

Comparación de susceptibilidad bacteriana y cambios morfológicos en biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a terapias antimicrobianas

Comparison of bacterial susceptibility and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in response to antibiotic therapies

Sofía Cabezón-Leighton¹, Karen Moreno.Mendieta^{2,3}, María Paz Durán^{2,3} y Jaime Figueroa^{2,3}

¹Universidad Austral de Chile, Facultad de Medicina, Valdivia, Chile.

²Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Valdivia, Chile.

³Centro FONDAP-ANID, Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR). Concepción, Chile.

Apoyo financiero: FONDAP-INCAR 1523A0007

Conflictos de interés: Ninguno

Recibido: 17 de abril de 2026 / Aceptado: 27 de julio de 2026

Correspondencia a: Sofía Cabezón Leighton
sofi.cabazon.l@gmail.com

ISSN 0717-6341



Resumen

Introducción: *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista con alta capacidad de formar biopelículas, lo que favorece su resistencia en infecciones intrahospitalarias. **Objetivos:** Comparar la susceptibilidad bacteriana y los cambios morfológicos en biopelículas de *P. aeruginosa* frente a trimetoprim (TMP) y cotrimoxazol (TMP/SXT). **Material y Métodos:** Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante densidad óptica (DO) a partir de concentraciones establecidas por EUCAST. La formación de biopelícula se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y análisis de fracción de área con ImageJ, empleando un umbral estandarizado. **Resultados:** Se evidenció resistencia a ambos antimicrobianos. Sin embargo, la cobertura de biopelícula disminuyó desde 18,55% en el control, a 1,47% con TMP y 1,29% con TMP/SXT. A 20.000x, se observó menor densidad bacteriana y mayor presencia de matriz extracelular en las muestras tratadas. **Conclusiones:** Los antimicrobianos no inhiben completamente el crecimiento bacteriano, pero alteran la morfología de la biopelícula, sugiriendo un efecto sobre la organización estructural más que sobre la viabilidad.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*; biopelículas; microscopía electrónica de barrido; trimetoprim; cotrimoxazol.

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen known for its significant capacity to form biofilms, which contributes to its resistance in nosocomial infections. **Aim:** To compare bacterial susceptibility and morphological changes in *P. aeruginosa* biofilms in response to trimethoprim (TMP) and cotrimoxazole (TMP/SXT). **Materials and Methods:** The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by optical density (OD) based on concentrations established by EUCAST. Biofilm formation was assessed by scanning electron microscopy (SEM) and an area fraction analysis using ImageJ, applying a standardized threshold. **Results:** Resistance to both antimicrobials was detected. However, biofilm coverage decreased from 18.55% in the control group to 1.47% with TMP and 1.29% with TMP/SXT. At 20,000x magnification, a lower bacterial density and an increased presence of extracellular matrix were noted in the treated samples. **Conclusions:** Antimicrobials do not entirely inhibit bacterial growth; instead, they alter the morphology of the biofilm, suggesting an effect on the structural arrangement rather than on the viability.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; biofilms; scanning electron microscopy; trimethoprim; cotrimoxazole.

Introducción

Pseudomonas aeruginosa, un bacilo gramnegativo, es un patógeno oportunista, relevante en las infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS)^{1,2}, especialmente en pacientes con inmunodeficiencia³. Además de infectar tejido biológico, es capaz de colonizar insumos médicos y formar biopelículas en catéteres, implantes y lentes de contacto, entre otros. Su gran capacidad de adaptación y de producir biopelículas la posicionan como uno de los patógenos prevalentes en el entorno sanitario⁴. En 2017, la OMS la reconoció como patógeno prioritario para la investigación y el desarrollo de nuevos antimicrobianos⁴.

Entre los principales factores de riesgo para su adquisición se encuentran la alteración de barreras físicas como la piel y las mucosas (heridas, quemaduras, accesos vasculares) y los estados de inmunosupresión (diabetes mellitus, cáncer, VIH/SIDA, entre otros) o condiciones como la fibrosis quística. Puede ocasionar infecciones graves como bacteriemias, neumonía, infecciones del sistema nervioso central e infecciones del tracto urinario⁵. Según datos del MINSAL, en Chile *P. aeruginosa* es el microorganismo más frecuentemente aislado en neumonías nosocomiales asociadas a ventilación mecánica en UCI pediátricas (30,6%), y el tercero en unidades de cuidados intensivos de adultos (18,5% de los casos)⁵.

Este impacto epidemiológico se explica, en gran medida, por la capacidad de *P. aeruginosa* de formar biopelículas. Una biopelícula es un agregado estructurado de microorganismos embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (en inglés: EPS), compuesta por exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos extracelulares, que confiere viscoelasticidad y protección a las células bacterianas⁶. Se estima que 65% de las infecciones bacterianas involucran la formación de biopelículas, las cuales pueden aumentar hasta 1.000 veces la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en comparación con bacterias en estado planctónico^{4,7}. Esta característica se asocia clínicamente con infecciones crónicas, recurrentes y con retardo en la cicatrización de heridas⁷.

Los antimicrobianos seleccionados fueron trimetoprim (TMP) y cotrimoxazol (TMP/SXT). La selección no tuvo como objetivo evaluar su utilidad terapéutica frente a infecciones por *P. aeruginosa*, ya que este microorganismo presenta resistencia intrínseca a los antifolatos debido, entre otros mecanismos, a sistemas de eflujo como MexAB-OprM⁸. Sin embargo, el estudio de estos compuestos resulta relevante en determinados escenarios clínicos. Por una parte, TMP/SXT continúa utilizándose como tratamiento empírico en algunas infecciones urinarias antes de la identificación microbiológica definitiva, generando exposiciones transitorias de *P. aeruginosa* a concentraciones subinhibitorias del fármaco. En este contexto, resulta pertinente determinar si dicha exposición puede inducir modificaciones en la arquitectura de la biopelícula que potencialmente influyan en la respuesta posterior al tratamiento específico⁹.

Por otra parte, en pacientes con fibrosis quística son frecuentes las infecciones polimicrobianas en las que *P. aeruginosa* coexiste con otros patógenos oportunistas, particularmente

Stenotrophomonas maltophilia. Este segundo microorganismo, un bacilo gramnegativo cada vez más aislado en el esputo de pacientes con fibrosis quística, se ha asociado a peores respuestas terapéuticas y presenta resistencia intrínseca a múltiples β -lactámicos, incluidas las cefalosporinas¹⁰. Dado que TMP/SXT constituye uno de los principales tratamientos utilizados frente a *S. maltophilia* y que ambas especies presentan interacciones biológicas dentro de biopelículas mixtas, incluyendo efectos de *P. aeruginosa* sobre la adhesión, persistencia y organización estructural de *S. maltophilia*, resulta de interés evaluar si la exposición a TMP/SXT puede modificar la arquitectura de la biopelícula de *P. aeruginosa* y, potencialmente, alterar la dinámica de estas comunidades microbianas complejas. Estudios experimentales han demostrado que la presencia de *P. aeruginosa* incrementa la persistencia y carga bacteriana de *S. maltophilia* en el pulmón, favoreciendo además su co-localización dentro de biopelículas mixtas.

Considerando que la coinfección entre ambas especies se ha descrito en hasta 10-60% de los pacientes con fibrosis quística, comprender el efecto de TMP/SXT sobre la arquitectura de la biopelícula de *P. aeruginosa* podría aportar información relevante sobre la dinámica de estas asociaciones microbianas y sus posibles implicancias terapéuticas¹¹.

La evaluación convencional de susceptibilidad bacteriana *in vitro* se basa en la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), la que mide el crecimiento bacteriano en estado planctónico y no refleja completamente el comportamiento de las bacterias organizadas en biopelículas, donde la matriz extracelular juega un rol fundamental en la tolerancia antimicrobiana. En este contexto, la microscopía electrónica de barrido (MEB) surge como una herramienta complementaria fundamental, ya que permite observar alteraciones morfoestructurales que los métodos basados exclusivamente en el crecimiento bacteriano no logran captar. El presente trabajo se propone comparar la susceptibilidad bacteriana *in vitro* y los cambios morfológicos en biopelículas de *P. aeruginosa* frente a TMP y TMP/SXT, mediante ensayos de CIM y análisis ultraestructural por MEB, bajo la hipótesis de que la exposición a estos antimicrobianos genera alteraciones en la arquitectura de la biopelícula de forma distinta a la observada en estado planctónico.

Objetivos

General: Comparar la susceptibilidad bacteriana *in vitro* y cambios morfológicos en biopelículas de *P. aeruginosa* frente a TMP y TMP/SXT, de acuerdo con las concentraciones indicadas por el Comité Europeo de Evaluación de la Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST).

Específicos

- Determinar con ambos antimicrobianos la CIM y el efecto de su concentración en la formación de biopelículas.
- Comparar la respuesta de las fracciones bacterianas planctónicas y sésiles de *P. aeruginosa* frente a TMP y TMP/SXT
- Evaluar los cambios morfológicos y estructurales en las biopelículas expuestas a TMP y TMP/SXT, mediante MEB.

Material y Métodos

Diseño experimental

El estudio presenta un diseño experimental *in vitro*. Consiste en el análisis de cepas de *P. aeruginosa* con el propósito de evaluar la sobrevivencia de las bacterias cuando son sometidas a la acción de diferentes antimicrobianos. Para llevar a cabo este objetivo, se implementarán diversas técnicas especializadas, como espectrofotometría, para medir la DO y cuantificar el crecimiento bacteriano, y MEB, que permite una observación detallada de las estructuras celulares y posibles alteraciones morfológicas inducidas por los antimicrobianos. De esta manera, el diseño metodológico propuesto facilita la obtención de datos precisos y relevantes sobre la resistencia o susceptibilidad *in vitro* de las cepas bacterianas a los tratamientos antimicrobianos.

Los ensayos microbiológicos fueron realizados por triplicado utilizando tres biopelículas independientes (réplicas biológicas). En contraste, el análisis de microscopía electrónica de barrido se realizó sobre una biopelícula por condición experimental, a partir de la cual se obtuvieron seis regiones de interés para el análisis cuantitativo, consideradas como réplicas técnicas.

Determinación de CIM

La susceptibilidad bacteriana *in vitro* fue evaluada mediante medición de DO, utilizando como referencia los puntos de corte establecidos por EUCAST para determinar sensibilidad o resistencia. Los puntos de corte usados fueron de 64 µg/mL para TMP y 8 µg/mL para TMP/SXT. Para los ensayos se utilizó la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Con el fin de diferenciar la respuesta según el estado fenotípico, sétil o planctónico, se emplearon dos enfoques:

- **Estado planctónico:** Inoculación directa en microplaca con diluciones seriadas de antimicrobiano. Tras incubación, se registró la DO como indicador de crecimiento bacteriano.
- **Estado sétil (Biopelícula):** Se incubaron cultivos bacterianos durante 24 horas para permitir la formación de biopelícula. Tras la incubación, el sobrenadante (células planctónicas residuales) fue cuidadosamente separado para su evaluación independiente, mientras que la biopelícula adherida fue lavada y tratada *in situ* con los antimicrobianos para comparar su tolerancia frente a la fase líquida.

La DO fue medida en ambas condiciones experimentales, permitiendo comparar la respuesta de bacterias planctónicas y asociadas a biopelícula frente a los antimicrobianos evaluados.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La preparación de las muestras se inició con la estandarización del inóculo bacteriano, cultivando la cepa en caldo Mueller Hinton hasta alcanzar la fase estacionaria. La concentración celular se ajustó mediante espectrofotometría a una DO de 0,132 (DO₆₀₀), equivalente a 0,5 en la escala de McFarland (10⁸ ufc/mL), tras un periodo de incubación de 20 horas a 37°C. En

paralelo, se funcionalizaron cubreobjetos de vidrio mediante una incubación prolongada en poli-L-lisina (12-16 horas) para promover la adherencia bacteriana por interacción electrostática, seguida de un protocolo de lavado triple con PBS 1x y secado en condiciones de esterilidad. El montaje experimental se realizó en placas de 12 pocillos, donde se integraron los soportes tratados con una mezcla compuesta por 1 mL de caldo Mueller Hinton, 1 mL del agente antimicrobiano titulado mediante dilución seriada y 1 mL de la suspensión bacteriana estandarizada. El sistema se incubó a 37°C durante 24 horas, permitiendo la interacción entre el fármaco y el microorganismo sobre la superficie del cubreobjetos previo al procesamiento ultraestructural. Posteriormente, se procedió al lavado de las biopelículas mediante la extracción cuidadosa del sobrenadante con micropipetas de volumen variable (P1000 y P10) para evitar el desprendimiento mecánico de la biopelícula. Los soportes fueron lavados tres veces con PBS 1x estéril a temperatura ambiente, manteniendo siempre una película de líquido sobre la muestra para prevenir el colapso estructural por desecación.

La fijación química se llevó a cabo mediante inmersión en glutaraldehído al 2,5% en *buffer* cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,2) durante toda una noche a 4°C. Finalmente, tras la eliminación del fijador, las muestras se lavaron dos veces con *buffer* cacodilato y tres veces con agua destilada antes de iniciar la deshidratación química. Este proceso se realizó mediante una serie ascendente de alcoholes (concentraciones de 30 a 100%) y lavados dobles en acetona por periodos de 15 minutos cada uno. El protocolo concluyó con el secado de punto crítico en un equipo automatizado, utilizando CO₂ líquido para reemplazar la acetona residual y preservar la integridad tridimensional de la matriz extracelular y las células bacterianas.

A partir de los resultados se evaluaron dos niveles de magnificación:

- Baja magnificación (400x): Cobertura global de la biopelícula.
- Alta magnificación (15.000x): Estructura y matriz extracelular

Análisis de imágenes

Las imágenes obtenidas mediante MEB fueron analizadas utilizando ImageJ. Todas las imágenes fueron convertidas a escala de grises (8-bit) y ajustadas en brillo y contraste de manera estandarizada. Para el análisis cuantitativo se utilizó una plantilla fija compuesta por seis regiones de interés (ROI) rectangulares distribuidas uniformemente sobre cada imagen. La misma plantilla fue aplicada de forma idéntica a todas las condiciones experimentales. La segmentación de la biopelícula se realizó mediante el algoritmo automático de umbralización Otsu, utilizando exactamente los mismos parámetros para todas las muestras. Posteriormente, se generaron máscaras binarias y se cuantificó la fracción de área cubierta mediante análisis de partículas. Los resultados se expresaron como porcentaje de cobertura de biopelícula.

Para cada condición experimental se analizó una imagen obtenida de la biopelícula, obteniéndose seis mediciones derivadas de las seis regiones de interés definidas previamente.

Análisis estadístico

Los datos de cobertura de biopelícula fueron expresados como la media $\pm$ la desviación estándar (DE). Se analizó un total de seis zonas de interés por cada condición experimental. Para determinar las diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados con antimicrobianos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. El análisis se realizó utilizando el software Excel y VassarStats.

Resultados

Resultados CIM y ensayos de medición de DO

Los ensayos de susceptibilidad *in vitro* de *P. aeruginosa* permiten categorizar la cepa como resistente según los puntos de corte de EUCAST, tanto a TMP como a TMP/SXT, observándose crecimiento bacteriano en todas las condiciones evaluadas. Sin embargo, se presentó un mayor crecimiento frente a TMP en comparación de TMP/SXT.

En el ensayo de inoculación directa, el análisis de DO mostró diferencias en el crecimiento bacteriano entre los tratamientos, evidenciándose una menor DO en presencia de TMP/SXT en comparación con TMP lo que sugiere una mayor actividad relativa del primero.

En el modelo que permitió diferenciar fracciones planctónicas y asociadas a biopelícula, se observó que el sobrenadante presentó valores de DO significativamente menores en comparación con las condiciones iniciales, indicando una menor biomasa bacteriana en esta fracción. No obstante, se mantuvo el patrón observado previamente, con menor crecimiento en presencia de TMP/SXT respecto a TMP.

Por otro lado, la biopelícula remanente tratado directamente con antimicrobianos mostró persistencia de crecimiento bacteriano, lo que sugiere una mayor tolerancia de las bacterias en estado sésil.

En conjunto, estos resultados indican que, si bien ambos antimicrobianos no inhiben completamente el crecimiento de *P. aeruginosa*, existen diferencias en su efecto sobre las distintas fracciones bacterianas, siendo TMP/SXT el que presenta una mayor reducción relativa del crecimiento.

Resultados de análisis cuantitativo de imágenes de microscopía electrónica de barrido a magnificación 400x

El análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas mediante MEB a baja magnificación ($\sim 400\times$) permitió determinar la fracción de área cubierta por biopelícula en cada condición experimental.

El grupo control presentó una cobertura promedio de 18,55%, evidenciando una formación significativa de biopelícula. En contraste, los tratamientos con antimicrobianos mostraron una marcada disminución en la cobertura, alcanzando valores de 1,47% para TMP y 1,29% para TMP/SXT.

Se observó una reducción significativa en la cobertura de la

biopelícula en los grupos tratados con TMP (1,47%) y TMP/SXT (1,29%) en comparación con el control (18,55%) ($p < 0,001$, ANOVA-Tukey).

Estos resultados indican una reducción sustancial en la extensión superficial de biopelícula en presencia de ambos antimicrobianos (Figuras 1 a 4).

Resultados de análisis cualitativo de imágenes de microscopía electrónica de barrido a magnificación 15.000x

El análisis cualitativo a alta magnificación (15.000x) reveló diferencias estructurales relevantes en la organización de la biopelícula entre las condiciones evaluadas.

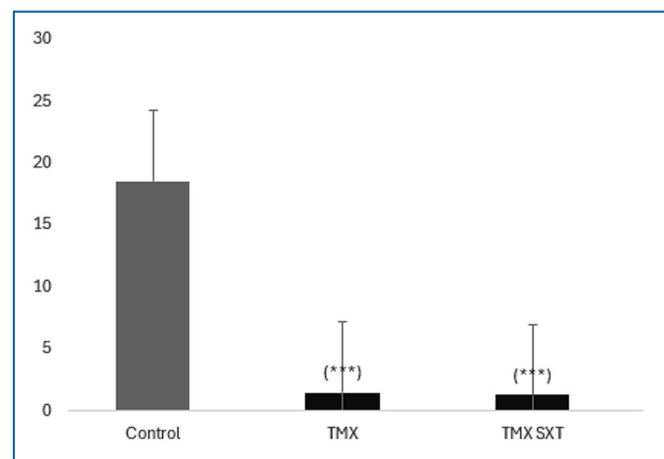


Figura 1. Porcentaje de cobertura de superficie por biopelícula de *P. aeruginosa*. Los datos representan la media $\pm$ DE de seis áreas de interés. (***) indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,001$).

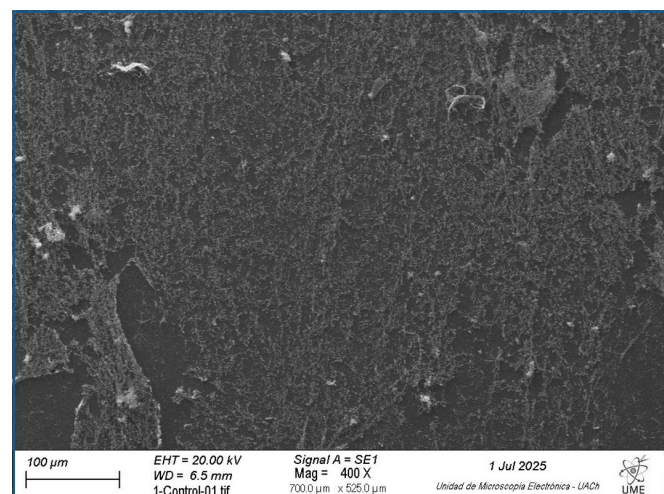


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido a magnificación de 400x de muestra Control.

En el grupo control, se observó una alta densidad de bacterias con una matriz extracelular relativamente escasa, caracterizada por la presencia de filamentos finos que conectan las células. En contraste, las muestras tratadas con TMP/SXT evidenciaron una reorganización de la arquitectura sésil; una menor densidad bacteriana, acompañada de una matriz de exopolisacáridos más densa y compacta. Esta matriz se presentó como una red más compacta que rodea a las bacterias remanentes.

Estos hallazgos sugieren que la exposición a antimicrobianos reduce la población bacteriana, pero también induce cambios en la arquitectura de la biopelícula, caracterizados por una disminución en la densidad celular y un aumento relativo de la matriz extracelular (Figuras 5 y 6).

Discusión

Los resultados obtenidos evidencian una discrepancia entre la resistencia observada en los ensayos de susceptibilidad y los cambios estructurales detectados en la biopelícula de *P. aeruginosa*. Mientras que los ensayos de DO mostraron crecimiento bacteriano en presencia de TMP y TMP/SXT, el análisis mediante MEB reveló una disminución significativa en la cobertura superficial de la biopelícula y modificaciones en su arquitectura.

Esta diferencia puede explicarse considerando que los ensayos basados en DO evalúan principalmente bacterias en estado planctónico, sin reflejar completamente el comportamiento de las

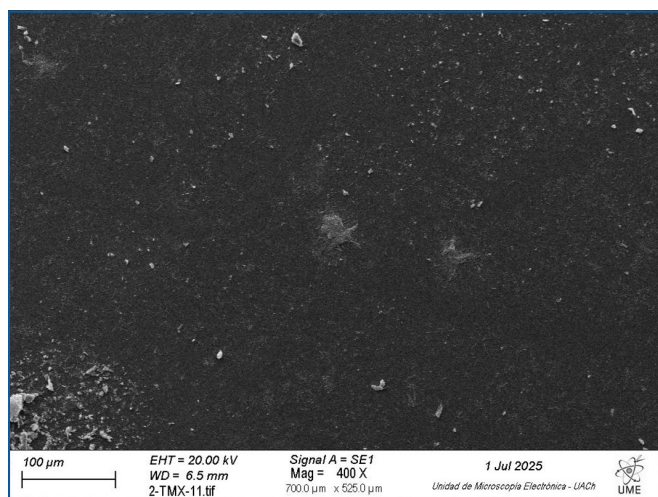


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido a magnificación de 400x de muestra con TMP.

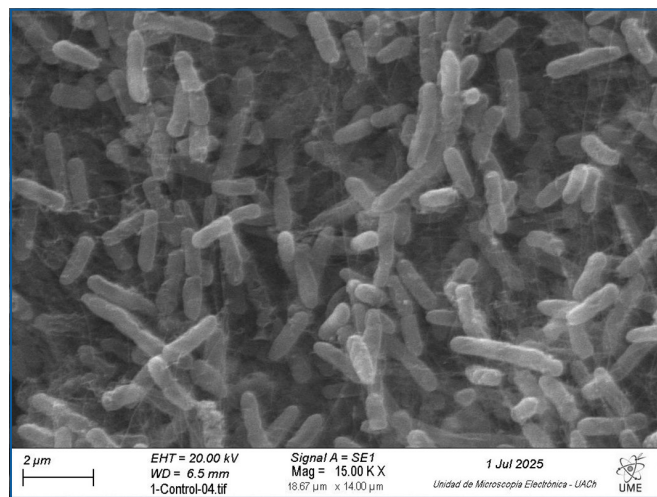


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido a magnificación de 15.000x de muestra Control.

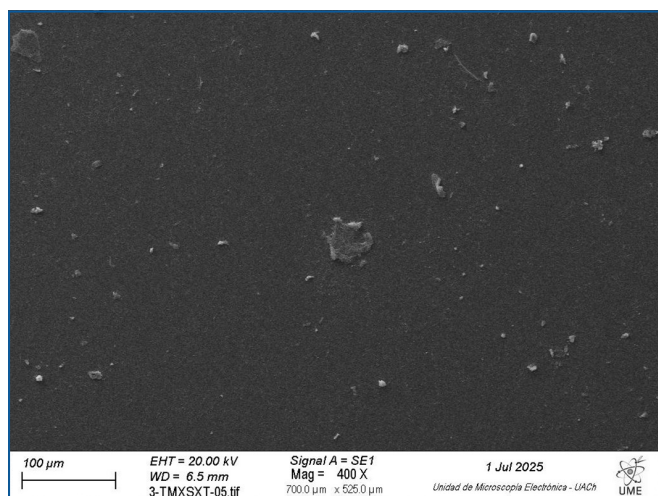


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido a magnificación de 400x de muestra con TMP/ SXT.

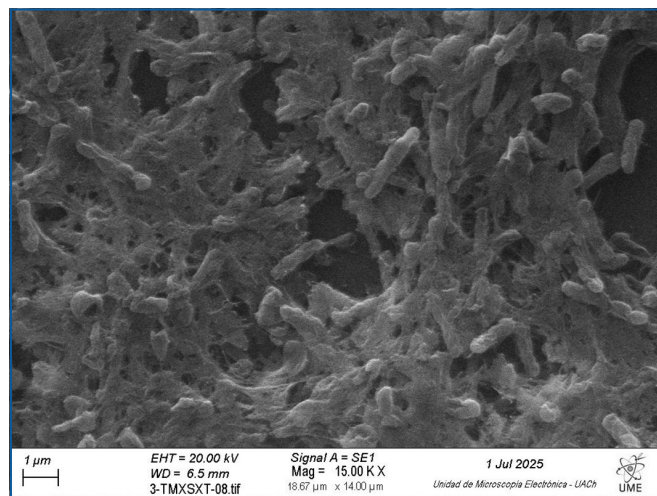


Figura 6. Microscopía electrónica de barrido a magnificación de 15.000x de muestra de TMP/SXT.

células en biopelícula. En este contexto, el modelo experimental utilizado permitió diferenciar entre fracciones planctónicas y sésiles, evidenciando que el sobrenadante presentó menor biomasa bacteriana, mientras que la biopelícula remanente mostró persistencia de crecimiento, sugiriendo una mayor tolerancia de las bacterias adheridas.

El análisis cuantitativo a baja magnificación evidenció una reducción marcada en la cobertura de la biopelícula en presencia de ambos antimicrobianos, lo que sugiere un efecto sobre la adhesión o expansión superficial. Sin embargo, el análisis cualitativo a alta magnificación reveló un aumento relativo en la densidad de la matriz extracelular en las muestras tratadas, acompañado de una menor densidad bacteriana.

Esta observación coincide con lo reportado por Thi y cols. (2020), quienes sugieren que el estrés por agentes bacteriostáticos puede gatillar vías de señalización de *quorum sensing* que refuerzan la producción de EPS. No obstante, nuestros hallazgos contrastan con estudios de susceptibilidad tradicional que suelen descartar el uso de antifolatos en *P. aeruginosa*, demostrando que, aunque no hay lisis total, existe un impacto estructural observable que no es detectado mediante los ensayos convencionales de susceptibilidad *in vitro*.

Estos hallazgos sugieren que, si bien los antimicrobianos no eliminan completamente a *P. aeruginosa*, sí inducen una reorganización de la biopelícula. La mayor presencia de matriz de exopolisacáridos podría interpretarse como una respuesta adaptativa al estrés antimicrobianos, en la cual las bacterias sobrevivientes incrementan la producción de matriz como mecanismo de protección, favoreciendo la persistencia y tolerancia antimicrobiana.

Además, se observaron diferencias entre los antimicrobianos evaluados, evidenciándose una menor DO en presencia de TMP/SXT en comparación con TMP, lo que sugiere una mayor actividad relativa del primero. No obstante, ambos antimicrobianos fueron incapaces de inhibir completamente el crecimiento bacteriano en las condiciones evaluadas.

Es importante reconocer las limitaciones de este estudio, al ser un modelo *in vitro* que no considera la interacción con el sistema inmune del hospedero ni las variaciones de pH y nutrientes propias de una infección *in vivo*. Futuras investigaciones deberían evaluar si esta reorganización de la matriz observada mediante MEB se traduce en una barrera física para la entrada de otros antimicrobianos en terapias combinadas.

No se realizaron ensayos de recuento viable (ufc), tinciones *Live/Dead* ni determinaciones de actividad metabólica, por lo que no es posible establecer si la disminución de cobertura observada corresponde a muerte bacteriana, desprendimiento celular o reorganización estructural de la biopelícula.

Este modelo *in vitro* presenta ventajas y desventajas ya que evalúa solo la interacción entre bacterias y fármacos. Por ejemplo, se utilizó una cepa de referencia (ATCC 27853) en un contexto ambiental ideal y controlado, lo cual no replica la complejidad de los tejidos humanos, donde *P. aeruginosa* interactúa con el sistema inmune, gradientes de oxígeno fluctuantes y la presencia

de otras células del hospedero. Asimismo, factores como el error humano inherente a la manipulación técnica y el procesamiento de muestras para MEB podrían influir en la variabilidad observada. Adicionalmente, el análisis de imágenes fue realizado por un único observador conocedor de las condiciones experimentales, sin cegamiento respecto de los tratamientos evaluados. Aunque se empleó un procedimiento de segmentación automatizada y estandarizado para todas las muestras, no puede descartarse completamente la introducción de sesgos durante la selección y procesamiento de las imágenes.

Como proyecciones de este trabajo, resulta fundamental trasladar este análisis estructural a aislados clínicos obtenidos directamente de pacientes con infecciones nosocomiales. Esto permitiría determinar si las cepas adaptadas al entorno hospitalario presentan mecanismos de reorganización de matriz aún más agresivos que los observados en cepas estandarizadas. Asimismo, se sugiere evaluar el efecto de estos antimicrobianos en combinación con otros agentes para explorar posibles sinergias que logren desestabilizar la arquitectura de la biopelícula aquí descrita.

En conjunto, estos resultados destacan la importancia de complementar los ensayos convencionales de susceptibilidad *in vitro* con análisis estructurales de biopelícula, ya que la respuesta bacteriana a los antimicrobianos no depende exclusivamente de la viabilidad celular, sino también de la organización y dinámica de la biopelícula.

Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que TMP y TMP/SXT no inhiben completamente el crecimiento de *P. aeruginosa*, evidenciando resistencia en las condiciones experimentales evaluadas mediante DO.

No obstante, ambos antimicrobianos se asociaron a cambios en la cobertura superficial y en la organización de la matriz extracelular de la biopelícula, observados por MEB. Estos hallazgos sugieren que, aun en ausencia de inhibición bactericida completa, TMP y TMP/SXT podrían ejercer efectos sobre la arquitectura de la biopelícula que no son detectables mediante ensayos convencionales de susceptibilidad *in vitro* basados en densidad óptica.

Sin embargo, el presente estudio no permite establecer los mecanismos moleculares específicos que explican estos cambios, ni extrapolar sus implicaciones clínicas directas, dado que se trata de un modelo *in vitro* con cepa de referencia ATCC y sin cuantificación de viabilidad celular.

En conjunto, estos resultados destacan la utilidad de complementar los ensayos de susceptibilidad *in vitro* convencionales con análisis morfoestructurales de biopelícula, y justifican la realización de estudios futuros con aislados clínicos y métodos de cuantificación de viabilidad que permitan profundizar en la relevancia de estos hallazgos.

Referencias bibliográficas

1. Figueroa J, Cartes C, Villagrán D, Solís C, Nourdin-Galindo G. J Fish Disease | Wiley Online Library [Internet]. 2021 [citado 11 de julio de 2024]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfd.13333>
2. Gomila A, Carratalà J, Badia JM, Camprubí D, Piriz M, Shaw E, et al. Preoperative oral antibiotic prophylaxis reduces *Pseudomonas aeruginosa* surgical site infections after elective colorectal surgery: a multicenter prospective cohort study. BMC Infect Dis. 5 de octubre de 2018; 18(1): 507. doi: 10.1186/s12879-018-3413-1.
3. Gale MJ, Maritato MS, Chen YL, Abdulateef SS, Ruiz JE. *Pseudomonas aeruginosa* causing inflammatory mass of the nasopharynx in an immunocompromised HIV infected patient: A mimic of malignancy. IDCases. 2015; 2(2): 40-3. doi: 10.1016/j.idcr.2015.01.004.
4. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Int J Mol Sci. 17 de noviembre de 2020; 21(22): 8671. doi: 10.3390/ijms21228671.
5. Zambrano FA, Herrera A. N. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta, Chile. Rev Chil Infectol. junio de 2004; 21(2): 117-24. doi: 10.4067/S0716-10182004000200003
6. Zúñiga A, Solís C, Cartes C, Nourdin G, Yañez A, Romero A, et al. Transcriptional analysis of metabolic and virulence genes associated with biofilm formation in *Piscirickettsia salmonis* strains. FEMS Microbiol Lett. 25 de noviembre de 2020; 367(21): fnaa180. doi: 10.1093/femsle/fnaa180
7. Bolívar-Vargas AF, Torres-Caycedo MI, Sánchez-Neira Y. Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* como mecanismos de resistencia y tolerancia a antibióticos. Revisión narrativa. Rev Fac Cienc Salud Univ Cauca. 22 de noviembre de 2021; 23(2): 2. doi: 10.47373/rfcs.2021.v23.1780