

## **Towards personalized medicine in antibiotic treatment: The development of a Real-Time Cell Analysis system for biofilm studies**

### **RESUMEN**

**Antecedentes:** Las biopelículas bacterianas y fúngicas contribuyen enormemente a la persistencia de muchas infecciones graves y potencialmente mortales, las cuales anualmente provocan millones de defunciones. Además, estas bacterias y hongos que crecen adheridas formando biopelículas son hasta 1.000 veces más resistentes a los tratamientos antimicrobianos convencionales, generando una carga económica significativa y dificultando su diagnóstico y tratamiento. Por tanto, es necesario buscar nuevas herramientas fiables para estudiar la dinámica de formación de biopelículas con el fin de mejorar las estrategias de tratamiento.

**Objetivos:** El objetivo general de la tesis doctoral es la puesta a punto de un sistema basado en medidas de impedancia eléctrica para el estudio de la formación y dinámica de crecimiento de las biopelículas bacterianas (gram-positivas y gram-negativas) y fúngicas, así como de biopelículas complejas multi-especie como las de la placa dental subgingival de muestras periodontales humanas. Tras la puesta a punto del sistema, los objetivos específicos de la tesis doctoral son su aplicación como herramienta en la identificación de tratamientos efectivos contra biopelículas persistentes, la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos con actividad anti-biofilm, así como la evaluación de novedosas nanopartículas autopropulsadas para la erradicación de biofilms multirresistentes. Finalmente, se ha evaluado su aplicación clínica directa en la selección de la terapia antibiótica para el tratamiento personalizado de pacientes con enfermedad periodontal.

**Métodos:** Para el estudio de las dinámicas de crecimiento y los patrones de erradicación de la formación de biopelículas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*) y fúngicas (*Candida* spp.) se ha utilizado el sistema xCELLigence de análisis celular en tiempo real (del inglés RTCA). Diferentes antibióticos convencionales, antifúngicos y compuestos anti-biofilm han sido testados, solos y en combinación, para determinar su efecto *in vitro* en la prevención y erradicación de las biopelículas. Además, el sistema también ha sido empleado para evaluar el efecto de nuevas nanopartículas autopropulsadas en la eliminación de biopelículas de *S. aureus* maduras. Por otro lado, para la confirmación de los resultados obtenidos con el sistema xCELLigence se han empleado diferentes metodologías

estándares de estudio de los biofilms a tiempo final como son la tinción con cristal violeta, los recuentos de células viables y diferentes técnicas de microscopía. Además, se han realizado análisis genómicos para el estudio de las variantes bacterianas persistentes de *P. aeruginosa*. Por último, se ha llevado a cabo un ensayo clínico aleatorizado doble ciego de dos grupos paralelos en pacientes con periodontitis crónica donde se comparó la mejora clínica y microbiológica observada en los pacientes tras el tratamiento antibiótico sugerido por el sistema de impedancia o por los métodos actuales basados en la cuantificación de patógenos periodontales mediante PCR-hibridación. Los pacientes fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos (xCELLigence vs. método actual de selección de antibiótico), y fueron tratados con el antibiótico sugerido en cada caso. Al mes y a los dos meses tras el tratamiento, se evaluó en ambos grupos la mejora observada en los parámetros clínicos (profundidad de las bolsas periodontales, sangrado al sondaje, pérdida de inserción clínica y la presencia de placa) así como los cambios en microbiota oral, mediante secuenciación del gen 16S rRNA de las muestras periodontales

**Resultados:** En esta tesis doctoral se ha evaluado exhaustivamente las dinámicas de crecimiento y los patrones de erradicación de biopelículas bacterianas gram-positivas (estafilocócicas) y gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*), fúngicas (*Candida* spp.) y de biopelículas complejas multiespecies (placa dental subgingival de pacientes con enfermedad periodontal) utilizando el sistema xCELLigence basado en mediciones de valores de impedancia en tiempo real. Específicamente, se ha demostrado que un nuevo antibiótico del grupo de los lipoglucopeptidos, la dalbavancina, tiene propiedades inhibitorias sobre las biopelículas estafilocócicas, testado solo y en combinación con otros compuestos antiagregación. En segundo lugar, se ha evaluado el efecto de diferentes antibióticos convencionales tanto en la prevención como en la erradicación de las biopelículas en *P. aeruginosa*. Además, tras la exposición de las biopelículas maduras de *P. aeruginosa* a determinados antibióticos, se han podido identificar una fracción de células persistentes que mediante el uso combinado con manitol se consiguieron erradicar. Lo que sugiere que el uso combinado del manitol junto con los antibióticos convencionales podría ser una buena alternativa en el tratamiento de infecciones asociadas a biopelículas y evitar la aparición de células persistentes. Por otro lado, se ha estudiado la formación de biopelículas fúngicas de *Candida* spp. en tiempo real por primera vez, utilizando medidas de impedancia. Con este sistema, se ha podido evaluar el efecto anti-biofilm del compuesto natural andrografolida, que es el principal componente bioactivo de la planta medicinal *Andrographis paniculata*, y que ha resultado ser un

extraordinario agente anti-biofilm. Además, se ha testado el efecto de novedosas nanopartículas porosas de sílice con movimiento, impulsadas por concentraciones bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que han mostrado ser eficaces para la erradicación de biopelículas maduras de *S. aureus*. Finalmente, el ensayo clínico aleatorizado doble ciego llevado a cabo ha demostrado que el sistema basado en medidas de impedancia es una herramienta rápida, barata y eficaz para el estudio en tiempo real de las biopelículas multiespecie de muestras periodontales, al permitir una selección del tratamiento antibiótico individualizado con mejores resultados clínicos en pacientes con enfermedad periodontal comparado con los métodos actuales.

En conclusión, los resultados de la tesis doctoral sugieren que este sistema de impedancia podría usarse como herramienta rápida y reproducible en la investigación de biopelículas, tanto para testar el efecto de nuevos compuestos o nanomateriales antimicrobianos con propiedades anti-biofilms, así como en entornos clínicos para la evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos de infecciones causadas por biopelículas.