obtenido mejores resultados, en la potenciación de los efectos de la TFDA sobre la viabilidad bacteriana, a partir de la TFTc, y el objetivo de este ensayo era evaluar específicamente el incremento en la fluorescencia de las porfirinas.

Para obtener una cuantificación más precisa, se realizó la extracción química de porfirinas presentes en el tejido, incluyendo en este caso ambas condiciones de irradiación (Figura IV.10-B). Los incrementos fueron de 1,8 y 3,6 veces (respecto del control tratado con ALA, pero sin irradiar) para TFTc y TFTp, respectivamente.

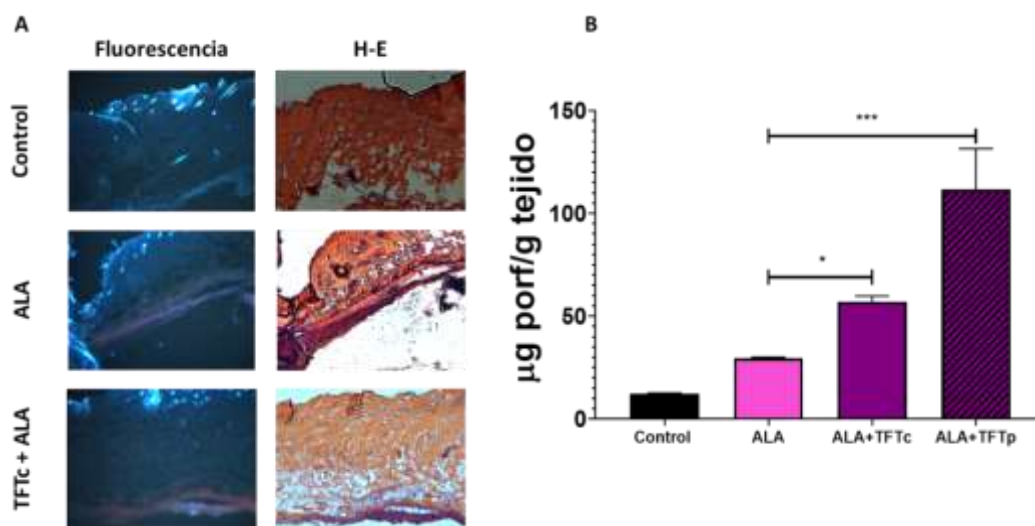


Figura IV.10: Síntesis y localización de porfirinas en abscesos topicados con ALA y tratados con TFT

Efectos de la TFT en abscesos cutáneos de *S. aureus* tratados con 1,5 mg de ALA tópico y TFTc ($24,3 \text{ J/cm}^2$) o TFTp ($32,9 \text{ J/cm}^2$). A) Imágenes representativas de cortes histológicos observados por microscopía de fluorescencia, y contratinción con H-E (aumento 5X). B) Cuantificación de porfirinas presentes en los abscesos. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$, ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey.

IV.3.3 Tratamiento de abscesos con TFT

Luego de tratar los abscesos con TFTc o TFTp (sin topicar ALA, o irradiar con luz visible), no se observaron diferencias significativas en la progresión del área de las heridas respecto al control sin tratar, en ninguno de los días posteriores a los tratamientos (Figura IV.11-A), como tampoco en el día de caída de costra, que fue de $12,2 \pm 1,3$ días en el control, y $11,8 \pm 1,5$ y $11,4 \pm 1,6$ días para TFTp y TFTc respectivamente (datos no graficados). Sin embargo, sí hubo diferencias entre el tratamiento con TFTc y el tratamiento control, en el tiempo de resolución de las heridas. La TFTc redujo el tiempo de cierre en 4 días (Figura IV.11-B).

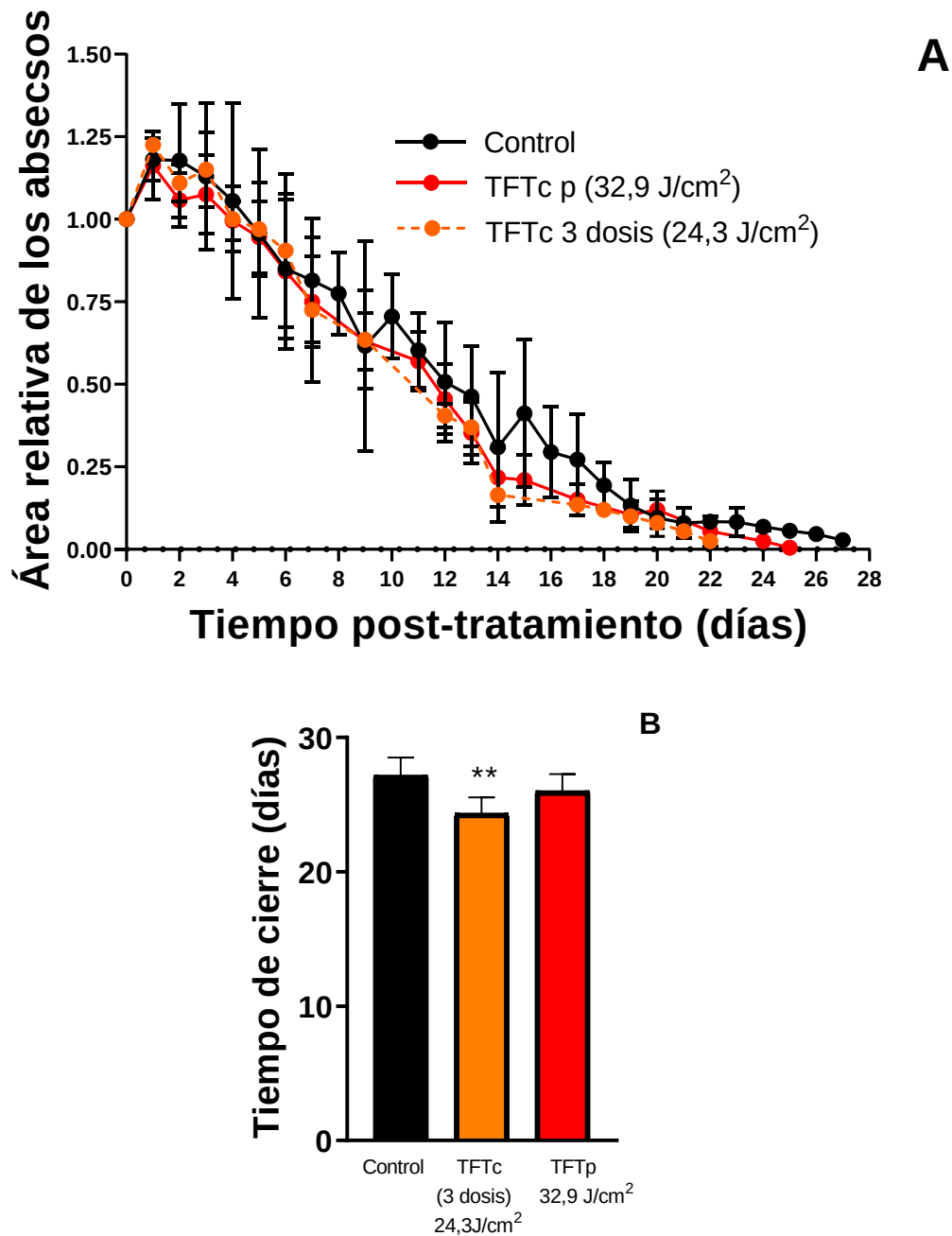


Figura IV.11: Evolución de las heridas causadas por los abscesos, luego de ser tratados con TFTc y TFTp

A) Área relativa (al día cero) de las heridas en los días posteriores al tratamiento con TFTc (3 dosis de 10 s, 24,3 mW/cm²) y TFTp (50 ms 4 Hz, 32.9 mW/cm², 100 s) Medias $\pm$ SD de 3 ratones por tratamiento. B) Tiempo de resolución de la herida para los diferentes tratamientos. ** $p < 0,01$, test de Kruskal-Wallis,

IV.4 Combinación de TFT y TFDA en el tratamiento de abscesos cutáneos de *S. aureus*

La aplicación de las terapias combinadas (TFT y ALA-TFDA) se realizó según el FiguraIV.12.

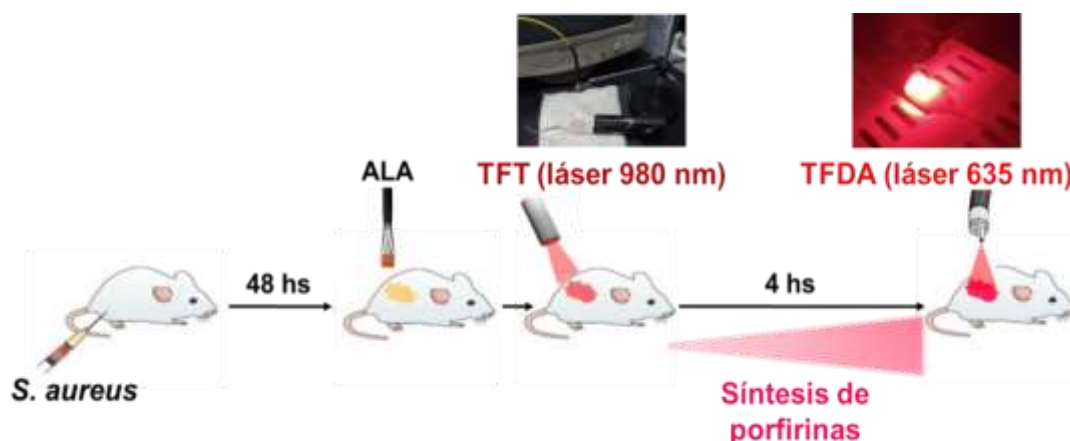


Figura IV.12: Esquema experimental para ALA-TFDA combinado con TFT sobre abscesos de *S. aureus*

Luego de 48 h de desarrollados los abscesos cutáneos en los ratones, se tópicó la piel de los mismos con 1,5 mg de ALA en PBS, y se realizó la TFT (empleando un láser con emisión a 980 nm, según los esquemas de TFTc y TFTp seleccionados en las secciones precedentes). Se dejó al ratón en oscuridad durante 4 h y se realizó la TFDA mediante irradiación con luz visible (láser de 635 nm, empleando la potencia de 160 mW/cm²). Se incluyeron, además, controles topicados con PBS con y sin irradiación posterior.

IV.4.1 Progresión del área de las heridas producidas por abscesos de *S. aureus*, tratadas con combinación de TFT y TFDA

Se emplearon las condiciones que mejor resultado produjeron en las secciones anteriores: ALA-TFDA (160 mW/cm²), TFTc (3 dosis de 10 s, 24,3 mW/cm²), y TFTp (50 ms 4 Hz, 32.9 mW/cm², 100 s).

Los resultados de la progresión del área de las heridas luego de los tratamientos, se muestran en la Figura IV.13. Contrariamente a lo esperado, el tratamiento combinado de TFTc y ALA-TFDA pareció haber revertido levemente los resultados benéficos de la ALA-TFDA vistos anteriormente, al menos el primer día luego del tratamiento. En el día 1, el área de la herida continuó creciendo, y fue significativamente mayor en el grupo de las terapias combinadas que en el grupo que recibió ALA-TFDA como tratamiento único. Para el resto de los días, no se registraron diferencias significativas entre los efectos

producidos por el tratamiento con ALA-TFDA y el tratamiento combinado (TFTc y ALA-TFDA).

La combinación de TFTp con ALA-TFDA, también indujo efectos perjudiciales sobre la progresión de las heridas, respecto al tratamiento solo con ALA-TFDA. En este caso se registró un mayor tamaño en el área de las heridas tratadas con la combinación de terapias, respecto las tratadas solo con ALA-TFDA, no solo en el primer día, sino también en las fases tardías del proceso de cierre de herida (días 8 al 12) (Figura IV.13).

No se observaron diferencias significativas en los tiempos de caída de costra y de cierre de herida para el tratamiento combinado de ALA-TFDA con TFT (tanto en modo continuo como pulsado) vs ALA-TFDA como tratamiento único (datos no graficados).

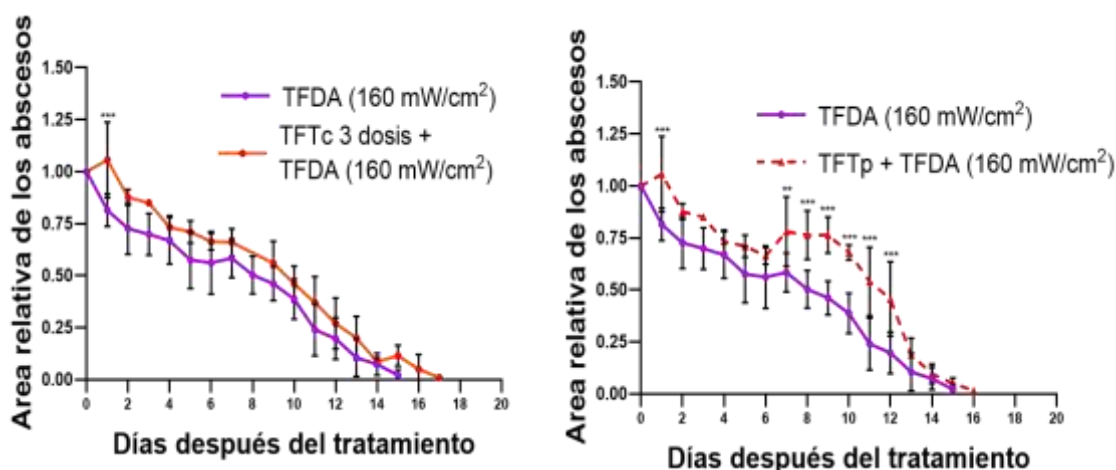


Figura IV.13: Progresión de los abscesos tratados con ALA-TFDA en combinación con TFTc y TFTp

Se comparó la progresión de los abscesos tratados con ALA-TFDA combinado con TFTc: 3 dosis de 10 s, 24,3 mW/cm² (panel izquierdo), o TFTp: 50 ms 4 Hz, 32.92 mW/cm², 100 s (panel derecho). Los puntos representan la media $\pm$ SD de 3 ratones. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, vs control sin tratar; test U de Mann-Whitney, en cada día de la curva.

IV.4.2 Determinación de citoquinas luego de tratamiento de los abscesos con TFTc y TFTp en combinación con ALA-TFDA

Para evaluar la respuesta inflamatoria temprana inducida por los tratamientos, se cuantificaron los niveles de IL-6, IL-10, TNF- α e IL-1 β a las 48 horas post tratamiento en los grupos tratados con TFTc, tanto de manera individual como en combinación con ALA-TFDA. Como se observa en la Figura IV.14, los niveles de estas citoquinas no

mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales, lo que indica una respuesta inflamatoria similar en todos los esquemas de tratamientos evaluados. No se prosiguió el análisis de citoquinas a tiempos más largos debido a la falta de respuesta positiva del tratamiento combinado, sobre la progresión del área de las heridas mencionada anteriormente.

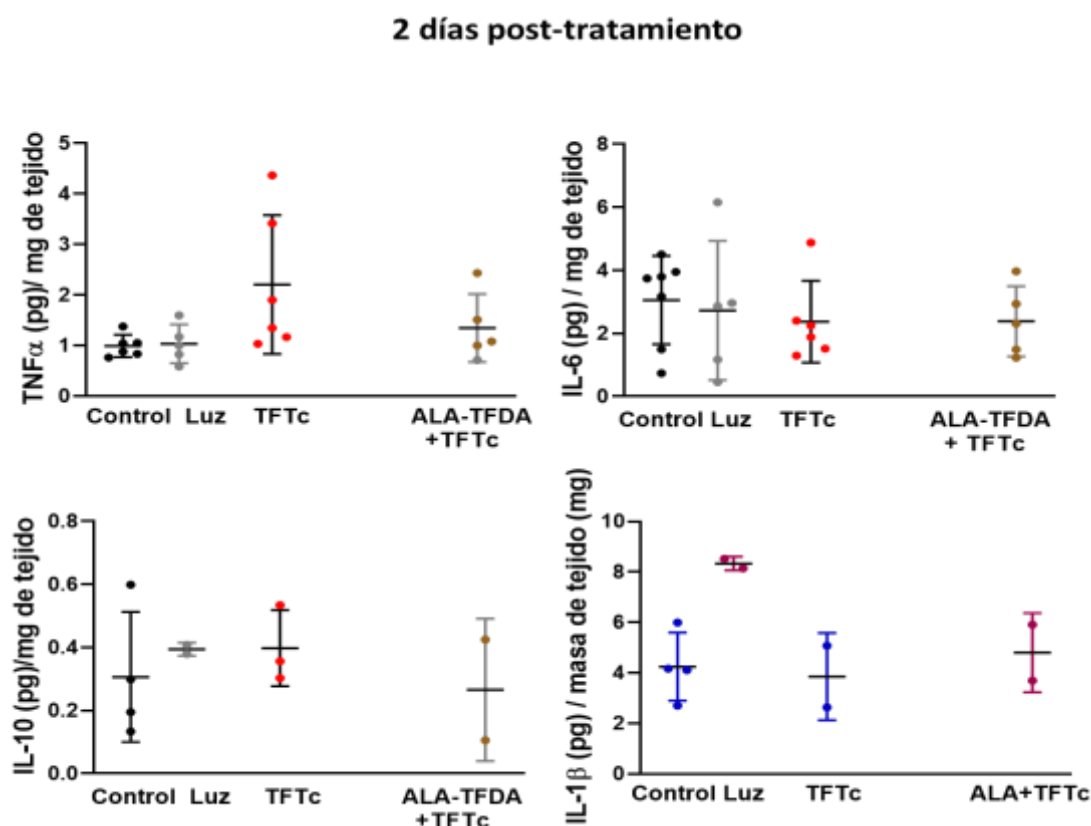


Figura IV.14: Determinación de citoquinas en los abscesos tratados con TFTc y su combinación con ALA-TFDA

Los gráficos muestran los niveles de citoquinas $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ y $IL-10$ cuantificadas a los 2 días del tratamiento con TFTc (3 dosis de 10 s, $24,3 \text{ mW/cm}^2$) y su combinación con ALA-TFDA (160 mW/cm^2). Se incluyen controles sin tratar, y controles solo tratados con luz visible (sin ALA, ni TFTc). Los valores se presentan como medias $\pm$ SD de 6 y 3 ratones por tratamiento para la cuantificación de $TNF-\alpha$ e $IL-6$ y para $IL-10$ e $IL-1\beta$ respectivamente. Los resultados se expresan en pg de citoquina por mg de tejido. Test estadístico aplicado: Kruskal-Wallis.

IV.4.3 Análisis de resultados de TFT y combinación con ALA-TFDA

La Tabla IV.2 sintetiza los efectos de la TFTc, TFTp y sus respectivas combinaciones con la ALA-TFDA sobre los parámetros claves de la resolución de abscesos cutáneos.

Los resultados revelan que la TFTc logra una reducción moderada pero significativa en el tiempo de cierre de herida, disminuyéndolo de $27,1 \pm 1,4$ días a $23 \pm 0,9$ días, lo que representa una mejora del 15%. Sin embargo, la TFTc no muestra efectos significativos sobre la progresión temporal del tamaño de la herida, ni sobre el tiempo de caída de costra.

En contraste, la TFTp no evidencia efectos beneficiosos en ninguno de los parámetros evaluados bajo las condiciones experimentales estudiadas.

Respecto a las combinaciones terapéuticas, tanto TFTc + TFDA como TFTp + TFDA no muestran cambios significativos en los parámetros de cicatrización cuando se comparan con la aplicación de TFDA de forma aislada. Más aún, TFT + TFDA empeora la progresión de los abscesos en algunos puntos de la curva. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el trabajo *in vitro* presentado en el Capítulo I.

Mientras la ALA-TFDA demostró mejoras significativas en múltiples parámetros de cicatrización (con reducciones de hasta un 44% en el tiempo de cierre y reducción de la carga bacteriana), empleando la TFT tan solo se obtuvo una modesta reducción en el tiempo de cierre de herida. Además, las estrategias combinadas no parecen proporcionar ventajas adicionales sobre la TFDA (aun cuando el TFT aumenta las porfirinas sintetizadas a partir del ALA), al menos en el modelo experimental empleado.

Tabla IV.2: Efectos de la TFTc, TFTp y sus combinaciones con ALA-TFDA sobre parámetros de cicatrización en abscesos cutáneos

Tratamientos	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)
Control		$27,1 \pm 1,4$	$12,2 \pm 1,3$
TFTc	=	 $23 \pm 0,9$	=
TFTp	=	=	=
TFTc + TFDA°	=	=	=
TFTp + TFDA°	=	=	=

°en comparación con TFDA

 Efecto positivo sobre los parámetros indicados y  efecto negativo

IV.5 Discusión

En este Capítulo se evaluaron los efectos de la ALA-TFDA, TFT y su combinación, sobre un modelo de absceso cutáneo de *S. aureus* en ratón. Se analizó la progresión de las lesiones en términos de área de herida, tiempo de resolución de las mismas, y de caída de costra. Además, se estudiaron los efectos biológicos involucrados en la resolución de los abscesos, tales como la carga bacteriana y la respuesta del sistema inmune.

Tanto los tratamientos con ALA-TFDA como los de luz sola, previnieron el aumento de tamaño de la herida que se observa entre el día 0 y el día 2 del experimento, en los controles sin tratar. Adicionalmente, a los días 11 de la curva del control y 7 post ALA-TFDA se observó un aumento transitorio de las áreas de los abscesos, que se correlaciona con la fase previa a la caída de la costra. Este patrón no se observó en los ratones tratados con luz sola, en los cuales la caída de la costra se retrasó.

El tratamiento de ALA-TFDA favoreció la resolución de los abscesos, en todos los parámetros analizados. Estos efectos dependieron de la potencia lumínica empleada. La ALA-TFDA llevada a cabo con el láser de 635 nm emitiendo a 160 mW/cm² fue la más efectiva: redujo el área de las heridas desde el comienzo del experimento, al igual que el tiempo requerido para la caída de la costra 13% (10,6 vs 12,2 días en el control) y el cierre total de la herida en un 44% (15 vs 27 días en el control).

Estos resultados concuerdan con reportes bibliográficos donde se observaron reducciones significativas en el tiempo de cicatrización de úlceras cutáneas crónicas murinas, tratadas con ALA-TFDA, con reducciones de entre el 38-45 % en el cierre completo de las lesiones (Lei et al., 2015; Li et al., 2022).

También han sido reportados resultados obtenidos a partir de la aplicación de la TFDA sobre abscesos, pero empleando otros compuestos FS. La TFDA a partir de azul de toluidina encapsulado en nanopartículas, produjo la reducción (25-30 %) del tiempo de resolución de herida en un modelo de infección de *S. aureus* en ratones. Por otra parte, al emplear ftalocianinas y compuestos derivados de las mismas, se consiguió reducir un 30% el tiempo de resolución de heridas producidas por MRSA en un modelo murino, e incluso reducir un 35% el tiempo requerido para la cicatrización de úlceras infectadas, en pacientes con pie diabético (Xu et al., 2021; Vecchio et al., 2013).

Respecto a la caída de costras en heridas cutáneas, se reportaron reducciones del 10-15% realizando la TFDA a partir del derivado metilado del ALA, metil-ALA, lo cual es consistente con la reducción del 13% observada en este trabajo (Almenara-Blasco et al., 2022).

Si bien al emplear determinadas potencias de irradiación, no se encontraron diferencias significativas en las curvas de progresión del área de las heridas entre ALA-TFDA y luz sola, sí se evidenciaron efectos sobre los tiempos de cierre de herida y de caída de costra, obteniéndose mejores resultados con la ALA-TFDA. Esto denotaría diferencias sobre estos parámetros ante la aplicación de estos dos tratamientos asistidos por luz.

La caída de la costra es un evento importante en la cicatrización ya que marca el final de la fase proliferativa y el inicio de la fase de remodelación del proceso de cicatrización. Este evento indica que la reepitelización se completó, es decir, que una nueva capa de piel ha cubierto totalmente la herida y desplazado la costra. Como resultado, la herida ya no requiere protección externa, ya que está cubierta por tejido epitelial nuevo. La luz puede acelerar o dificultar la cicatrización de heridas según la longitud de onda y la duración de la exposición. Mientras que la luz azul puede inhibir el crecimiento bacteriano y favorecer la epitelización, la luz roja y la infrarroja cercana se utilizan con frecuencia para reducir la inflamación y promover la regeneración tisular en etapas posteriores de la cicatrización (Deng et al., 2024).

En esta Tesis observamos que, a las 48 h, el absceso tratado con luz poseía un infiltrado inflamatorio más marcado que en el control, y que el proceso de re-epitelización se encontraba acelerado a este tiempo, sin embargo, el retraso del momento de la caída de costra unido a la aceleración del cierre de herida, da cuenta de la modulación de las etapas de la cicatrización mediada por la luz roja. En el Capítulo VI retomaremos en detalle la acción de la luz *per se* sobre heridas no infectadas, para centrarnos en los efectos sobre la cicatrización independientemente de la infección bacteriana de este tratamiento.

En cuanto al efecto sobre la carga bacteriana a los 14 días de realizados los tratamientos, los abscesos tratados con ALA-TFDA que se encontraban próximas a cerrar, mostraron una reducción de 2 logs respecto a la carga presente en el grupo control sin tratamientos y el grupo tratado solo con luz roja. Este patrón de reducción tardía concuerda con resultados informados en bibliografía, donde se demuestra que además de los efectos inmediatos de reducción de la viabilidad bacteriana, la TFDA genera efectos pleiotrópicos sobre los tejidos infectados (inflamación, regeneración de tejidos, respuesta inmune, etc.) que potencian la eliminación microbiana a largo plazo, coincidiendo con la fase de remodelación tisular (Sellera et al., 2022). De manera que la reducción de la carga microbiana parece estar asociada directamente al cierre de herida, ya que en las primeras etapas del proceso de resolución las bacterias quedan confinadas a una zona más pequeña del absceso, para que, en la etapa final, el sistema inmune las elimine más rápidamente, traducándose esto en una menor carga bacteriana a tiempos largos, junto con una más rápida resolución de la lesión.

Es de destacar que al día 14, en los animales tratados con ALA-TFDA, aún se encontraban bacterias viables en el tejido analizado, aunque este tiempo es coincidente con el día de cierre. Sin embargo, cabe destacar que, debido a la variación de este parámetro, en este momento algunos de los animales analizados para conteo de UFCs aún tenían heridas abiertas.

En relación a lo anteriormente mencionado, ha sido documentado cómo la TFDA genera daños en las membranas bacterianas y afecta sus mecanismos de virulencia, de forma tal, que, aunque no cause la inactivación inmediata de las bacterias, disminuye la capacidad de las mismas de persistir en el ambiente de la herida, facilitando su eliminación gradual por el sistema inmune a medida que se produce la cicatrización (Sabino et al., 2023). Esto ha sido observado en TFDA llevada a cabo con FS porfirínicos, donde la eliminación

bacteriana no se produjo durante la irradiación en la TFDA, ni en los primeros días post tratamiento, y sí se produjo en días posteriores junto con la cicatrización (Sun et al., 2022).

Los resultados encontrados en bibliografía sobre los efectos de la TFDA en infecciones *in vivo*, son diversos, y no siempre que se reportan efectos sobre la reducción del tiempo de resolución de la herida producidos por la TFDA, se informa si hubo efectos sobre la carga bacteriana (Vallejo et al., 2021). Dentro de los reportes donde la TFDA fue exitosa en reducir el tiempo de resolución de las heridas y reducir también la carga bacteriana, los tiempos de detección en la reducción de la carga bacteriana fueron variables, si bien en la mayoría de los casos correspondieron a tiempos cortos luego de llevarse a cabo la TFDA.

En un modelo murino de úlcera superficial infectada con SAMR, la ALA-TFDA aceleró la cicatrización de heridas y disminuyó 2 órdenes el recuento bacteriano en la superficie de las úlceras a las 16 h de realizado el tratamiento (Morimoto et al. 2014). Resultados similares fueron obtenidos en la inactivación de infecciones cutáneas por *P. aeruginosa*, donde la ALA-TFDA redujo 6 órdenes la carga bacteriana de las heridas, inmediatamente después de realizado el tratamiento (Katayama et al., 2018).

En algunos trabajos se informó la detección temprana de la reducción de la carga bacteriana en distintos tipos de infecciones cutáneas empleando TFDA con distintos FS (Sahu et al., 2013, Orestein et al., 1997, Xu et al., 2016, Fang et al., 2016).

Yang y colaboradores, emplearon ALA-TFDA para combatir infecciones en heridas cutáneas de ratón producidas por *P. aeruginosa*, y encontraron que el tratamiento redujo 1 orden de magnitud la carga bacteriana medida el primer día, y que la misma se mantuvo más o menos constante, hasta que descendió bruscamente luego de 14 días, casi coincidiendo con la fase final del cierre total de la herida. Estos autores también informaron que la TFDA regula la inflamación y el reclutamiento de macrófagos en la herida, y que estimuló la producción de colágeno en el tejido regenerado (Yang et al., 2020).

En este grupo de resultados, si bien se diferencia de los obtenidos durante esta Tesis, en cuanto a la temprana detección de la reducción de la carga bacteriana, coincide con los nuestros, al reportar el descenso final de la carga bacteriana en las etapas finales de resolución de la herida.

En coincidencia con lo obtenido por nosotros, Lei y colaboradores informaron un trabajo llevado a cabo en infecciones cutáneas de *S. aureus* en ratones, empleando un conjugado de clorina e6 como FS. En él, la reducción en la carga bacteriana recién fue detectable a los 10 días de realizada la TFDA lo que coincidió con la fase final del cierre de la herida (Lei et al., 2020).

Al realizar una revisión general de la bibliografía científica sobre TFDA empleada en modelos *in vivo* de infección en animales, y casos y ensayos clínicos en pacientes humanos, se encuentra variabilidad en los resultados reportados, principalmente porque las condiciones experimentales son muy diversas (FS empleado, microorganismos

causantes de la infección, tipos de heridas, dispositivos y dosis de irradiación, etc.). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la TFDA fue capaz de reducir los tiempos de resolución de las infecciones y de cierre de las heridas, con reducción de la carga bacteriana luego del tratamiento. Es importante destacar que, si bien son minoritarios, existen reportes donde la TFDA pudo reducir la carga bacteriana, pero sin embargo no mejoró los tiempos de resolución de la infección y la regeneración del tejido infectado. De forma inversa, también es posible encontrar trabajos donde la TFDA produjo una resolución de la infección más rápida respecto a los controles no tratados, pero no se detectaron diferencias en la carga bacteriana entre dichos grupos experimentales (Vallejo et al., 2020; Vallejo et al., 2021).

La TFDA puede estimular la respuesta inflamatoria aguda y localizada sobre la infección, activando la respuesta inmune y promoviendo así la resolución de la misma. Ha sido demostrado que la TFDA produce la activación de los neutrófilos, lo que contribuiría al aumento de citoquinas proinflamatorias después del tratamiento (Nesi-Reis et al., 2018).

Sin embargo, la TFDA puede generar tanto efectos inmunoestimuladores como inmunosupresores, siendo probablemente el factor determinante, el tipo de daño celular generado. La inflamación aguda parece estar estimulada con mayor frecuencia en casos de necrosis tisular, favorecida por protocolos de TFDA más agresivos (altas dosis de FS y/o luz). Existen reportes donde se demostró que las lesiones tratadas presentaron un menor infiltrado inflamatorio (adjudicando este efecto a la reducción de la carga microbiana producida por la TFDA), y que la terapia tuvo efectos inmunosupresores, mediante la regulación negativa de la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α) (Nesi-Reis et al., 2018).

Dada la presencia de infiltrado inmune en los abscesos tratados con ALA-TFDA, se decidió estudiar algunas de las citoquinas mediadoras de respuesta inmune ante infección bacteriana más importantes. En particular, IL-6 y TNF- α , que están implicadas en la respuesta pro-inflamatoria temprana, IL-10 que actúa como un modulador antiinflamatorio, e IL-1 β que contribuye a la amplificación del proceso inflamatorio (Dinarello, 2018; Tanaka et al., 2014).

Las mediciones realizadas a los 2 días post tratamiento no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y los controles sin tratar, en los niveles de IL-1 β , TNF α , IL-6 e IL-10. Al analizar la expresión de la IL-6 a los días 7 y 11 post tratamiento, tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de la citoquina.

La IL-6 se expresa (junto con TNF α e IL-1) de forma aguda y temprana luego de producirse la infección. Forma parte de la respuesta innata, actuando como citoquina pro-inflamatoria, siendo junto a la IL-1, la principal inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda, y promoviendo la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas. Es,

además, mediadora entre la respuesta innata y la respuesta inmune adaptativa (que se produce en los días subsiguientes), siendo una citoquina con efectos pleiotrópicos, con la capacidad de inducir la inflamación en la fase aguda y temprana de la respuesta, pero también de reducir la inflamación en fases posteriores., mediante la regulación del equilibrio entre las células Th17 y las células T reguladoras. Las Th17 promueven la inflamación y estimulan la respuesta inmune, mientras que las células T reguladoras, restringen la respuesta inmune y disminuyen la inflamación (Tanaka et al., 2016; Uciechowski & Dempke, 2020; Kimura, 2010).

En una respuesta inmune normal, la expresión de IL-6 disminuye luego de la fase aguda, si la misma se sostiene en el tiempo más allá de la fase aguda de la respuesta, puede actuar como mediadora del pasaje a la inflamación crónica. Como se mencionó anteriormente, la cronicidad de la inflamación puede conducir a daño tisular progresivo, cicatrización deficiente, predisposición a nuevas infecciones y efectos sistémicos adversos. La disminución en los niveles de IL-6, se produce generalmente durante la fase inflamatoria de la reparación de la herida en los primeros días de la infección (Tanaka et al., 2016; Uciechowski & Dempke, 2020; Masson-Meyers et al., 2016).

En los resultados mostrados en esta tesis, el no haber podido detectar diferencias significativas en las mediciones de citoquinas puede explicarse por la alta variabilidad de los datos y la complejidad de la interacción entre la infección y la respuesta inmune. Además, podría deberse a que los tiempos de muestreo, no coincidieran con los picos de expresión de las citoquinas mencionadas. Para ahondar el análisis, se plantea estudiar la expresión de las citoquinas luego de realizar los tratamientos y a las 24 h (fase aguda), debido a la observación de infiltrado inflamatorio ya a las 48 h. Debido a la alta dispersión de los datos, es necesario ampliar el tamaño de la muestra para terminar de elucidar este punto.

Los resultados, muestran que si bien los efectos de reducción del tiempo de resolución de herida producidos por la ALA-TFDA (en particular sobre la fase inflamatoria de la misma), no podrían ser adjudicados a la disminución del número de bacterias viables en los abscesos, ni a la expresión diferencial de las citoquinas estudiadas (a los tiempos en que se las midió), la mayor cantidad de neutrófilos presentes en el infiltrado inmune en los abscesos tratados, podría explicar en parte los efectos benéficos de la ALA-TFDA. Sería esperable, que la ALA-TFDA realizada sobre los abscesos, modificase en algún momento de la respuesta inmune, la expresión de la IL-6, ya que se pudo observar la reducción total del tiempo de cierre de la herida y caída de costra, lo que indicaría que la fase inflamatoria de la resolución de la herida, estaría también reduciendo su duración.

El efecto de la TFDA sobre la cicatrización de heridas puede estar asociada con su mecanismo de acción en las mitocondrias, a través del estímulo de la cadena respiratoria y la producción de ATP, lo que contribuye al proceso de cicatrización mediante la

proliferación celular, la síntesis de ácidos nucleicos, colágeno y la reducción de la inflamación. La TFDA también es capaz de regular la liberación de citoquinas responsables de la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno, además de su efecto bactericida *per se* (Oyama et al., 2020). Existen reportes de que los efectos positivos de la TFDA se manifiestan con mayor intensidad en la fase inicial del proceso de reparación (García et al., 2015; Yang et al., 2021).

Por otra parte, a partir de los resultados obtenidos en los controles iluminados solamente con luz visible, comenzamos a observar y analizar con exhaustividad la acción de este factor de manera separada en los procesos de resolución de infecciones. A los tiempos analizados, no observamos reducción de la carga bacteriana, aunque es necesario considerar que al día 14, que fue el último tiempo al que se realizó el recuento de bacterias viables en los abscesos, las heridas del grupo tratado solo con luz aún se encontraban abiertas y estaban en proceso de caída de costra. Dado que la luz *per se* indujo el retraso en este proceso, pero una aceleración del cierre de herida, es probable que este tratamiento pueda estar promoviendo la disminución de la carga bacteriana en la lesión a tiempos más largos que los analizados.

Respecto al objetivo de potenciar la ALA-TFDA con un pre tratamiento de TFT, la combinación de tratamientos no demostró mejorar los resultados obtenidos empleando la ALA-TFDA como único tratamiento. Aún cuando la TFT en modo continuo y pulsado indujo un aumento, de 1,8 y 3,6 veces respectivamente, en la síntesis de porfirinas en los abscesos tratados con ALA. Esto difirió, de los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* (Capítulo I) donde se había observado sinergismo entre tratamientos.

La principal vía de acción de la TFT es el aumento de temperatura en el tejido blanco. Sin embargo, a partir de determinadas temperaturas, los efectos beneficiosos de la terapia, comienzan a ser dañinos para el tejido tratado. Este umbral depende de las condiciones del tejido, y si bien no está definida una única temperatura límite para todos los casos, existe cierto consenso en que, para el tratamiento de heridas infectadas, las temperaturas óptimas oscilan entre 38-40°C, aunque para el tejido sano la temperatura máxima tolerable es de 42° C (Bora et al., 2022). Temperaturas en el rango de 42-45°C inducen efectos adversos significativos en el tejido de granulación, causando alteraciones en las dinámicas térmicas que afectan la trayectoria de cicatrización (Zhang et al., 2024). Estas temperaturas desencadenan estrés térmico con expresión aumentada de proteínas de shock térmico como HSP70 (Stevens et al., 2023) y pueden activar vías apoptóticas dependiendo de la sensibilidad tisular (Hu et al., 2024), comprometiendo así los procesos normales de reparación tisular.

En las condiciones de TFT puestas a punto en este capítulo, buscamos que la temperatura máxima alcanzada en los tejidos durante los tratamientos no superara el umbral de 42°C. La TFTc se realizó dividida en tres irradiaciones con el láser de 980 nm, enfriando por spray refrigerante el tejido tratado antes de cada una, alcanzando una dosis de energía total de 24,3 J/cm². La TFTp se llevó a cabo en una sola irradiación, enfriando previamente el tejido con el spray refrigerante, con una dosis de energía mayor (32,92

J/cm²). Por lo tanto, las diferencias entre ambos protocolos no radican únicamente en el modo de aplicación, sino también en las distintas dosis de energía empleadas en cada caso.

El incremento en la síntesis de porfirinas en los abscesos tratados con TFT, podría deberse o bien al aumento de la penetración del ALA a través de la piel y los tejidos infectados, o bien a efectos de estimulación del metabolismo, promovidos por el tratamiento fototérmico. Sin embargo, la ausencia de efectos potenciadores sobre la ALA-TFDA, podría estar siendo ocasionada por un aumento en la inflamación y daño en los tejidos, producidos por el mismo tratamiento con el láser NIR (debido a aumentos locales de temperatura por sobre los umbrales deseados) que estarían contrarrestando los efectos de la ALA-TFDA.

Reportes similares han sido informados para el tratamiento combinado de la TFT con antibióticos convencionales. Cuando la TFT genera temperaturas moderadas (40-42°C) en los tejidos infectados, se observa potenciación del efecto antimicrobiano, aun contra cepas multirresistentes. Sin embargo, al alcanzarse temperaturas más elevadas, este efecto no se produce, y en cambio se registra daño extenso del tejido circundante (Tan et al., 2020).

Otra causa que podría dar cuenta de los resultados obtenidos, podría ser que se alcance un nivel de acumulación de porfirinas, a partir del cual ya no se mejora la acción fotodinámica, o bien a que las porfirinas se localicen en las células del huésped, en particular en células del sistema inmune, y no en las bacterias (blanco directo de la ALA-TFDA). La observación de fluorescencia de porfirinas en los abscesos estériles, estaría indicando que esto podría estar ocurriendo en nuestro sistema experimental.

Por otra parte, la TFTc *per se*, no indujo cambios en las áreas de las heridas generadas por los abscesos, pero sí redujo significativamente en 4 días el tiempo de resolución de las mismas. La TFTp, en cambio, no indujo diferencias significativas respecto a los controles sin tratar, en ninguno de los parámetros evaluados.

Estas diferencias pueden deberse a que la TFTc en las condiciones empleadas, elevó la temperatura en la piel sana de los ratones hasta 39°C, mientras que TFTp lo hizo hasta 42°C. Dado que estas temperaturas se encuentran en los límites reportados entre los diferentes tipos de efectos (estimuladores de la regeneración o generadores de daño), es posible pensar que la diferencia de esos 3 grados entre ambos esquemas (sumado a que en el esquema de la TFTc se refrigera el tejido tres veces intercaladas con la irradiación, mientras que en la TFTp solo una, al comienzo del tratamiento), aplicados sobre una zona de piel afectada (con un mayor contenido acuoso que la piel sana debido a la inflamación) produzcan un incremento ligeramente mayor en la temperatura (que aquél medido en la puesta a punto), y esto sea suficiente para que induzcan efectos diferenciales sobre la progresión y cierre de las heridas.

Capítulo V: ALA-TFDA y TFT sobre heridas no infectadas

Dado que el proceso de resolución de herida requiere tanto de la eliminación de los microorganismos causantes de la infección como de la reconstitución del tejido infectado, se decidió utilizar un nuevo modelo de herida no infectada con el fin de evaluar los efectos de la TDFA y la TFT sobre los procesos de cicatrización, de forma separada de los efectos antimicrobianos.

En este Capítulo, se presentan los resultados obtenidos al aplicar ALA-TFDA y TFT por separado, en modelos de heridas no infectadas. Es importante destacar que no se evaluó la combinación de ambas terapias dado que en el Capítulo IV, dicha combinación no resultó beneficiosa. Por otra parte, en ese mismo Capítulo se había observado el efecto de la luz roja *per se* sobre el proceso de resolución de las heridas generadas por los abscesos, este tratamiento se analizará en el siguiente Capítulo (VI).

El objetivo principal de este Capítulo fue determinar cómo la ALA-TFDA y la TFT afectan la progresión de la cicatrización, identificando posibles diferencias entre los efectos de ambos tratamientos entre estos modelos, y los de abscesos analizados en el Capítulo IV. Los parámetros analizados fueron la velocidad de cierre de las heridas, el tiempo de resolución de las mismas y de caída de costra.

En la primera sección se emplea el modelo de heridas generadas mediante raspado con bisturí, y en la segunda, las generadas empleando un punch de biopsia de piel. Como se mencionó en el Capítulo II, estos los modelos de heridas no infectadas, intentan emular el escenario de heridas agudas. Cabe destacar que este Capítulo se trata de resultados preliminares, obtenidos en experimentos llevados a cabo con un número de 3 ratones por grupo experimental.

V.1 Acción de la ALA-TFDA y la TFT sobre heridas no infectadas generadas por raspado con bisturí

El esquema experimental en esta sección, consistió en generar las heridas mediante raspado con bisturí, y luego de 1 h, aplicar la solución de ALA sobre las mismas. El ratón permaneció en oscuridad durante 4 h, y luego se irradió empleando el láser de 635 nm a

dos potencias distintas: 160 mW/cm² y 320 mW/cm² durante 20 min. Las potencias de irradiación se seleccionaron a partir de los resultados obtenidos en el Capítulo IV.

V.1.1 Efectos de la ALA-TFDA sobre heridas no infectadas generadas con bisturí

A diferencia de lo observado en modelos de heridas generadas por abscesos de *S. aureus*, el tratamiento con ALA-TFDA tuvo un efecto negativo en las heridas generadas con bisturí. Como se observa en la Figura V.1, el tratamiento con ALA-TFDA produjo un aumento significativo del área de las heridas, y del tiempo requerido para la caída de la costra, y para el cierre de la herida, respecto al control sin tratar. Las diferencias en el área de la herida se detectan desde los primeros días luego de realizados los tratamientos, tanto empleando potencias de irradiación con el láser rojo (635 nm) de 160 mW/cm², como de 320 mW/cm².

En la Figura V.2 se presentan imágenes representativas de las heridas tratadas con ALA-TFDA a las distintas potencias lumínicas. Es importante remarcar que en ningún caso se observó signos de infección para este modelo de herida, y para ninguno de los tratamientos aquí analizados, así como tampoco ninguna marca debida a mordeduras u otras causas.

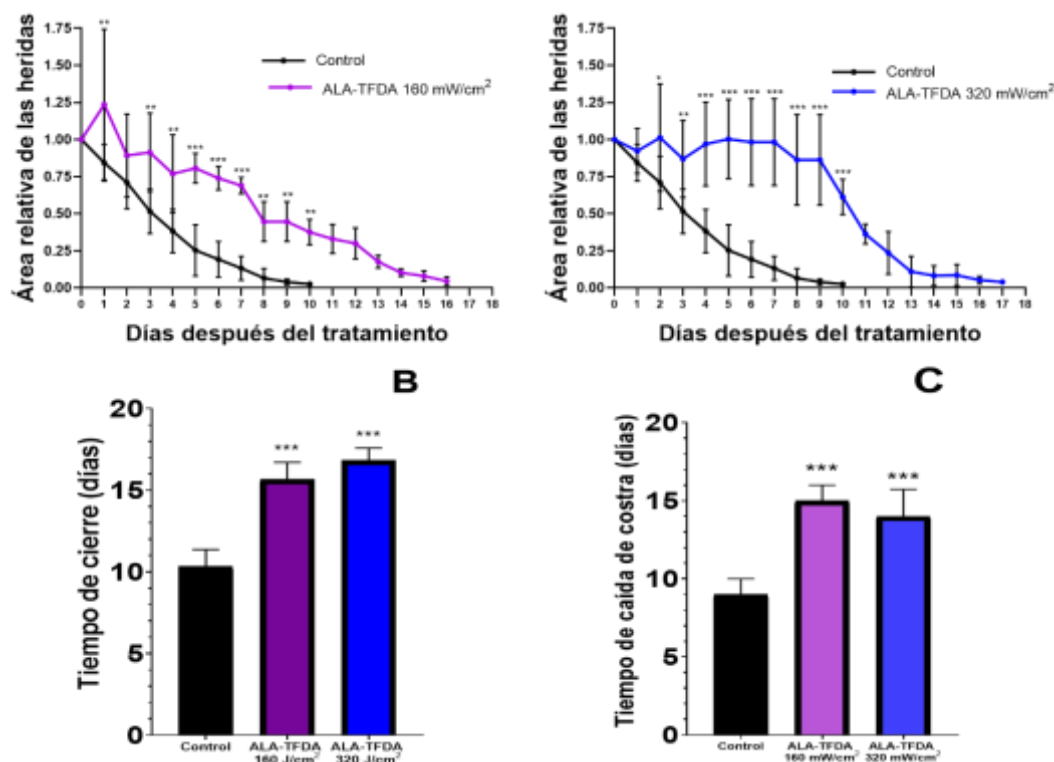


Figura V.1: Evolución de las heridas producidas con bisturí (no infectadas), y tratadas con ALA-TFDA

A) Área relativa (al día cero) de las heridas en los días posteriores al tratamiento con ALA-TFDA a 160 mW/cm², o 320 mW/cm². B) Tiempo de cierre de la herida. C) Tiempo de caída de costra. Los puntos representan la media $\pm$ SD de 3 ratones. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. A) Test U de Mann-Whitney Tukey día a día en comparación con el control sin tratamiento. B) y C) *** $p < 0.001$, test de Kruskal-Wallis.

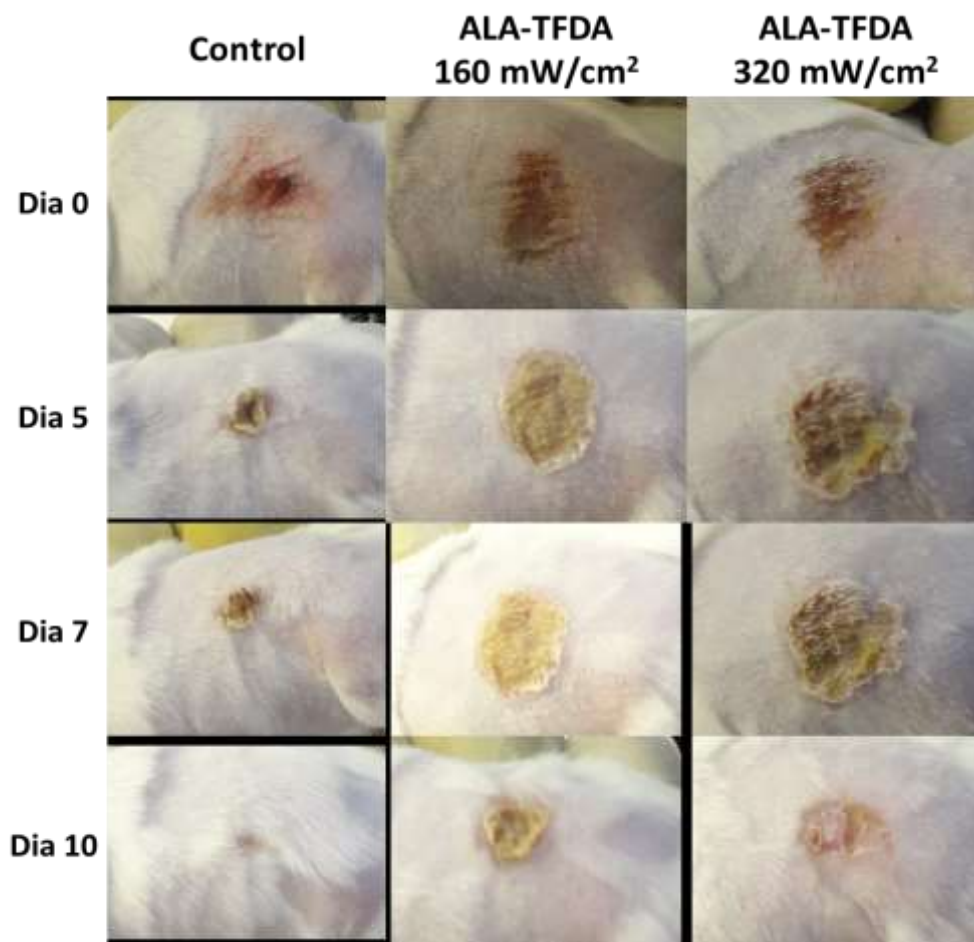


Figura V.2: Imágenes de heridas generadas por raspado con bisturí (no infectadas) tratadas con ALA-TFDA

Imágenes representativas de las heridas generadas por bisturí y tratadas con ALA-TFDA empleando un láser de 635 nm y potencias de 160 mW/cm² o 320 mW/cm², en los días 0, 5, 7 y 10 posteriores al tratamiento.

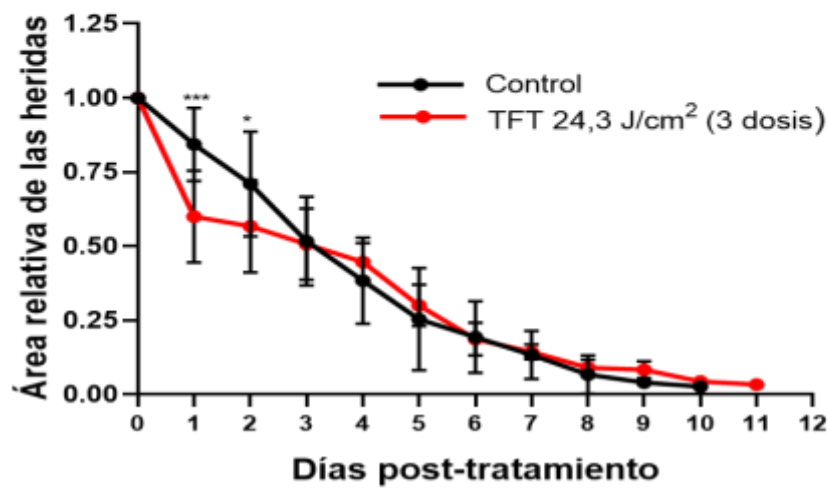
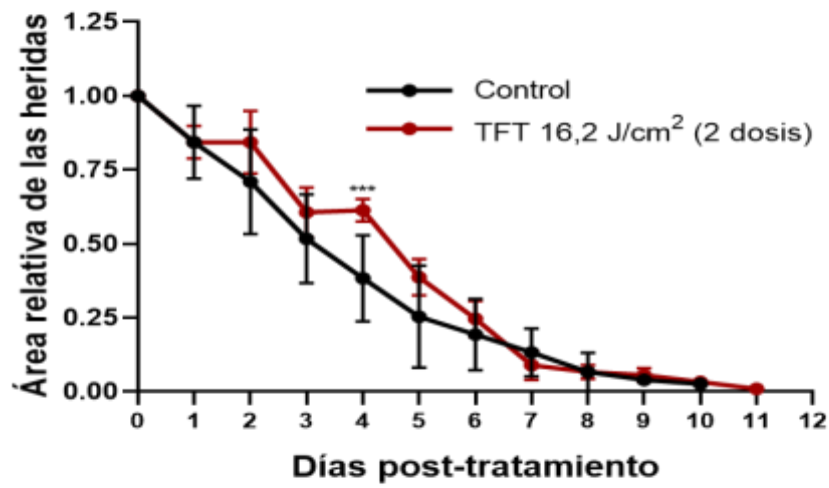
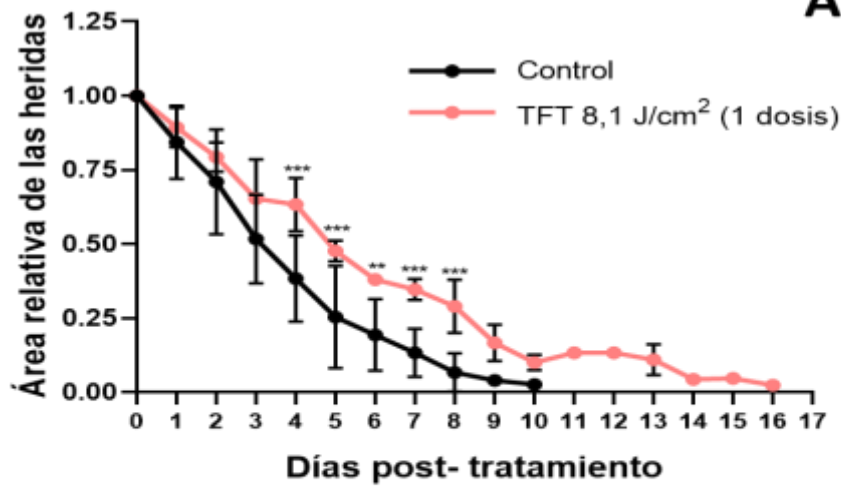
V.1.2 Efectos de la TFTc sobre heridas no infectadas generadas con bisturí

En este Capítulo se empleó TFT en modo continuo, por ser el tratamiento con el cual se obtuvo, en el Capítulo IV, una reducción del tiempo de cierre de herida, respecto al control sin tratar.

La TFTc se llevó a cabo irradiando con el láser de 980 nm, en dosis de 10 s, empleando una potencia de $0,81 \text{ W/cm}^2$, según condiciones descritas, y seleccionadas, a partir de los resultados de la sección 3 del Capítulo IV. De esta forma, cada dosis entrega $8,1 \text{ J/cm}^2$ a la herida, y los intervalos entre las dosis (junto con la aplicación del spray refrigerante), permiten la disipación del aumento de temperatura producido en la piel de los ratones.

Se observó que al tratar con TFTc con una sola dosis de $8,1 \text{ J/cm}^2$, se produjo un aumento significativo del área de las heridas a partir del 4 día post tratamiento. Además, se incrementó el tiempo necesario para la caída de la costra, y el cierre de la herida.

Por otra parte, la aplicación de TFTc de dos o tres dosis, no produjeron diferencias significativas en el área de las heridas, ni el tiempo de caída de la costra, o de cierre de herida, respecto al control sin tratar (Figura V.3).

A

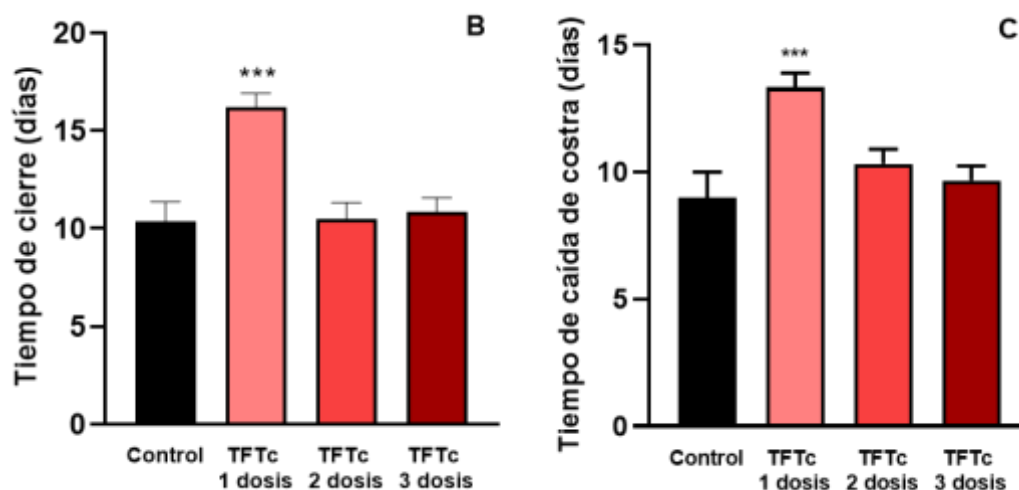


Figura V.3: Evolución de las heridas producidas con bisturí (no infectadas), y tratadas con TFTc

A) Área relativa (al día cero) de las heridas en los días posteriores al tratamiento con TFTc en 1, 2 o 3 dosis de 10 s ($1,64 \text{ W/cm}^2$), de manera de entregar 8,1; 16,2 y 24,3 J/cm^2 . Los puntos representan la media $\pm$ SD de 3 ratones. *** $p < 0,001$, test U de Mann-Whitney día a día en comparación con el control sin tratamiento B) Tiempo de cierre de herida, C) Tiempo de caída de costra. *** $p < 0,001$ respecto al control. Test de Kruskal-Wallis.

En la Figura V.4 se presentan imágenes representativas de los diferentes tratamientos con TFTc. En ninguno de los casos, se observaron signos de infección en las heridas.

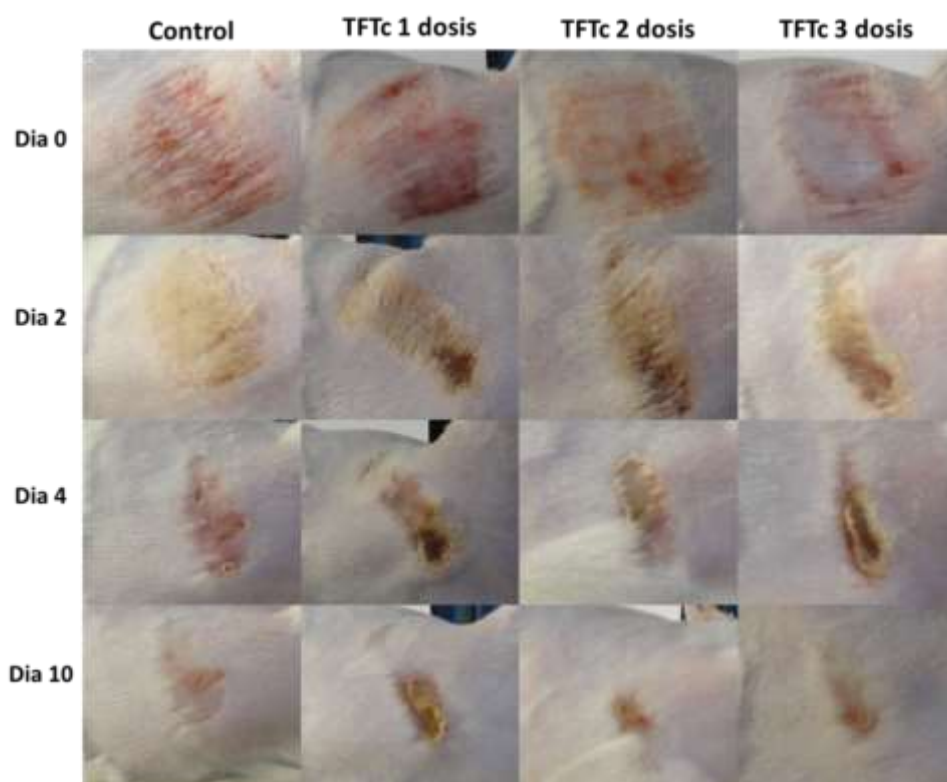


Figura V.4: Imágenes de heridas generadas por raspado con bisturí (no infectadas) tratadas con TFTc

Imágenes representativas de las heridas generadas por bisturí y tratadas con TFTc en 1, 2 o 3 dosis. Las imágenes se tomaron en los días 0, 2, 4 y 10 posteriores al tratamiento (seleccionados en función del análisis de reducción de heridas).

V.1.3 Análisis de efectos de la ALA-TFDA y TFTc sobre heridas no infectadas generadas con bisturí

La Tabla VI.1 resume los efectos de la ALA-TFDA y la TFTc sobre las heridas agudas producidas por bisturí.

En el grupo control, las heridas agudas por bisturí presentaron un tiempo de cierre de $10,3 \pm 1,0$ días y un tiempo de caída de costra de $9,0 \pm 1,0$ días. El tratamiento con ALA-TFDA mostró un impacto claramente negativo en todos los parámetros evaluados. La reducción del área de la herida se vio retrasada. El tiempo de cierre de herida aumentó significativamente a $16,8 \pm 0,7$ días ($p < 0,001$), representando un incremento del 63% respecto al control. De manera similar, el tiempo de caída de costra se prolongó a $15,0 \pm 1,0$ días ($p < 0,001$), un aumento del 67% comparado con el grupo control.

Los efectos de la TFTc dependieron del número de dosis aplicadas. Con una única dosis, la TFTc mostró efectos negativos similares a la ALA-TFDA, retrasando la progresión temporal y aumentando tanto el tiempo de cierre de herida ($16,2 \pm 1,1$ días, 57% más que el control $p < 0,001$) como el tiempo de caída de costra ($13,3 \pm 0,6$ días, 48% más que el control $p < 0,001$).

Sin embargo, al aumentar el número de dosis de la TFTc, a 2 o 3, no se observaron diferencias significativas respecto al control sin tratar, en ninguno de los parámetros analizados.

Tabla V.1: Efectos de la ALA-TFDA y la TFTc sobre parámetros de cicatrización en heridas agudas por bisturí

Comparación de los tiempos de progresión, cierre de herida y caída de costra entre el grupo control y los tratamientos con ALA-TFDA (160 mW/cm^2) y TFTc con diferentes dosis.

Tratamientos	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)
Control		$10,3 \pm 1,0$	$9,0 \pm 1,0$
ALA-TFDA	↓	↓ $16,8 \pm 0,7$	↓ $15,0 \pm 1,0$
TFTc 1dosis	↓	↓ $16,2 \pm 1,1$	↓ $13,3 \pm 0,6$
TFTc 2dosis	=	$10,5 \pm 0,8$	$10,3 \pm 0,6$
TFTc 3dosis	=	$10,8 \pm 0,8$	$9,7 \pm 0,6$

↑ Efecto positivo sobre los parámetros indicados y ↓ efecto negativo

V.2 Efectos de la ALA-TFDA sobre heridas no infectadas generadas con punch para biopsia

Debido a la falta de acción de la ALA-TFDA sobre la progresión de heridas por bisturí, en esta sección se limitó el estudio de esta terapia, a la dosis lumínica que había sido menos perjudicial en la sección V.1 (20 min, con potencia de 160 mW/cm^2).

Además, dado que en el modelo de herida por bisturí se habían observado molestias en los animales al momento de la topicación con ALA, seguido de un empeoramiento de las heridas luego del tratamiento, se consideró modificar el vehículo del ALA, empleándose en este caso crema en lugar de PBS.

Por otra parte, en este modelo se decidió no evaluar los efectos de la TFT debido a la ausencia de efectos positivos sobre los modelos de abscesos y de heridas no infectadas por bisturí.

Luego de tratar las heridas con ALA-TFDA, se observó que durante los primeros 4 días post-tratamiento, la ALA-TFDA no mostró diferencias significativas respecto a los controles, pero a partir del día 4, se produjo un pronunciado aumento del área de la herida (Figura V.5 A). Cabe destacar que se consideró área de herida la zona enrojecida, periférica a la herida inicial, que luego desarrolló costra y se unificó con la misma. La caída de la misma y el cierre de las heridas se demoraron significativamente en los animales tratados con ALA-TFDA (Figuras V.5 B y C).

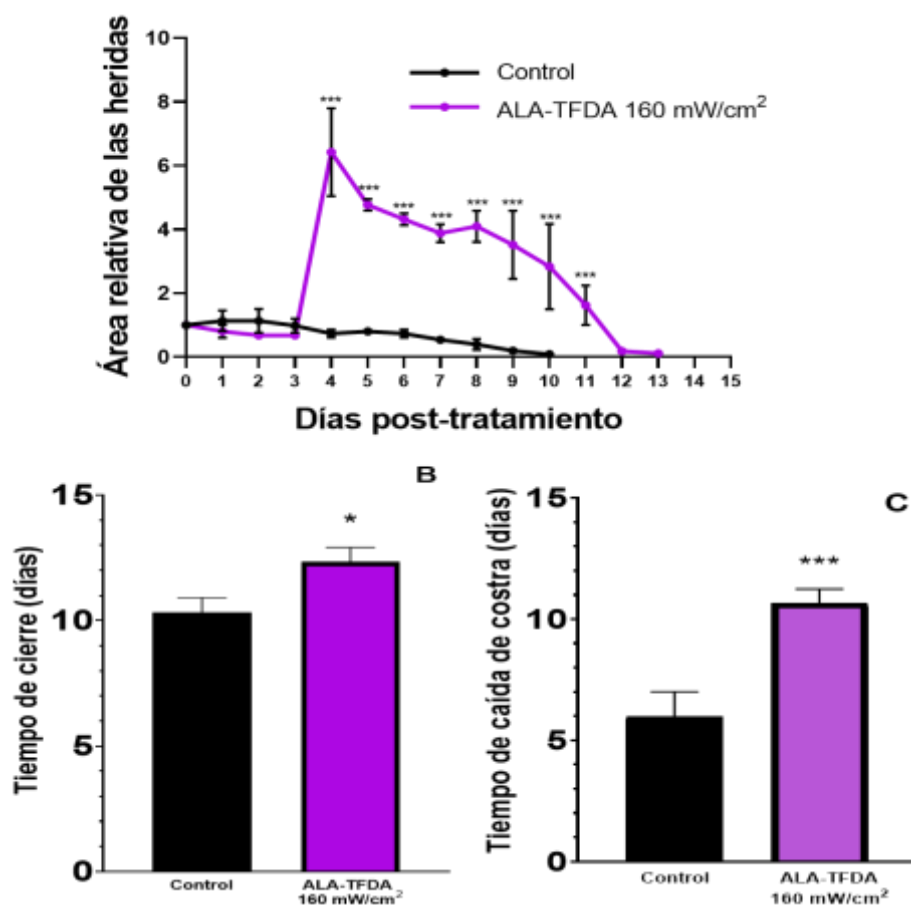


Figura V.5: Evolución de las heridas producidas con punch (no infectadas), y tratadas con ALA-TFDA

A) Área relativa (al día cero) de las heridas en los días posteriores al tratamiento con ALA-TFDA a 160 mW/cm². *** $p < 0,001$, test U de Mann-Whitney día a día en comparación con el control. B) Tiempo de caída de costra y C) Tiempo de cierre de herida. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$, test de Kruskal-Wallis. Los puntos representan la media $\pm$ SD de 3 ratones.



Figura V.6: Imágenes de heridas generadas con punch de biopsia (no infectadas) tratadas con ALA-TFDA.

Imágenes representativas de las heridas generadas con punch de biopsia y tratadas con ALA-TFDA (160 mW/cm²), en los días 0, 2, 4 y 10 posteriores al tratamiento.

En las imágenes correspondientes a la Figura V.6, se evidencia que a los 2 días post tratamiento con ALA-TFDA, durante la fase aguda de inflamación, existe un eritema perilesional que amplía la zona inflamatoria sin integrarse con la herida propiamente dicha, fenómeno que no se manifestó en los otros casos estudiados. Posteriormente, a los cuatro días, esta zona inflamatoria se unificó con la herida original mediante la formación

de una costra, coincidiendo con la transición hacia la fase proliferativa del proceso de cicatrización.

V.2.1 Análisis de resultados de los efectos de la ALA-TFDA sobre heridas no infectadas, generadas por incisión con punch

La Tabla V.2 muestra los resultados de la aplicación de ALA-TFDA en heridas agudas generadas mediante incisión con punch para biopsia.

Para este modelo, el grupo control, mostró un tiempo de cierre de $10,3 \pm 0,5$ días y un tiempo de caída de costra de $6,0 \pm 1,0$ días. El tratamiento con ALA-TFDA produjo un incremento en el tiempo de cierre de herida a $12,3 \pm 0,5$ días ($p < 0,001$), representando un aumento del 19,4% respecto al control sin tratar. El tiempo de caída de costra se prolongó hasta $10,6 \pm 0,6$ días ($p < 0,001$), lo que supone un incremento del 76,7% en comparación con el grupo control.

Estos resultados son consistentes con los observados previamente en heridas por bisturí, donde la ALA-TFDA también mostró efectos negativos en el proceso de cicatrización. Estos efectos de la ALA-TFDA en heridas agudas no infectadas contrasta con los resultados obtenidos en el modelo de abscesos cutáneos previamente analizado (ver Capítulo IV).

El efecto sobre el tiempo de caída de costra (76,7% de incremento) sugiere que la ALA-TFDA afectó especialmente los procesos de maduración y remodelación tisular en este tipo de heridas.

Tabla V.2: Efecto de ALA-TFDA sobre parámetros de cicatrización en heridas agudas realizadas por punch para biopsia

Los valores se presentan como media $\pm$ SD

Tratamientos	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)
Control		$10,3 \pm 0,5$	$6,0 \pm 1,0$
ALA-TFDA		 $12,3 \pm 0,5$	 $10,6 \pm 0,6$

 Efecto positivo sobre los parámetros indicados y  efecto negativo

V.3 Discusión

En este Capítulo se observó que, en el modelo de herida aguda producida con bisturí, la ALA-TFDA generó un aumento significativo en el tamaño de las heridas y en el tiempo necesario para su resolución. Adicionalmente, se observa una gran dispersión en las áreas de las heridas tratadas fotodinámicamente. Estos efectos perjudiciales producidos por la ALA-TFDA, podrían deberse al bajo pH (2,5) de la solución de ALA en PBS con la que se topicó a los ratones. El pH de las soluciones aplicadas en las heridas puede influir en el proceso de cicatrización. Un pH más bajo podría generar inflamación en los tejidos, afectando negativamente la regeneración (Sim et al, 2022).

Por otra parte, la ALA-TFDA no produjo efectos significativamente diferentes del control sin tratar, en el área de las heridas realizadas con punch de biopsia hasta el día 4 post-tratamiento. A partir de este momento, las heridas aumentaron su tamaño, y se observó la inflamación de la zona periférica a la herida. A diferencia del resto de los modelos de herida, en el de herida por punch se utilizó crema como vehículo del ALA.

Mientras que el modelo de absceso estudiado anteriormente se asemeja más a una herida crónica que se encuentra en una etapa de inflamación y concurrencia de células del sistema inmune (sobre las cuales la TFDA podría tener efectos beneficiosos), mientras que el modelo de raspado por bisturí, se trata de una herida aguda con un alto contenido de hemoglobina que puede estar actuando como barrera para la penetración de la luz roja, dado que dicha molécula tiene la capacidad de absorber parcialmente entre los 630-670 nm y reducir la penetración de la luz entre alrededor de un 50% cuando se encuentra en grandes concentraciones (Giannakopoulos et al., 2024)

Vale la pena mencionar que si bien la TFDA puede promover la cicatrización de heridas (estimulando la formación de tejido de granulación, angiogénesis, y remodelación del colágeno), también han sido reportado efectos adversos de la misma, como eritema, dolor, edema, picazón y descamación. Estos efectos, principalmente inflamatorios, resultan más pronunciados y prolongados en tejidos con alta vascularización, como heridas agudas recientes (Li et al., 2022).

En cuanto a los efectos de la ALA-TFDA sobre la inflamación en heridas cutáneas generadas por incisión (no infectadas), existen reportes bibliográficos donde este tratamiento promovió la inflamación en etapas tempranas de la lesión (estimulando activación de macrófagos), generando el retraso inicial en la cicatrización (Li et al., 2022).

Han sido reportados efectos duales de la ALA-TFDA en modelos de herida infectada y no infectada, en un estudio llevado a cabo en heridas producidas por quemaduras cutáneas

en ratones, los autores reportaron que la ALA-TFDA produjo la reducción de la carga bacteriana y el tiempo de cicatrización cuando las heridas eran infectadas con *P. aeruginosa*, mientras que cuando las heridas no eran infectadas, la ALA-TFDA generó una fase inflamatoria inicial prolongada (primeros 7-10 días) con eritema y edema incrementado en las mismas (Yang et al.,2020).

Por su parte, la TFTc no mejoró la resolución de las heridas, siendo inclusive, perjudicial a ser aplicada como una única dosis (8,1 J/cm²), y no observándose efectos diferentes a los controles sin tratar, al realizar 2 o 3 dosis de irradiación. En estos últimos dos casos, solo podemos especular, que la aplicación del spray refrigerante (que se produce entre la aplicación de las diferentes dosis) estaría siendo responsable de la reversión de los efectos negativos que observamos al aplicar solo una dosis. Posiblemente en estos casos la temperatura máxima alcanzada durante el tratamiento, sea menor, o la energía de la irradiación se distribuya de forma diferente en los tejidos.

Al respecto, mencionamos que, si bien existe mucha evidencia sobre los efectos benéficos de la TFT, la aplicación de energía térmica puede interferir con la dinámica de regeneración celular si no se maneja adecuadamente (Yi et al.,2021).

En particular en heridas agudas, se han reportado patrones complejos de respuesta a la TFT, dependientes de la temperatura alcanzada durante el tratamiento. Por ejemplo, empleando un modelo de herida por escisión dérmica en ratones, Kim y colaboradores (2022) reportaron que al realizar la TFT en una única sesión, donde se alcanzaron temperaturas entre 39 y 42°C, la respuesta inicial al tratamiento fue el retraso de la contracción de la herida y el aumento de la respuesta inflamatoria local. Sin embargo, al repetir las aplicaciones del tratamiento (3 veces) pero intercalando periodos de enfriamiento entre sesiones, se incrementó significativamente la velocidad y tasa de cicatrización de las heridas hasta un 24%, respecto a los controles sin tratar (Kim et al., 2022).

En otro modelo de herida aguda tratada con TFT, se informó que el uso de técnicas de refrigeración perilesional (spray a -20°C aplicado por 5 segundos antes y después del tratamiento) redujo significativamente el daño térmico y el retraso de la cicatrización, mediada por sobreexpresión transitoria de proteínas de choque térmico (que inhibían la proliferación de fibroblastos), que se generaban si no se enfriaba la lesión (Atalay et al., 2009).

En cuanto a la temperatura máxima alcanzada en nuestro modelo de TFT de herida, cabe aclarar que el aumento de temperatura medido en la puesta a punto fue realizado sobre piel normal de ratón y no sobre heridas. La absorción de la hemoglobina podría estar

aumentando la temperatura local a valores mayores que los reportados en la Figura IV.8, lo que explicaría los resultados perjudiciales observados en este Capítulo.

Es importante mencionar nuevamente, que los resultados preliminares mostrados en este Capítulo, se obtuvieron empleando 3 ratones por grupo experimental. Por lo cual es necesario respaldar estos resultados, con nuevos experimentos donde se amplíe el número de unidades experimentales, dando mayor robustez estadística a los mismos.

En conjunto, los resultados destacan que las terapias ALA-TFDA y TFT pueden tener limitaciones importantes en su aplicación a heridas agudas y que se requiere de una puesta a punto adicional que va más allá de los alcances de esta Tesis.

Capítulo VI: Efecto de la luz roja sobre las heridas no infectadas (fotobiomodulación)

En los resultados presentados en el Capítulo IV, se observó que la aplicación de los tratamientos asistidos por luz roja (tanto ALA-TFDA, como luz sola) sobre los abscesos producía una mejora en los parámetros de resolución de las heridas analizados. En ese capítulo se analizaron los efectos de las terapias asistidas por luz, sobre la viabilidad de las bacterias que estaban causando la infección y sobre la respuesta inmune montada frente a ellas. Los efectos sobre la cicatrización y regeneración de tejidos que permiten el cierre de la herida producidos por la ALA-TFDA y el TFT se analizaron en el Capítulo anterior.

En este Capítulo nos centraremos en los efectos de la luz *per se*, sobre los tejidos y la cicatrización de las heridas, empleando los modelos de heridas cutáneas no infectadas utilizados anteriormente (generadas con bisturí o punch de biopsia). El efecto de la luz sobre la cicatrización, está bien descrito y suele mencionarse en la bibliografía científica como Fotobiomodulación (FBM). Esta, es una técnica que emplea luz de baja intensidad (láseres de baja potencia o LED) para estimular procesos celulares y tejidos, sin causar daño térmico, y reducir la inflamación y promover la reparación de tejido.

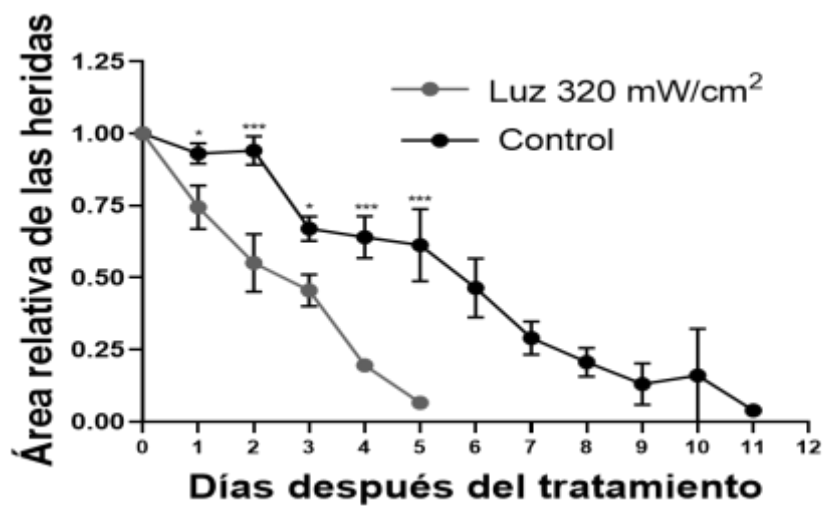
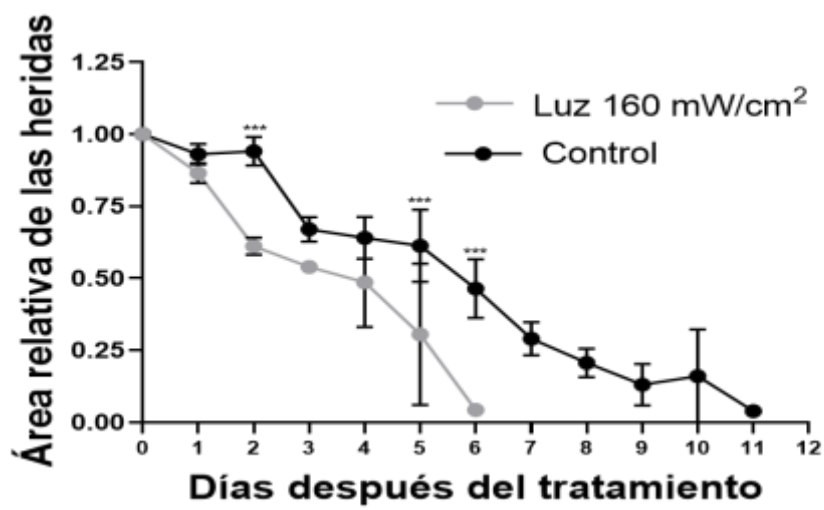
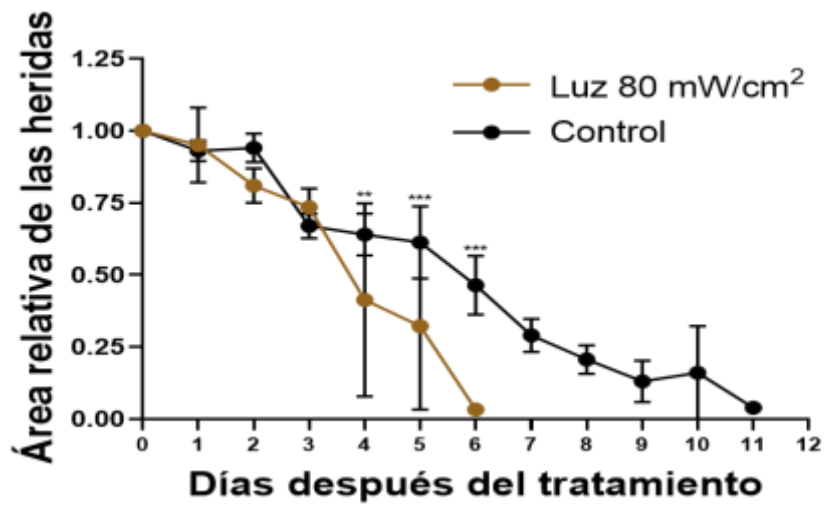
VI.1 FBM con luz roja sobre heridas no infectadas realizadas con bisturí

La irradiación con el láser rojo de 635 nm sobre las heridas, produjo la reducción del área de las mismas, respecto a los controles sin tratar, y este efecto dependió de la potencia de irradiación empleada. Cuando se llevaron a cabo los tratamientos empleando las dos mayores potencias empleadas, 160 y 320 mW/cm², las diferencias con los controles fueron estadísticamente significativas desde el primer día de seguimiento, luego de los tratamientos. Al emplear la menor potencia empleada, 80 mW/cm², las diferencias en el área de las heridas recién se evidenciaron al día 4 post tratamientos (Figura VI.1 A).

Los tiempos de cierre de las heridas disminuyeron aproximadamente 4 días para todos los grupos tratados con luz roja ($p < 0,001$), independientemente de la potencia empleada. Los

tiempos de caída de costra también fueron significativamente menores ($p < 0,01$): 9 ± 1 días para el control vs $4,0 \pm 1,1$; $4 \pm 1,0$ y $2,6 \pm 0,5$ días para 80, 160 y 320 mW/cm² respectivamente (Figura VI.1-B).

Esta mejora en la resolución de las heridas producida por la FBM empleando el láser de 635 nm, también puede apreciarse en las imágenes de la Figura VI.2.



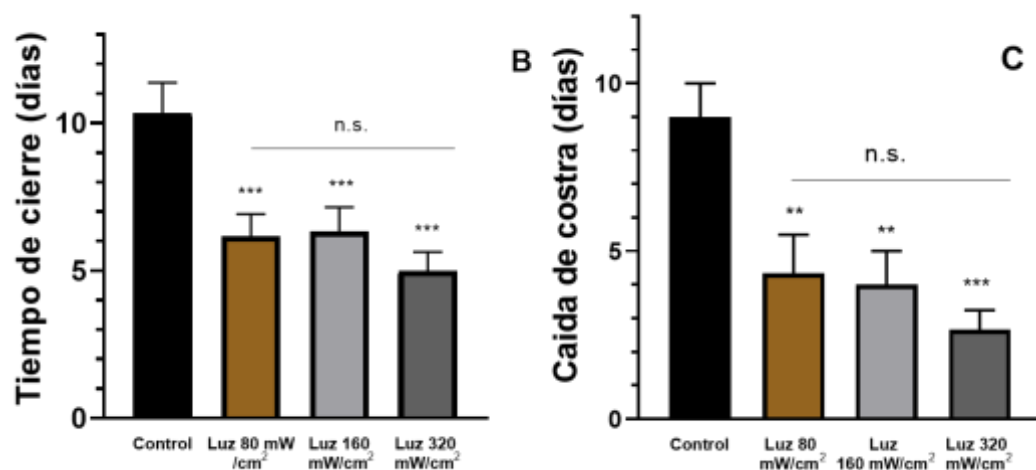


Figura VI.1: Evolución de las heridas producidas con bisturí (no infectadas), y tratadas con luz roja

A) Área relativa (al día cero) de las heridas en los días posteriores al tratamiento con luz laser roja (635 nm) 160 mW/cm² o 320 mW/cm². B) Tiempo de cierre de la herida. C) Tiempo de caída de costra. Medias $\pm$ SD correspondientes a 6 ratones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. A, ANOVA de 2 vías en comparación con el control y prueba post hoc de Tukey día a día. B y C, ANOVA de 1 vía y post hoc de Tukey.

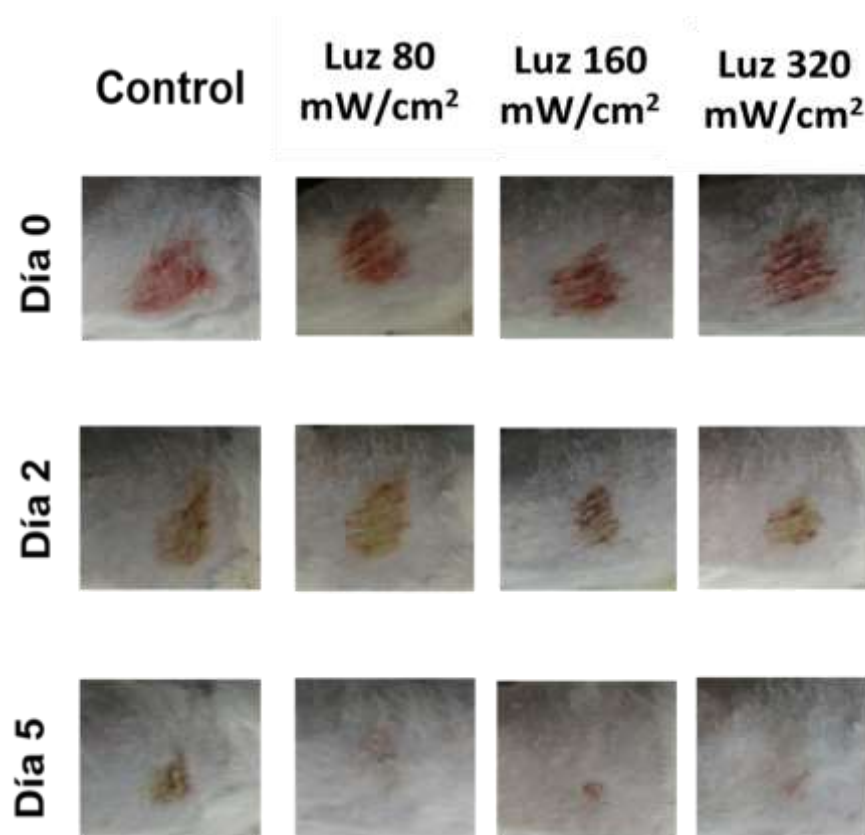


Figura VI.2: Imágenes de heridas generadas con bisturí (no infectadas) tratadas con luz roja

Imágenes representativas de las heridas generadas por bisturí y tratadas con láser de 635 nm a diferentes potencias. Las imágenes se tomaron en los días 0, 2, y 5 posteriores al tratamiento.

VI.2 FBM con luz roja sobre heridas no infectadas realizadas con punch de biopsia

Para este segundo modelo de herida no infectada, se empleó solamente la potencia de 160 mW/cm², dado que en la sección V.I todas las potencias empleadas aceleraron la cicatrización, mientras que esta potencia fue la óptima en el tratamiento de abscesos (sección IV.2). En la Figura VI.2, se observa que el tratamiento con FBM no generó resultados significativamente diferentes de los del control sin tratar. De igual manera, no se observaron diferencias significativas respecto al control sin tratar en términos de caída de costras y tiempo de cierre de heridas (datos no graficados).

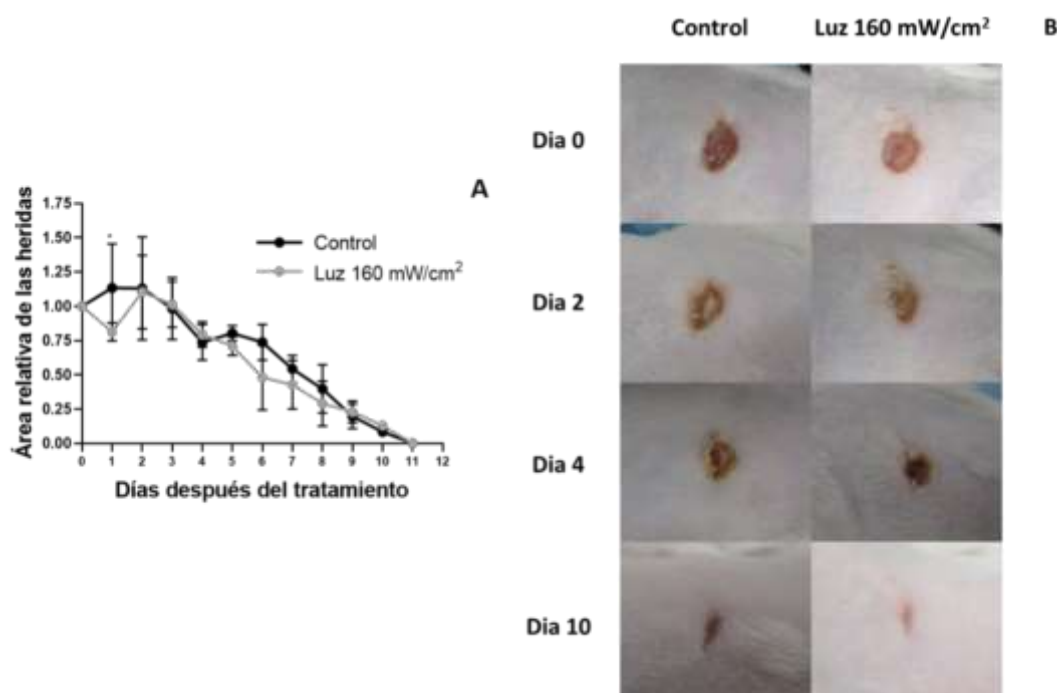


Figura VI.2: Evolución de las heridas producidas con punch de biopsia (no infectadas), y tratadas con FBM

A) Área relativa (al día cero) de las heridas en los días posteriores al tratamiento con luz laser rojo (635 nm) a 160 mW/cm². Los datos están expresados como medias SD correspondiente a 3 ratones por tratamiento. Test U de Mann-Whitney día por día respecto al control. B) Imágenes representativas de las heridas tratadas con láser y de los controles no tratados, a los días 0, 2, 4 y 10 post-tratamiento.

VI.3 Resumen y análisis de resultados de FBM

Tal como se resume en la Tabla VI.1, los resultados de este capítulo, indican que un mismo tratamiento (FBM empleando un láser de 635 nm a 160 mW/cm²) puede producir efectos estimulantes de la cicatrización en un modelo de herida aguda (generada con bisturí), mientras que no lo hace en otro (herida generada con punch de biopsia). Los 3 parámetros estudiados en la evolución de las heridas no fueron afectados por la luz roja sobre lesión por punch y sí fueron positivamente modificados en el caso de las heridas por bisturí.

Esta divergencia en los resultados sugiere que las características de cada tipo de herida, propios del método de lesión, determinan la respuesta frente a la FBM.

Tabla VI.1: Efecto de la luz sobre parámetros de cicatrización en heridas agudas realizadas por punch para biopsia y raspado por bisturí

Los valores se presentan como media $\pm$ SD. [#] 160 mW/cm², ^{##} 320 mW/cm²

Aguda por punch	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)
Control		10,3 $\pm$ 0,5	6,0 $\pm$ 1,0
Luz	=	10,6 $\pm$ 0,5 [#]	7,3 $\pm$ 0,5 [#]
Aguda por bisturí	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)
Control		10,3 $\pm$ 1,0	9,0 $\pm$ 1,0
Luz	↑	↑ 6,0 $\pm$ 0,6 ^{##}	↑ 2,6 $\pm$ 0,5 ^{##}

VI.4 Discusión

En el presente Capítulo se analizaron los efectos biomoduladores de la luz roja sobre la cicatrización de heridas no infecciosas. En las heridas realizadas con bisturí, se observó que la FBM con láser de 635 nm, redujo el tiempo de caída de costra, y cierre de las heridas, junto con la reducción del área de las mismas (en relación a los controles sin

tratar) en los días posteriores al tratamiento. Estos efectos dependieron levemente de la potencia empleada en el tratamiento. Por otro lado, la FBM no indujo efectos sobre el modelo de herida por punch.

En concordancia con los resultados presentados en este Capítulo, Zhang y colaboradores (2015), han demostrado que la evaluación de tratamientos en modelos de heridas, requiere considerar la biomecánica y el tipo de lesión, ya que diferentes métodos de inducción de heridas, pueden generar respuestas tisulares distintas. Estos autores, destacan que la estructura de la herida y la interacción con apósitos y tratamientos terapéuticos, influyen en los mecanismos de reparación tisular. Vale la pena mencionar que esta variación en los efectos producidos por un tratamiento asistido con luz, en diferentes modelos de herida, también ha sido reportada para tratamientos que emplean luz azul. En estos casos, la optimización de los diferentes parámetros del tratamiento asistido por luz, es crucial para maximizar los beneficios terapéuticos (Zhang et al., 2015; Prado et al., 2023).

Las heridas por bisturí, son hechas con un corte limpio que produce bordes regulares y menor daño en los tejidos adyacentes a la herida. En contraste, las heridas por punch para biopsia, implican compresión y cizallamiento de los tejidos heridos. Ha sido informado, que la eficacia de la FBM depende del tipo de lesión, siendo más efectiva en heridas donde los bordes están bien alineados y existe poca pérdida de tejido, mientras que requiere mayor energía y repetición de tratamientos, para ser efectiva en otro tipo de heridas con bordes más irregulares (Chung et al., 2012). Esto se encuentra en consonancia con nuestros resultados.

Por otra parte, mientras que las heridas con bisturí suelen presentar un daño más superficial, las heridas por punch son más profundas, lo que podría influir en la capacidad de penetración de la luz y en la respuesta biológica del tejido. Se ha demostrado que la respuesta a la luz roja depende de la profundidad de la herida, la vascularización y la densidad celular del tejido tratado (Deng et al., 2024).

Otra diferencia entre ambos modelos es la coloración y la humedad del tejido al momento de la iluminación, debido a que el color rojo de la hemoglobina es el predominante en la herida por bisturí mientras que el ocre de la capa muscular expuesta, es el predominante en la herida por punch. Estas características podrían estar modificando la reflexión, refracción y absorción de la luz roja empleada. Nuestros resultados indicarían que la herida por bisturí tendría una mayor capacidad de recibir y responder al estímulo del láser, mientras que la herida por punch no. Respecto a la microarquitectura de los tejidos en cada tipo de herida y su potencial capacidad de interactuar con la luz, es importante señalar que, aunque la hemoglobina absorbe parcialmente en el rango del rojo, existen diferencias estructurales entre los modelos de herida que podrían influir en la distribución

de la luz. Se podría hipotetizar que la geometría de los cortes de herida por bisturí, al crear bordes definidos y lineales, podría favorecer una distribución más uniforme de la luz en el tejido, dado que la organización y orientación de las fibras de colágeno influyen en la dispersión de la luz en los tejidos (Turčanová et al., 2021). En contraste, podría plantearse la hipótesis de que la compresión mecánica inherente al modelo de punch generaría un microambiente con características estructurales que podrían afectar la interacción luz-tejido, aunque la penetración lumínica pudiera ser potencialmente mayor debido a la menor presencia de hemoglobina. Sin embargo, es importante destacar que estas consideraciones son especulativas y requerirían investigación experimental específica para ser validadas, ya que no se han encontrado estudios comparativos directos que evalúen estas diferencias en el contexto de la FBM.

En cuanto a los mecanismos implicados en la FBM, se ha reportado que la luz roja actúa principalmente durante las fases de proliferación y remodelación temprana del proceso de cicatrización. En las heridas por bisturí, con mínimo daño tisular lateral, la luz roja puede ejercer su efecto bioestimulante inmediatamente después de la fase inflamatoria inicial (día 2-3), acelerando la proliferación de fibroblastos, la síntesis de colágeno tipo III y la migración de queratinocitos desde los bordes. Ha sido demostrado que la luz roja (630-670 nm) estimula la actividad mitocondrial en los fibroblastos dérmicos, aumentando la producción de ATP y acelerando la expresión de factores de crecimiento durante esta fase crítica de proliferación (Hawkins & Abrahamse 2006; Houreld et al., 2012).

En contraste, en las heridas por punch, la fase inflamatoria es más prolongada (días 3-5) debido al mayor daño tisular circundante, y que requiere primero la formación extensiva de tejido de granulación antes de poder avanzar hacia las etapas de contracción y epitelización (Gurtner et al., 2014). La FBM en este contexto aún puede ser beneficiosa, pero sus efectos se manifiestan principalmente en la fase tardía de proliferación y durante la remodelación (días 7-14), explicando por qué su impacto en los parámetros tempranos de cicatrización resulta menos evidente que en las heridas por bisturí.

Si bien existen escasas publicaciones acerca del uso de la luz roja en heridas, se están llevando a cabo en la actualidad numerosos estudios clínicos empleando radiación visible o infrarroja para el manejo de diversos tipos de úlceras, incluidas las de pie diabético, además de heridas agudas. Los protocolos incluyen diversas fuentes de luz desde dispositivos LED hasta láseres, con aplicaciones diarias, semanales o de dosis única, y empleando luz azul, roja o NIR (NCT03687320, NCT04300205, NCT04285710, NCT06353568, NCT02883751, NCT04446767, NCT02883751, NCT04446767, NCT05530486, NCT00859599).

La complejidad de los factores a tener en cuenta en los procesos de FBM se encuentran hasta el momento poco estudiados. Los resultados que surgen de esta Tesis son el puntapié inicial de estudios a futuro empleando modelos de ratón diabético, elucidando mecanismos de acción, y acercándonos a la traslación clínica de nuestros resultados.

Discusión

En este trabajo de tesis se investigó la efectividad de tres modalidades terapéuticas basadas en luz para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus*: la terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) mediada por ácido 5-aminolevulínico (ALA) y su derivado hexil éster (H-ALA), la terapia fototérmica (TFT) con radiación infrarroja cercana (NIR), y la fotobiomodulación (FBM).

El abordaje experimental abarcó desde modelos *in vitro* de biopelículas bacterianas (crecidas sobre superficies inertes), hasta modelos *in vivo* de infecciones cutáneas y heridas no infectadas, en función de los aspectos que se buscó indagar. Se evaluó no sólo el efecto antimicrobiano sino también los efectos sobre el proceso de cicatrización y la respuesta inmune del hospedador.

Los resultados revelaron que tanto la eficacia de los diferentes tratamientos, como sus vías de acción principales, dependieron del contexto en que se encontraban las bacterias, y permitieron identificar fortalezas y limitaciones de las terapias basadas en luz, en cuanto a su potencial aplicación clínica.

En la primera etapa de estudios *in vitro*, se observó que la TFT potencia significativamente el efecto bactericida de la TFDA mediada tanto por ALA como por H-ALA en biopelículas de *S. aureus* sensibles (RN6390) y resistentes (STC-SCCmecI) a antibióticos. Para llevar a cabo estos estudios de combinación de terapias lumínicas, se emplearon condiciones sub-letales tanto de ALA-TFDA como de TFT, además de utilizar cepas de *S. aureus* poco respondedoras a la TFDA.

Si bien, al igual que ha sido reportado en bibliografía, la respuesta a los tratamientos varió según la cepa empleada, en todos los casos las reducciones de viabilidad bacteriana fueron superiores a los 3 órdenes de magnitud, umbral propuesto como criterio para considerar efectivo un nuevo tratamiento antibacteriano (Kossakowska et al., 2023; Rapacka-Zdończyk et al., 2021; Cieplik et al., 2014).

Al emplear el ALA, la TFT incrementó la síntesis de porfirinas en las biopelículas mediante efectos independientes de la temperatura y propios de la irradiación NIR. Este aumento de moléculas fotosensibilizantes principalmente en capas basales de la biopelícula, explicaría el incremento en los efectos de la TFDA realizada posteriormente. El contraste entre los resultados obtenidos en biopelículas y cultivos planctónicos -en los cuales la TFT no mejoró el efecto de la ALA-TFDA- indicaría que la TFT mejora la penetración del ALA a través de la matriz de la biopelícula.

Al emplear H-ALA, las reducciones de viabilidad fueron mayores respecto a las observadas con el ALA. La potenciación, en este caso, parecería estar mediada principalmente por la desestabilización de las estructuras de la biopelícula, la membrana y/o la pared bacteriana, producidas tanto por la TFT como por la misma molécula de H-ALA.

Al intentar reproducir la sinergia observada *in vitro* entre ALA-TFDA y TFT, en el modelo *in vivo* de infección cutánea en ratones, no se pudieron obtener resultados

similares, es decir no se registraron efectos de potenciación entre dichos tratamientos. Sin embargo, sí se comprobó que la TFDA es capaz de reducir el tiempo requerido para resolver la infección y cerrar la herida producida por la misma respecto al control sin tratar. Además, esta reducción en el tiempo de resolución de la infección, aunque en menor medida, también se produce al tratar las heridas solo con luz roja, siendo éste un tratamiento que no mostraba efecto sobre la viabilidad de las biopelículas en los experimentos *in vitro*.

Entre los factores que explican estas discrepancias entre los resultados obtenidos *in vitro* y los resultados obtenidos *in vivo*, comenzamos mencionando que las condiciones en las que se realizó el tratamiento de TFT, debieron ser modificadas respecto a las empleadas en el trabajo *in vitro*, debido a los efectos del tratamiento sobre la temperatura en la superficie de la piel de los ratones. Mientras que *in vitro* se lograban incrementos de temperatura controlados para las distintas superficies empleadas (37°C en poliestireno y 27°C en titanio), realizar la TFT con los mismos parámetros de potencia, tiempos y modalidad de irradiación, hubiese producido un aumento de la temperatura de la piel, por sobre lo tolerable por los ratones. Esto obligó a reconfigurar los parámetros de irradiación NIR, reduciendo la potencia del láser de 980 nm y modificando los tiempos y modalidad de irradiación, buscando condiciones acordes con la aplicabilidad clínica. Estos cambios en la potencia y régimen empleados en la TFT de los abscesos, podrían ser una de las causas de los resultados obtenidos.

Sin embargo, aun empleando estas condiciones de TFT tanto en modalidad continua como pulsada, se registró el incremento de la síntesis de porfirinas en el sitio de infección a partir de la topicación con ALA. Dicho incremento, como se mencionó, no produjo el efecto sinérgico observado *in vitro* entre TFT y TFDA, lo que sugeriría que la síntesis de porfirinas a partir de ALA en el absceso podría no ser el factor limitante en la eficiencia de la TFDA en nuestro modelo *in vivo*, y/o que en este contexto, las bacterias se encontrarían en una forma de vida que no se ve afectada por la TFT (al menos en la dosis que están recibiendo dentro del absceso) como sí lo hacen en las biopelículas crecidas *in vitro*. Al respecto, se menciona que la formación de biopelículas en heridas, se asocia a etapas tardías de la infección (y heridas crónicas), mientras que en etapas tempranas de la infección (y heridas agudas), la formación de estructuras del tipo biopelícula suelen estar poco desarrolladas (Pouget et al., 2022; Martin et al., 2010).

Antes de continuar con el análisis de los resultados, vale la pena mencionar nuevamente que la resolución de una herida cutánea es un proceso dinámico que se desarrolla en fases secuenciales y superpuestas. Luego de las primeras horas y durante los primeros días, tiene lugar la fase inflamatoria, en la que intervienen células inmunitarias eliminando microorganismos y restos celulares, y reclutando células que participan de la reparación tisular. Durante la fase de proliferación, que ocurre en los días posteriores, se inicia la regeneración del tejido, a partir de la migración de fibroblastos y proliferación de queratinocitos. Finalmente, en la fase de remodelación, que puede extenderse por semanas o incluso meses, el tejido recién formado se reorganiza y fortalece.

La ALA-TFDA en el modelo de absceso infectado, indujo la reducción del área de la herida desde el comienzo del experimento, y del tiempo de caída de la costra, y resolución

de la herida. También produjo la reducción de la carga bacteriana, pero esto solo fue detectable en la etapa final del cierre de la herida. Además, aumentó el infiltrado de células involucradas en la respuesta inmune en los primeros días luego del tratamiento. Estos resultados, indican que los mecanismos de acción *in vivo* trascienden la simple fotoinactivación directa sobre las bacterias reportada en el modelo *in vitro*, y que la TFDA aplicada en este contexto biológico, implicaría también efectos sobre los procesos de reparación tisular y la respuesta inmune frente a la infección. Esto concuerda con la bibliografía, donde se reporta que además de los efectos inmediatos de reducción de la viabilidad bacteriana, la TFDA potencia la eliminación microbiana a “largo plazo”, coincidiendo con la fase de remodelación tisular, a partir de generar daños en las membranas bacterianas y afectar mecanismos de virulencia, de forma tal que, aunque no cause la inactivación inmediata de las bacterias, disminuye la capacidad de las mismas de persistir en el ambiente de la herida, facilitando así, su eliminación por el sistema inmune (Sellera et al., 2022; Sabino et al., 2023; Sun et al., 2022).

La TFDA podría estar siendo afectada, además, por la reducción de la penetración de la luz roja en el sitio de infección, debido a la dispersión y el apantallamiento que el mismo tejido infectado y la piel representan. Por lo tanto, los efectos directos sobre las bacterias registrados *in vitro*, estarían viéndose reducidos *in vivo* por este factor, aun cuando la síntesis de porfirinas se encontrase incrementada, tal como se mencionó anteriormente. Por otra parte, en el sistema *in vitro*, las porfirinas sintetizadas quedan retenidas en el interior de las estructuras bacterianas (célula y matriz de la biopelícula) o bien en el medio líquido del cultivo, mientras que en el modelo *in vivo*, las mismas podrían difundir a través del infiltrado de la infección, reduciendo así el efecto sobre las bacterias durante la irradiación con luz visible. De manera similar, la biodisponibilidad del ALA puede verse reducida en el modelo *in vivo*.

Por otra parte, vale la pena mencionar que la cepa seleccionada (RN6390) para llevar a cabo la mayor parte del trabajo experimental, fue seleccionada debido a que es una cepa con alta capacidad de formar biopelículas, y una de las cepas de las que disponemos en nuestro laboratorio, con menor sensibilidad a la TFDA. En principio, esta elección respondió a que se buscaba evidenciar interacción entre la ALA-TFDA y la TFT en el sistema *in vitro*, trabajando con una cepa difícil de sensibilizar.

Al indagar los efectos de la ALA-TFDA sobre los procesos involucrados en la cicatrización de heridas no infectadas (Capítulo V), dicho tratamiento mostró efectos perjudiciales en los dos modelos experimentales *in vivo* empleados sobre los parámetros de aumento del tiempo de cierre de la herida y caída de costra. Esto podría deberse al bajo pH de la solución de ALA (factor desestimado en el modelo *in vitro* debido a la solución buffer que se utiliza durante los tratamientos) que podría estar generando inflamación iatrogénica en los tejidos sin infección.

Además, ha sido reportado que, de forma dependiente a la intensidad del tratamiento, la ALA-TFDA puede generar estrés oxidativo en el tejido infectado, interfiriendo así con la cicatrización al causar eritema y prolongar la inflamación (Sim et al., 2022; Liet al., 2022; Chen et al., 2024). En relación a este punto, se menciona que los efectos de la ALA-TFDA sobre el modelo de abscesos *in vivo*, dependieron de la potencia lumínica empleada,

lográndose los mejores resultados con la potencia de 160 mW/cm². Al emplear potencias superiores o inferiores (80, 240 y 320 mW/cm²), los efectos de aceleración en la resolución de la herida producidos por la TFDA, fueron menores. Esto indicaría que existe un rango de intensidad en la aplicación de la terapia y por ende en la producción de ROS, en el cual se consigue un equilibrio entre el daño producido al tejido, y la activación de los efectores de la cicatrización, generando una respuesta óptima al tratamiento.

Teniendo en cuenta lo hasta aquí mencionado, nuestros resultados sugieren que, dentro de un rango de dosis lumínicas, la ALA-TFDA aplicada sobre heridas infectadas, facilita la transición desde la etapa de inflamación hacia la etapa de proliferación en el proceso de resolución de la herida, promoviendo la formación temprana de tejido de granulación y favoreciendo el reclutamiento de células inmunes en etapas tempranas de la inflamación.

En los resultados obtenidos *in vitro*, la luz por sí sola no produjo modificaciones en la viabilidad bacteriana ni en la estructura de las biopelículas, independientemente de la fuente de luz y dosis lumínica entregada. En cambio, en el modelo de herida infecciosa *in vivo* en ratón, el tratamiento con el láser de luz roja indujo la reducción del área de la herida luego del tratamiento y del tiempo de cierre de la misma, respecto a los controles sin tratar. A diferencia de lo observado con la ALA-TFDA, en este caso, no se pudo detectar efecto sobre la carga bacteriana. Por otra parte, la luz roja retrasó la caída de la costra en este tipo de heridas.

Si además se tienen en cuenta los resultados en el modelo de herida no infectada generada por bisturí del Capítulo VI, donde se observó que el tratamiento con luz roja (FBM) redujo considerablemente el tiempo de caída de la costra y cierre total de la herida, podría proponerse que en la herida infectada, la luz roja no estaría generando el efecto virtuoso que se observaba con la TFDA sobre la inflamación temprana, pero sí estaría estimulando la fase de proliferación que permite reducir el tiempo de resolución final de la herida. Sin embargo, estos efectos no se registraron en el otro modelo de herida no infectada, generado por punch de biopsia. En este segundo modelo, la herida es más profunda, con bordes irregulares y daños en el tejido circundante, producidos por el desgarro de los tejidos durante la generación de la herida.

Se ha informado que la eficacia de la FBM depende del tipo de lesión, siendo más efectiva en heridas donde los bordes están bien alineados y existe poca pérdida de tejido, probablemente la dosis lumínica empleada no haya sido suficiente para evidenciar efectos en este tipo de heridas durante los experimentos llevados a cabo en esta tesis (Zhang et al., 2015; Prado et al., 2023).

Vale la pena mencionar que, a diferencia de lo que ocurrió con la ALA-TFDA, al emplear como tratamiento solo la luz roja, se observó mejor respuesta cuanto mayor fue la potencia de irradiación empleada. Es posible que en ausencia de FS a alta concentración, el mecanismo de acción de la luz, este mediado por cromóforos endógenos que necesiten ser irradiados con mayor intensidad para producir efectos, o bien, que dichos efectos no estén siendo contrarrestados por daños producidos en el tejido debido a las especies oxidantes generadas durante la ALA-TFDA.

En cuanto a los resultados al aplicar la TFT sobre las heridas infectadas, este tratamiento solo produjo efectos al ser realizado en la modalidad de emisión continua, generando una reducción en el tiempo de cierre de herida respecto al control sin tratar. Como se mencionó anteriormente, a pesar de estimular una mayor síntesis de porfirinas a partir del ALA, la TFT no mejoró los efectos de la ALA-TFDA sobre la resolución de las heridas producidas por los abscesos.

El incremento en la síntesis de porfirinas en los abscesos tratados con TFT podría deberse al aumento de la penetración del ALA a través de la piel y los tejidos infectados, o a efectos de estimulación del metabolismo promovidos por el tratamiento fototérmico. Sin embargo, la ausencia de efectos potenciadores de la ALA-TFDA podría, también, estar siendo ocasionada por un aumento en la inflamación y daño en los tejidos, producidos por el mismo tratamiento con el láser NIR que estarían contrarrestando los efectos benéficos de la ALA-TFDA. El retraso en el tiempo de cierre de herida (respecto al control sin tratar) producido por la TFTc en el modelo de herida no infectada, estaría respaldando esta hipótesis.

Respecto a los efectos directos de la TFT sobre las bacterias, como se mencionó, las dosis de irradiación NIR puestas a punto *in vivo* se establecieron priorizando no dañar la piel de los ratones, y fueron de menor intensidad que las empleadas *in vitro*, donde, además, dicho tratamiento no modificaba la viabilidad bacteriana. Los efectos fototérmicos bactericidas generalmente requieren temperaturas superiores a 45°C, que no fueron alcanzadas durante el desarrollo de los experimentos de la presente tesis, por lo que es esperable que no se hayan producido efectos sobre la viabilidad de las bacterias por la TFT.

En los estudios de localización de porfirinas mediante fluorescencia, se detectó señal intensa en las capas internas de la piel, específicamente en tejido subcutáneo y músculo esquelético, donde se observó infiltrado inflamatorio con bacterias. En cambio, no se observó acumulación de porfirinas en la superficie de la piel infectada.

El ALA, indujo mayor acumulación de porfirinas en tejidos infectados que en piel no infectada, mientras que el H-ALA generó el patrón opuesto, con mayor acumulación en piel sana. La principal porfirina sintetizada a partir de los precursores, fue la CpIII, lo cual indicaría que la síntesis de dichos compuestos se llevó a cabo principalmente por las bacterias. Por otra parte, el ALA (o las porfirinas sintetizadas a partir de este compuesto) mostró capacidad de migrar desde un flanco del ratón hacia el otro flanco contralateral. El H-ALA, en cambio, permaneció confinado al sitio de aplicación. De esta manera, en el modelo empleado de piel y partes blandas donde la infección no se encuentra superficial, el ALA es más adecuado que el H-ALA, aun con las limitaciones que hemos observado para el empleo en fotodiagnóstico y seguimiento, dada la imposibilidad de excitar las porfirinas fluorescentes desde el exterior.

Los resultados de esta tesis evidencian la complejidad en la extrapolación de resultados experimentales obtenidos *in vitro* hacia modelos *in vivo*, e indican que la efectividad de las terapias fotomediadas sobre los diferentes tipos de herida, no dependen únicamente de parámetros propios de la terapia, como la acumulación de FS, o la potencia de luz.

empleada, sino también de la compatibilidad entre el mecanismo de acción terapéutico y las características del tejido lesionado y/o infectado. Esto significaría que, en una eventual traslación de los tratamientos a la práctica clínica, los protocolos deberían ser optimizados para cada tipo de patología.

La efectividad de la ALA-TFDA para reducir los tiempos de resolución de heridas generadas por infecciones, permite proponer esta técnica como una alternativa terapéutica viable para infecciones de piel y tejidos blando, especialmente en el contexto actual de emergencia de cepas bacterianas multirresistentes a antibióticos convencionales, mientras que la FBM se recomendaría para acelerar los procesos de cicatrización tanto en heridas infectadas como no infectadas.

Conclusiones Generales

Este trabajo proporciona evidencias sobre los efectos y mecanismos de acción de las tres terapias basadas en luz empleadas en esta Tesis (Terapia Fotodinámica antibacteriana, Terapia Fototérmica y Fotobiomodulación por luz roja), para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* y para la cicatrización de heridas.

En esta Tesis hemos demostrado que:

- La combinación de TFT y TFDA ejerce efectos sinérgicos contra biopelículas de *S. aureus in vitro*, mediados por la desestabilización estructural y el aumento en la síntesis o penetración de fotosensibilizadores.

- El ALA y el H-ALA presentan diferencias en su distribución tisular y capacidad de síntesis de porfirinas en abscesos cutáneos de *S. aureus* y en piel sana, con importantes implicaciones para su utilización terapéutica y diagnóstica. Sin embargo, en el modelo de absceso cutáneo empleado en esta Tesis, por el alojamiento de la infección en la profundidad de la piel, no pudimos realizar el seguimiento de la misma excitando la fluorescencia de las porfirinas desde el exterior.

- En un modelo *in vivo* de absceso cutáneo de *S. aureus*, la ALA-TFDA reduce la carga bacteriana a tiempos largos y promueve la resolución de las infecciones en términos de cierre de herida y caída de costra, aunque sin el efecto sinérgico con la TFT observado *in vitro*, a pesar de que dicha terapia induce un aumento en la síntesis de porfirinas en los abscesos.

- La TFT por sí sola, en modo continuo afectó positivamente en forma leve la resolución de abscesos cutáneos sólo en uno de los parámetros, pero en general no tuvo demasiado impacto sobre este modelo.

- La respuesta a las tres terapias basadas en luz analizadas en esta Tesis difiere marcadamente entre tejidos infectados y no infectados.

- La TFDA y la TFT no fueron efectivas en la resolución de heridas agudas no infectadas tanto en el modelo incisional como escisional.

- La fotobiomodulación (FBM) con luz roja demostró efectos beneficiosos sobre la resolución tanto de abscesos como de heridas incisionales no infectadas.

Estos hallazgos sientan las bases para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en luz, con potencial para abordar el creciente problema de las infecciones resistentes a antibióticos. La combinación racional de diferentes modalidades lumínicas, considerando el contexto tisular específico, podría maximizar los efectos antimicrobianos y regenerativos, ofreciendo alternativas valiosas a los tratamientos convencionales.

A continuación, se presentan las Tablas que resumen los aspectos fundamentales de los experimentos *in vivo* abordados en esta Tesis.

Abscesos cutáneos tratados con TFDA y TFT

Tratamientos	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)	UFCs
Control		27,1 ± 1,4	12,2 ± 1,3	
ALA-TFDA	↑	↑ 15,1 ± 0,7 [#]	↑ 10,6 ± 1,1 [#]	↓
Luz	↑	↑ 20,6 ± 0,8 ^{##}	↓ 16,0 ± 2,0 ^{##}	=

↑ Efecto positivo sobre los parámetros indicados y ↓ efecto negativo

Tratamientos	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)
Control		27,1 ± 1,4	12,2 ± 1,3
TFTc	=	↑ 23 ± 0,9	=
TFTp	=	=	=
TFTc + TFDA [°]	=	=	=
TFTp + TFDA [°]	=	=	=

[°]en comparación con TFDA

Heridas agudas por bisturí tratadas con TFDA y TFT

Tratamientos	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)
Control		10,3 ± 1,0	9,0 ± 1,0
ALA-TFDA	↓	↓ 16,8 ± 0,7	↓ 15,0 ± 1,0
TFTc 1dosis	↓	↓ 16,2 ± 1,1	↓ 13,3 ± 0,6
TFTc 2dosis	=	10,5 ± 0,8	10,3 ± 0,6
TFTc 3dosis	=	10,8 ± 0,8	9,7 ± 0,6

Heridas agudas por punch tratadas con TFDA y TFT

Tratamientos	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)
Control		10, 3 ± 0,5	6,0 ± 1,0
ALA-TFDA		↓ 12,3 ± 0,5	↓ 10,6 ± 0,6

Fotobiomodulación

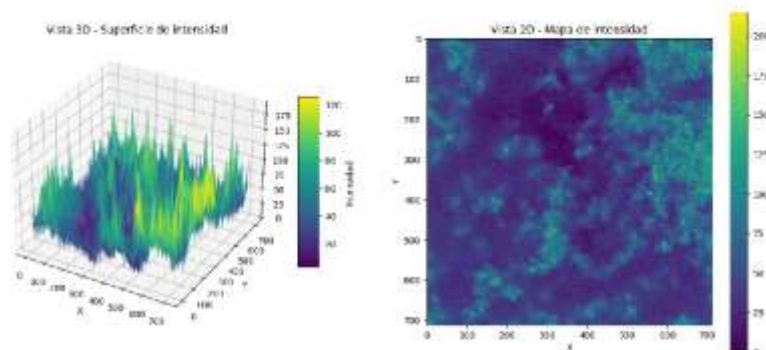
Aguda por punch	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)
Control		10,3 ± 0,5	6,0 ± 1,0
Luz	=	10,6 ± 0,5 [#]	7,3 ± 0,5 [#]
Aguda por bisturí	Progresión temporal (días)	Cierre de herida (días)	Caída de costra (días)
Control		10,3 ± 1,0	9,0 ± 1,0
Luz	↑	↑ 6,0 ± 0,6 ^{##}	↑ 2,6 ± 0,5 ^{##}

[#] 160 mW/cm², ^{##} 320 mW/cm²

Apéndice

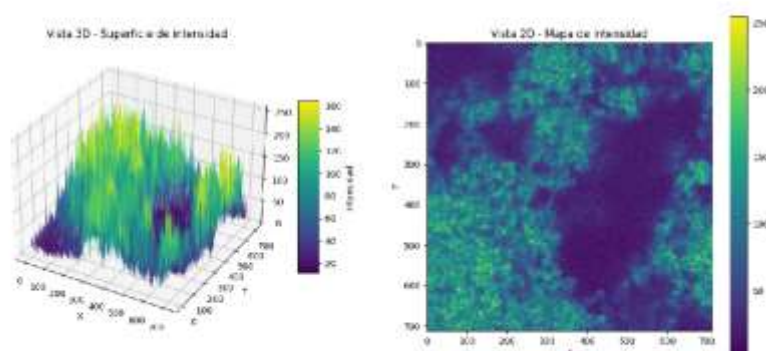
Apical

ALA



Área normalizada = $0,1845 \pm 0,0001$

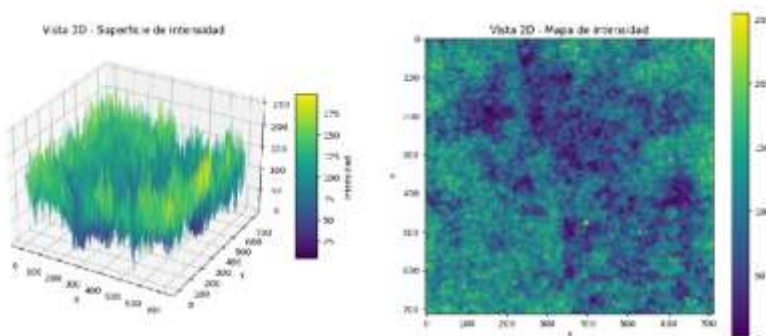
ALA + TFT



Área normalizada = $0,2731 \pm 0,0002$

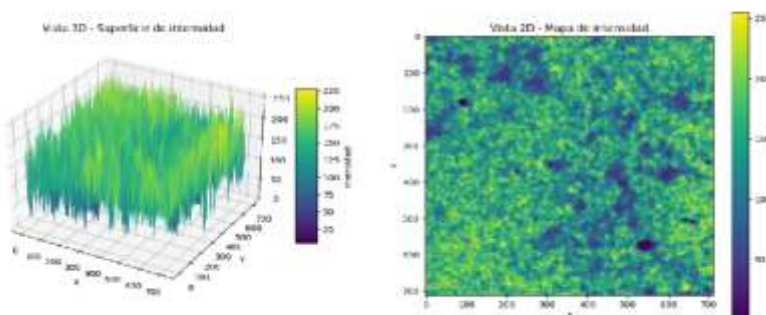
Medio

ALA



Área normalizada = $0,3815 \pm 0,0002$

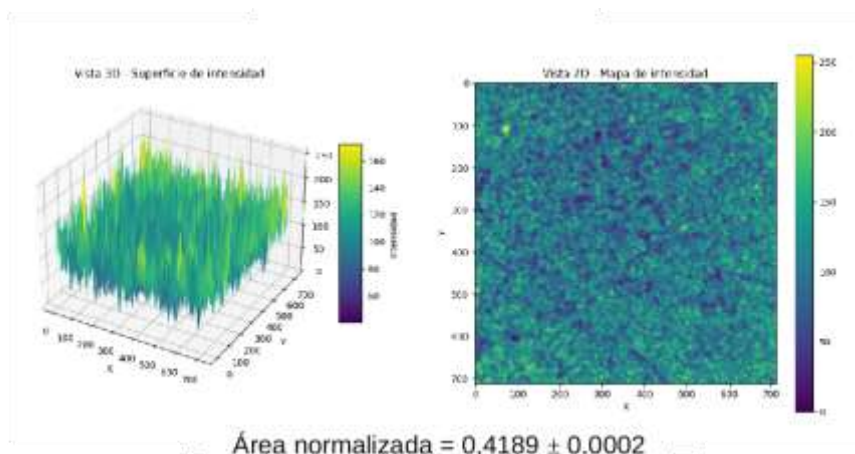
ALA + TFT



Área normalizada = $0,5509 \pm 0,0003$

Basal

ALA



ALA + TFT

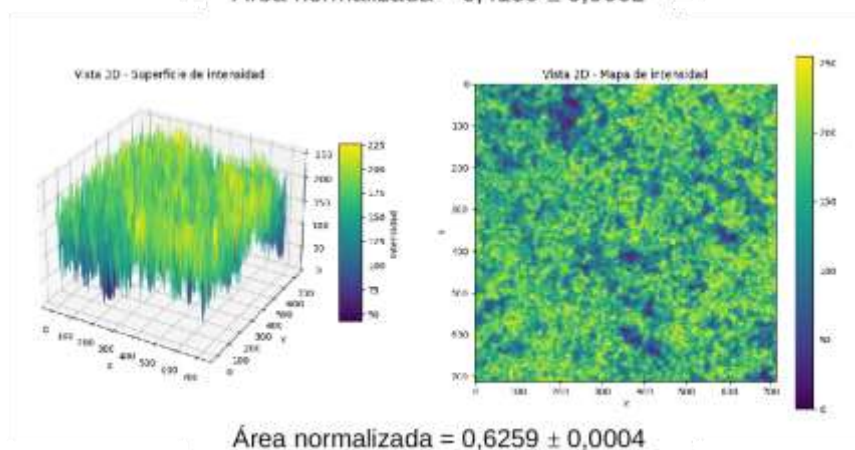


Figura A1: Gráficos 3D y 2D de la suma de la fluorescencia las distintas zonas de las biopelículas tratadas con ALA con o sin tratar con TFTc

Gráfico de área bajo la curva de la suma de la intensidad de fluorescencia de los stacks correspondientes a las distintas zonas (apical, media y basal) de las biopelículas tratados con ALA y ALA + TFTc. En el eje Z de los gráficos 3D se muestran los valores de fluorescencia normalizados, obtenidos a partir de la suma de imágenes de cada zona. Los gráficos 2D muestran la distribución espacial de los valores de intensidad para visualizar las diferencias entre los tratamientos y las zonas evaluadas. Se muestra una zona representativa de cada muestra.

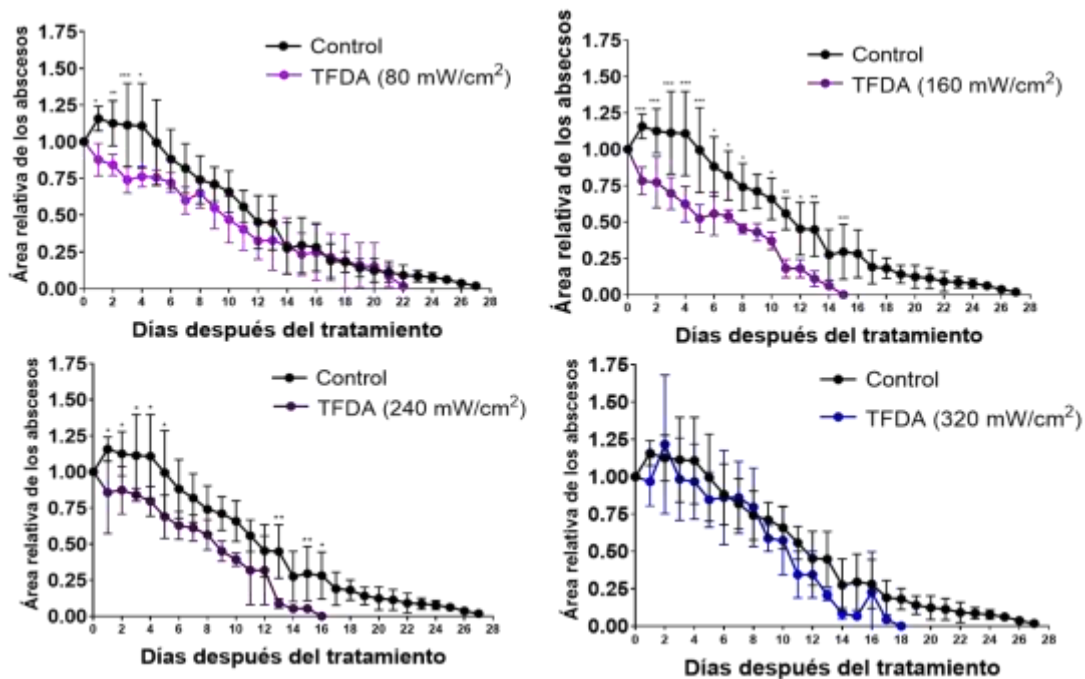


Figura A2: Comparación estadística entre las áreas de los abscesos tratados ALA-TFDA y controles

A las 48 h post infección, los ratones se topicaron con ALA y a las 4 h se realizó la ALA-TFDA empleando distintas potencias de láser 635 nm. Se realizó el seguimiento del tamaño de los abscesos en el tiempo. Los resultados corresponden a las medias $\pm$ SD de 6 ratones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.001$ en comparación con el control sin tratamiento comparando día a día con ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey.

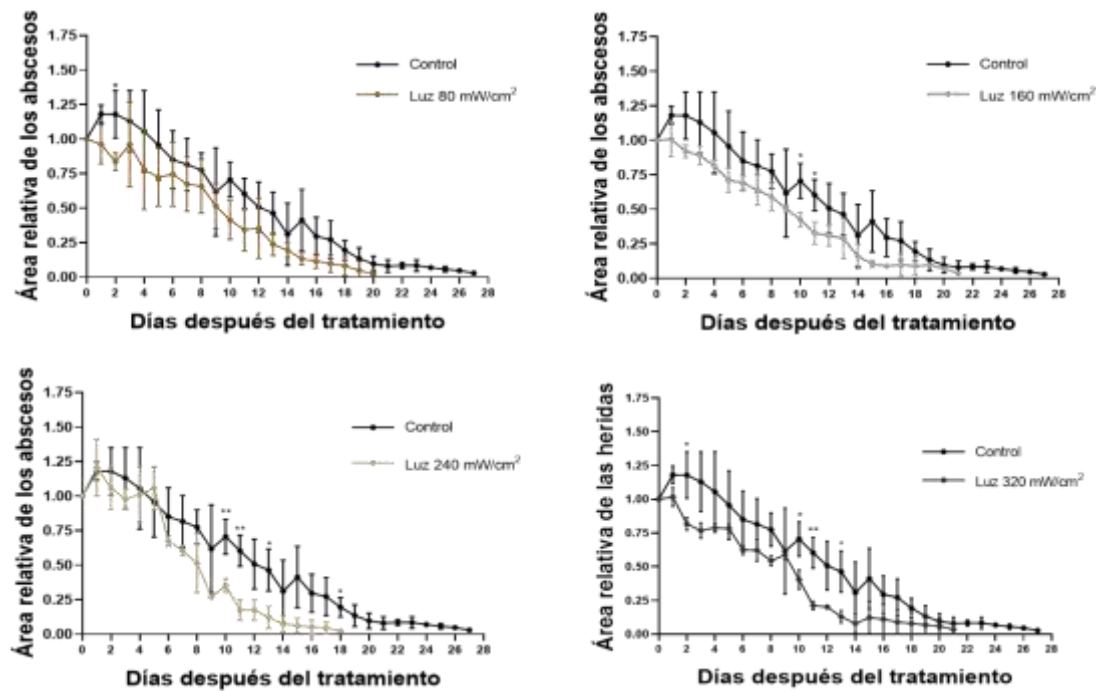


Figura A3: Comparación estadística entre las áreas de los abscesos tratados con luz sola y controles

A las 48 h post infección, los ratones se topicaron con PBS y se iluminaron con distintas potencias de láser 635 nm. Se realizó el seguimiento del tamaño de los abscesos en el tiempo. Los resultados corresponden a las medias $\pm$ SD de 6 ratones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.001$ en comparación con el control sin tratamiento comparando día a día con ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey.

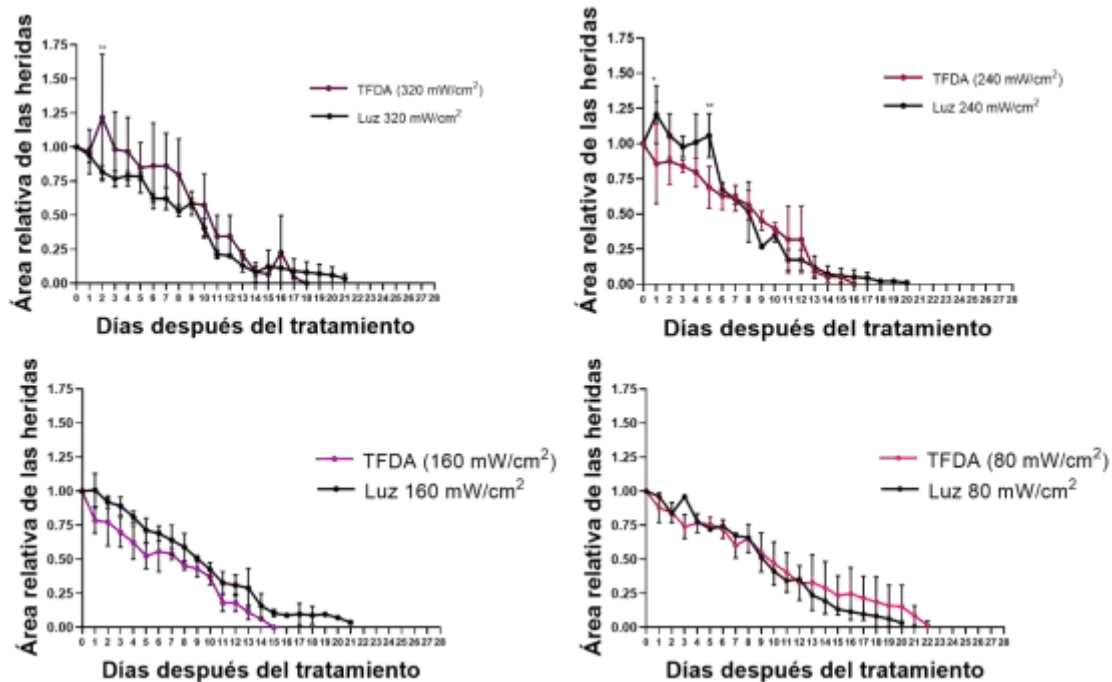


Figura A4: Comparación estadística entre las áreas de los abscesos tratados con ALA-TFDA y luz sola

Se comparan las áreas de los abscesos tratados con ALA-TFDA y luz sola graficados en A1 y A2. Los resultados corresponden a las medias $\pm$ SD de 6 ratones por tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.001$ comparando día a día con ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey.

Bibliografía

Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2016;473(4):347-364. doi: 10.1042/BJ20150942.

Ajmal M. Effectiveness of photodynamic therapy as an adjunct to topical antiviral therapy in the treatment of herpes labialis: a randomized controlled clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;34:102302. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102302.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.

Alam ST, Le TAN, Park JS, Kwon HC, Kang K. Antimicrobial Biophotonic Treatment of Ampicillin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Hypericin and Ampicillin Cotreatment Followed by Orange Light. *Pharmaceutics.* 2019;11(12):641. doi: 10.3390/pharmaceutics11120641.

Alghamdi WA, Al-Shaer MH, Peloquin CA. Protein binding of linezolid in patients with diabetic foot infections and healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022;66(7):e0235821. doi: 10.1128/aac.02358-21.

Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy: basic principles and clinical applications. *Cancer.* 2008;112(3):630-637. doi: 10.1002/cncr.23199.

Almeida PP, Pereira ÍS, Rodrigues KB, Leal LS, Marques AS, Rosa LP, da Silva FC, da Silva RAA. Photodynamic therapy controls of *Staphylococcus aureus* intradermal infection in mice. *Lasers Med Sci.* 2017;32(6):1337-1342. doi: 10.1007/s10103-017-2247-1.

Al Mohajer M, Darouiche RO, Hanna HA, et al. Antimicrobial lock solutions in the treatment of bloodstream infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(4):433-444. doi: 10.1586/14787210.2014.894881.

Almenara-Blasco M, García-Gil M, Gilaberte Y. Terapia fotodinámica antimicrobiana. In: *Manual de Terapia Fotodinámica para Dermatología.* 1a ed. Editors T Gracia-Cazaña, Y Gilaberte. Madrid: Aulamédica; 2022. p. 181.

Almenara-Blasco M, Pérez-Laguna V, Navarro-Bielsa A, Gracia-Cazaña T, Gilaberte Y. Antimicrobial photodynamic therapy for dermatological infections: current insights and future prospects. *Front Photobiol.* 2024;2:1294511.

Anderson RR, Parrish JA. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science.* 1983;220(4596):524-527. doi: 10.1126/science.6836297.

Ando T, Xuan W, Xu T, Dai T, Sharma SK, Kharkwal GB, Huang YY, Wu Q, Whalen MJ, Sato S, Obara M, Hamblin MR. Comparison of therapeutic effects between pulsed and continuous wave 810-nm wavelength laser irradiation for traumatic brain injury in mice. *PLoS One.* 2011;6(10):e26212. doi: 10.1371/journal.pone.0026212.

Ansell DM, Campbell L, Thomason HA, Brass A, Hardman MJ. Comparison of murine wound models. *Wound Repair Regen.* 2014;22(2):281-287. doi: 10.1111/wrr.12148.

Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(7):397-409. doi: 10.1038/s41579-018-0019-y.

Armstrong DG, Tan TW, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic foot ulcers: a review. *JAMA*. 2023;329(17):1471-1482. doi: 10.1001/jama.2023.4400.

Atalay M, Oksala N, Lappalainen J, Laaksonen DE, Sen CK, Roy S. Heat shock proteins in diabetes and wound healing. *Curr Protein Pept Sci*. 2009;10(1):85-95. doi: 10.2174/138920309787315202.

Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson DI, Brynildsen MP, Bumann D, Camilli A, Collins JJ, Dehio C, Fortune S, Ghigo JM, Hardt WD, Harms A, Heinemann M, Hung DT, Jenal U, Levin BR, Michiels J, Storz G, Tan MW, Tenson T, Van Melderen L, Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(7):441-448. doi: 10.1038/s41579-019-0196-3.

Balderas-Cordero D, Canales-Alvarez O, Sánchez-Sánchez R, Cabrera-Wrooman A, Canales-Martínez MM, Rodríguez-Monroy MA. Análisis antiinflamatorio e histológico de la cicatrización de heridas cutáneas mediante la aplicación tópica de propóleo mexicano. *Int J Mol Sci*. 2023;24:11831. doi: 10.3390/ijms241411831.

Bellis A, Cañas E, García C, et al. MRSA infections: epidemiology, antibiotic resistance, and treatment outcomes in Latin America. *Clin Microbiol Infect*. 2024;30(1):45-52. doi: 10.1016/j.cmi.2023.08.015.

Bohm GC, Gándara L, Di Venosa G, Mamone L, Buzzola F, Casas A. Photodynamic inactivation mediated by 5-aminolevulinic acid of bacteria in planktonic and biofilm forms. *Biochem Pharmacol*. 2020;177:114016. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114016.

Bora P, Soundrapandian C, Vinothkumar V, et al. Near-infrared photothermal therapy: recent advances and clinical translation. *Biomed Pharmacother*. 2022;150:113019. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113019.

Borges NCS, Soares LR, Perissini MM, Carvalho MS, Guirro ECO, Freitas MCF, Guirro RRJ. Photobiomodulation using red and infrared spectrum light emitting-diode (LED) for the healing of diabetic foot ulcers: a controlled randomized clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2024;39(1):253. doi: 10.1007/s10103-024-04199-5.

Brancaleon L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2002;17(3):173-186. doi: 10.1007/s101030200027.

Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 2011;27(9):1017-32. doi: 10.1080/08927014.2011.626899.

Carpenter J, Bithell J. Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians. *Stat Med*. 2000;19(9):1141-64. doi: 10.1002/(sici)1097-0258(20000515)19:9<1141::aid-sim479>3.0.co;2-f.

Carro GV, Saurral R, Sagüez FS, Witman EL. Pie diabético en pacientes internados en hospitales de Latinoamérica. *Medicina (Buenos Aires)*. 2019;79(1):21-31.

Carvalho CA, Fernandes RS, Macaroff PP, et al. Prevention of MRSA nasal colonization using photodynamic therapy: a proof-of-concept study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021;34:102244. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102244.

Casas A. Clinical uses of 5-aminolaevulinic acid in photodynamic treatment and photodetection of cancer: A review. *Cancer Lett*. 2020;490:165-173. doi: 10.1016/j.canlet.2020.06.008.

Casas A, Perotti C, Fukuda H, Rogers L, Butler AR, Battle A. ALA and ALA hexyl ester-induced porphyrin synthesis in chemically induced skin tumours: the role of different vehicles on improving photosensitization. *Br J Cancer*. 2001;85(11):1794-1800. doi: 10.1054/bjoc.2001.2156.

Cecilia M, Caussonne C, Luis F, Calvino LF. Virulence factors of *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infections in cows: Relevance and role as immunogens. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Rafaela, Santa Fe, Argentina; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina. 2013. doi: 10.1016/S0325-7541(13)70011-7.

Cela EM, Prack McCormick B, Rama Chola J, Friedrich A, Simón D, Etchenique I, Iovanna J, Lombardo MV, Quintana FJ. UV radiation reduces pathology in a mouse model of cutaneous *Staphylococcus aureus* infection. *J Invest Dermatol*. 2022;142(7):1914-1924.e2. doi: 10.1016/j.jid.2021.11.023.

Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. 2014;61(1):28-40.

Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(9):629-641. doi: 10.1038/nrmicro2180.

Chen L, Mirza R, Kwon Y, DiPietro LA, Koh TJ. The murine excisional wound model: Contraction revisited. *Wound Repair Regen*. 2015;23(6):874-877. doi: 10.1111/wrr.12338.

Chen P, Zou Y, Liu Y, Han W, Zhang M, Wu Y, Yin R. Low-level photodynamic therapy in chronic wounds. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2024;46:104085. doi: 10.1016/j.pdpdt.2024.104085.

Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(2):516-533. doi: 10.1007/s10439-011-0454-7.

Cieplik F, Deng D, Crielard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(5):571-589. doi: 10.1080/1040841X.2018.1467876.

Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol.* 2014;5:405. doi: 10.3389/fmicb.2014.00405.

Correia JH, Rodrigues JA, Pimenta S, et al. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics.* 2021;13(9):1332. doi: 10.3390/pharmaceutics13091332.

Costa AC, Lima SA. Photodynamic therapy: from mechanisms to applications in cancer and infectious diseases. *Pharmaceutics.* 2024;16(2):266. doi: 10.3390/pharmaceutics16020266.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318.

Cox R, Charles HP. Porphyrin-accumulating mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1973;113(1):122-32. doi: 10.1128/jb.113.1.122-132.1973.

Cremer RJ, Perryman PW, Richards DH. Influence of light on the hyperbilirubinaemia of infants. *Lancet.* 1958;1(7030):1094-1097. doi: 10.1016/s0140-6736(58)91849-x.

Dailey HA, Gerdes S, Dailey TA, Burch JS, Phillips JD. Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(7):2210-2215. doi: 10.1073/pnas.1416285112.

Dailey TA, Boynton TO, Albetel AN, Gerdes S, Johnson MK, Dailey HA. Discovery and characterization of HemQ: an essential heme biosynthetic pathway component. *J Biol Chem.* 2017;292(9):3623-3633. doi: 10.1074/jbc.M116.770792.

David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):616-687. doi: 10.1128/CMR.00081-09.

Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(2):114-122. doi: 10.1038/nrd1008.

de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2016;22(3):7000417. doi: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.

de Jong NWM, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr.* 2019;7(2). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0061-2019.

De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(3):e00181-19. doi: 10.1128/CMR.00181-19.

Dehkordi AN, Babaheydari FM, Chehelgerdi M, Dehkordi SR. Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):111. doi: 10.1186/s13287-019-1212-2.

Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2329-2335. doi: 10.1128/AAC.49.6.2329-2335.2005.

Deng F, Yang R, Yang Y, Zhou J, Lin D, Yi Y, Yu W, Xu Y, Xing W, Liu Z, Tian Y, Wang T, Sui X, Duan R, Lu K, Peng Z. Visible light accelerates skin wound healing and alleviates scar formation in mice by adjusting STAT3 signaling. *Commun Biol*. 2024;7(1):1266. doi: 10.1038/s42003-024-06973-1.

Di Gregorio S, Fernández Canigia L, Tucta F, et al. *Staphylococcus aureus* ST5-SCCmecI clone as a major cause of bloodstream infections in Argentina: a 10-year study (2011-2020). *J Antimicrob Chemother*. 2023;78(2):348-355. doi: 10.1093/jac/dkac400.

Di Gregorio S, Vielma J, Haim MS, Rago L, Campos J, Kekre M, Abrudan M, Famiglietti Á, Canigia LF, Rubinstein G, Helena von Specht M, Herrera M, Aro C, Galas M, Yarhui NB, Figueiredo A, Lincopan N, Falcon M, Guillén R, Camou T, Varela G, Aanensen DM, Argimón S, Mollerach M, On Behalf Of StaphNET-Sa Consortium. Genomic epidemiology of *Staphylococcus aureus* isolated from bloodstream infections in South America during 2019 supports regional surveillance. *Microb Genom*. 2023;9(5):mgen001020. doi: 10.1099/mgen.0.001020.

Di Venosa G, Batlle A, Fukuda H, Macrobert A, Casas A. Distribution of 5-aminolevulinic acid derivatives and induced porphyrin kinetics in mice tissues. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;58(4):478-86. doi: 10.1007/s00280-006-0186-9.

Dinarello CA. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Semin Immunol*. 2013;25(6):389-393. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.001.

Dompe C, Moncrieff L, Matys J, et al. Photobiomodulation-underlying mechanism and clinical applications. *J Clin Med*. 2020;9(6):1724. doi: 10.3390/jcm9061724.

Domínguez Saavedra G, Hernández Galván D. Actualizaciones en el manejo de heridas. *Digital ciencia@uaqro*. 2021; 14(1):16-28. Disponible en: <https://revistas.uaq.mx/index.php/ciencia/article/view/95>

Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst*. 1975;55(1):115-121. doi: 10.1093/jnci/55.1.115.

Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol*. 2015;25(2):92-99. doi: 10.1016/j.tcb.2014.10.001.

Dunn L, Prosser HC, Tan JT, Vanags LZ, Ng MK, Bursill CA. Murine model of wound healing. *J Vis Exp*. 2013;(75):e50265. doi: 10.3791/50265.

Efron B, Tibshirani RJ. *An Introduction to the Bootstrap*. 1st ed. Chapman and Hall/CRC; 1994. doi: 10.1201/9780429246593.

Egea AL, Galletti P, Lamberghini R, et al. New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community-associated MRSA genotypes behave

like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. *Int J Med Microbiol.* 2014;304(8):1086-1099. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.08.002.

Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 2014;6(265):265sr6. doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.

Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science.* 2017;356(6342):1026-1030. doi: 10.1126/science.aam7928.

Enriquez J, Mims BMD, Trasti S, et al. Genomic, microbial and environmental standardization in animal experimentation limiting immunological discovery. *BMC Immunol.* 2020;21(1):50. doi: 10.1186/s12865-020-00380-x.

Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff LD. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(4):323-329. doi: 10.1089/pho.2004.22.323.

Fang Y, Liu T, Zou Q, Zhao Y, Wu F. Water-soluble benzylidene cyclopentanone based photosensitizers for in vitro and in vivo antimicrobial photodynamic therapy. *Sci Rep.* 2016;6:28357. doi: 10.1038/srep28357.

Finsen NR. *Phototherapy.* London: Edward Arnold; 1901.

Fotinos N, Convert M, Piffaretti JC, Gurny R, Lange N. Effects on gram-negative and gram-positive bacteria mediated by 5-aminolevulinic acid and 5-aminolevulinic acid derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1366-1373. doi: 10.1128/AAC.01372-07. Finsen NR. *Phototherapy.* London: Edward Arnold; 1901.

Fowler VG Jr, Boucher HW, Corey GR, et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med.* 2006;355(7):653-665. doi: 10.1056/NEJMoa053783.

Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(6):2173-2178. doi: 10.1128/AAC.48.6.2173-2178.2004. Galiano RD, Michaels V J, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen.* 2004;12(4):485-492. doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x.

Gandara L, Mamone L, Dotto C, Buzzola F, Casas A. Enhancement of photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* biofilms by disruptive strategies. *Lasers Med Sci.* 2017;32(8):1757-1767. doi: 10.1007/s10103-017-2242-6.

Gao J, Huang L, Tang M, et al. Recent advances in photosensitizers for photodynamic therapy. *Molecules.* 2023;28(15):5808. doi: 10.3390/molecules28155808.

García A, Martínez C, Juárez RI, Téllez R, Paredes MA, Herrera MDR, Giono S. Methicillin resistance and biofilm production in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*

and coagulase-negative Staphylococcus in México. *Biomedica*. 2019;39(3):513-523. doi: 10.7705/biomedica.4131.

García C, López R, Santos M, et al. Enhanced antimicrobial photodynamic therapy using light-based approaches. *Front Pharmacol*. 2021;12:642609. doi: 10.3389/fphar.2021.642609.

García JGM. The role of photodynamic therapy in wound healing and scarring in human skin. Ph.D. Thesis, The University of Manchester, Manchester, UK. 2015.

Ghorbani J, Rahban D, Aghamiri S, et al. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. *Laser Ther*. 2018;27(1):293-302. doi: 10.5978/islsm.18-RE-01.

Gilaberte Y, Rezusta A, Juarranz A, Hamblin MR. Editorial: Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Paradigm in the Fight Against Infections. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:788888. doi: 10.3389/fmed.2021.788888.

Gilaberte Y, Aspiroz C, Alexandre MC, et al. Cutaneous sporotrichosis treated with photodynamic therapy: report of five cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34(8):e389-e392. doi: 10.1111/jdv.16268.

Gnanasekar L, Suresh PK, Prabhu A, et al. Advanced laser therapy for biofilm disruption and antimicrobial applications. *Lasers Med Sci*. 2023;38(1):256. doi: 10.1007/s10103-023-03895-w.

Gonzales PR, Pesesky MW, Bouley R, et al. Synergistic, collaterally sensitive β -lactam combinations suppress resistance in MRSA. *Nat Chem Biol*. 2005;11(11):855-861. doi: 10.1038/nchembio.1911.

Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado AR. Wound healing - A literature review. *A Bras Dermatol*. 2016;91(5):614-620. doi: 10.1590/abd1806-4841.20164741.

Gotthardt M, Bleeker-Rovers CP, Boerman OC, Oyen WJ. Imaging of inflammation by PET, conventional scintigraphy, and other imaging techniques. *J Nucl Med*. 2013;54(12):1947-1954. doi: 10.2967/jnumed.112.109645.

Gudjonsson JE, Johnston A, Dyson M, Valdimarsson H, Elder JT. Mouse models of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2007;127(6):1292-1308. doi: 10.1038/sj.jid.5700807.

Guo N, Chen J, Kong F, Gao Y, Bian J, Liu T, Hong G, Zhao Z. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for chronic wound infection in rats with diabetes. *Biomed Pharmacother*. 2024;178:117132. doi: 10.1016/j.biopha.2024.117132.

Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2022;89(3):219-229. doi: 10.1177/0022034509359125.

Guo Y, Ramos RI, Cho JS, Donegan NP, Cheung AL, Miller LS. In vivo bioluminescence imaging to evaluate systemic and topical antibiotics against community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus-infected skin wounds in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57. doi: 10.1128/aac.01003-12.

Gustavo G, Fernández L, Rodríguez M, et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers: prevalence and molecular characteristics. *J Hosp Infect.* 2023;131:45-52. doi: 10.1016/j.jhin.2022.10.012.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453(7193):314-321. doi: 10.1038/nature07039.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Adv Wound Care.* 2014;3(4):315-323. doi: 10.1089/wound.2013.0485.

Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol.* 2016;33:67-73. doi: 10.1016/j.mib.2016.06.008.

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):436-450. doi: 10.1039/b311900a.

Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, et al. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(6):941-951. doi: 10.1093/jac/dkf053.

Hashmi JT, Huang YY, Osmani BZ, Sharma SK, Naeser MA, Hamblin MR. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. *PM R.* 2010;2(12 Suppl 2):S292-305. doi: 10.1016/j.pmrj.2010.10.013.

Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2006;38(1):74-83. doi: 10.1002/lsm.20271.

Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit Care.* 2022;21(1):85. doi: 10.1186/s13054-017-1684-4.

Hempstead J, Jones D, Ziouche A, et al. Low-cost photodynamic therapy devices for global health settings: characterization of battery-powered LED performance and smartphone imaging in 3D tumor models. *Sci Rep.* 2015;5:10093. doi: 10.1038/srep10093.

Heydorn A, Ersbøll B, Hentzer M, Parsek MR, Givskov M, Molin S. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology.* 2000;146(10):2409-2415. doi: 10.1099/00221287-146-10-2409.

Hill R, Rennie MY, Douglas J. Using bacterial fluorescence imaging and antimicrobial stewardship to guide wound management practices: a case series. *Ostomy Wound Manage.* 2018;64(8):18-28.

Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, et al. Vancomycin AUC/MIC ratio and 30-day mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1654-1663. doi: 10.1128/AAC.02485-12.

Horsburgh MJ, Aish JL, White IJ, Shaw L, Lithgow JK, Foster SJ. σ B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional rsbU Strain Derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol*. 2002;184(19):5457-5467. doi: 10.1128/jb.184.19.5457-5467.2002.

Howley R, Chandratre S, Chen B. 5-Aminolevulinic acid as a theranostic agent for tumor fluorescence imaging and photodynamic therapy. *Bioengineering (Basel)*. 2023;10(4):496. doi: 10.3390/bioengineering10040496.

Hourelid NN, Masha RT, Abrahamse H. Low-intensity laser irradiation at 660 nm stimulates cytochrome c oxidase in stressed fibroblast cells. *Lasers Surg Med*. 2012;44(5):429-34. doi: 10.1002/lsm.22027.

Hruz P, Zinkernagel AS, Jenikova G, et al. NOD2 contributes to cutaneous defense against *Staphylococcus aureus* through alpha-toxin-dependent innate immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):12873-12878. doi: 10.1073/pnas.0904958106.

Hu S, et al. Effects of chronic heat stress on Ca²⁺ homeostasis, apoptosis, and protein carbonylation profiles in the breast muscle of broilers. *Poultry Sci*. 2024;103(12):104342. doi: 10.1016/j.psj.2024.104342.

Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals*. 2019;9(10):754. doi: 10.3390/ani9100754.

Hu X, Huang YY, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. *Front Microbiol*. 2018;9:1299. doi: 10.3389/fmicb.2018.01299.

Huang J, Fan C, Ma Y, Huang G. Exploring thermal dynamics in wound healing: the impact of temperature and microenvironment. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2024;17:1251-1258. doi: 10.2147/CCID.S468396.

Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine*. 1996;8(7):548-556. doi: 10.1006/cyto.1996.0074.

Hultgren OH, Svensson L, Tarkowski A. Critical role of signaling through IL-1 receptor for development of arthritis and sepsis during *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol*. 2002;168(10):5207-5212. doi: 10.4049/jimmunol.168.10.5207.

Hume EB, Cole N, Garthwaite LL, Khan S, Willcox MD. A protective role for IL-6 in staphylococcal microbial keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(11):4926-4930. doi: 10.1167/iovs.06-0340.

Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015;16(5):448-457. doi: 10.1038/ni.3153.

Jacques SL, Prahl SA. Modeling optical and thermal distributions in tissue during laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2013;45(3):122-136. doi: 10.1002/lsm.22119.

Jori G, Fabris C, Soncin M, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):468-481. doi: 10.1002/lsm.20361.

Jørgensen LB, Sørensen JA, Jemec GB, Yderstraede KB. Methods to assess area and volume of wounds - a systematic review. *Int Wound J.* 2016;13(4):540-53. doi: 10.1111/iwj.12472.

Kahl BC, Goulian M, van Wamel W, et al. Staphylococcus aureus RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect Immun.* 2000;68(9):5385-5392. doi: 10.1128/IAI.68.9.5385-5392.2000.

Karp G, Iwasa J, Marshall W. *Karp's Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments.* 8th ed. Hoboken: Wiley; 2015.

Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(2):159-160. doi: 10.1089/pho.2010.2789.

Kashef N, Huang YY, Hamblin MR. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. *Nanophotonics.* 2017;6(5):853-879. doi: 10.1515/nanoph-2016-0189.

Katayama B, Ozawa T, Morimoto K, et al. Enhanced sterilization and healing of cutaneous pseudomonas infection using 5-aminolevulinic acid as a photosensitizer with 410-nm LED light. *J Dermatol Sci.* 2018;90(3):323-331. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.03.001.

Keshishyan ES, Hamblin MR, Navolokin NA, et al. Photodynamic therapy combined with antibiotics or antifungals against microorganisms that cause skin and soft tissue infections: a planktonic and biofilm approach to overcome resistances. *Pharmaceutics.* 2019;11(7):603. doi: 10.3390/ph14070603.

Khatib R, Sharma M, Iyer R, et al. Dalbavancin for the treatment of Staphylococcus aureus bloodstream infections: clinical experience and considerations. *Clin Infect Dis.* 2022;74(10):1779-1785. doi: 10.1093/cid/ciab860.

Khatri KA, Ross V, Grevelink JM, Magro CM, Anderson RR. Comparison of a 532 nm laser and a 532 nm laser with radiofrequency device for facial skin rejuvenation: a controlled study. *Dermatol Surg.* 2007;33(5):572-579. doi: 10.1111/j.1524-4725.2007.33117.x.

Kim D, Kim H. Study on the optimal treatment condition control of photothermal therapy under various cooling time ratios of lasers. *Int J Mol Sci.* 2022;23(22):14266. doi: 10.3390/ijms232214266.

Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010;40(7):1830-5. doi: 10.1002/eji.201040391.

Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci*. 2008; 13:2400-2407. doi: 10.2741/2853.

Koffi AA, Agnely F, Besnard M, Brossard D. [5-aminolevulinic acid prodrugs for photodynamic therapy]. *Ann Pharm Fr*. 2014;72(3):162-169. doi: 10.1016/j.pharma.2014.03.001.

Kossakowska M, Nakonieczna J, Kawiak A, Kurlenda J, Bielawski KP, Grinholc M. Discovering the mechanisms of strain-dependent response of *Staphylococcus aureus* to photoinactivation: oxidative stress toleration, endogenous porphyrin level and strain's virulence. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013;10(4):348-55. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.02.004.

Kostron H, Hasan T, editors. *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2016.

Krespi YP, Kizhner V, Kara CO. Photodynamic therapy for chronic rhinosinusitis: a preliminary report. *Am J Rhinol Allergy*. 2009;23(2):e29-32. doi: 10.2500/ajra.2009.23.3433.

Krespi YP, Kizhner V, Nistico L, Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evaluation of biofilm formation in chronic rhinosinusitis using a novel in vitro model. *Am J Otolaryngol*. 2011;32(3):198-205. doi: 10.1016/j.amjoto.2010.09.011.

Kruszewska-Naczek B, Grinholc M, Rapacka-Zdonczyk A. Mimicking the Effects of Antimicrobial Blue Light: Exploring Single Stressors and Their Impact on Microbial Growth. *Antioxidants (Basel)*. 2024;13(12):1583. doi: 10.3390/antiox13121583.

Kugelberg E, Norström T, Petersen TK, Duvold T, Andersson DI, Hughes D. Establishment of a superficial skin infection model in mice by using *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3435-3441. doi: 10.1128/AAC.49.8.3435-3441.2005.

Kuamoto JN, Acerbi VG, Sampaio GS, et al. Comparison of the effects of laser photobiomodulation at wavelength of 660 nm and 808 nm in full-thickness burns in rats: a pre-clinical study. *Lasers Med Sci*. 2025;40(1):136. doi: 10.1007/s10103-025-04391-1.

Kuffler DP. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regen Med*. 2016;11(1):107-122. doi: 10.2217/rme.15.82.

Kurosu M, Mitachi K, Yang J, et al. Antibacterial Activity of Pharmaceutical-Grade Rose Bengal: An Application of a Synthetic Dye in Antibacterial Therapies. *Molecules*. 2022;27(1):322. doi: 10.3390/molecules27010322.

Lade H, Kim JS. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanistic insights and therapeutic approaches. *Microorganisms*. 2023;11(9):2304. doi: 10.3390/microorganisms11092304.

Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):e00020-18. doi: 10.1128/CMR.00020-18.

Lambert P, Whitman C, Dyson O, Akula SM. Comprehensive analysis of photothermal therapy for biofilm treatment. *Pathogens*. 2022;11(1):80. doi: 10.3390/pathogens11010080.

Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, Martino MM. Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2018;7(7):209-231. doi: 10.1089/wound.2017.0761.

Lashkari SM, Kariminezhad H, Amani H, Mataji P, Rahimnejad M. Introduction of 5-aminolevulinic acid as a theranostics agent in dentistry. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;25:336-343. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.01.021.

Lei X, Qiu L, Lan M, et al. Antibacterial photodynamic peptides for staphylococcal skin infection. *Biomater Sci*. 2020;8(23):6695-6702. doi: 10.1039/d0bm01467b.

Li M, Zhao M, Kumar S, et al. Enhanced antimicrobial activity through the combination of antimicrobial photodynamic therapy and low-frequency ultrasonic irradiation. *Nanomedicine*. 2023;48:102652. doi: 10.1016/j.nano.2023.102652.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737.

Li Y, Wu MX. Visualization and elimination of polymicrobial biofilms by a combination of ALA-carvacrol-blue light. *J Photochem Photobiol B*. 2022;234:112525. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112525.

Li, Shuai; Liu, Yue; Yao, Yuan; Chen, Weiwei; Luo, Jie; Zheng, Jianjun; Jin, Ronghua; Zhang, Xiaobo; Li, Junwei; Zhou, Yan. Inflammatory microenvironment of skin wounds. *Front Immunol*. 2022;789274. doi: 10.3389/fimmu.2022.789274.

Liu, Chaw Yee; Bayer, Arnold; Cosgrove, Sally E.; Daum, Paul S.; Fridkin, Scott K.; Gorwitz, Rosemarie J.; Kaplan, Sharon L.; Karchmer, Allen W.; Levine, David P.; Murray, Bruce E.; Reller, Lori B.; Chambers, Henry F. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis*. 2016;52(3):e18-55. doi: 10.1093/cid/ciq146.

Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, Shirriff ME. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog*. 2016;101:56-67. doi: 10.1016/j.micpath.2016.10.028.

Longo JPF, Muchmann LA, Azevedo RB. Nanostructured carriers for photodynamic therapy applications in microbiology. In: *Science against microbial pathogens communicating current research and technological advances*. 2011; p. 189-196.

Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med. 1998;339(8):520-532. doi: 10.1056/NEJM199808203390806.

Luisier F, Vonesch C, Blu T, Unser M. Fast interscale wavelet denoising of Poisson-corrupted images. Signal Processing. 2010;90(2):415-427. doi: 10.1016/j.sigpro.2009.07.009.

Maisch T. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. J Photochem Photobiol B. 2015;150:2-10. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.05.010.

Mamone LA, Tomás R, Gándara L, Di Venosa G, Durantini E, Buzzola F, Casas A. Laser NIR irradiation enhances antimicrobial photodynamic inactivation of biofilms of Staphylococcus aureus. Preprint. 2024. doi: 10.1101/2024.05.08.593196.

Martin JM, Zenilman JM, Lazarus GS. Molecular microbiology: new dimensions for cutaneous biology and wound healing. J Invest Dermatol. 2010;130(1):38-48. doi: 10.1038/jid.2009.221.

Martin MD, Danahy DB, Hartwig SM, Harty JT, Badovinac VP. Revealing the Complexity in CD8 T Cell Responses to Infection in Inbred C57B/6 versus Outbred Swiss Mice. Front Immunol. 2017;8:1527. doi: 10.3389/fimmu.2017.01527.

Martelli P, Corradini S, Cavarani S, Luppi A. El sistema inmunitario y la inmunidad en el cerdo: la piel. 3tres3.com. 2017. Disponible en: https://www.3tres3.com/articulos/el-sistema-inmunitario-y-la-inmunidad-en-el-cerdo-la-piel_39194/

Martinez C, García A, López F, et al. Evolution and spread of the Chilean-Cordobes MRSA clone in healthcare settings. J Antimicrob Chemother. 2019;74(7):2034-2041. doi: 10.1093/jac/dkz147.

Martinez C, García A, López F, et al. Community dissemination of the Chilean-Cordobes MRSA clone: molecular epidemiology and clinical characteristics. Microb Drug Resist. 2023;29(4):161-169. doi: 10.1089/mdr.2022.0142.

Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GF, Guimaraes FR, Leite MN, Leite SN, Frade MAC. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. Int J Exp Pathol. 2020;101(1-2):21-37. doi: 10.1111/iep.12346.

Maczyszyn K, Myszkiewicz A, Puchała M, et al. Phototherapy devices and systems for antimicrobial applications. J Photochem Photobiol C. 2023;55:100571. doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2023.100571.

Mauzerall D, Granick S. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. J Biol Chem. 1956;219(1):435-446.

Medina G, Egea AL, Otaegui L, et al. MRSA epidemiology and molecular characteristics in Argentina: first multicenter study. Int J Med Microbiol. 2013;303(8):457-464. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.06.009.

Megías M, Molist P, Pombal MA. Atlas de histología vegetal y animal. 2023. Disponible en: <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>. Consultado marzo 2023.

Michalik M, Szymańczyk J, Stajnke M, Ochrymiuk T, Cenian A. Medical applications of diode lasers: pulsed versus continuous wave (cw) regime. *Micromachines* (Basel). 2021;12(6):710. doi: 10.3390/mi12060710.

Miller LS, O'Connell RM, Gutierrez MA, et al. MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against *Staphylococcus aureus*. *Immunity*. 2007;26(1):79-91. doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.014.

Ministerio de Salud de la Nación Argentina. 4ª Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Resultados definitivos. Buenos Aires; 2019.

Miyachi H, Wakabayashi S, Sugihira T, Aoyama R, Saijo S, Koguchi-Yoshioka H, Fujimoto M, Núñez G, Matsue H, Nakamura Y. Keratinocyte IL-36 Receptor/MyD88 Signaling Mediates *Malassezia*-Induced IL-17--Dependent Skin Inflammation. *J Infect Dis*. 2021;223(10):1753-1765. doi: 10.1093/infdis/jiab194.

Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res*. 2003;23(5A):3591-3600.

Morimoto K, Ozawa T, Awazu K, et al. Photodynamic therapy using systemic administration of 5-aminolevulinic acid and a 410-nm wavelength light-emitting diode for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected ulcers in mice. *PLoS One*. 2014;9(8):e105173. doi: 10.1371/journal.pone.0105173.

Murray PR. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2006.

Nazar JC. Bacterial biofilms. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello*. 2007;67:61-72.

Neuman KC, Chadd EH, Liou GF, Bergman K, Block SM. Characterization of photodamage to *Escherichia coli* in optical traps. *Biophys J*. 1999;77(5):2856-2863. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77117-1.

Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(10):679-691. doi: 10.1038/nri2622.

Nesi-Reis V, Lera-Nonose DSSL, Oyama J, Silva-Lalucci MPP, Demarchi IG, Aristides SMA, Teixeira JJV, Silveira TGV, Lonardoni MVC. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;21:294-305. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.12.015.

Nippe N, Varga G, Holzinger D, Löffler B, Medina E, Becker K, Roth J, Ehrchen JM, Sunderkötter C. Subcutaneous infection with *S. aureus* in mice reveals association of resistance with influx of neutrophils and Th2 response. *J Invest Dermatol*. 2011;131(1):125-32. doi: 10.1038/jid.2010.282.

Norman G, Dumville JC, Moore ZE, Tanner J, Christie J, Goto S. Antibiotics and antiseptics for pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;4:CD011586. doi: 10.1002/14651858.CD011586.pub2.

Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet*. 2008;42:541-564. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.090442.

Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2004;73(1-2):1-28. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002.

Orenstein A, Klein D, Kopolovic J, et al. The use of porphyrins for eradication of *Staphylococcus aureus* in burn wound infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997;19(4):307-314. doi: 10.1111/j.1574-695X.1997.tb01101.x.

Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol*. 2013;17:32-37. doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004.

Oyama J, et al. Photodynamic therapy in wound healing in vivo: a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;30:101682. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101682.

Ovchinnikov KV, Kranjec C, Thorstensen T, Carlsen H, Diep DB. Successful Development of Bacteriocins into Therapeutic Formulation for Treatment of MRSA Skin Infection in a Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(10):e00829-20. doi: 10.1128/aac.00829-20.

Pahissa A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Valencia: Marge Médica Books; 2009.

PAHO. Report on antimicrobial resistance surveillance in the region of the Americas 2020. Washington, DC: Pan American Health Organization; 2021.

Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(5):289-301. doi: 10.1038/nri3646.

Percival SL, Emanuel C, Cutting KF, Williams DW. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int Wound J*. 2012;9(1):14-32. doi: 10.1111/j.1742-481X.2011.00836.x.

Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol*. 2015;64(Pt 4):323-334. doi: 10.1099/jmm.0.000032.

Percival SL, McCarty SM, Lipsky B. Biofilms and wounds: an overview of the evidence. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2019;4(7):373-381. doi: 10.1089/wound.2014.0557.

Pérez-Laguna V, García-Malinis AJ, Aspiroz C, Rezusta A, Gilaberte Y. Antimicrobial effects of photodynamic therapy. *G Ital Dermatol Venereol*. 2018;153(6):833-846. doi: 10.23736/S0392-0488.18.06007-8.

Pérez-Laguna V, Gilaberte Y, Millán-Lou MI, et al. A combination of photodynamic therapy and antimicrobial compounds to treat skin and mucosal infections: a systematic review. *Photochem Photobiol Sci*. 2019;18(5):1020-1029. doi: 10.1039/c8pp00534f.

Perni S, Pratten J, Wilson M, et al. Antimicrobial properties of light-activated polyurethane containing indocyanine green. *J Biomater Appl*. 2011;25(4):387-400. doi: 10.1177/0885328209354930.

Perotti C, Casas A, Fukuda H, et al. Topical application of ALA and ALA hexyl ester on a subcutaneous murine mammary adenocarcinoma: tissue distribution. *Br J Cancer*. 2003;88(3):432-437. doi: 10.1038/sj.bjc.6600665.

Perotti C, Fukuda H, DiVenosa G, MacRobert AJ, Batlle A, Casas A. Porphyrin synthesis from ALA derivatives for photodynamic therapy. In vitro and in vivo studies. *Br J Cancer*. 2004;90(8):1660-5. doi: 10.1038/sj.bjc.6601722.

Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg*. 2005;31(3):334-340. doi: 10.1111/j.1524-4725.2005.31086.

Pottier R, Kennedy JC. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. *J Photochem Photobiol B*. 1990;8(1):1-16. doi: 10.1016/1011-1344(90)85183-w.

Pouget C, Dunyach-Remy C, Magnan C, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP. Polymicrobial biofilm organization of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a chronic wound environment. *Int J Mol Sci*. 2022;23(18):10761. doi: 10.3390/ijms231810761.

Prado TP, Zanchetta FC, Barbieri B, et al. Photobiomodulation with blue light on wound healing: a scoping review. *Life (Basel)*. 2023;13(2):575. doi: 10.3390/life13020575.

Rapacka-Zdończyk A, Woźniak A, Michalska K, Pierański M, Ogonowska P, Grinholc M, Nakonieczna J. Factors Determining the Susceptibility of Bacteria to Antibacterial Photodynamic Inactivation. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:642609. doi: 10.3389/fmed.2021.642609.

Rapacka-Zdonczyk A, Wozniak A, Nakonieczna J, Grinholc M. Development of Antimicrobial Phototreatment Tolerance: Why the Methodology Matters. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):2224. doi: 10.3390/ijms22042224.

Rapacka-Zdonczyk A, Wozniak A, Pieranski M, et al. Development of *Staphylococcus aureus* tolerance to antimicrobial photodynamic inactivation and antimicrobial blue light upon sub-lethal treatment. *Sci Rep*. 2019;9(1):9423. doi: 10.1038/s41598-019-45962-x.

Rastelli ANS, Hernández-Vázquez RA, Santos FB, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: current trends and future perspectives. *Photochem Photobiol Sci*. 2022;21(3):473-493. doi: 10.1007/s43630-021-00154-8.

Rennie MY, Lindvere-Teene L, Tapang K, Linden R. Point-of-care fluorescence imaging predicts the presence of pathogenic bacteria in wounds: a clinical study. *J Wound Care*. 2017;26(8):452-460. doi: 10.12968/jowc.2017.26.8.452.

Rittié L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *J Cell Commun Signal*. 2016;10(2):103-120. doi: 10.1007/s12079-016-0330-1.

Robert G, Daysi E, Ana P, et al. Revisión Bibliográfica sobre la Presencia de *Staphylococcus Aureus* Meticilinoresistentes en Personal de la Salud. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*. 2023;7(5):3541-3555. doi: 10.37811/cl_rcm.v7i5.7974.

Rowland MB, Moore PE, Bui C, Correll RN. Assessing wound closure in mice using skin-punch biopsy. *STAR Protocols*. 2023;4(1):101989. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101989.

Ryvak M, Collier L, Dean K, et al. Treatment of community-acquired MRSA skin and soft tissue infections. *Am Fam Physician*. 2020;102(11):672-680.

Sabino CP, Ribeiro MS, Wainwright M, et al. The biochemical mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2023;99(2):742-750. doi: 10.1111/php.13685.

Sahu K, Krishna H, Shrivastava R, et al. Evaluation of the potential of Delta-aminolevulinic acid for simultaneous detection of bioburden and anti-microbial photodynamic therapy of MRSA infected wounds in Swiss albino mice. *J Photochem Photobiol B*. 2024;254:112892. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2024.112892.

Sahu K, Sharma M, Bansal H, Dube A, Gupta PK. Topical photodynamic treatment with poly-L-lysine-chlorin p6 conjugate improves wound healing by reducing hyperinflammatory response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds of mice. *Lasers Med Sci*. 2013;28(2):465-471. doi: 10.1007/s10103-012-1083-6.

Sajjad F, Sun NN, Chen T, et al. Evaluation of antimicrobial photodynamic activities of 5-aminolevulinic acid derivatives. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2021;37(4):296-305. doi: 10.1111/phpp.12652.

Sakr A, Brégeon F, Mège JL, Rolain JM, Blin O. *Staphylococcus aureus* nasal colonization: an update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. *Front Microbiol*. 2018;9:2419. doi: 10.3389/fmicb.2018.02419.

Salisbury AM, Woo K, Sarkar S, et al. Tolerance of biofilms to antimicrobial agents: mechanisms and clinical significance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018;16(8):629-640. doi: 10.1080/14787210.2018.1503712.

Samuel IDW, Namdas EB, Turnbull GA. How to recognize lasing. *Nat Photonics*. 2019;13(1):56-63. doi: 10.1038/s41566-018-0320-3.

Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170-181. doi: 10.1038/nri2711.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(5):878-888. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.

Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen*. 2017;15 Suppl 1:S1-S28. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00204.x.

Sennhenn-Kirchner S, Klaue S, Wolff N, et al. Microbiological characterization of peri-implantitis: a clinical study. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(1):126-132. doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01401.x.

Sellera FP, Sabino CP, Núñez SC, Ribeiro MS. Clinical acceptance of antimicrobial photodynamic therapy in the age of WHO global priority pathogens: So what we need to move forward? *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2022;40:103158.

Senet P. Fisiología de la cicatrización cutánea. *EMC - Dermatología*. 2008;42(1):1-10. doi: 10.1016/S1761-2896(08)70356-X.

Serini SM, Cannizzaro MV, Dattola A, et al. The efficacy and tolerability of 5-aminolevulinic acid 5% thermosetting gel photodynamic therapy (PDT) in the treatment of mild-to-moderate acne vulgaris. A two-center, prospective assessor-blinded, proof-of-concept study. *J Cosmet Dermatol*. 2019;18(1):156-162. doi: 10.1111/jocd.12670.

Sgouros G, Bodei L, McDevitt MR, Nedrow JR. Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(9):589-608. doi: 10.1038/s41573-020-0073-9.

Signore A, Mather SJ, Piaggio G, et al. Molecular imaging of inflammation/infection: nuclear medicine and optical imaging agents and methods. *Chem Rev*. 2010;110(5):3112-3145. doi: 10.1021/cr900351r.

Silveira PC, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2009;95(2):89-92. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.01.001.

Sim P, Strudwick XL, Song Y, Cowin AJ, Garg S. Influence of acidic pH on wound healing in vivo: a novel perspective for wound treatment. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):13655. doi: 10.3390/ijms232113655.

Sola C, Gribaudo G, Vindel A, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a teaching hospital in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2002;34(2):87-94.

Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*. 2001;19(1):29-33. doi: 10.1089/104454701753342758.

Songca SP, Adjei Y. Applications of antimicrobial photodynamic therapy against bacterial biofilms. *Int J Mol Sci*. 2022;23(6):3209. doi: 10.3390/ijms23063209.

Soukos NS, Som S, Abernethy AD, et al. Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(7):4126-4132. doi: 10.1128/AAC.05254-14.

Sridharan K, Sivaramakrishnan G. Photodynamic therapy for localized infections: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021;34:102340. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102340.

Sulaiman JE, Lam H. Evolution of bacterial tolerance under antibiotic treatment and its implications on the development of resistance. *Front Microbiol*. 2021;12:617412. doi: 10.3389/fmicb.2021.617412.

Stevens WG, et al. Expression of HSP70 in human skin after cryolipolysis treatment. *Aesthetic Surg J*. 2023;43(11):NP910-NP915. doi: 10.1093/asj/sjad178.

Sun Y, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in skin wound healing: a systematic review of animal studies. *Int Wound J*. 2020;17(2):285-299. doi: 10.1111/iwj.13269.

Sun Y, Ogawa R, Xiao BH, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to antibiotic therapy. *Pharmaceutics*. 2023;15(2):775. doi: 10.3390/pharmaceutics15020775.

Takeya H. Preparation of 5-aminolevulinic acid alkyl esters as herbicides. *Chem Abstr*. 1992;116:9.

Tan Y, Bai Y, Li F, et al. Evaluation of ALA-PDT combined with antibiotics for the treatment of skin ulcers with sinus tract formation: a pilot study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;31:101802. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101802.

Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10):a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295.

Tappeiner H, Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffe. *Muench Med Wochenschr*. 1903;47:2042-2044.

Thomas-Moore N, Barbosa F, Forti F, et al. Recent advances in nanoparticle-mediated antimicrobial photodynamic therapy. *Molecules*. 2020;25(23):5577. doi: 10.3390/molecules25235577.

Tsai SR, Hamblin MR. Biological effects and medical applications of infrared radiation. *J Photochem Photobiol B*. 2017;170:197-207. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.014.

Tsuchiya K, Kawamura T, Takahashi M, et al. Enhanced antimicrobial photodynamic therapy using light irradiation with multiple treatment sessions. *Lasers Med Sci*. 2020;35(3):729-734. doi: 10.1007/s10103-019-02888-0.

Turčanová M, et al. Full-range optical imaging of planar collagen fiber orientation using polarized light microscopy. *Biomed Res Int*. 2021;2021:6879765. doi: 10.1155/2021/6879765.

Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(4):203-218. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4.

Uciechowski P, Dempke WCM. Interleukin-6: a masterplayer in the cytokine network. *Oncology*. 2020;98(3):131-137. doi: 10.1159/000505099.

Uehlinger P, Zellweger M, Wagnières G, Juillerat-Jeanneret L, van den Bergh H, Lange N. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B*. 2000;54(1):72-80. doi: 10.1016/s1011-1344(99)00159-1.

Vallejo MCS, Moura NMM, Gomes ATPC, et al. The role of porphyrinoid photosensitizers for skin wound healing. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):4121. doi: 10.3390/ijms22084121.

Vallejo MCS, Moura NMM, Ferreira Faustino MA, et al. An insight into the role of non-porphyrinoid photosensitizers for skin wound healing. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):234. doi: 10.3390/ijms22010234.

van de Vosse E, van Dissel JT, Ottenhoff TH. Genetic deficiencies of innate immune signalling in human infectious disease. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(12):1000-1012. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70195-8.

Vecchio D, Dai T, Huang L, Fantetti L, Roncucci G, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy with RLP068 kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and improves wound healing in a mouse model of infected skin abrasion PDT with RLP068/Cl in infected mouse skin abrasion. *J Biophotonics*. 2013;6(9):733-42. doi: 10.1002/jbio.201200121.

Vieceli AS, Silveira PCL, Zaccaron RP, et al. Influence of photobiomodulation and radiofrequency on the healing of pressure lesions in mice. *Lasers Med Sci*. 2024;39(1):280. doi: 10.1007/s10103-024-04226-5.

Vogel A, Venugopalan V. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem Rev*. 2003;103(2):577-644. doi: 10.1021/cr010379n.

Volpe DA. Advances in cell-based permeability assays to screen drugs for intestinal absorption. *Expert Opin Drug Discov*. 2020;15(5):539-549. doi: 10.1080/17460441.2020.1735347.

Wainwright M, Maisch T, Nonell S, et al. Photoantimicrobials-are we afraid of the light? *Lancet Infect Dis*. 2017;17(2):e49-e55. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30268-7.

Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, et al. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2023;370:fnac098. doi: 10.1093/femsle/fnac098.

Waldvogel FA. Staphylococcus aureus (including staphylococcal toxic shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Churchill Livingstone; 2000. p. 2069-2092.

Wang HW, Wang XL, Zhang LL, Guo MX, Huang Z. Aminolevulinic acid (ALA)-assisted photodynamic diagnosis of subclinical and latent HPV infection of external genital region. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2008;5(4):251-255. doi: 10.1016/j.pdpdt.2008.11.004.

Wang J, Li R, Lu X, et al. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic diagnosis in oral and maxillofacial oncology: a systematic review. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2008;5(4):271-275. doi: 10.1016/j.pdpdt.2008.12.004.

Wang S, Gao J, Wang Z. Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2019;11(2):e1523. doi: 10.1002/wnan.1523.

Wang W, Tabu K, Hagiya Y, et al. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation. Sci Rep. 2017;7:42070. doi: 10.1038/srep42070.

Wang Y, Fan H, Li Y, et al. Enhanced antimicrobial photodynamic therapy: recent advances and prospects. Pharmaceutics. 2025;17(1):89. doi: 10.3390/pharmaceutics17010089.

Weber SG, Gold HS, Hooper DC, Karchmer AW, Carmeli Y. Fluoroquinolones and the risk for methicillin-resistant Staphylococcus aureus in hospitalized patients. Emerg Infect Dis. 2003;9(11):1415-1422. doi: 10.3201/eid0911.030284.

Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. Cancer Res. 1976;36(7 Pt 1):2326-2329.

Welling MM, Hensbergen AW, Bunschoten A, et al. Fluorescent imaging of bacterial infections and recent advances made with multimodal radiopharmaceuticals. Clin Transl Imaging. 2019;7(2):125-138. doi: 10.1007/s40336-019-00322-7.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev. 2003;83(3):835-870. doi: 10.1152/physrev.00032.2002.

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva: World Health Organization; 2021.

WHO. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. ISBN: 978 92 4 002733 6.

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health Organization; 2024.

Wiehe A, O'Brien JM, Senge MO. Trends and targets in antiviral phototherapy. Photochem Photobiol Sci. 2019;18(11):2565-2612. doi: 10.1039/c9pp00211a.

Wolcott RD, Hanson JD, Rees EJ, et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair Regen.* 2016;24(1):163-174. doi: 10.1111/wrr.12370.

Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, et al. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care.* 2010;19(2):45-53. doi: 10.12968/jowc.2010.19.2.46966.

Wong VW, Sorkin M, Glotzbach JP, Longaker MT, Gurtner GC. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:969618. doi: 10.1155/2011/969618.

Xiao T, Yan Z, Xiao S, et al. Proinflammatory cytokines regulate epidermal stem cells in wound epithelialization. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11:232. doi: 10.1186/s13287-020-01755-y.

Xu M, Li L, Hu Q. The recent progress in photothermal-triggered bacterial eradication. *Biomater Sci.* 2021;9(6):1995-2008. doi: 10.1039/d0bm02057e.

Xu N, Zhang X, Qi T, et al. Biomedical applications and prospects of temperature-orchestrated photothermal therapy. *MedComm Biomater Appl.* 2022;1(1):e25. doi: 10.1002/mba2.25.

Xu Z, Gao Y, Meng S, et al. Mechanism and in vivo evaluation: photodynamic antibacterial chemotherapy of lysine-porphyrin conjugate. *Front Microbiol.* 2016;7:242. doi: 10.3389/fmicb.2016.00242.

Xue M, Jackson CJ. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015;4(3):119-136. doi: 10.1089/wound.2013.0485.

Yang T, Tan Y, Zhang W, et al. Effects of ALA-PDT on the healing of mouse skin wounds infected with *Pseudomonas aeruginosa* and its related mechanisms. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8:585132. doi: 10.3389/fcell.2020.585132.

Yang Z, et al. Photodynamic therapy accelerates skin wound healing through promoting re-epithelialization. *Burns Trauma.* 2021;9:tkab008.

Youn I, Bae IG, Tsuji BT, et al. Comparative efficacy of telavancin, vancomycin, daptomycin, and linezolid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rabbit model of acute hematogenous osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(1):149-156. doi: 10.1093/jac/dky397.

Youn I, Park S, Ko Y, et al. Standard mouse models of cutaneous *Staphylococcus aureus* infection: a systematic review. *Pathogens.* 2020;9(6):420. doi: 10.3390/pathogens9060420.

Yi X, Duan QY, Wu FG. Low-temperature photothermal therapy: strategies and applications. *Research (Wash D C).* 2021;2021:9816594. doi: 10.34133/2021/9816594.

Zak O, Sande ME. HANDBOOK OF ANIMAL MODELS OF INFECTION: EXPERIMENTAL MODELS IN ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. Shock. 2000;13(3):252.

Zhang J, Zhao Y, Zhao X, et al. Efficacy and safety of red and infrared light in the adjunctive treatment on diabetic foot ulcers: a systematic review and meta-analysis. Complement Ther Clin Pract. 2024;57:101906. doi: 10.1016/j.ctcp.2024.101906.

Zhang Z, Zhang Q, Wang T, et al. Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes. Nat Commun. 2022;13:1553. doi: 10.1038/s41467-022-29283-8.

Zhang Y, et al. Exploring thermal dynamics in wound healing: the impact of temperature and microenvironment. Chronic Care Innovation Dermatol. 2024;PMC11144001.