

Dispositivo para el estudio de adhesión bacteriana en prótesis metálicas: formación de biopelículas en contacto con superficies metálicas

Eugenio Exequiel Balbi¹, Mario Spector², Carolina Daniela Galetto³, Cecilia Isabel Sánchez⁴ y Gastón Leonardo Miño^{1,3,5,6}

Autores:

¹ Grupo de Investigación en Microfluídica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos (FIUNER)

² Laboratorio de Materiales del Depto. Electromecánica de UTN Reg. Paraná

³ Laboratorio de Microscopía Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LMAE) de FIUNER

⁴ Cátedra Biología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de UNER

⁵ Cátedra Biomateriales y Biocompatibilidad del Departamento Bioingeniería de FIUNER

⁶ Instituto de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática (IBB, CONICET – UNER)

Contacto: gaston.lm@uner.edu.ar

ARK: <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/whabk5o5p>

RESUMEN

La adhesión bacteriana sobre superficies de los materiales puede conducir al desarrollo de biopelículas responsables de infecciones en pacientes. Una detallada comprensión de los mecanismos involucrados en la adhesión bacteriana puede facilitar el desarrollo de superficies “antibacterianas”. En los últimos años el avance por generar nuevos materiales y estrategias que combatan las infecciones en implantes está creciendo.

El proyecto intenta aplicar técnicas microfluídicas, microscópicas y de procesamiento de imagen para investigar los procesos de interacción entre bacterias y superficies. Los primeros pasos para consolidar este tipo de líneas innovadoras en FIUNER requirieron desarrollar protocolos para observar distintos procesos biológicos a microescala usando diferentes técnicas microscópicas y adaptando el desarrollo de dispositivos microfluídicos a la infraestructura disponible. El desarrollo del proyecto permitió estudiar otros problemas que involucran sistemas microbiológicos, y gracias al enfoque biofísico se pudieron determinar y caracterizar el transporte y las dinámicas involucradas en este tipo particular de suspensiones activas. Durante el proyecto se estudió el desarrollo de biopelículas en sustratos semisólidos y sólidos, se determinó la movilidad de diferentes cepas bacterianas y células eucariotas y también se propusieron soluciones mediante el modelado de este tipo de sistemas.

Palabras clave: Biopelículas, interacciones material-bacterias, influencia campo eléctrico y células, microfluidic, microdispositivos, microscopia, bioimágenes

Objetivos propuestos y cumplidos

El presente trabajo de investigación pretende desarrollar dispositivos que permitan estudiar de forma sistematizada las interacciones bacterianas con superficies metálicas, con el objetivo de dar respuesta a aspectos aún desconocidos de la formación de biopelículas y del proceso infeccioso de prótesis metálicas utilizadas tanto en osteosíntesis como en reemplazo articular.

El proyecto logró en gran medida avanzar la investigación sobre diferentes aspectos básicos relacionados a las interacciones de bacterias con superficies utilizadas en el campo de los biomateriales y la formación de biopelículas. También se logró avanzar en el estudio de la interacción de campos eléctricos y células bacterianas.

Con este proyecto se logró adquirir equipamientos específicos para la fabricación de microdispositivos, expandiendo así las capacidades del grupo. Esto permitió brindar servicios de asistencia a un grupo de investigación de la Universidad Nacional de Córdoba y a la empresa startup Selectivity dedicada a facilitar el acceso al tratamiento de fertilidad. También se comenzó a colaborar con otros investigadores de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos (FIUNER) y el Instituto de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática (IBB). El desarrollo de dispositivos microfluídicos permitió estudiar la evolución de los fenómenos de acumulación bacteriana y formación de biopelículas en superficies curvas que se vieron reflejadas en publicaciones.

Para el estudio de procesos bacterianos se logró generar protocolos adaptados a las facilidades de LAMAE para poder conservar y replicar cultivos bacterianos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Además, se caracterizaron los crecimientos de las biopelículas de cada cepa en medio de cultivo LB agar. Estas experiencias, además, permitieron proyectar mejoras en el área de docencia de grado al implementar trabajos prácticos de laboratorio durante el cursado de Biomateriales y Biocompatibilidad tanto para el manejo de cultivo bacterianos con buenas prácticas para evitar contaminaciones con otros microorganismos ambientales como así también observar el efecto de esterilización de piezas metálicas mediante antibióticos y el efecto de la rugosidad superficial.

La caracterización de diferentes procesos de transporte en suspensiones biológicas dentro de canales microfluídicos y la adhesión bacteriana se logró gracias al análisis de imágenes obtenido por diferentes técnicas microscópicas. Estos análisis involucraron el seguimiento (o en inglés "tracking") individual de células móviles (tanto de *Escherichia coli* como de células coanoflageladas) y la cuantificación de intensidades fluorescentes de bacterias marcadas adheridas a la superficie.

En colaboración con el Prof. Mario Spector, quien está desarrollando la tesis doctoral bajo la dirección del Dr. Miño, se comenzó con el estudio de la interacción de suspensiones de levaduras sometidas a campos eléctricos.

El proyecto permitió fortalecer las líneas de investigación propuestas que se ven reflejadas en la formación de recursos de alumnos de grado, de la maestría y del doctorado. Además, se generaron nuevas colaboraciones ampliándose a otras áreas de investigación con integrantes de FIUNER e IBB, y unidades académicas de Buenos Aires y Córdoba.

La participación a congresos nacionales e internacionales en el área de Microfluídica, Microbiología y Materia Blanda dan cuenta de un abordaje interdisciplinario de esta temática actual. Las publicaciones científicas durante el proyecto han permitido plasmar los avances logrados y han dado antecedente a las colaboraciones que se están llevando a cabo.

Marco teórico y metodológico

Las infecciones relacionadas con prótesis son complicaciones graves en pacientes que han sufrido cirugías de reemplazo articular o de fijación de fracturas mediante la utilización de placas o clavos. Las

infecciones relacionadas con este tipo de dispositivos son difíciles de erradicar y a veces requieren de cirugías restauradoras (Song, et al., 2015, Mountcastle et al., 2021). De aquí que el paciente puede sufrir hasta tres intervenciones (primera implantación, extracción de la prótesis infectada y reimplantación de otra prótesis). Este proceso muy perjudicial para el paciente produce asimismo un alto costo en los sistemas de salud. Según el Boletín Epidemiológico Periódico del Ministerio de Salud de la Nación (2007), en el año 2006 se registraron entre 9,21% y 8,33% infecciones en cirugías de reemplazo articulación de cadera y rodilla, respectivamente. Hace casi una década se estimaba que las cifras de pacientes con infecciones en prótesis aumentarían debido a que, al momento del estudio, se esperaba que el número de pacientes mayores a 50 años con enfermedades óseas se iba a duplicar (Ribeiro et al. 2012). Estudios realizados en la Clínica Santa Isabel en Buenos Aires, revelaron que los factores de riesgos que podrían producir infecciones del sitio quirúrgico están relacionados a la edad del paciente (>55 años), la inmunosupresión, y tiempos quirúrgicos requeridos para su realización (Ortiz et al., 2014). Un reciente estudio realizado en una clínica de Córdoba indicó que, de 181 cirugías de artroplastia de cadera, el 12,7% desarrollaron infecciones post quirúrgicas (Buasso et al., 2020). En la escala mundial hay estudios que muestran un incremento de infecciones en cirugías de reemplazo total de rodillas en Estados Unidos (Lachman et al., 2018).

Las infecciones asociadas a implantes son el resultado de la adhesión bacteriana a la superficie de la prótesis y la subsecuente formación de biopelículas (del inglés *biofilm*). La formación del biofilm tiene lugar en varias etapas (Hall-Stoodley et al, 2004; Kolter & Greenberg, 2006), comenzando con la rápida adhesión celular a la superficie, seguida de la proliferación bacteriana en multicapas y la adhesión entre células dentro de una matriz polisacárida extracelular (Trampuz et al., 2003; Tande & Patel, 2014). La formación de biopelículas en dispositivos médicos presenta mayormente tres problemas. Primero, la comunidad bacteriana en esas superficies representa un reservorio de agentes patógenos que pueden ser liberados al organismo del paciente produciendo infecciones crónicas. Segundo, las bacterias dentro de la biopelícula son altamente resistentes a los tratamientos con antibióticos; en consecuencia, una vez que la comunidad bacteriana se establece sobre la superficie, es extremadamente difícil su eliminación con terapias antimicrobianas convencionales. Por último, dado a que la respuesta del huésped y las terapias antimicrobiales son incapaces de eliminar el crecimiento de bacteria dentro del biofilm, se puede producir una respuesta inflamatoria crónica en el sitio del implante (Costerton et al., 1999; Donlan, 2001; Høiby et al., 2010).

En los últimos años, se ha mostrado como la presencia de defectos por procesos de mecanizado produce irregularidades en la superficie metálica aumentando la posibilidad de contaminación y la formación de biopelículas (Spector et al., 2015). Recientemente, se ha mostrado que la topografía de la superficie influye en la adhesión bacteriana ya que las superficies con profundidad nanométrica y micrométrica presentan distinta respuesta a la adherencia bacteriana (Cheng et al., 2019). Las diferentes características topológicas de la superficie a nivel de nanoescala muestran efectos bactericidas directos en bacterias Gram positivas y Gram negativas, presuntamente por un mecanismo de ruptura de la membrana bacteriana que se encuentra en contacto (Yavari et al. 2020). Los nanopatrones, las fuerzas electrostáticas, estéricas e hidrofóbicas, junto con las modificaciones químicas modulan la adhesión celular en la formación de biofilm (Tuson y Weibel, 2013).

Asimismo, diferentes autores han estudiado diferentes materiales empleados como prótesis en su interacción con microorganismos. Entre esos materiales se destacan aceros inoxidables (Medilanskia, et al., 2002); cerámicas (Siboni et al., 2007) y superficies de hidroxiapatita polarizada positiva y negativamente (Ueshima et al., 2002), superficies metálicas oxidadas (Li & Logan, 2004) o diferentes materiales de bracket dentales (Brandão et al. 2015).

Por el otro lado, en la reacción de cuerpo extraño, la propagación y la modulación inmune de las células eucariotas está mediada por los cambios en la absorción superficial de proteínas y la mecano-

transducción mediada por integrina (Yavari et al., 2020). Es así como las investigaciones en biomateriales intentan predecir el éxito del implante mediante el modelo de “carrera hacia la superficie”, donde se plantea la competencia entre las células eucariotas del paciente y las bacterias en la superficie del material (Gristina et al. 1988). En este contexto, las propiedades antibacterianas del implante se traducen en mecanismos de destrucción por contacto directo debido a modificaciones de la superficie del implante (Mirzaali et al. 2018; Modaresifar et al. 2019; Raphel et al. 2016; Mas-Moruno et al. 2019) o mediante el uso de fármacos (Akhavan et al. 2018, Jin et al. 2019) ya que ambas estrategias “protegen” al implante de la adhesión bacteriana. Si la adhesión bacteriana ocurre antes que suceda la regeneración tisular, la defensa del huésped a menudo no puede prevenir la colonización de la superficie de ciertos tipos de bacteria que son capaces de formar una capa de biofilm muy protegida (Khatoon et al. 2018).

Desde el punto de vista microbiológico, existen diferentes trabajos que identifican cepas bacterianas específicas involucradas en los procesos de infección de prótesis. En particular *S. aureus* y *S. epidermidis* se encuentran en más de 50% de los casos de infecciones (Barberán, 2006). Aunque el número de microorganismos más frecuentes encontrados en infecciones de prótesis asciende a la decena (Tande & Patel, 2014).

Ante la presencia de campos eléctricos las células experimentan un estrés inducido que puede producir la rotura reversible o irreversible la membrana, a través de un procesado denominado electroporación, el cual depende de la magnitud y duración del campo eléctrico (Wu et al., 2004). Por esta razón, actualmente se están investigando campos eléctricos y electromagnéticos para el tratamiento de la colonización bacteriana.

Se considera que la aplicación de métodos eléctricos para tratar biopelículas, como voltaje continuo (Haddad et al., 2016), corrientes alternas bajas, campos eléctricos pulsados, tratamiento de acoplamiento capacitivo y ondas electromagnéticas de frecuencia extremadamente baja (ELF-EMF) produce un efecto “electricidal” (Freebairn et al. 2013). Este reduce las biopelículas tanto de *Staphylococcus sp.* y *Pseudomonas sp.* cuando están expuestas por un tiempo prolongado a corrientes eléctricas de baja intensidad (Del Pozo et al., 2009; Freebairn et al., 2013). Este mecanismo en combinación con el uso de antibióticos o con respuestas inmunitarias del huésped para crear un efecto sinérgico, se denomina efecto bioeléctrico (Haddad et al., 2016; Freebairn et al., 2013). Giladi et al. (2008) mostraron la eficacia de los campos eléctricos no homogéneos (3-4 V / cm) para controlar eficazmente la *P. aeruginosa* y *S. aureus*, mostrando un efecto sinérgico cuando se aplicó junto con el tratamiento con cloranfenicol (Giladi et al., 2008). Algunos estudios también han demostrado la eficacia del campo electromagnético pulsado (2000mA, 1210-7500 V / cm) con un mayor número de pulsos y campo eléctrico pulsado. Al utilizar como modelo animal al conejo con infección de la columna vertebral, se encontró que estos tratamientos producen la desintegración de la pared celular bacteriana a la vez que combinados con el antibiótico ceftriaxona se produce un efecto sinérgico (Wu et al., 2004; Gilotra et al., 2012; Khan et al., 2016; Pillet et al., 2016).

También se ha demostrado la erradicación biopelículas de *S. epidermidis*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* con el uso de corrientes continuas (Sandvik et al., 2013; Boda et al., 2016). Por otro lado, se ha mostrado una inhibición de *S. typhi* mediante el uso ondas electromagnéticas de frecuencia extremadamente bajas (por sus siglas en inglés ELF-EM, 0,8 Hz) que resonaban con la señal bioeléctrica generada para el *S. typhi*, creando un campo eléctrico de 2 V / cm (Fadel et al., 2014). Se demostró que los campos eléctricos (1,25 V / cm) combinados con análogos de inhibidores quorum sensing (QS) bacteriano, son eficaces para prevenir el crecimiento de *E. coli*, con un efecto sinérgico con gentamicina (Subramanian et al., 2016).

Estos métodos han demostrado ser eficaces para prevenir y tratar tanto bacterias planctónicas como biopelículas, y representan alternativas para la eliminación de infecciones en dispositivos mediante una técnica mínimamente invasiva. Aunque prometedoras, estas terapias se han probado incipientemente en estudios con animales y se requiere más investigaciones (Khoury et al., 1992; Stoodley et al., 2013;

Freebairn et al., 2013; Bordi and Bentzmann, 2011).

La miniaturización y los sistemas microelectromecánicos (abreviado del inglés MEMS), dieron origen a la **Microfluídica**. Para la fabricación de dispositivos microfluídicos se pueden utilizar varias técnicas: litografía blanda, grabado, deposición en capas sobre un sustrato, micromojado, y microimpresión.

La utilización de polidimetilsiloxano (PDMS), en los procesos de fabricación por litografía blanda, es clave ya que su biocompatibilidad, transparencia y permeabilidad al oxígeno permite estudiar sistemas microbiológicos *in vitro*. Por tal razón, esta técnica de microfabricación se puede combinar con técnicas de revestimiento por bombardeo iónico (del inglés sputtering coating) y así poder modificar las propiedades de la pared del dispositivo.

La fabricación de un dispositivo por litografía blanda comienza con la deposición de una fotoresina sobre una oblea de silicio (ver fig.1.a y 1.b). Luego se transfiere el motivo del canal utilizando una máscara con impresión en alta resolución que contiene el diseño deseado (ver figura 1.c). Luego, este motivo o forma impreso en la máscara, se transfiere a la fotoresina (por ejemplo, SU8) mediante radiación UV. Las partes no iluminadas son removidas y se obtiene el molde master (fig 1.d). Mediante colado se transfiere el motivo y se fabricación de los canales en PDMS. Una vez solidificado el PDMS, se procede a la perforación de los puertos de conexión para la entrada y salida de las suspensiones (Tabeling, 2005). Finalmente, el dispositivo se ensambla adhiriéndolo a un portaobjeto de vidrio, mediante la generación de radicales libres generados por plasma. La microfabricación basada en silicona se debe llevar a cabo en ambientes extremadamente limpios ya que la escala de las partículas en aire ronda en los micrómetros (orden de magnitud de los dispositivos) y tienden a pegarse en las superficies. Para realizar todos los procesos de litografía, la FIUNER cuenta con el Área de Microfabricación que dispone de todo el equipamiento para realizar el diseño y desarrollo de dispositivos microfluídicos.

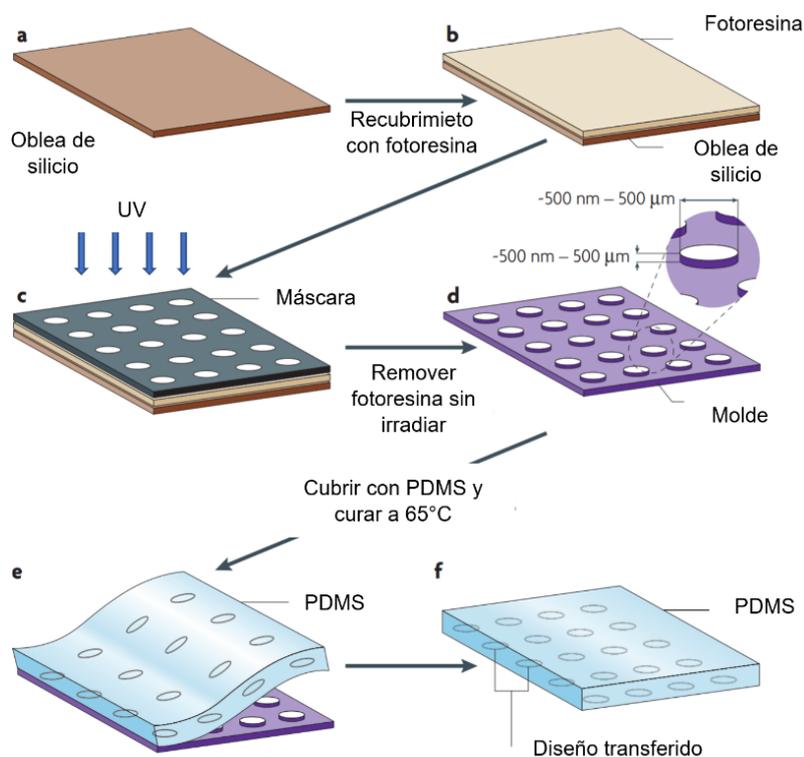


Figura 1. Litografía blanda. Pasos para fabricar una oblea master a partir de fotoresina. Una vez creado es molde se puede reproducir el motivo y reproducir canales microfluídicos. Adaptado de Weibel et al. 2007.

La **Microscopía** es un área muy amplia y el uso de distintas técnicas ha facilitado la comprensión de distintos procesos celulares. Las diferentes técnicas van desde microscopía de transmisión por contraste de fase, fluorescencia, por reflexión total interna, holográfica, confocal, etc. El uso de cada una de ellas depende del tipo de problema a estudiar. Los experimentos llevados a cabo en este trabajo exploraron distintas técnicas microscópicas (óptica, de fluorescencia y confocal) disponibles en el Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Celulares y Moleculares (LMAE) dependiendo del tipo de problema estudiado.

El monitoreo de la dinámica de procesos biológicos puede representar un desafío y el sistema de adquisición, visualización y registro debe adaptarse en tiempo real. La bioinformática de bioimágenes en un contexto de alta resolución es relevante en procesos donde se quiere cuantificar la cantidad y la localización de una proteína marcada, medir cambios en las estructuras a través del tiempo, o seguir la invasión de células por observación de la evolución de marcadores fluorescentes (Ball et al., 2012). La formación de biofilm es un claro ejemplo de este tipo de procesos, ya que diferentes aspectos pueden observarse cuando se estudia su dinámica. El estudio se puede focalizar en el crecimiento bacteriano o en la formación de la matriz extracelular. Estos dos puntos de vista requieren distintos abordajes al problema, y el diseño e implementación del “proceso de la imagen” será específico para cada uno de ellos. Dada la amplia variedad de herramientas de software disponibles, junto con la gran diversidad de subcampos y herramientas especializadas, actualmente existen numerosas y poderosas herramientas que pueden ser utilizadas para acceder de forma rápida a la interpretación de la información contenida en la imagen. Análisis preliminares se desarrollarán utilizando ImageJ (Schneider et al., 2012), y luego, dependiendo de la complejidad del análisis, se generan códigos que optimicen los tiempos de procesamiento.

Los procesos de adhesión y la formación de biofilm son registrados mediante la utilización de cámaras CCD. Para el análisis de imágenes, se desarrollaron códigos computacionales que pueden ser ejecutados en el clúster perteneciente a FIUNER en el caso que se requieran grandes cantidades de cómputo.

En cuanto al modelo biológico empleado en este proyecto, se utilizaron *Staphylococcus aureus* (bacteria comúnmente presente en infecciones en implantes) junto con *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, para tener modelos de bacterias Gran positivos y negativos. Dependiendo los experimentos, las determinaciones se realizan a temperatura ambiente o a 37°C para poder tener un mejor control de condiciones de crecimiento bacteriano.

El conocimiento de los “mecanismos de adhesión bacteriana y formación de biofilm” puede dar respuesta a muchos interrogantes del proceso de contaminación de superficies en implantes, lo cual contribuirá al mejoramiento de protocolos de fabricación que minimicen su efecto. Es por esto que el uso combinado de técnicas microfluídicas, microscópicas y de procesamiento de imágenes está ayudando a estudiar estos procesos desde un enfoque distinto y más novedoso.

Síntesis de resultados y conclusiones

a) Manejo de cultivos bacterianos

Para llevar a cabo los ensayos microbiológicos realizados en este proyecto fue necesario contar con protocolos de manipulación y conservación de microorganismos. Durante la ejecución de este proyecto, se logró generar un protocolo de conservación para las cepas ensayadas en el laboratorio. Las cepas de *S. aureus* se conservan en placa de Petri con medio de cultivo LB-agar a 4°C. En cambio, las cepas de *P. aeruginosa* no pudieron ser conservadas en esta condición. Es por ello que se probaron 3 métodos, a saber:

Método 1:	De un cultivo bacteriano líquido que ha llegado a la etapa de saturación, se agrega un 15% de glicerol y se guarda a -20 °C.
Método 2:	Se inocula a partir de colonias crecidas en placa de Petri un pellet en agua estéril para ser mantenido a 4 °C
Método 3:	Se preparan tubos eppendorf con agar nutritivo que se solidifica en forma inclinada (ángulo de 45°) y luego se deposita un pellet que ha sido retirado de la placa de cultivo y se conserva a temperatura ambiente.

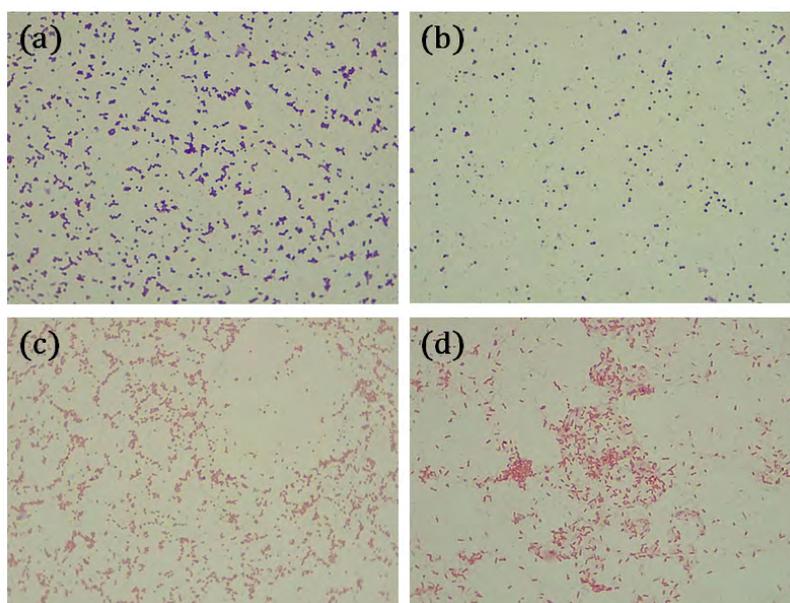


Figura 2. Tinción de Gram de los microorganismos ensayados. a) *Staphylococcus aureus* b) *Staphylococcus aureus* ATCC. c) *Pseudomonas aeruginosa*. d) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

A partir de los ensayos observamos que el método 2 no tiene efecto de preservación sobre las cepas de *Pseudomonas*. En cuanto a los métodos 1 y 3 encontramos que la viabilidad de la cepa de *Pseudomonas* alcanza un tiempo de preservación de aproximadamente 6 meses. Para los ensayos a corto plazo empleamos el método de placa de Petri y LB-agar.

Para controlar la pureza de los cultivos se realizó en forma periódica la tinción de Gram. Los preparados fueron observados con microscopio LEICA ICC50W con cámara incorporada. Se tomaron microfotografías para el registro de trabajo (Fig. 2).

B) Diseño e implementación de dispositivos microfluídicos

Durante la ejecución del proyecto, se adquirió equipamiento para el tratamiento de plasma-corona de superficies (Fig. 3.a). Esto permitió unir los canales de polidimetilsiloxano (PDMS) con portaobjetos de vidrio mediante un tratamiento de plasma en la superficie (Haubert et. al, 2006).

Este equipamiento es fundamental en la fabricación de dispositivos microfluídicos, ya que una vez realizado el procedimiento de obtener el canal grabado en el PDMS se deben sellar para evitar fugas de líquido en el sistema microfluídicos, y ha permitido adaptar dispositivos utilizados en trabajos anteriores durante las estadías en el exterior del Dr. Miño. La figura 4.b muestra un dispositivo apoyado sobre la platina el microscopio que ha sido modificado mediante la inserción de cables conductores en el PDMS para poder generar el campo eléctrico. Dicho dispositivo cuenta con dos canales de 200 μm y tres conductores separados en 1 cm, aproximadamente. El dispositivo está montado sobre un cubreobjetos y se pueden observar 4 perforaciones que representan las salidas y entradas a los canales.

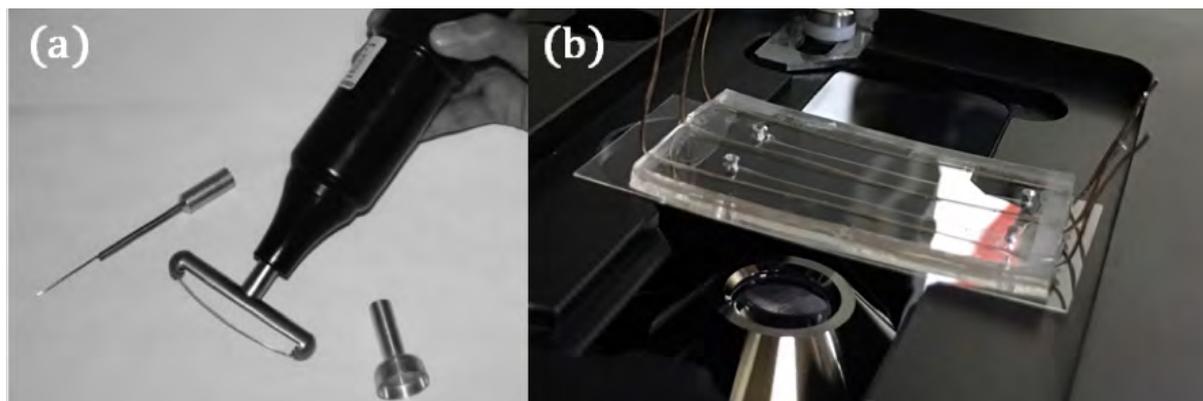


Figura 3. a) Equipo de tratamiento plasma-corona para superficies (Haubert et al., 2006). b) Fotografía del dispositivo microfluídico para estudio del efecto del campo eléctrico en el transporte bacteriano dispuesto sobre la platina del microscopio.

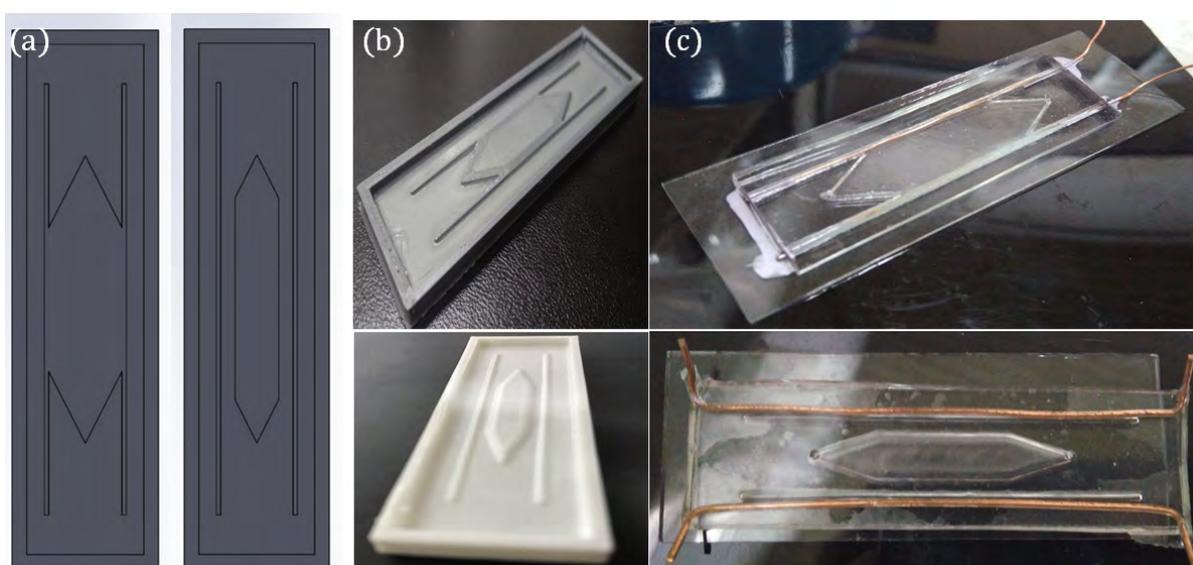


Figura 4. Fabricación de canales para generar campos eléctricos en las suspensiones bacterianas. a) Diseño de los moldes en formato CAD. b) Moldes de dos diseños de canales realizados con impresión 3D (gris y blanco). c) Canales con conductores.

Debido a la imposibilidad para realizar nuevos diseños en el Área de Microfabricación de la FIUNER, debido a daños estructurales de la sala limpia, se utilizaron técnicas de impresión 3D del Laboratorio. Se pudieron implementar nuevos canales microfluídicos, evitando los procesos de litografía blanda. La fig. 4 muestra una de las adaptaciones realizadas en el procedimiento de fabricación de los microcanales. La figura 4.a muestra el diseño CAD de dos tipos de canales. En el primero, el canal que contiene la suspensión bacteriana debe estar en contacto con el conductor y en el segundo, el conductor está sumergido en el PDMS (es decir aislado) y sin contacto con las bacterias. La figura 4.b muestra los moldes realizados en el Laboratorio de Prototipado Electrónico y 3D de FIUNER a cargo del Mg. Juan Manuel Reta. En gris se puede ver el diseño del molde donde el conductor va a estar en contacto con la cámara donde se depositan las bacterias (se puede apreciar el relieve de las guías que luego serán de pasacables) y en blanco, el dispositivo donde no hay contacto con el metal. Para fabricar los canales, se preparó PDMS y se vertió en los moldes previamente alisados. Una vez pasado el tiempo de curado del polímero en la estufa se procede al corte y despegado del molde. Al despegar el PDMS solidado del molde, queda impreso en un lado el diseño deseado. Para ensamblar el dispositivo, se realizan las perforaciones de las entradas y salidas para el fluido y se pega el PDMS mediante plasma a un cobre o portaobjetos. De esta

manera tendremos en el canal donde inocularemos bacterias, por un lado, el “techo” del dispositivo en PDMS y el “piso” de vidrio formado por el cubre o porta objeto. En la fig. 4.c se muestran los dos tipos de dispositivos fabricados. En ambos se puede ver como ha quedado la disposición de conductores dentro del canal.

Los experimentos en donde el conductor no toca la solución bacteriana, no se detectó ningún efecto de movimiento impulsado por el campo aplicado. Es por esto que se decidió aumentar el área de los conductores utilizando áreas de conductores de cobre mayores.

C) Caracterización del transporte celular en canales microfluidicos

La caracterización del transporte de suspensiones activas, es decir con partículas o células que tienen la capacidad de autopropulsión o de nado, es importante a la hora de estudiar cualquier proceso biológico que involucre la interacción con una superficie. Cuando la concentración de nadadores en el líquido es relativamente baja o en régimen diluido, se pueden aplicar técnicas de seguimiento de partículas. A partir de secuencias de imágenes microscópicas o videos, se detecta la posición de cada célula o partícula en cada frame. Luego se conectan esas posiciones entre las distintas imágenes y se logra obtener la trayectoria de la partícula. Si bien existen varias técnicas de tracking disponibles, el grupo ha desarrollado algunos algoritmos para realizar esta tarea y además se han utilizados plugins como TrackMate en Fiji (Tinevez et al., 2017).

Durante este proyecto realizaron tres trabajos donde se aplicaron estas técnicas para determinar la dinámica del transporte de diferentes células en interacción con superficies.

La figura 5 muestra el resultado del análisis de videos adquiridos a 30 cuadros por segundo y la obtención de trayectorias alrededor de un obstáculo en un canal microfluídico. De las trayectorias se puede determinar la distribución de velocidades para diferentes flujos aplicados al canal. A partir de estas distribuciones se pueden estudiar el efecto convectivo el flujo en el canal y determinar las bacterias que son arrastradas por el flujo de las que permanecen nadando cerca de las paredes superiores e inferiores del canal. La figura 5.a y 5.b muestra la separación de estas trayectorias interaccionando con el flujo y las superficies de canal alrededor de un obstáculo que han sido agrupadas considerando las bacterias que se mueven a velocidades menores y mayores a $V_b=25$ $\mu\text{m/s}$, donde V_b es la velocidad media de nado de las bacterias cuando no hay flujo en el canal. La fig. 5.c muestra las distribuciones de la componente x (eje del flujo longitudinal al canal) de las velocidades de baterías a diferentes flujos impuestos 0, 55 y 89 $\mu\text{m/s}$.

A medida que el flujo aumenta más células son arrastradas por el líquido. También se muestra el transporte de bacterias muertas las cuales son arrastradas como partículas pasivas (Miño et al. 2018).

La figura 6 muestra la caracterización de la dinámica de nado de las células coanoflageladas. Se considera que esta célula posee un ancestro común con las células animales, y por lo tanto son muy importantes en Biología Evolutiva ya que permite estudiar procesos celulares que se comparten entre estos grupos celulares. Un coanoflagelado tiene un cuerpo oval o esférico, con un collar en la parte apical que rodea un único flagelo. El flagelo le confiere motilidad y el collar es utilizado para capturar sus presas, las bacterias. Los coanoflagelados están presentes en la naturaleza de forma unicelular y también formando colonias.

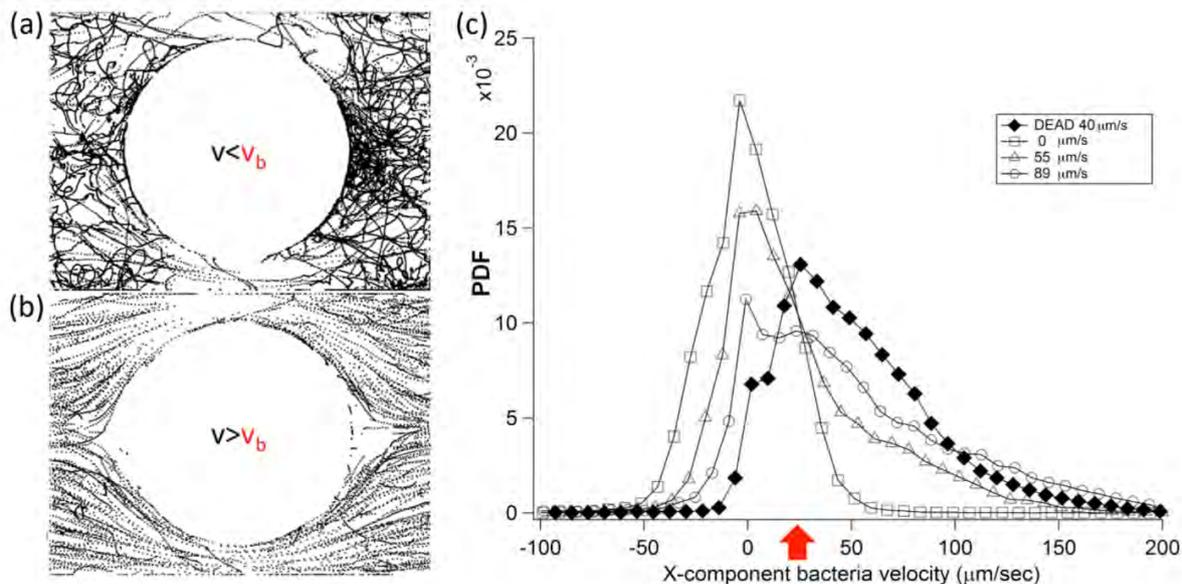


Figura 5: Determinación de las trayectorias bacterianas alrededor de un obstáculo. a) Trayectorias de *E. coli* con velocidades menores de $V_b=25 \mu\text{m/s}$. b) Trayectorias bacterias con velocidades mayores a V_b . c) Determinación de las distribuciones de velocidades de bacterias sometidas a diferentes flujos (Miño et al., 2018).

La transición entre una forma u otra se da por estímulos de químicos presentes en su medio ambiente. En forma unicelular presentan dos tipos de nadadores, lentos y rápidos que se diferencian morfológicamente por el tamaño de cuerpo (las lentas son más grandes) y el tamaño del collar (las rápidas poseen un collar más pequeño o pueden estar ausentes).

Mediante el procesamiento de videos y siguiendo la metodología de seguimiento de partículas, fue posible caracterizar el movimiento de cada nadador. En la figura 6.a muestra una micrografía de ambos nadadores, donde se pueden ver las diferencias morfológicas. La figura 6.b muestra la forma en que ambos nadadores se desplazan. Los nadadores rápidos describen en videos tomados a 30 cuadros por segundo un trazo punteado y más lineal, mientras que los nadadores lentos describen un trazo más grueso y tortuosos. A partir del análisis de las trayectorias se pueden caracterizar la velocidad de nado y los coeficientes de difusión que son utilizados en el modelado de cada tipo celular. Las figuras 6.c y 6.d muestran las trayectorias numéricas que imitan la forma de desplazamiento de cada nadador. Una vez reproducida esta dinámica mediante nadadores numéricos, se pueden diseñar diferentes cámaras que a través de una pared de obstáculos semicirculares permiten separar las células rápidas de las lentas. La figura 6.e muestra los parámetros que definen el microcanal, mostrando el tamaño de la cámara (L_x y L_y), la separación entre obstáculos (l_g) y el radio de los obstáculos (R_o). El diseño de la cámara es tal que la inoculación se realiza en la cámara 1 y luego de un tiempo los nadadores comienzan a explorar toda la cámara. Una vez que llegan a la cámara 2, la geometría de obstáculos evita que vuelvan a la cámara 1, produciendo una acumulación de células en la cámara 2. La figura 6.f y 6.g muestran las interacciones de cada nadador con los obstáculos (Sparacino et al., 2020).

La figura 7 muestra otros experimentos donde se caracteriza el nado de espermatozoides humanos cuando se acercan a una pared lateral. El trabajo muestra que al acercarse a una superficie rígida como PDMS, el nadador disminuye su velocidad por algunos segundos para recuperar la velocidad de nado inicial antes de la colisión. En estos experimentos el grupo colaborador en Córdoba realizó análisis

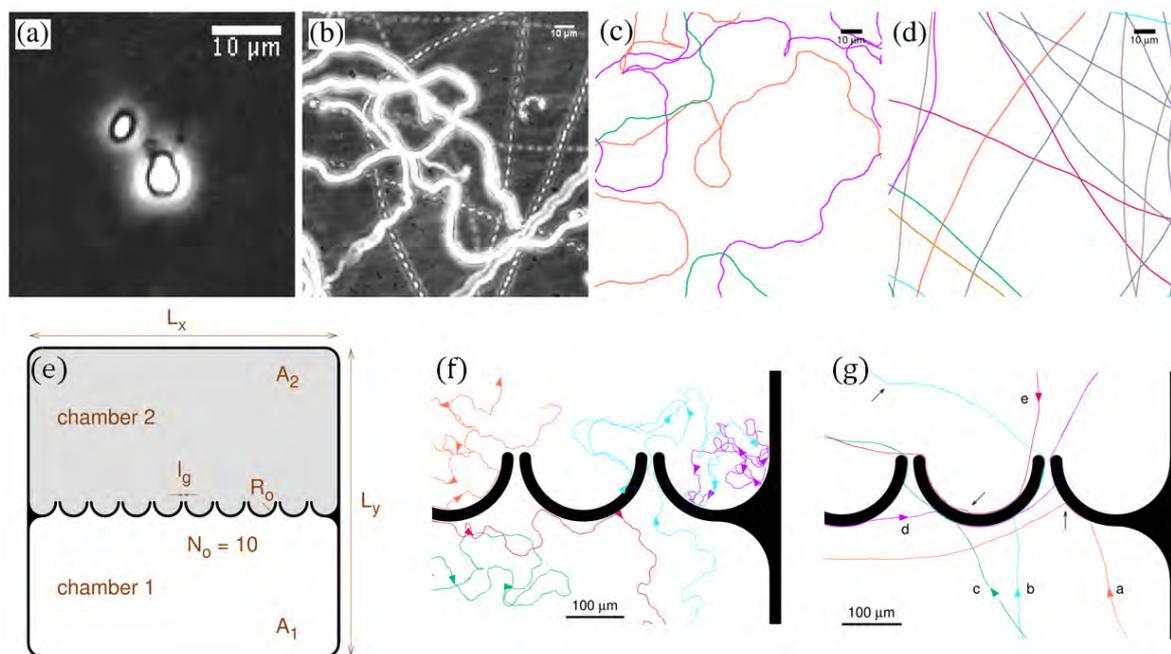


Figura 6: Dinámica experimental y numérica de coanoflagelados nadando en interacción con superficies en microcanales. a) Micrografía de coanoflagelados mostrando un nadador lento y un nadador rápido. b) Trazas descritas por los dos tipos de nadadores: líneas punteadas representan las trayectorias descritas por los nadadores rápidos y las trazas gruesas por nadadores lentos. c y d) Reproducción de las trayectorias usando nadadores numéricos lento y rápidos respectivamente. e) Canal numérico diseñado para separar células rápidas de lentas. f y g) Interacción con obstáculos de nadadores lentos y rápidos respectivamente (Sparacino et al., 2020).

similares en el tracking de células, y se pudo comparar lo observado experimentalmente con un modelo numérico que capturaba la dinámica observada. Es importante notar que para este proyecto el grupo del Dr. Miño pudo diseñar y fabricar los canales microfluídicos que permitieron la realización de los experimentos. La figura 7.a muestra una vista tridimensional obtenida con microscopía confocal, donde se muestra el tamaño del microcanal y se detallan las células espermáticas que han quedado pegadas en la pared de PDMS, mostrando el detalle del cuerpo celular y el flagelo. La fig. 6.b muestra una trayectoria ejemplo de un espermatozoide que se acerca a la pared lateral con un ángulo de 90° y luego comienza a nadar paralelamente a la superficie. También se muestra la trayectoria mostrando la velocidad media en cada instante de la trayectoria. La fig. 7.c muestra las mediciones de la velocidad media de varios experimentos donde a tiempo cero, el espermatozoide colisiona con la pared lateral. La figura 7.d esquematiza lo observado durante la colisión con la pared lateral, el nado paralelo y escape del celular. La fig. 7.e muestra los resultados experimentales comparados con el modelo numérico donde se ve la evolución de la colisión para diferentes alineamientos del espermatozoide nadando cerca de la pared (Bettera Marcat et al., 2020).

D) Acumulación de bacterias detrás de un obstáculo

El uso de herramientas microfluídicas y el análisis presentado en la sección anterior permitieron caracterizar el efecto que produce un obstáculo en un canal de sección rectangular en la acumulación de bacterias nadadoras (Miño et al., 2018). En este trabajo se usó un microcanal como se esquematiza en la fig. 8.a que posee una cánula de entrada por la que se inyecta la suspensión bacteriana de *E. coli* y que luego de pasar por el microcanal con el obstáculo para eliminar el contenido por otra cánula de salida. Debajo del canal se muestra una micrografía tomada con microscopía óptica donde se detallan los

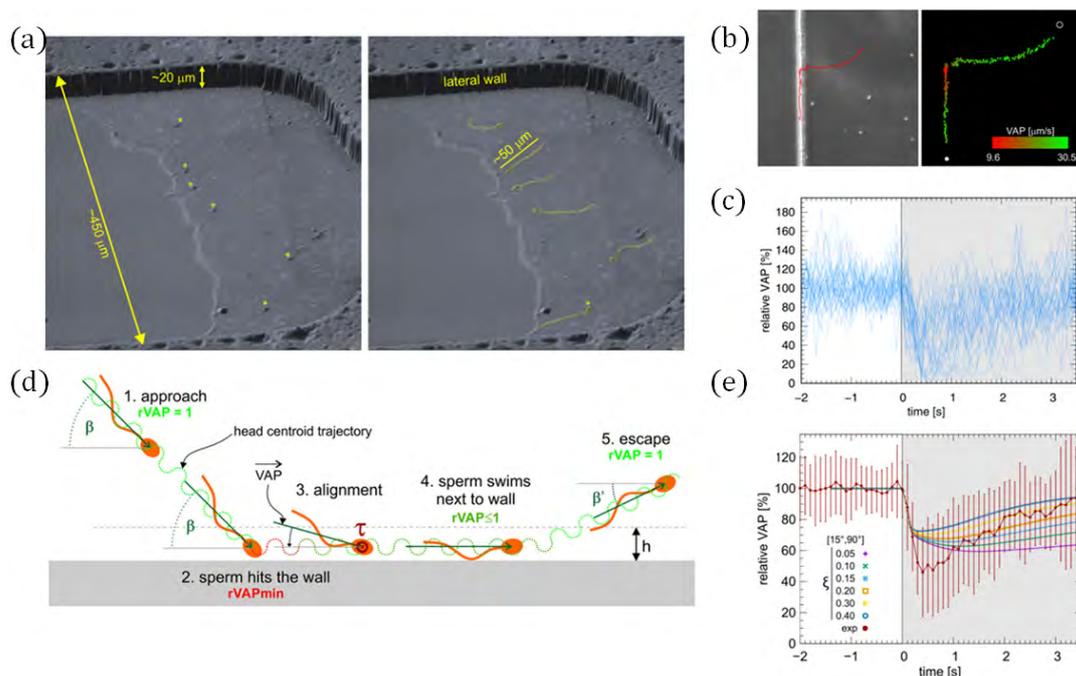


Figura 7: Caracterización experimental y numérica de nado de espermatozoides interactuando con una pared lateral. a) Micrografía confocal de barrido mostrando canal microfluídico en PDMS utilizado para realizar las caracterizaciones de interacción. b) Trayectoria de un espermatozoide llegando a la pared lateral superpuesta a una imagen de la pared lateral tomada con microscopía óptica y la misma trayectoria caracterizada por la velocidad media (VAP) de nado. c) Velocidad media de diferentes espermatozoides llegando a la superficie ($t=0$). d) Diagrama de la interacción entre la superficie y el espermatozoide usados para el modelado del nadador. e) Velocidades medias experimentales y numéricas variando el alineamiento (ξ) del nadador respecto a la superficie (Bettera Marcat et al. 2020).

parámetros que caracterizan el microcanal. El ancho w es de 200 μm , el radio R es de 80 μm y el alto del canal es de 20 μm . La fig. 8.b resume lo observado cuando fluye de izquierda a derecha suspensiones de bacterias vivas y muertas con un flujo de aproximadamente 0 y 55 $\mu\text{m/s}$. Se puede observar que para ambos flujos las bacterias muertas se convierten en trazados pasivos que describen las líneas de campo del líquido alrededor del obstáculo (las líneas rojas representan las líneas de campo calculadas numéricamente para este canal). En cambio, para bacterias vivas, sin flujo las bacterias nadan cerca de la superficie superior e inferior describiendo círculos producto de las interacciones hidrodinámicas con la pared. Cuando se aplica un flujo, se observa una acumulación de bacterias del lado derecho del obstáculo, es decir el punto de estancamiento que está más alejado de la entrada. Para poder caracterizar la concentración de bacterias alrededor del obstáculo, se realizó un conteo de bacterias en función del ángulo θ , donde $\theta=90^\circ$ representa el primer punto de estancamiento y $\theta=270^\circ$ el segundo punto de estancamiento. En la fig. 8.c se puede observar la variación de la concentración de bacteria a lo largo del perímetro del obstáculo para dos valores de flujo 55 y 89 $\mu\text{m/s}$. Se puede ver que los valores obtenidos a 90° (P) son menores que los de 270° (P_+), indicando que existe una acumulación detrás del obstáculo (lado derecho) si la suspensión se mueve de izquierda a derecha. Este efecto se mantiene para valores de flujo que van de 55 a 100 $\mu\text{m/s}$ como lo muestra la última figura del panel 8.c.

Estos resultados son interesantes ya que la presencia de obstáculos en microcanales podría actuar como filtros para bacterias y para favorecer la creación de biofilm en esos puntos donde hay una mayor concentración de células.

E) Estudio de adhesión en superficies rugosas

El uso de herramientas microfluídicas permite estudiar los procesos de adhesión bacteriana a superficies y la consecuente formación de biopelículas (Secchi et al., 2020). En esta parte del estudio se caracterizó

como el flujo cerca de una superficie rugosa influye en los procesos de adhesión celular. Para ello se diseñó un canal de sección rectangular donde una pared lisa lateral se convertía en una pared rugosa, caracterizado

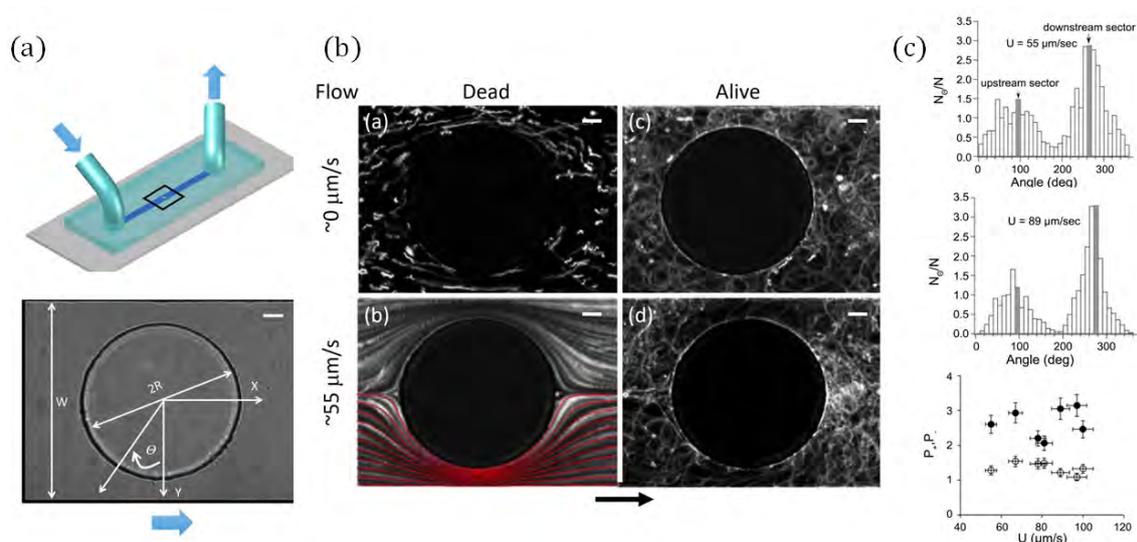


Figura 8: Adhesión bacteriana en superficies rugosas. a) Esquema del dispositivo microfluídico e imagen microscópica fluorescente del canal visto desde arriba, mostrando el detalle de la superficie rugosa y las bacterias marcadas. b) Arriba: imagen de las trazas descritas por bacterias que son arrastradas por el flujo y las que atraviesan las líneas de campo, dirigiéndose hacia los valles de la superficie. Medio: micrografías fluorescentes luego de 2 horas de experimento donde se observa la adhesión homogénea en la superficie rugosa. Abajo: caracterización de la intensidad de fluorescente a lo largo de la superficie ondulada (r Secchi et al. 2020).

por una longitud de onda λ y una amplitud A . En la figura 9.a se puede ver un esquema del canal desarrollado y la dirección del flujo aplicado. En este panel también se puede ver una micrografía de un experimento donde se aplica un flujo de $200 \mu\text{m/s}$. En este trabajo se usó *E. coli* marcada fluorescentemente, en la fotografía se puede observar a las bacterias como puntos brillantes dentro del canal. Las interacciones del fluido y la superficie rugosa modifican las líneas del campo de flujo laminar. Si se focaliza en esta región (recuadro rojo) se observa que este flujo interactúa con el nado bacteriano. Esta interacción se muestra en la primera fotografía del panel 9.b, donde hay bacterias que se desplazan ingresando a los valles de la superficie ondulada, describiendo trayectorias curvadas. Por otro lado, en esta micrografía se puede apreciar trazos puenteados que representan las bacterias que son arrastradas por el flujo. Estos fenómenos ocurren ni bien se aplica el flujo y da cuenta de la compleja hidrodinámica que sucede cerca de una superficie.

Si se deja fluir esta suspensión de bacterias móviles por más de 2 horas, se puede observar que sobre la superficie ondulada comienzan a aparecer zonas más brillantes indicando acumulación de bacterias (segunda micrografía fig 9.b). Del análisis de estas imágenes se puede calcular como varía la intensidad de la fluorescencia a lo largo de la rugosidad (último gráfico de la fig 9.b). En este gráfico se muestra en color azul las zonas sin bacterias y en rojo las zonas con mayor adhesión, se puede concluir que los picos de acumulación se dan desfazados de las zonas de máxima velocidad de corte que se producen en los picos de las ondas.

F) Caracterización del transporte con campo eléctrico

Durante el proyecto se exploró el efecto del campo eléctrico en el transporte de suspensiones microbianas. Durante las primeras experiencias se utilizaron suspensiones de levaduras y suspensiones de *S. áureos*. Los resultados están siendo analizados para ser publicados. En la figura 10 se observa algunos avances logrados durante este proyecto. En la figura 10.a se muestra un canal microfluídico realizado

con las técnicas antes mencionadas, el cual está conectado a una jeringa que contiene la suspensión microbiológica. El canal posee dos conductores a los cuales se les aplica un voltaje. La figura 10.b muestra una fotografía por microscopía óptica donde los puntos oscuros representan *S. aureus* en suspensión cuando no se aplica campo eléctrico. La fig. 10.c muestra la superposición de varias imágenes

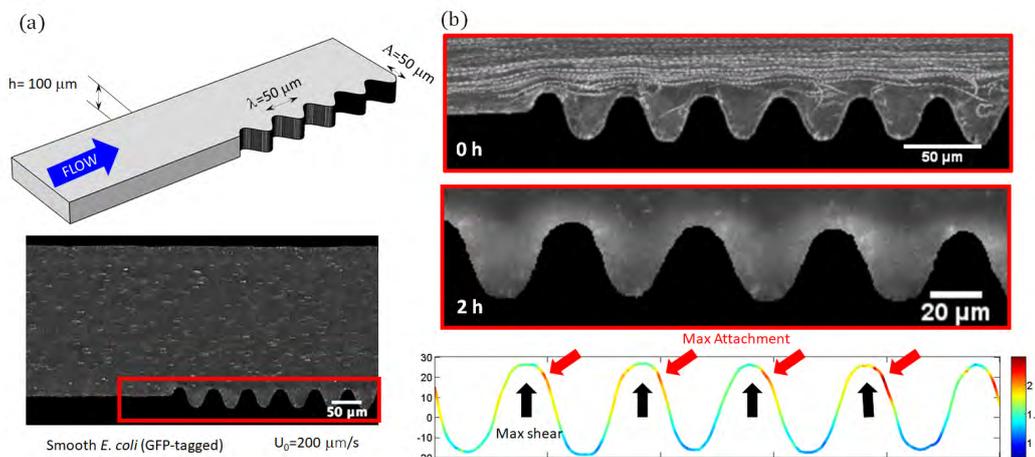


Figura 9: Adhesión bacteriana en superficies rugosas. a) Esquema del dispositivo microfluídico e imagen microscópica fluorescente del canal visto desde arriba, mostrando el detalle de la superficie rugosa y las bacterias marcadas. b) Arriba: imagen de las trazas descritas por bacterias que son arrastradas por el flujo y las que atraviesan las líneas de campo, dirigiéndose hacia los valles de la superficie. Medio: micrografías fluorescentes luego de 2 horas de experimento donde se observa la adhesión homogénea en la superficie rugosa. Abajo: caracterización de la intensidad de fluorescente a lo largo de la superficie ondulada (r Secchi et al. 2020).

evidenciando las trazas de las bacterias cuando se mueven bajo por efecto del campo eléctrico aplicado. Del seguimiento de partículas se puede obtener las trayectorias en coordenadas “x” y “y” las cuales se pueden graficar como en la fig. 10.d. Del análisis de estas trayectorias se calcula la velocidad de desplazamiento y graficar la distribución de velocidades (fig. 10.e).

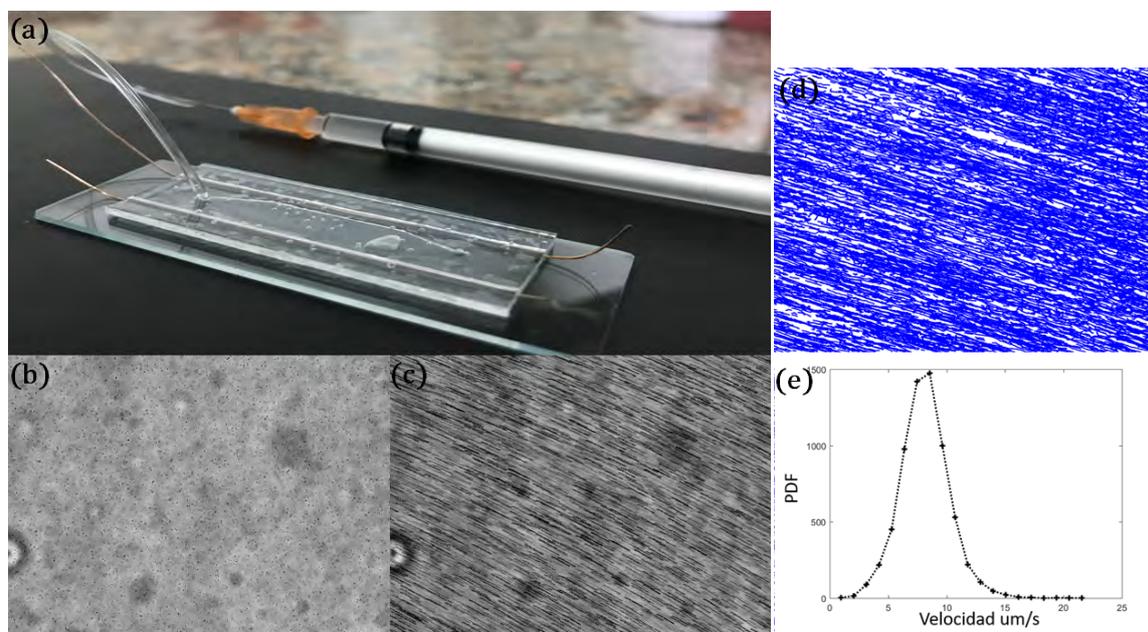


Figura 10: Efecto del campo eléctrico en el transporte de microorganismos. a) Dispositivo microfluídico implementado mostrando la conexión con la suspensión microbiana contenida en la jeringa. b) Fotografía de la suspensión cuando no hay campo aplicado. c) Trazas descritas por las células bajo el efecto del campo. d) reconstrucción de las trayectorias descritas por el movimiento de las células. e) Distribución de probabilidad de velocidades obtenidas del tracking celular.

G) Integración de conceptos en el aula

Gracias al trabajo realizado en este proyecto, se ha podido integrar dentro del dictado dos prácticas de laboratorio durante el cursado de la materia cuatrimestral “Biomateriales y Biocompatibilidad” de la carrera de Bioingeniería. Es la primera vez que los alumnos aprenden a manipular muestras biológicas y realizan ensayos de formación de biofilms y contaminación de superficies metálicas usadas en prótesis.

Laboratorio 3: Formación de Biopelículas. El estudiante se familiariza con la manipulación de muestras biológicas y el sembrado de bacterias. Esta actividad teórica/experimental propone estudiar la formación de biopelículas y la estructura de la matriz extracelular generada por el microorganismo.

Laboratorio 8: Esterilización de materiales mediante antibióticos. Se investiga como las fallas de mecanizado pueden producir lugares susceptibles a colonización bacteriana. En esta actividad teórica/experimental se aplican métodos de esterilización de prótesis para comprobar eficacia en condiciones de paredes rugosas.



Figura 11: Implementación de laboratorios combinando metodologías microbiológicas y el efecto de contaminación sobre superficies metálicas.

Indicadores de producción

Spector, M.; Balbi, E.E.; Sánchez, C.I. y Miño, G.L. Transporte de suspensiones biológicas bajo campos eléctricos. En preparación.

Balbi, E.E.; Sánchez, C.I.; Miño, G. L. Influencia en la formación de bio películas de culturas bacterianas mixtas (móviles y no móviles) mediante análisis de imágenes. En preparación.

Sparacino, J.; Miño, G.L.; Banchio, A. J.; Marconi, V.I. Solitary choanoflagellate dynamics and micro-confined directed transport. *Phys. D: Appl. Phys* 53 505403 (2020).

Secchi, E.; Vitale, A.; Miño, G.L. Kantsler, V., Eberl, L. Rusconi, R. and Stocker, R. The effect of flow on swimming bacteria controls the initial colonization of curved surfaces. *Nature Communications* 11, 2851 (2020).

Bettera Marcat, M.A.; Gallea, M.N. Miño, G. L.; Cubilla, M. A.; Banchio, A.J.; Giojalas, L.C.; Marconi, V.I. and Guidobaldi, H.A. Hitting the wall: Human sperm velocity recovery under ultra-confined conditions. *Biomicrofluidics* 14 (2), 024108 (2020).

Molnar, I. L.; Pensini, E., Asad, Md A., Mitchell, C. A., Nitsche, L. C., Pyrak-Nolte, L. J., Miño, G. L. and Krol, M. M. Colloid Transport in Porous Media: A Review of Classical Mechanisms and Emerging Topics. *Transport in Porous Media* 130, 129-156 (2019).

Miño, G. L.; Chertcoff, R.; Baabour, M.; Gutkind, G.; Clément, E.; Auradou, H. and Ippolito, I. *E-coli* Accumulation behind an Obstacle. *Advances in Microbiology* 8 (6): 451-464 (2018).

Congresos

- Balbi, E. E.; Sánchez, C. I.; Miño, G. L. Influencia en la formación de bio películas de culturas bacterianas mixtas (móviles y no móviles) mediante análisis de imágenes. 105a Reunión de la Asociación Física Argentina, Primera Webinar realizada durante septiembre 2020, por la sede Córdoba.
- Balbi, E. E.; Sánchez, C. I.; Spector, M.; Campana, D.M. y Miño, G. L. Microorganisms-electric field interactions. II Brazil–Argentine Microfluidics Congress / V Congreso de Microfluídica Argentina. October 22-25, 2019. Córdoba, Argentina.
- Bettera Marcat, M. A.; Gallea, N.; Miño, G. L.; Cubilla, M.; Giojalas, L. C.; Guidobaldi, H. A.; Banchio, A. J. y Marconi, V. I. Near-wall dynamics of microconfined sperm cells. II Brazil–Argentine Microfluidics Congress / V Congreso de Microfluídica Argentina. October 22-25, 2019. Córdoba, Argentina.
- Miño, G. L.; Sánchez, J. A.; Pury, P.A. and Marconi, V. I. Microhydrodynamic characterization of the closest animal cell relative. II Brazil–Argentine Microfluidics Congress / V Congreso de Microfluídica Argentina. October 22-25, 2019. Córdoba, Argentina.
- Balbi, E.E.;Sánchez, C. I.; Spector, M.; Campana, D.M.; Miño, G.L.. Interacciones de campo eléctrico con microorganismos. 104a Reunión de la Asociación Física Argentina. 30 de Septiembre al 03 de Octubre de 2019, Santa Fe, Argentina
- Sánchez, C. I.; Balbi, E. E. y Miño, G. L. Caracterización del crecimiento de cepas móviles y no móviles mediante el análisis de imágenes. XV Congreso Argentino de Microbiología (CAM2019). Congresos conjuntos: XIV Congreso Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE). V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos (CAMA). V Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos (CLAMME). 25 a 27 de septiembre de 2019, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Miño G. L. La rugosidad y el flujo modifican la adhesión bacteriana. Conferencia: nano2019. XIX Encuentro de superficies y materiales nanoestructurados. 5 al 7 de junio 2019 Buenos Aires, Argentina.
- Balbi, E. E.; Spector, M.; Miño, G. L. Dispositivo microfluídico para el estudio del efecto del campo eléctrico en microorganismos. Buenos Aires, 2018. Conferencia: 103ª Reunión de la Asociación Física Argentina. Asociación Física Argentina.
- Miño, G. L.; Sparacino, J.; Reyes, M. G.; Sánchez, J. A.; Pury, P. A.; Banchio, A. J.; Marconi, V. I. Microfluidics for evolutionary biology. Rio de Janeiro, 2018. Conferencia: VIII Workshop in Microfluidics / I Brazil-Argentina Microfluidics
- Miño, G.L. Baabour, M.; Chertcoff, R.; Gutkind, G.; Clément, E.; Auradou, H. and Ippolito, I. Bacteria Accumulation Behind an Obstacle. Rio de Janeiro, 2018. Conferencia: VIII Workshop in Microfluidics / I Brazil-Argentina Microfluidics.

Bibliografía

- Akhavan, B., Bakhshandeh, S., Najafi-Ashtiani, H., Fluit, A. C., Boel, E., Vogely, C., & Yavari, S. A. (2018). Direct covalent attachment of silver nanoparticles on radical-rich plasma polymer films for antibacterial applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(37), 5845-5853.
- Ball, G., Parton, R. M., Hamilton, R. S., & Davis, I. (2012). A cell biologist's guide to high resolution imaging. *Methods in enzymology*, 504, 29-55.
- Barberán, J. (2006). Management of infections of osteoarticular prosthesis. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(3), 93-101.
- Bettera Marcat, M. A., Gallea, M. N., Miño, G. L., Cubilla, M. A., Banchio, A. J., Giojalas, L. C., & Guidobaldi, H. A. (2020). Hitting the wall: Human sperm velocity recovery under ultra-confined conditions. *Biomicrofluidics*, 14(2), 024108.

- Boda, S. K., Bajpai, I., & Basu, B. (2016). Inhibitory effect of direct electric field and HA-ZnO composites on *S. aureus* biofilm formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(6), 1064-1075.
- Bordi, C., & de Bentzmann, S. (2011). Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Annals of intensive care*, 1(1), 1-8.
- Buasso M. S. y Rojo C. C. (2020). Artroplastia de cadera en el adulto mayor: frecuencia de infecciones post quirúrgica y diagnóstico microbiológico de una clínica de Córdoba Argentina. Publicación on-line del Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Córdoba (ISSN: 2344-9926).
- Cheng, Y., Feng, G., & Moraru, C. I. (2019). Micro-and nanotopography sensitive bacterial attachment mechanisms: a review. *Frontiers in microbiology*, 10, 191.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.
- Del Pozo, J. L., Rouse, M. S., Euba, G., Kang, C. I., Mandrekar, J. N., Steckelberg, J. M., & Patel, R. (2009). The electricidal effect is active in an experimental model of *Staphylococcus epidermidis* chronic foreign body osteomyelitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(10), 4064-4068.
- Donlan, R. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 277-281.
- Equipo Ejecutivo, Comisión Asesora, & Consultores Especialistas (2007). Infecciones Hospitalarias de Argentina. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Cdad. Autónoma de Buenos Aires: Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud.
- Fadel, M. A., Mohamed, S. A., Abdelbacki, A. M., & El-Sharkawy, A. H. (2014). Inhibition of *Salmonella typhi* growth using extremely low frequency electromagnetic (ELF-EM) waves at resonance frequency. *Journal of applied microbiology*, 117(2), 358-365.
- Freebairn, D., Linton, D., Harkin-Jones, E., Jones, D. S., Gilmore, B. F., & Gorman, S. P. (2013). Electrical methods of controlling bacterial adhesion and biofilm on device surfaces. *Expert review of medical devices*, 10(1), 85-103.
- Giladi, M., Porat, Y., Blatt, A., Wasserman, Y., Kirson, E. D., Dekel, E., & Palti, Y. (2008). Microbial growth inhibition by alternating electric fields. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(10), 3517-3522.
- Gilotra, M., Griffith, C., Schiavone, J., Nimmagadda, N., Noveau, J., & Ludwig, S. C. (2012). Capacitive coupling reduces instrumentation-related infection in rabbit spines: a pilot study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 470(6), 1646-1651.
- Gristina, A. G., Naylor, P., & Myrvik, Q. (1988). Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Medical progress through technology*, 14(3-4), 205-224.
- Haddad, P. A., Mah, T. F., & Mussivand, T. (2016). In Vitro Assessment of Electric Currents Increasing the Effectiveness of Vancomycin Against *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Artificial organs*, 40(8), 804-810.
- Haubert, K., Drier, T., and Beebe D. (2006). PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system. *Lab Chip*, 6, 1548-1549
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 95-108.
- Haubert, K., Drier, T., & Beebe, D. (2006). PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system. *Lab on a Chip*, 6(12), 1548-1549.
- Høiby, N., Bjarnsholm, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofub, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 322-332.
- Jin, X., Xiong, Y. H., Zhang, X. Y., Wang, R., Xing, Y., Duan, S., ... & Xu, F. J. (2019). Self-Adaptive Antibacterial Porous Implants with Sustainable Responses for Infected Bone Defect Therapy. *Advanced Functional Materials*, 29(17), 1807915.

- Khan, S. I., Blumrosen, G., Vecchio, D., Golberg, A., McCormack, M. C., Yarmush, M. L., ... & Austen Jr, W. G. (2016). Eradication of multidrug-resistant *Pseudomonas* biofilm with pulsed electric fields. *Biotechnology and bioengineering*, 113(3), 643-650.
- Khatoun Z., McTiernan C. D., Suuronen EJ, Mah T.-F., Alarcon E.I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon* 4(12): e01067.
- Khoury, A. E., Lam, K., Ellis, B., & Costerton, J. W. (1992). Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)*, 38(3), M174-8.
- Kolter, R., & Greenberg, E. (2006). The superficial life of microbes. *Nature*, 441, 300-302.
- Lachman, J. R., Ramos, J. A., DeOrio, J. K., Easley, M. E., Nunley, J. A., and Adams, S. B. (2018). Outcomes of Acute Hematogenous Periprosthetic Joint Infection in Total Ankle Arthroplasty Treated with Irrigation, Debridement, and Polyethylene Exchange. *Foot & Ankle International*, 39(11): 1-6.
- Li, B., & Logan, B. (2004). Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 36, 81-90.
- Martins Brandão, G. A., Pereira, A. C., Martins Brandão, A. M., Amorim de Almeida, H. y Lopes Motta, R. H. (2015). Does the Bracket Composition Material Influence Initial Biofilm Formation? *Indian Journal of Dental Research*, 26, 2: 148.
- Mas-Moruno, C., Su, B., & Dalby, M. J. (2019). Multifunctional Coatings and Nanotopographies: Toward Cell Instructive and Antibacterial Implants. *Advanced Healthcare Materials*, 8(1), 1801103.
- Medilanskia, E., Kaufmanna, K., Wicka, L. Y., Wannernb, O., & Harmsa, H. (2002). Influence of the Surface Topography of Stainless Steel on Bacterial Adhesion. *Biofouling*, 18, 3.
- Miño, G. L., Baabour, M., Chertcoff, R., Gutkind, G., Clément, E., Auradou, H. and Ippolito, I. (2018) *E coli* Accumulation behind an Obstacle. *Advances in Microbiology*, 8, 451-464.
- Mirzaali, M. J., Van Dongen, I. C. P., Tümer, N., Weinans, H., Yavari, S. A., & Zadpoor, A. A. (2018). In-silico quest for bactericidal but non-cytotoxic nanopatterns. *Nanotechnology*, 29(43), 43LT02.
- Mountcastle, S. E., Vyas, N., Villapun, V. M., Cox, S. C., Jabbari, S., Sammons, R. L., ... & Kuehne, S. A. (2021). Biofilm viability checker: An open-source tool for automated biofilm viability analysis from confocal microscopy images. *NPJ biofilms and microbiomes*, 7(1), 1-12.
- Ortiz, M., Vilela, A., Ponce, C., Davaro, M., Altieri, R., & Morón, J. (2014). "Infecciones del sitio quirúrgico en cirugías limpias". *Revista Argentina de Medicina*, 2(4), 69-72.
- Pillet, F., Formosa-Dague, C., Baaziz, H., Dague, E., & Rols, M. P. (2016). Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.
- Raphel, J., Holodniy, M., Goodman, S. B., & Heilshorn, S. C. (2016). Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. *Biomaterials*, 84, 301-314.
- Ribeiro, M., Monteiro, F. J., & Ferraz, M. P. (2012). Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomatter*, 2(4), 176-194.
- Sandvik, E. L., McLeod, B. R., Parker, A. E., & Stewart, P. S. (2013). Direct electric current treatment under physiologic saline conditions kills *Staphylococcus epidermidis* biofilms via electrolytic generation of hypochlorous acid. *PloS one*, 8(2), e55118.
- Secchi, E., Vitale, A., Miño, G. L., Kantsler, V., Eberl, L., Rusconi, R., & Stocker, R. (2020). The effect of flow on swimming bacteria controls the initial colonization of curved surfaces. *Nature communications*, 11(1), 1-12.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.
- Siboni, N., Lidor, M., Kramarsky-Winter, E., & Kushmaro, A. (2007). Conditioning film and initial biofilm formation on ceramics tiles in the marine environment. *FEMS Microbiol Lett.*, 274(1), 24-9.

- Song, Z., Borgwardt, L., Høiby, N., Wu, H., Sørensen, T. S., & Borgwardt, A. (2015). Prosthesis infections after orthopedic joint replacement: the possible role of bacterial biofilms. *Orthopedic Reviews*, 5: e14.
- Sparacino, J., Miño, G. L., Banchio, A. J., & Marconi, V. I. (2020). Solitary choanoflagellate dynamics and microconfined directed transport. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 53(50), 505403.
- Spector, M., Peretti, L., Salas, F., Romero, G., & Iglesias, L. (2015). Bacterial Conduction in Prosthesis. *Procedia Materials Science*, 8, 351-357.
- Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Costerton, B., DeMeo, P., Shirtliff, M., Gawalt, E., & Kathju, S. (2013). Biofilms, biomaterials, and device-related infections. In *Handbook of polymer applications in medicine and medical devices* (pp. 77-101). William Andrew Publishing.
- Subramanian, S., Gerasopoulos, K., Guo, M., Sintim, H. O., Bentley, W. E., & Ghodssi, R. (2016). Autoinducer-2 analogs and electric fields-an antibiotic-free bacterial biofilm combination treatment. *Biomedical microdevices*, 18(5), 1-12.
- Tabeling, P. (2005). *Introduction to microfluidics*. OUP Oxford.
- Tande, A. J., & Patel, R. (2014). Prosthetic Joint Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 302-345.
- Tinevez, J.-Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G. M., Reynolds, G. D., Laplantine, E., ... Eliceiri, K. W. (2017). TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*, 115, 80-90.
- Trampuz, A., Osmon, D. R., Hanssen, A. D., Steckelberg, J. M., & Patel, R. (2003). Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin Orthop Relat Res*, 414, 69-88.
- Tuson, H. H., & Weibel, D. B. (2013). Bacteria-surface interactions. *Soft matter*, 9(17), 4368-4380.
- Ueshima, M., Tanaka, S., Nakamura, S., & Yamashita, K. (2002). Manipulation of bacterial adhesion and proliferation by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 60(4), 578-584.
- Weibel, D., DiLuzio, W. & Whitesides, G. (2007). Microfabrication meets microbiology. *Nat Rev Microbiol* 5, 209-218.
- Wu, T. F., Tseng, S. Y., & Hung, J. C. (2004). Generation of pulsed electric fields for processing microbes. *IEEE transactions on plasma science*, 32(4), 1551-1562.
- Yavari, S. A., Castenmiller, S. M., van Strijp, J. A., & Croes, M. (2020). Combating implant infections: shifting focus from bacteria to host. *Advanced Materials*, 32(43), 2002962.

PID 6173

Denominación del Proyecto

Dispositivo para el estudio de adhesión bacteriana en prótesis metálicas: formación de biopelículas en contacto con superficies metálicas.

Director

Miño, Gastón Leonardo

Codirectora

Sanchez, Cecilia Isabel

Unidad de Ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de ingeniería.

Cátedra/s, área o disciplina científica

Laboratorio de microscopía aplicada a estudios moleculares (LMAE)

Contacto

gaston.mino@uner.edu.ar

Integrantes del proyecto

Campana, Diego Martín. Becario: Balbi, Eugenio Ezequiel

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

29/08/2017 y 21/07/2021

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 031/2022 (21/03/2022)