

Vanesa Pérez Laguna

Terapia fotodinámica  
antimicrobiana frente a agentes  
causantes de infecciones en piel  
y/o mucosas

Departamento

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es

REZUSTA LÓPEZ, ANTONIO  
SAMPER BLASCO, SOFIA  
GILABERTE CALZADA, YOLANDA

**EXTRACTO**

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

El presente documento es un extracto de la tesis original depositada en el Archivo Universitario.

En cumplimiento del artículo 14.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, los autores que puedan verse afectados por alguna de las excepciones contempladas en la normativa citada deberán solicitar explícitamente la no publicación del contenido íntegro de su tesis doctoral en el repositorio de la Universidad de Zaragoza. Las situaciones excepcionales contempladas son:

- Que la tesis se haya desarrollado en los términos de un convenio de confidencialidad con una o más empresas o instituciones.
- Que la tesis recoja resultados susceptibles de ser patentados.
- Alguna otra circunstancia legal que impida su difusión completa en abierto.



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral [Extracto]

TERAPIA FOTODINÁMICA ANTIMICROBIANA  
FRENTE A AGENTES CAUSANTES DE  
INFECCIONES EN PIEL Y/O MUCOSAS

Autor

Vanesa Pérez Laguna

Director/es

REZUSTA LÓPEZ, ANTONIO  
SAMPER BLASCO, SOFIA  
GILABERTE CALZADA, YOLANDA

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2019



**Terapia fotodinámica  
antimicrobiana frente a  
agentes causantes de  
infecciones en piel y/o  
mucosas**

*Vanesa Pérez-Laguna*







**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA  
MOLECULAR Y CELULAR**



**TERAPIA FOTODINÁMICA ANTIMICROBIANA  
FRENTE A AGENTES CAUSANTES DE  
INFECCIONES EN PIEL Y/O MUCOSAS**

**VANESA PÉREZ LAGUNA**

**TESIS DOCTORAL**

**-2018-**



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y CELULAR**

**TERAPIA FOTODINÁMICA ANTIMICROBIANA  
FRENTE A AGENTES CAUSANTES DE  
INFECCIONES EN PIEL Y/O MUCOSAS**

Memoria presentada por:

**VANESA PÉREZ LAGUNA**

Para optar al Título de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Dirigida por:

**DR. ANTONIO REZÚSTA LÓPEZ**

**DRA. YOLANDA GILABERTE CALZADA**

**DRA. SOFÍA SAMPER BLASCO**



Departamento de  
Bioquímica y Biología  
Molecular y Celular  
Universidad Zaragoza



Hospital Universitario  
Miguel Servet



Aragón  
Instituto de Investigación  
Sanitaria Aragón



A mi familia, amigos y Santi  
por todo vuestro apoyo.  
Sé que no ha sido fácil.  
Os dedico el fruto del tiempo  
que no he pasado con vosotros.



## *AGRADECIMIENTOS*

---

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible este trabajo:

En primer lugar, a mis directores, el Dr. Antonio Rezusta, la Dra. Sofía Samper y la Dra. Yolanda Gilaberte sin los cuales esta Tesis no habría tenido lugar.

A Antonio porque echando la vista atrás tengo que agradecer que me metiera en este lío que tanto esfuerzo me ha costado y tantas veces pensé que no acabaría. Me introdujo en el mundo de la terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA), confió en mí desde el principio y me abrió las puertas del Laboratorio de Hongos del Departamento de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS).

A Sofía, por todo su apoyo, tratarme siempre con tanto cariño y acogerme en la Unidad de Investigación Traslacional del HUMS. No solo me ha proporcionado un sitio donde realizar parte de los experimentos de TFDA y tener mi despacho, siempre ha estado dispuesta a ayudarme con una sonrisa.

A Yolanda, por su paciencia a la hora de corregir una y otra vez mis escritos. Me ha enseñado con cada comentario.

Continúo los agradecimientos con Luna Pérez Artiaga y Verónica Lampaya Pérez, las mejores técnicas de laboratorio, por su inconmensurable ayuda a la hora de realizar gran parte de los experimentos, por su compañía y por el apoyo constante. Haberlas conocido es de lo mejor que me llevo de este periodo. Ellas saben de primera mano el esfuerzo que hay detrás de cada dato y por eso parte del mérito de esta Tesis es suyo.

A la Dra. Carmen Alejandre por la orientación recibida en los comienzos de mis experimentos. Sus conocimientos y experiencia previa en TFDA fueron esenciales para el comienzo de esta Tesis.

A Pilar Soria Lozano por su ayuda para comenzar los experimentos TFDA y al Dr. Manuel Pablo Paz-Cristobal porque su Tesis ha supuesto un ejemplo para mí. A ambos, por la colaboración en los Estudios.

A la Dra. Isabel Millán Lou por el trabajo conjunto y los consejos.

A mis compañeros de despacho por estar siempre para escucharme y animarme, por toda su ayuda y porque estos años no habrían sido lo mismo sin ellos.

A María Isabel García Luque y Sofía Ballesta del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla por su apoyo en todo el desarrollo de esta Tesis y la realización de los experimentos de TFDA *in vitro* en estado de biofilm. Así como al Profesor Santi Nonell, a la Prof. Montse Agut y a todo su grupo del Institut Químic de Sarrià de Barcelona por la constante colaboración. No puedo dejar de citar al proyecto CTQ2013-48767-C3-2-R del Ministerio de Economía y Competitividad en el que se incluyen parte de los Estudios que conforman esta Tesis y que es el que me dio la oportunidad de trabajar con ellos.

Al Dr. Francisco Galindo del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universitat Jaume I de Castellón de la Plana y a su grupo por habernos dado la oportunidad de poder experimentar con sus polímeros. Ha sido un placer.

A los Dres. Luís Miguel Ferrer Mayayo y Juan José Ramos del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza por darnos la oportunidad de colaborar y así poder llevar a cabo experimentos índole clínica en animales. He de confesar que me hace especial ilusión que uno de los estudios que conforman esta Tesis, el

Estudio 6, sea sobre la aplicación de la TFDA en ganado ovino y se lo debo a ellos.

A la Dra. Carmen Aspiroz por su buena disposición para trabajar conmigo y permitirme usar los Laboratorios de Microbiología del Hospital Royo Villanova de Zaragoza.

A la Secretaria de Relaciones Exteriores de México por concederme una de sus Becas de Excelencia del Gobierno de México para Extranjeros con la que puede realizar una estancia de investigación de seis meses. Estoy muy agradecida por la oportunidad que me brindo.

Al Dr. Santiago Camacho-López del Departamento de Óptica de la División de Física Aplicada del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México, por su confianza en la posibilidad de colaborar desde el primer momento, por acogerme en su grupo durante mi estancia, por los ánimos cuando los experimentos no salían y por sus revisiones con las que siempre aprendo. El periodo que pase bajo su supervisión fue una gran experiencia y se lo debo en gran parte.

A todas las personas del CICESE con las que tuve la suerte de trabajar. Especialmente a María Cecilia Guerra Olvera por todo el esfuerzo compartido, los buenos ratos y lo que me enseñó. También agradezco a la Dra. Carolina Álvarez Delgado por abrirnos las puertas de su laboratorio y su gran disposición para colaborar. Así como a la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez y a la Dra. Olga Alicia Callejas Negrete por su supervisión, apoyo y orientación en los experimentos de microscopía confocal de células bacterianas.



Dra. **YOLANDA GILABERTE CALZADA**, Jefa de Servicio de Dermatología en el Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

Dra. **SOFÍA SAMPER BLASCO**, investigadora de la Unidad de Investigación Traslacional del Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

Dr. **ANTONIO REZUSTA LÓPEZ**, Jefe de Servicio de Microbiología en el Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

Codirectores de esta Tesis Doctoral,

CERTIFICAN

Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada: "Terapia fotodinámica antimicrobiana frente a agentes causantes de infecciones en piel y/o mucosas", presentada por Dña. **VANESA PÉREZ LAGUNA**, ha sido realizada bajo su dirección, de acuerdo a los objetivos presentados en el Proyecto de Tesis aprobado por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, reúne los requisitos para ser presentada por su autora para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza y autorizan su presentación en la modalidad de compendio de publicaciones con mención internacional.

Zaragoza, 22 octubre 2018

Fdo. Dra. Yolanda Gilaberte

Fdo. Dra. Sofía Samper

Fdo. Dr. Antonio Rezusta



## ***PRESENTACION***

---

La presente Tesis Doctoral de título “Terapia fotodinámica antimicrobiana frente a agentes causantes de infecciones en piel y/o mucosas” está elaborada por compendio de trabajos científicos publicados.

Los artículos recogen el efecto de la fotodinámica en la inactivación de distintos microorganismos que, de forma habitual, son responsables de infecciones en piel y/o mucosas utilizando diferentes metodologías. Este tema se explica ampliamente en la introducción. A continuación, se precisa la justificación y se incluye el listado del compendio de publicaciones, la hipótesis, los objetivos, el material, los métodos y las conclusiones de los trabajos científicos principales que constituyen la presente Tesis Doctoral. Los resultados y la discusión quedan expuestos mediante la inclusión de dichos trabajos.

Las publicaciones que constituyen el núcleo de la Tesis y que se referencian de acuerdo a la numeración abajo expuesta son:

**Estudio 1:** Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez Artiaga L, Lampaya Pérez V, Aporta Alfonso J, **Pérez-Laguna V**, García Luque I, Revillo MJ, Rezusta A. ***In vitro* effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms.** BMC Microbiol. 2015 Sep 26;15(1):187. [FI: 2,644 Q2](#)

**Estudio 2:** **Pérez-Laguna V**, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Camacho-López S, García-Luque I, Revillo MJ, Nonell S, Gilaberte Y, Rezusta A. **Comparative effect of photodynamic therapy on separated or mixed cultures of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*.** Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017 Sep;19:98-102. [FI: 2,212 Q3](#)

**Estudio 3:** **Pérez-Laguna V**, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, García-Luque I, Ballesta S, Nonell S, Paz-Cristobal MP, Gilaberte Y, Rezusta

A. **Bactericidal Effect of photodynamic therapy, alone or in combination with mupirocin or linezolid, on *Staphylococcus aureus*.** Front Microbiol. 2017 May 31;8:1002. [FI: 4,076 Q1](#)

**Estudio 4:** Pérez-Laguna V, García-Luque I, Ballesta S, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Soria-Lozano P, Rezusta A, Gilaberte Y. **Antimicrobial photodynamic activity of Rose Bengal, alone or in combination with Gentamicin, against planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus*.** Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018 Mar; 21:211-216. [FI: 2,212 Q3](#)

**Estudio 5:** Beltrán A, Mikhailov M, Sokolov MN, Pérez-Laguna V, Rezusta A, Revillo MJ, Galindo F. **A photobleaching resistant polymer supported hexanuclear molybdenum iodide cluster for photocatalytic oxygenations and photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*.** J. Mater. Chem. B, 2016, 4, 5975. [FI: 4,543 Q1](#)

**Estudio 6:** Pérez-Laguna V, Rezusta A, Ramos JJ, Ferrer LM, Gene J, Revillo MJ, Gilaberte Y. **Daylight photodynamic therapy using methylene blue to treat sheep with dermatophytosis caused by *Arthroderma vanbreuseghemii*.** Small Ruminant Research, 2017 May 1; 150:97-101 [FI 0,947 Q2](#)

Se concluye con una sección de anexos: En el Anexo I se detalla el área temática, factor de impacto y aportación del doctorando en cada una de las publicaciones principales. En el Anexo II se incluyen las publicaciones que no conforman la Tesis pero están relacionadas con el núcleo temático y se derivan del trabajo de revisión bibliográfica e investigación experimental realizado mediante la elaboración de ésta. El Anexo III lo compone el área temática, el factor de impacto y la aportación del doctorando en las publicaciones secundarias.

Las publicaciones secundarias son:

- 1.- Lozano C, Rezusta A, Ferrer I, **Pérez-Laguna V**, Zarazaga M, Ruiz-Ripa L, Revillo MJ, Torres C. ***Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission.** Vector Borne Zoonotic Dis. 2017 Apr;17(4):268-270. [FI: 2,045 Q2](#)
- 2.- Felip-León C, Arnau del Valle C, **Pérez-Laguna V**, Millán-Lou MI, Miravet JF, Mikhailov M, Sokolov MN, Rezusta-López A, Galindo F. **Superior performance of macroporous over gel type polystyrene as a support for the development of photo-bactericidal materials.** J. Mater. Chem. B, 2017,5, 6058-6064 [FI: 4,543 Q1](#)
- 3.- **Pérez-Laguna V**, García-Malinis AJ, Aspiroz C, Rezusta A, Gilaberte Y. **Antimicrobial effects of photodynamic therapy: an overview.** G Ital Dermatol Venereol. 2018 Apr 19. [FI: 1,311 Q2](#)

# *ÍNDICE*

---

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>II</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN Y PALABRAS CLAVE</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT AND KEYWORDS</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>1. La resistencia a los antimicrobianos</b> .....	<b>5</b>
1.1. Antimicrobianos, resistoma y resistencia.....	5
1.2. Fundamento de la resistencia .....	6
1.3. Las enfermedades infecciosas y el problema de la resistencia.....	10
1.4. Bases de la lucha frente a la resistencia.....	14
1.4.1. Uso racional de los antimicrobianos.....	14
1.4.2. Programas de vigilancia y esfuerzo global.....	15
1.4.3. Nuevos antimicrobianos eficaces o tratamientos alternativos.....	16
<b>2. La Terapia fotodinámica</b> .....	<b>19</b>
2.1. Concepto.....	19
2.2. Historia.....	20
2.3. Componentes de la terapia fotodinámica .....	24
2.3.1 El oxígeno molecular.....	24
2.3.2 La luz.....	24
2.3.2.1 Clasificación y tipos de fuentes de luz .....	26
2.3.2.1.1. Fuentes de luz no coherentes .....	26
2.3.2.1.2. Fuentes de luz coherentes .....	28
2.3.2.2. Penetración de la luz en los tejidos .....	33
2.3.2.3. Dosimetría de la luz.....	35
2.3.3. Moléculas fotosensibilizantes.....	35
2.3.3.1. Características ideales de un fotosensibilizante .....	36
2.3.3.2. Clasificación y tipos de fotosensibilizantes.....	37
2.3.3.2.1. Compuestos tricíclicos.....	37
2.3.3.2.2. Compuestos policíclicos relacionados con las porfirinas .....	39
2.3.3.2.3. Otros compuestos .....	41
2.4. La reacción fotodinámica .....	43
2.4.1. Fundamento fotofísico y fotoquímico .....	43
2.4.2. Vías de generación de especies reactivas de oxígeno .....	47
2.4.2.1. Mecanismo tipo I.....	47
2.4.2.2. Mecanismo tipo II .....	49
2.4.3. Efecto en biosistemas .....	50
2.5. Dianas de la terapia fotodinámica antimicrobiana.....	53
2.5.1. Los virus .....	53
2.5.2. La célula bacteriana.....	56
2.5.3. La célula fúngica .....	62
2.5.4. Los parásitos.....	66

2.6. Aplicaciones de la terapia fotodinámica antimicrobiana .....	68
2.6.1. Aplicaciones clínicas: tratamiento de infecciones en piel y mucosas .....	68
2.6.2. Aplicaciones no clínicas .....	70
2.7. Ventajas de la terapia fotodinámica antimicrobiana .....	71
2.8. Limitaciones actuales y perspectivas de futuro de la terapia fotodinámica antimicrobiana .....	74
2.9. Perspectivas de futuro de la terapia fotodinámica antimicrobiana .....	75
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>79</b>
<b>COMPENDIO DE PUBLICACIONES: ESTUDIOS PRINCIPALES.....</b>	<b>84</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>87</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>89</b>
<b>1. Objetivo General.....</b>	<b>90</b>
<b>2. Objetivos de cada publicación .....</b>	<b>90</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>94</b>
<b>1. Material.....</b>	<b>95</b>
1.1. Reactivos y medios .....	95
1.1.1. Reactivos generales .....	94
1.1.2. Fotosensibilizantes .....	95
1.1.3. Antibióticos .....	97
1.1.4. Medios de cultivo .....	98
1.2. Microorganismos y población de estudio .....	98
1.2.1. Especies de colección.....	98
1.2.2. Población de estudio.....	99
1.3. Instrumentación .....	99
1.3.1. Fuentes de luz .....	99
1.3.1.1. Lámpara de haluro metálico .....	99
1.3.1.2. Lámpara de diodos emisores de luz .....	100
1.3.1.3. Sol.....	100
1.3.2. Materiales generales .....	103
<b>2. Métodos .....</b>	<b>104</b>
2.1. Cultivos y condiciones de crecimiento .....	104
2.1.1. Cultivo de bacterias y de levaduras .....	104
2.1.2. Aislamiento, cultivo e identificación de dermatofito .....	106
2.2. Preparación de los inóculos para estudios <i>in vitro</i> .....	108
2.3. Preparación de los fotosensibilizantes .....	109
2.3.1. Realización de las disoluciones .....	109
2.3.2. Concentraciones de trabajo empleadas.....	111
2.4. Tratamiento fotodinámico.....	111
2.4.1. Experimentos <i>in vitro</i> .....	111
2.4.1.1. Con concentraciones variables de fotosensibilizante y fluencia fija.....	111
2.4.1.2. Con concentraciones variables de fotosensibilizante, adición de antibiótico y fluencia fija.....	113
2.4.1.3. Concentración fija de fotosensibilizante y fluencia creciente .....	114

2.4.2. Experimentos <i>in vivo</i> .....	115
2.5. Cuantificación del efecto antimicrobiano .....	116
2.5.1. Experimentos <i>in vitro</i> .....	116
2.5.1.1. Contaje de colonias .....	116
2.5.1.2. Controles empleados .....	119
2.5.1.3 Análisis estadístico .....	120
2.5.2. Experimentos <i>in vivo</i> .....	121
<b>3. Resumen de los materiales y la metodología</b> .....	122
<b>4. Summary of materials and methodology</b> .....	123
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>124</b>
<b>Estudio 1:</b> <i>In vitro</i> effect photodynamic therapy with differents photosensitizers on cariogenic microorganisms.....	125
<b>Estudio 2:</b> Comparative effect of photodynamic therapy on separated or mixed cultures of <i>Streptococcus mutans</i> and <i>Streptococcus sanguinis</i> .....	134
<b>Estudio 3:</b> Bactericidal effect of photodynamic therapy, alone or in combination with mupirocin or linezolid, on <i>Staphylococcus aureus</i> .....	140
<b>Estudio 4:</b> Antimicrobial photodynamic activity of rose bengal, alone or in combination with gentamicin, against planktonic and biofilm <i>Staphylococcus aureus</i> .....	150
<b>Estudio 5:</b> A photobleaching resistant polymer supported hexanuclear molybdenum iodide cluster for photocatalytic oxygenations and photodynamic inactivation of <i>Staphylococcus aureus</i> .....	157
<b>Estudio 6:</b> Daylight photodynamic therapy using methylene blue to treat sheep with dermatophytosis caused by <i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> .....	170
<b>1. Resumen de los resultados</b> .....	176
<b>2. Summary of of the results</b> .....	177
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>179</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>181</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>183</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>199</b>
<b>I. Área temática, factor de impacto y aportación del doctorando en compendio de publicaciones</b> .....	<b>200</b>
<b>II. Publicaciones secundarias relacionadas con la Tesis</b> .....	<b>202</b>
1. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. ....	203
2. Superior performance of macroporous over gel type polystyrene as a support for the development of photo-bactericidal materials. ....	207
3. Antimicrobial effects of photodynamic therapy: an overview.....	215
<b>III. Área temática, factor de impacto y aportación del doctorando en publicaciones secundarias</b> .....	<b>229</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

---

### INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1.</b> Principales familias de fotosensibilizantes tricíclicos .....	37
<b>Tabla 2.</b> Principales familias de fotosensibilizantes policíclicos relacionados con las porfirinas.....	39
<b>Tabla 3.</b> Otros fotosensibilizantes.....	41

### MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Tabla 4.</b> Moléculas de azul de metileno, rosa de bengala y curcumina.....	96
<b>Tabla 5.</b> Resumen de los materiales y la metodología de los principales Estudios que constituyen la Tesis Doctoral.....	122
<b>Table 6.</b> Summary of the materials and methodology of the main Studies that constitute the Doctoral Thesis .....	123

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>Tabla 7.</b> Resumen de los resultados de los principales Estudios que constituyen la Tesis Doctoral .....	200
<b>Table 8.</b> Summary of the result of the main Studies that constitute the Doctoral Thesis .....	201

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

### INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b> Diseminación de la resistencia.....	7
<b>Figura 2.</b> Aumento de la prevalencia de resistentes .....	8
<b>Figura 3.</b> Aumento de la prevalencia de la resistencia .....	9
<b>Figura 4.</b> Importancia de las muertes por la resistencia .....	12
<b>Figura 5.</b> Tiempo desde la introducción de un antibiótico hasta la aparición de resistencia.....	17
<b>Figura 6.</b> Ondas electromagnéticas.....	25
<b>Figura 7.</b> Luz visible del espectro electromagnético.....	25
<b>Figura 8.</b> Tipos de luz .....	26
<b>Figura 9.</b> Espectro de emisión de láser de femtosegundos y la imagen en osciloscopio de su modo pulsado.....	30
<b>Figura 10.</b> Ejemplo de irradiación con láser de femtosegundos.....	31
<b>Figura 11.</b> Ejemplo de irradiación con el láser de nanosegundos.....	31
<b>Figura 12.</b> Penetración de la luz en la piel .....	34
<b>Figura 13.</b> Mecanismo de acción simplificado de la terapia fotodinámica .....	43
<b>Figura 14.</b> Excitación de un fotosensibilizante.....	44
<b>Figura 15.</b> Reacción fotodinámica .....	45
<b>Figura 16.</b> Oxígeno molecular y las especies reactivas de oxígeno (ERO).....	47
<b>Figura 17.</b> Diagrama de orbitales moleculares del oxígeno singlete. ....	50
<b>Figura 18.</b> Multiplicidad de dianas .....	52
<b>Figura 19.</b> Tipos de dianas.....	53
<b>Figura 20.</b> Infecciones víricas .....	54
<b>Figura 21.</b> Pared y membrana de una bacteria.....	57
<b>Figura 22.</b> Infecciones bacterianas.....	60
<b>Figura 23.</b> Pared y membrana de un hongo .....	62
<b>Figura 24.</b> Infecciones de piel y mucosas tratadas con terapia fotodinámica antimicrobiana .....	69

## MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Figura 25.</b> Estructura química del hexanúcleo de Mo .....	96
<b>Figura 26.</b> Polímero reticular .....	97
<b>Figura 27.</b> Estructura química del linezolid .....	97
<b>Figura 28.</b> Estructura química de la mupirocina .....	97
<b>Figura 29.</b> Estructura química de la gentamicina.....	98
<b>Figura 30.</b> Lámpara de halogenuro metálico y su espectro de emisión.....	101
<b>Figura 31.</b> Lámpara LED y su espectro de emisión .....	102
<b>Figura 32.</b> Placa de cultivo sembrada por agotamiento .....	105
<b>Figura 33.</b> Toma de muestras .....	106
<b>Figura 34.</b> Subcultivos .....	107
<b>Figura 35.</b> Pesaje .....	110
<b>Figura 36.</b> Diluciones seriadas de fotosensibilizante en cada pocillo.....	112
<b>Figura 37.</b> Diluciones seriadas de fotosensibilizante en cada pocillo con y sin antibiótico .....	113
<b>Figura 38.</b> Irradiación en agitación.....	114
<b>Figura 39.</b> Pauta de tratamiento de las lesiones.....	116
<b>Figura 40.</b> Contador automático de colonias.....	117
<b>Figura 41.</b> Contaje de colonias en agar.....	118
<b>Figura 42.</b> Evolución de las lesiones .....	119

## *ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS*

---

1FS\*: fotosensibilizante en estado singlete  
3FS\*: fotosensibilizante en estado triplete  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: oxígeno singlete  
<sup>3</sup>O<sub>2</sub>: oxígeno molecular  
ALA: ácido metil aminolevulínico  
aPDT: en inglés antimicrobial photodynamic therapy (terapia fotodinámica antimicrobiana, TFDA)  
ATCC: American Type Culture Collection  
AS: medio agar sangre Columbia  
CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)  
DTM: Medio de prueba de Dermatofitos (por las siglas en inglés de Dermatophyte test médium)  
CFU: en inglés colony forming unit (unidades formadoras de colonias, UFC)  
CICESE: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada  
CUR: curcumina  
DMMB: 1,9-dimetil azul de metileno (1,9-dimethylmethylene blue)  
DMSO: di-metil sulfóxido  
ECDC: Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (European Centre for Disease Prevention and Control)  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EMA: Agencia Europea del Medicamento (European Medicines Agency)  
ERO: especies reactivas de oxígeno  
ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*.  
FDA: Food and Drug Administration  
FS: fotosensibilizante o fotosensibilizador  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno  
HIP: hipericina  
HO<sup>•</sup>: radical hidroxilo  
Hp: hematoporfirina  
HpD: dihematoporfirina  
HUMS: Hospital Universitario Miguel Servet  
*hν*: fotón  
IDSA: Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (del inglés Infectious Diseases Society of America)  
IPL: lamparas de luz pulsada intensa (del inglés intense pulsed light)

ITS: espaciador transcrito interno (del inglés internal transcribed spacer)  
LÁSER: luz láser (acrónimo del inglés light amplification by stimulated emission of radiation)  
LED: lámparas de diodos emisores de luz (del inglés light emitting diode)  
LN: linezolid  
LPS: lipopolisacárido  
MAL: aminolevulinato de metilo  
MB: azul de metileno (del inglés methylene blue)  
McF: unidades de escala turbidimétrica Mc Farland  
MDR: multirresistente (del inglés multidrug resistant)  
mL: mililitro  
Mo: molibdeno  
MRSA: methicillin resistant *Staphylococcus aureus*  
MU: mupirocina  
ND: no datos  
NMB: nuevo azul de metileno (siglas en inglés de new methylene blue)  
O<sub>2</sub>: oxígeno molecular  
O<sub>2</sub><sup>-•</sup>: radical superóxido  
OMS: Organización Mundial de la Salud (en inglés World Health Organization, WHO)  
PDR: panresistente (en inglés pan-drug resistant)  
Pol-Mo6: cluster de molibdeno hexanuclear vinculado a polímero reticular  
PpIX: protoporfirina IX  
PS: del inglés photosensitizer (fotosensibilizante, FS)  
PVP: polivinilpirrolidona  
RB: rosa de bengala (en inglés rose bengal)  
RGB: siglas en inglés de red, green y blue (rojo, verde y azul, RVA)  
ROS: reactive oxygen species  
RVA: rojo, verde y azul  
SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina  
SB: medio de Sabouraud  
spp.: subespecies  
TBO: azul de toulidina O (del inglés toluidine blue O)  
TFD: terapia fotodinámica  
TFDA: terapia fotodinámica antimicrobiana  
UFC: unidades formadoras de colonias  
XDR: extremadamente resistente (en inglés extremely drug resistant)  
λ: longitud de onda (en inglés wavelength)

## ***RESUMEN Y PALABRAS CLAVE***

---

## *RESUMEN*

---

Los microorganismos causantes de infecciones son cada vez más resistentes a los antibióticos. En este contexto, es necesaria la búsqueda de alternativas para combatirlos.

La terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) se presenta como una opción de tratamiento frente a los agentes causantes de infecciones en piel y/o mucosas. Es una modalidad terapéutica basada en la utilización de moléculas fotosensibilizantes que, al ser irradiadas con luz de una longitud de onda adecuada y a dosis suficiente, acaban generando especies reactivas de oxígeno que inducen la destrucción de las células diana.

En la presente Tesis Doctoral, elaborada por compendio de publicaciones, se presentan seis Estudios que muestran cómo la TFDA es capaz de inactivar ciertas bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Se han realizado experimentos con diferentes fotosensibilizantes clásicos, azul de metileno, rosa de bengala y curcumina y uno nuevo, probado por primera vez por nuestro grupo, con una estructura química cuyo núcleo está formado por seis átomos de molibdeno, logrando en todos los casos resultados prometedores. Además, se demuestra que se pueden usar distintos tipos de fuentes de luz para la aplicación de la TFDA habiéndose empleado satisfactoriamente lámparas LED, lámparas de halogenuro e incluso la luz solar. Asimismo, la TFDA en combinación con cada uno de los diferentes antibióticos ensayados, mupirocina, linezolid y gentamicina, ha mostrando efecto sinérgico en la inactivación de los microorganismos estudiados.

## *PALABRAS CLAVE*

---

Fotoinactivación, terapia fotodinámica antimicrobiana, fotosensibilizante, azul de metileno, rosa bengala, antibióticos

## *ABSTRACT*

---

The microorganisms that cause infections are showing an unreleased resistance to antibiotics. Therefore, it is necessary to search for alternatives to combat them.

The antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been put forward as a possible treatment against the agents that cause skin and / or mucous infections. aPDT is a therapeutic modality based on photosensitizing molecules that end up generating reactive oxygen species that induce the destruction of the target cells when are irradiated with light of a suitable wavelength and at a proper dose.

The present Doctoral Thesis, elaborated by compendium of six publications, shows how the aPDT is able to inactivate diverse microorganisms (bacteria, yeasts and fungi); The experiments have been carried out with different classic photosensitizers (methylene blue, rose bengal and curcumin) and a new designed compound (a chemical structure whose nucleus is formed by six molybdenum atoms linked to a reticular polymer) achieving promising results in all cases. In addition, the application of different light sources were used for aPDT as LED lamps, white light lamps and even sunlight which have shown successful results. The possibility of using aPDT in combination with different antibiotics (mupirocin, linezolid and gentamicin) has also been investigated demonstrating a synergistic effect.

## *KEYWORDS*

---

Photoinactivation, antimicrobial photodynamic therapy, photosensitizer, methylene blue, rose bengal, antibiotics.

# *INTRODUCCIÓN*

---

# 1. La resistencia a los antimicrobianos

## 1.1. Antimicrobianos, resistoma y resistencia

Los antimicrobianos son sustancias activas de origen sintético o natural que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos, e incluyen a los antibacterianos, los antivirales, los antifúngicos, los antiprotozoarios y los antihelmínticos. Se utilizan a diario para prevenir y tratar infecciones tanto en humanos como en animales (1).

El resistoma es un término propuesto para designar a la colección de todos los genes que contribuyen directa o indirectamente a la resistencia de los microorganismos frente a los antimicrobianos (2).

Dentro de la resistencia debemos diferenciar dos tipos (3–5):

-La resistencia intrínseca, que hace referencia a cuando ningún miembro de una especie es sensible al antimicrobiano, es por tanto una característica propia de la especie determinada por su material genético intrínseco.

-La resistencia adquirida, que hace referencia a cuando una cepa de una especie que es sensible al antimicrobiano presenta resistencia, es por tanto una característica propia de esa cepa en concreto. Está conferida por genes

adquiridos en algún momento por los diferentes mecanismos de modificación de material genético con los que cuentan los microorganismos.

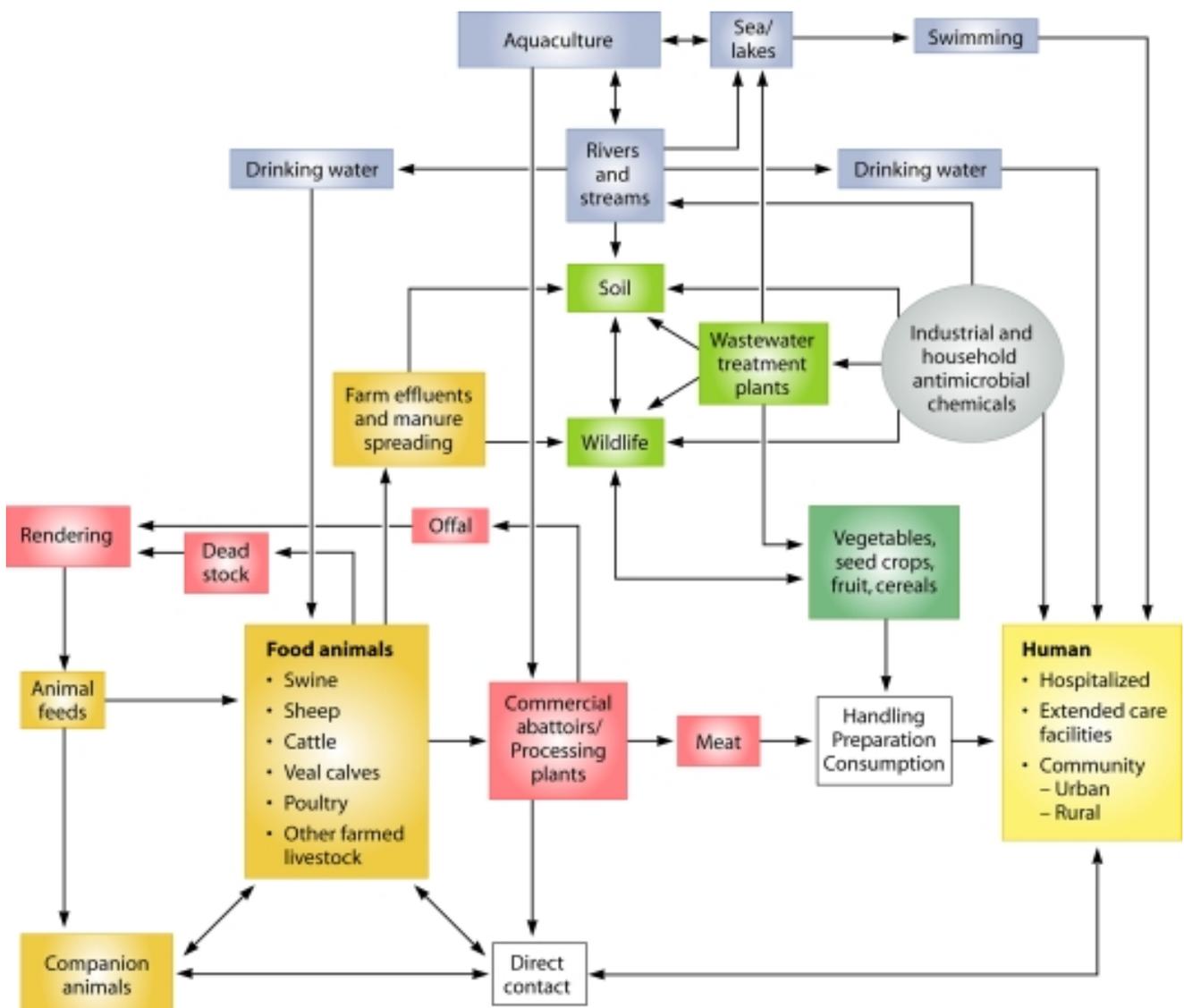
Cuando hablamos de “el problema de la resistencia” nos referimos a este tipo de resistencia adquirida. De hecho, la resistencia antimicrobiana es definida por la Comisión Europea como la capacidad de los microorganismos para volverse cada vez más resistentes a un antimicrobiano al que antes eran susceptibles (1).

En función de esta resistencia adquirida, las características de sensibilidad a los antibióticos de las cepas bacterianas constituyen lo que se conoce como el “patrón de sensibilidades” o el “fenotipo o patrón de resistencias”. Dependiendo de éste se utiliza el calificativo de multirresistente (MDR, de las siglas del inglés multidrug-resistant) para denotar las cepas resistentes a los agentes antimicrobianos representantes de tres o más grupos, extremadamente resistente (XDR, extremely drug resistant) a aquellas que son resistentes a los miembros de todos menos a uno o dos grupos y panresistente (PDR, pan-drug resistant) a las resistentes a todos los grupos de antimicrobianos disponibles e intrínsecamente activos contra las respectivas especies (6).

## **1. 2. Fundamento de la resistencia**

El fenómeno de la resistencia a los antimicrobianos es un proceso natural que puede ser amplificado o acelerado por varios factores, dentro de los que se incluye la acción humana (3). La subdosificación, la infradosificación, el desconocimiento generalizado en la sociedad sobre cuáles son las funciones de los antibióticos (inútiles frente a virus, por ejemplo), la falta de técnicas adecuadas de control de la infección, tanto dentro como fuera de los hospitales, y la aplicación a gran escala de los antibióticos en la agricultura, la acuicultura y

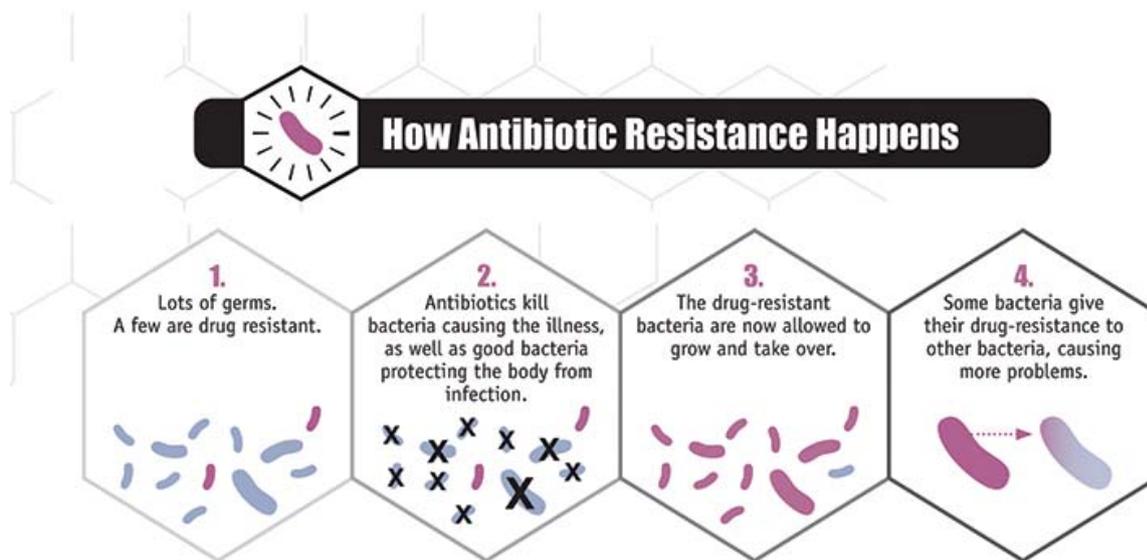
la ganadería juegan un papel importante en la propagación de la resistencia a los antimicrobianos (3,5). Todo ello lo debemos de considerar bajo el concepto “One Health” que recoge cómo la salud humana, salud animal y del entorno están interrelacionadas y constituyen una única salud (1) (figura 1).



**Figura 1. Diseminación de la resistencia:** esquema que ilustra cómo se disemina la resistencia entre los humanos, los animales y el entorno a través de sus interrelaciones por el uso de antibióticos en la agricultura, la ganadería, la comunidad, los hospitales, el tratamiento de aguas residuales y en los entornos asociados. Tomado de Julian Davies y Dorothy Davies (5).

Un ejemplo que ilustra el concepto “One Health” y demuestra la interrelación lo encontramos en el artículo “*Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission” que se recoge en el Anexo II de publicaciones secundarias relacionadas con la Tesis. En él se describe cómo cepas de *S. pseudintermedius* comensales en perros y gatos son capaces de resultar patógenas en sus dueños inmunodeprimidos (7).

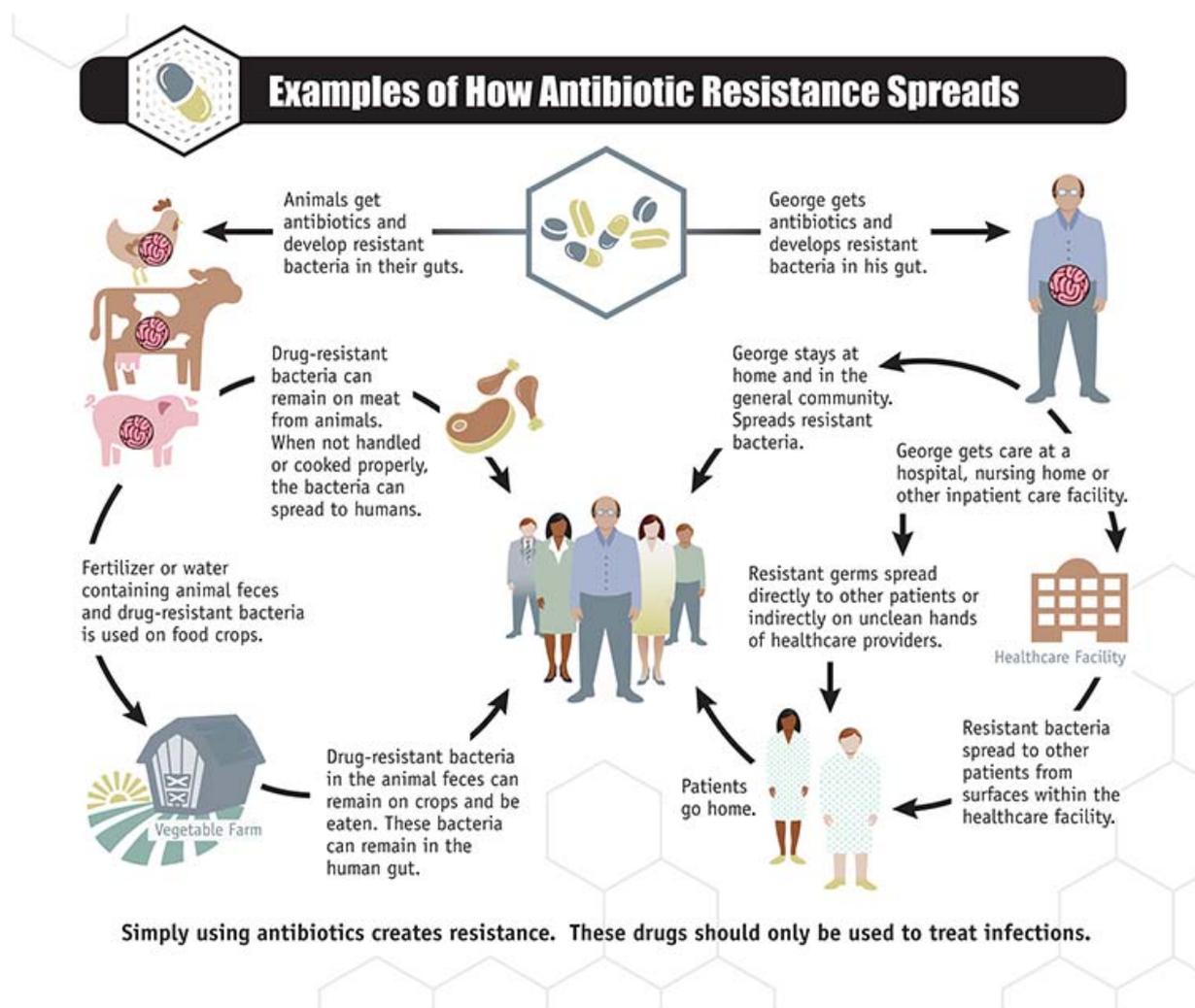
El simple uso de antibióticos conlleva una presión selectiva que inhibe o mata las bacterias sensibles y favorece la proliferación de cepas con mecanismos de resistencia. En consecuencia, estas bacterias se multiplican ocupando el nicho ecológico, de modo que al final son más prevalentes (3,8) (figura 2).



**Figura 2. Aumento de la prevalencia de resistentes:** esquema que ilustra cómo los microorganismos resistentes aumentan su prevalencia, publicado por el CDC (8).

En consecuencia, hay algunos antibióticos que han perdido su actividad frente a ciertos microorganismos para los cuales habían sido de elección tradicionalmente. Este hecho dificulta el tratamiento de las enfermedades infecciosas y facilita la diseminación de las mismas, agravando el problema en caso de que se produzca la aparición de un brote (9).

El origen exacto de los genes de resistencia a menudo es difícil de discernir, pero en algunos casos es posible establecer que los determinantes de resistencia adquiridos se originaron en otros géneros (3). En este contexto, los microorganismos denominados genéricamente ubicuos, aunque sean saprófitos o comensales, juegan un papel crucial para el resistoma pudiendo actuar como reservorios de genes de resistencia y siendo capaces de transferirlos a otras especies de bacterias que sí sean patógenas de humanos, animales e incluso plantas del propio medio (9–11). Esto contribuye a la emergencia de microorganismos con marcada resistencia a antibióticos (12,13) (figura 3).



**Figura 3. Aumento de la prevalencia de la resistencia:** esquema que ilustra cómo la resistencia aumenta su prevalencia en la comunidad por el uso de antibióticos mediante dos ejemplos: a la izquierda por el uso en ganadería y a la derecha en un paciente hospitalario, publicado por el CDC (8).

## 1. 3. Las enfermedades infecciosas y el problema de la resistencia

Las enfermedades infecciosas son cada día más numerosas y su aumento conlleva un incremento significativo en las tasas de morbilidad y mortalidad, así como del coste económico asociado. La causa principal es el incremento de la resistencia a múltiples fármacos antimicrobianos por parte de los agentes causantes de las infecciones (14). La resistencia microbiana, tanto en la comunidad como el entorno hospitalario, ha aumentando a lo largo de todo el mundo en las últimas dos décadas y parece probable que siga aumentando en el futuro cercano (15,16).

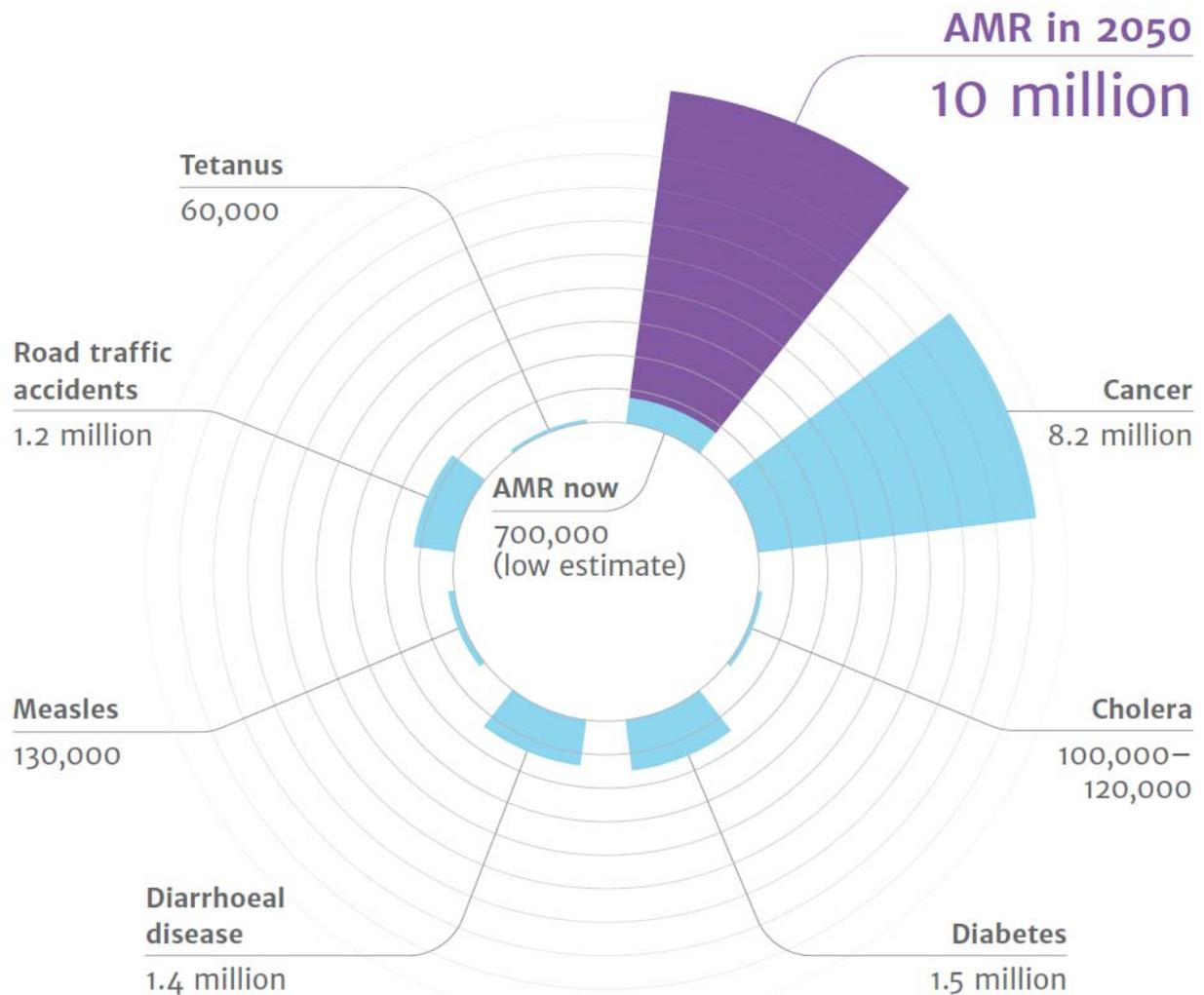
Los microorganismos que intervienen principalmente en el proceso de resistencia son denominados patógenos ESKAPE por las siglas de los principales microorganismos implicados (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*) y constituyen la principal causa de infecciones nosocomiales en todo el mundo (17).

El problema de la resistencia antimicrobiana está considerado como uno de los problemas emergentes de mayor impacto en el siglo XXI por la Organización Mundial de la Salud (OMS o en inglés World Health Organization, WHO) y, como tal, es uno de los mayores retos en la práctica clínica por las consecuencias que acarrea (18,19). Estas consecuencias se resumen en los siguientes seis puntos según la OMS:

## 1. La resistencia a los antibióticos mata:

Las infecciones por microorganismos resistentes no responden a los tratamientos habituales, lo cual prolonga la duración de la enfermedad y aumenta el riesgo de muerte (18,19). Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por las siglas en inglés de Centers for Disease Control and Prevention) estimaron en 2013 el número de enfermos por la resistencia a los antimicrobianos en 2.049.442 con 23.000 muertes causadas en EE.UU. (8). Y la Comisión Europea estima que el número de muertes directamente atribuibles a las cinco bacterias multirresistentes más frecuentemente responsables de infecciones asociadas a cuidados sanitarios es de 25.000 cada año en la UE (20) y que a nivel mundial alcanzaría las 700.000 muertes al año (1). El escenario que manejan los expertos en sus estudios es que, de no cambiar la situación, la cifra llegue a 10 millones de muertes al año en el 2050. Para hacerse una idea de la magnitud de la tragedia, hoy mueren algo más de 8 millones de personas anualmente por culpa del cáncer. En consecuencia, si no se toman medidas contundentes para atajar el problema de la resistencia, puede llegar a convertirse en la primera causa de muerte (figura 4) (1,21).

Destacar el papel de la contaminación atmosférica puesto que la OMS estima que ocasiona 7 millones de muertes al año. Se debe al vínculo entre la exposición a la contaminación y las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, además de la función que desempeña la contaminación atmosférica en el desarrollo de enfermedades respiratorias, como las infecciones respiratorias agudas y las neumopatías obstructivas crónicas (22).



**Figura 4. Importancia de las muertes por la resistencia:** esquema de las muertes atribuibles al problema de la resistencia a antimicrobianos (AMR del inglés Antimicrobial Resistance) en relación a otras causas de muerte en la actualidad y la previsión en el año 2050 (21).

## 2. Pone en peligro el control de las enfermedades infecciosas:

Para muchas infecciones cada vez es mayor la dificultad del tratamiento por ejemplo, neumonía, tuberculosis, septicemia y hepatitis. Al reducirse la eficacia del tratamiento, los enfermos permanecen infectados por más tiempo, hecho que a su vez propicia la propagación de los microorganismos resistentes a otras personas o animales (18,19,23,24).

**3. Amenaza con hacer retroceder a la humanidad a la época anterior al descubrimiento de los antibióticos:**

Existe el riesgo de que muchas enfermedades infecciosas se vuelvan intratables y puedan afectar a cualquier persona, sea cual sea su edad o el país en el que resida (18,19).

**4. Encarece la asistencia médica:**

Cuando las infecciones dejan de responder a los medicamentos de primera línea, hay que recurrir a productos más caros. La prolongación de la enfermedad y del tratamiento, a menudo en hospitales, también aumenta los costos asistenciales (18,19). El CDC informó que los costes sanitarios directos ocasionados por las infecciones provocadas por bacterias resistentes alcanzan los 20.000 millones de dólares, a los que habría que añadir otros 35.000 millones en costes indirectos (8). La Comisión Europea estima que la resistencia a los antimicrobianos ocasiona pérdidas de 1.500 millones de euros cada año en la Unión Europea (1,20).

**5. Pone en riesgo los logros de la medicina moderna:**

El trasplante de órganos, la quimioterapia antineoplásica o las grandes intervenciones quirúrgicas, necesitan antimicrobianos eficaces para el tratamiento y la prevención de infecciones (18,19).

**6. Afecta a la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo perjudicando el comercio y las economías:**

El aumento del comercio y los viajes internacionales permite que los microorganismos resistentes se propaguen rápidamente a países lejanos obligando en algunos casos a establecerse mecanismos de control de fronteras (18,19).

## **1.4. Bases de la lucha frente a la resistencia**

La clave del éxito en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos consiste en establecer un planteamiento integrado según la Comisión Europea. Este organismo ha creado un “Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas” que fue publicado el 15 de Noviembre de 2011 (25). Se basa en la colaboración de todos los centros y personas que trabajan en Salud Pública y se puede resumir en los tres puntos enumerados a continuación y abordados en los subsiguientes apartados:

1. Uso racional de los antimicrobianos (apartado 1.4.1)
2. Programas de vigilancia y esfuerzo global (apartado 1.4.2)
3. Nuevos antimicrobianos eficaces o tratamientos alternativos (apartado 1.4.3)

### **1.4.1. Uso racional de los antimicrobianos**

El uso racional y responsable de los antimicrobianos es esencial para reducir y prevenir la adquisición de resistencias. Sólo se deben emplear cuando sean necesarios y de una forma correcta, puesto que una vez que han aparecido las resistencias, la reversión al estado de sensibilidad es un proceso muy lento y en algunos casos imposible. En este sentido, es importante la creación de protocolos estandarizados de diagnóstico, así como el diseño de nuevas herramientas de diagnóstico que sean precisas, eficaces a la vez que factibles y de rápida realización. Por este motivo, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA, por sus siglas en inglés Infectious Diseases Society of America) en 2007 presentó las directrices para desarrollar un programa institucional con el fin de mejorar la administración antimicrobiana (26) y en el 2012, Rodríguez-Baño *et al.* presentaron los denominados “Programas de optimización de uso de antimicrobianos” (PROA) en hospitales españoles en un

documento de consenso. Los objetivos y sus indicaciones deben responder al acrónimo “SMART” (eSpecíficos, Medibles, reAlizables, Relevantes y precisos en el Tiempo) (27). También, desde el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, se plantea desde el año 2014 el proyecto “Resistencia Zero” (RZ) destinado a reducir la aparición de bacterias MDR y la cantidad de antibióticos para su tratamiento mediante la aplicación de un paquete de medidas para prevenir su selección y diseminación (28).

Está demostrado que la aplicación de medidas preventivas e higiénicas (por ejemplo la implantación de protocolos de limpieza y desinfección y el lavado de manos entre el contacto con diferentes pacientes), tanto en hospitales o en ámbitos sanitarios (6), así como la instauración de medidas de bioseguridad, permiten reducir el uso de los antimicrobianos y con ello, la posible aparición de resistencias (29–31). Por supuesto, conseguirlo implica desarrollar programas de formación y educación, tanto a nivel profesional (médicos, veterinarios, farmacéuticos, agrónomos...) como a nivel social.

### **1.4.2. Programas de vigilancia y esfuerzo global**

Se debe prestar especial atención a las cepas MDR de cualquier población y al uso de antibióticos que se haga frente a ellas, ya que de esto depende, en gran medida, su evolución. Por ser un problema global, hay que aunar esfuerzos con socios nacionales e internacionales para reducir los riesgos de propagación (1). En este sentido a nivel nacional se planteó el proyecto RZ (28) comentado en el punto anterior y a nivel europeo se estableció con obligado cumplimiento la Decisión de Ejecución de la Comisión de 12 de noviembre de 2013 sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia a los antibióticos de las bacterias zoonóticas y comensales (32).

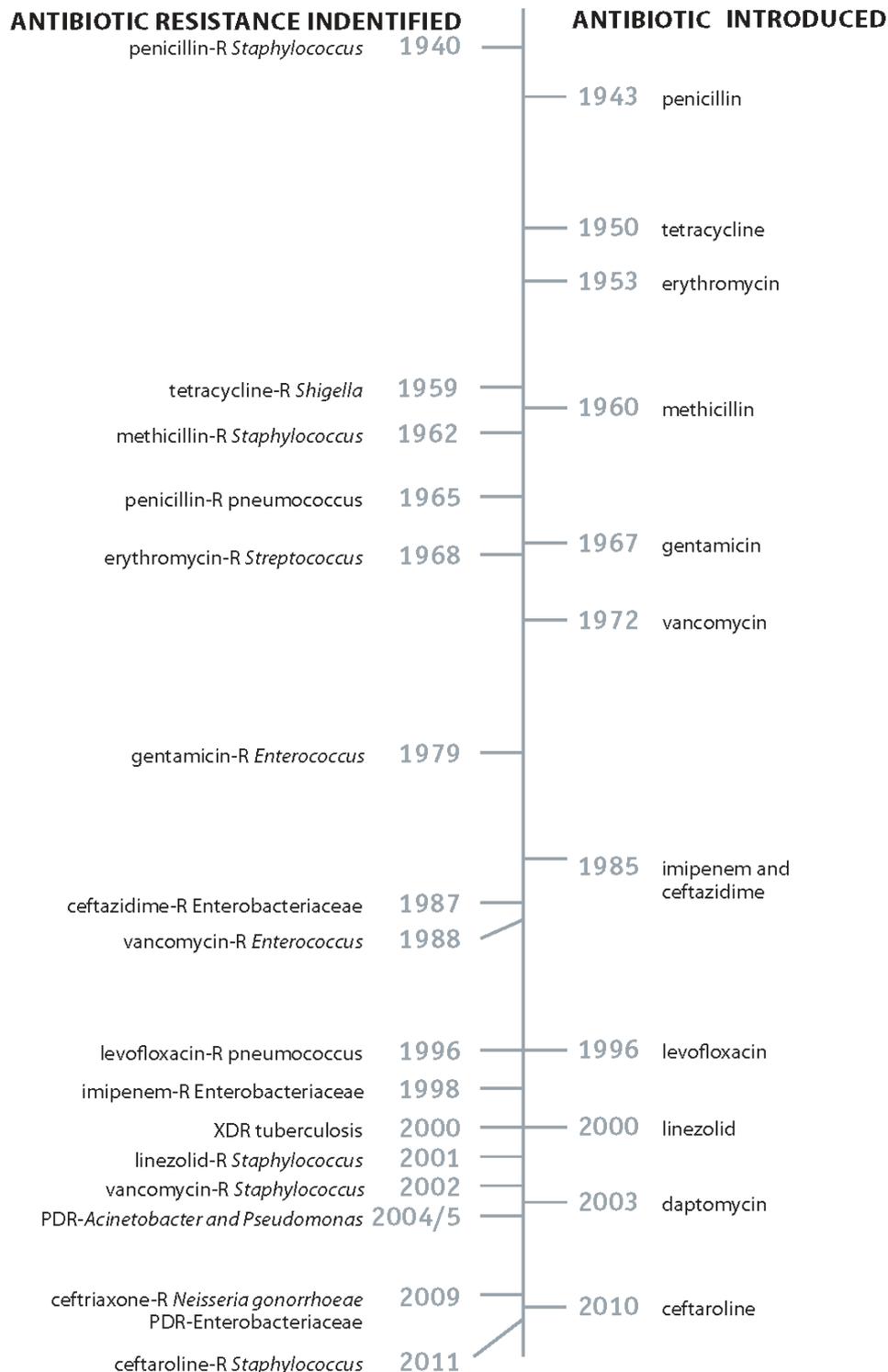
### **1.4.3. Nuevos antimicrobianos eficaces o tratamientos alternativos**

En 2009, el informe “The bacterial challenge: time to react” (33) realizado por el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA, European Medicines Agency) pone de manifiesto la necesidad de diseñar nuevos antibióticos capaces de cubrir las necesidades médicas frente al creciente problema que suponen las bacterias MDR en la Unión Europea.

Aunque algunos nuevos compuestos que tienen como objetivo los patógenos Gram positivos resistentes ya han sido aprobados para uso clínico, muy pocas moléculas son activas contra los patógenos Gram negativos MDR, especialmente los productores de carbapenemasas, y todavía encontramos menos si hablamos de los patógenos XDR (6,34,35). Entre los antibióticos frente a Gram negativos MDR están el ceftolozano-tazobactam (36), la ceftazidima-avibactam (37) y la colistina. Por ejemplo, este último antibiótico, miembro principal de la familia de las polimixinas, introducido en la década de 1950 y que se dejó de usar por sus considerables efectos secundarios, se ha recuperado porque es la única opción de tratamiento, que es activa vía parenteral, contra la infección nosocomial causada por cepas Gram negativas XDR de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp., incluyendo las cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido y productoras de carbapenemasas (38). Sin embargo, con el creciente uso de las polimixinas en los últimos años y su introducción en la producción de animales de consumo en algunos países como China, los informes de resistencia también han ido en aumento (39,40).

Además, en la actualidad, hay un número creciente de informes sobre infecciones causadas por microorganismos Gram negativos PDR (6,17,41) y cada

vez pasa menos tiempo desde que un nuevo antibiótico es introducido hasta la aparición de microorganismos resistentes (figura 5) (8).



**Figura 5. Tiempo desde la introducción de un antibiótico hasta la aparición de resistencia:** eje temporal que muestra el tiempo transcurrido entre el comienzo de la aplicación de un nuevo antibiótico (derecha) y la aparición de cepas resistentes frente a este (izquierda), publicado por el CDC (8).

Existen diversas razones que explican la escasa inversión en la creación de nuevos antibióticos (25). Diseñar nuevos antibióticos, eficaces y seguros presenta cada vez más dificultad a nivel científico y además su uso está más restringido. Conjuntamente, la mayor parte de antibióticos se administran durante periodos de tiempo breves y los antibióticos genéricos van incrementando su cupo de mercado. Como resultado, el esfuerzo económico no compensa a nivel industrial (1) y nos encontramos con datos como que menos del 5% de la inversión de capital de riesgo en I + D de las farmacéuticas entre 2003 y 2013 fue para el desarrollo de antimicrobianos (9). Por todo ello, en particular, la IDSA promovió la iniciativa para desarrollar diez nuevos antibacterianos para el año 2020: "10 x 20 Initiative" (42) contra los microorganismos del grupo ESKAPE y la Unión Europea promovió la Iniciativa de Medicamentos Innovadores (en inglés Innovative Medicines Initiative) cuyo objetivo en su fase actual (periodo 2014-2020) es desarrollar vacunas, medicamentos y tratamientos de próxima generación, como nuevos antibióticos (43). Sin embargo, Boucher *et al.* (44) y Bassetti *et al.* (16), en 2013, evaluaron las tendencias en el desarrollo de los antimicrobianos concluyendo que la aparición de nuevos antibióticos es poco esperable. Recientemente, en septiembre de 2017, el último informe sobre agentes antimicrobianos de la OMS (45) concluye que no están apareciendo antimicrobianos nuevos, solo modificaciones de las clases existentes y alerta sobre las escasas opciones de tratamiento frente a las infecciones causadas por microorganismos resistentes.

Respecto a los antifúngicos o antimicóticos, a principio de los 50 se sintetizaron los primeros antifúngicos tópicos y sistémicos para el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales, cutáneas o mucosas (46). Desde entonces se han ido desarrollando otros fármacos de administración oral, parenteral o tópica con el fin de mejorar su eficacia, espectro de acción, su tolerabilidad y la duración del tratamiento (47). Pueden presentar algunas interacciones y también ciertos efectos adversos aunque, lo más destacado y su principal inconveniente

es, al igual que los antibióticos, la resistencia que se genera en los microorganismos frente a dichos fármacos (48–51).

En consecuencia, la búsqueda de tratamientos alternativos a los antimicrobianos para combatir los patógenos implicados en el problema de la resistencia es fundamental (15,52). De esta manera, las vacunas, los anticuerpos mono o policlonales, los péptidos antibacterianos, las bacteriocinas, la terapia con fagos, y las lisinas de fagos son algunos ejemplos de tratamientos en estudio que podrían aportar ciertas soluciones (21,45,53–55). Entre estas posibles alternativas se ha propuesto la terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) (56–61).

## 2. La terapia fotodinámica

### 2.1. Concepto

La terapia fotodinámica (TFD) se basa en el uso de moléculas de distinta complejidad química denominadas fotosensibilizadores o fotosensibilizantes (FS) que en combinación con luz visible o del infrarrojo cercano y en presencia de oxígeno molecular son capaces de destruir células diana, por ejemplo, células tumorales o microbianas. Aplicada frente a microorganismos se denomina fotoinactivación antimicrobiana (en inglés Antimicrobial Photoinactivation o Photodynamic Inactivation, PDI) (62) y en estudios con perspectivas a aplicaciones clínicas se conoce como TFD antimicrobiana (TFDA)

(Antimicrobial Photodynamic Therapy, aPDT) (58) o quimioterapia fotodinámica antimicrobiana (Photodynamic Antimicrobial Chemo-Therapy, PACT) (63).

La TFD hace referencia a una parte concreta de la fototerapia que es un término empleado para denominar todos los casos donde la luz ultravioleta, visible o del infrarrojo cercano se usa terapéuticamente (64).

## 2.2. Historia

Los orígenes de la TFD se remontan hasta tiempos antiguos de la Cultura Hindú y la Civilización del Antiguo Egipto puesto que las primeras referencias se encuentran en el libro indio sagrado Atharva Veda que data del 2000-1400 a.C. y en el papiro de Ebers del 1550 a.C. aproximadamente. En estos documentos se describe la utilización de diversos extractos vegetales que se aplicaban sobre la piel y se exponían a la luz del Sol tratando así enfermedades dermatológicas como la psoriasis y el vitíligo (65,66).

En la Antigua Grecia, en el siglo II a.C., la fototerapia, llamada así por requerir la luz, fue denominada helioterapia por primera vez por el griego Hipócrates, conocido como el padre de la ciencia médica, puesto que la luz que se usaba era la del Sol. Hipócrates, que había conocido los poderes curativos de la luz solar en sus viajes a Egipto, recomendaba la luz del Sol para la restauración de la salud (64,66).

Los romanos también utilizaron la luz solar como tratamiento, especialmente para las enfermedades de la piel. Y cabe destacar que en la España musulmana, en el siglo XIII, Ebn al-Baitar, científico andalusí, en su libro *Kitab Al-jami li-mufradat al-adwiya wa al-aghhdhiya* que se puede traducir como “Recopilación de medicamentos y alimentos”, describió el tratamiento del vitíligo con una tintura de miel y semillas de *Ammi majus* en polvo. La

administración de esta tintura era tanto tópica como oral seguida por la exposición a la luz solar directa durante 1 o 2 h (65,66).

Con la caída del Imperio Romano y la difusión del cristianismo, la helioterapia cayó en el olvido (65,66) hasta comienzos del siglo XIX cuando se comenzaron a hacer estudios sobre la luz y a describir fotorreacciones. Friedrich Wilhelm Herschel describió el espectro infrarrojo de la luz solar en 1800 y Johann Wilhelm Ritter la luz ultravioleta en 1806. Posteriormente, Baumstark relacionó la incidencia de la luz con los síntomas clínicos de la porfiria aguda intermitente en 1874. Arthur Henry Downes y Thomas Porter Blunt descubrieron los efectos bactericidas de la luz solar en 1877. Por aquella época se suponía que el espectro ultravioleta de la luz era responsable del enrojecimiento de la piel, las quemaduras solares y el bronceado, pero no fue hasta 1889 cuando el oftalmólogo sueco Erik Johann Widmark lo demostró experimentalmente. En paralelo, varios informes relataban como la ingesta de ciertas drogas o plantas resultaban inofensivas incluso en grandes cantidades, pero solo hasta que las personas o animales se exponían a la luz del Sol. Por ejemplo, en 1892 Charles Darwin y Karl Dammann describieron la presencia de exantemas en animales que habían ingerido alforfón y que eran más graves en los que tenían menor pelaje y en aquellos expuestos más tiempo a la luz solar (66).

Pese a los avances citados del siglo XIX, se considera que la fototerapia no fue redescubierta hasta principios del siglo XX (66). Arnold Rikki, médico y sanador natural suizo, fue de los primeros en llamar la atención del mundo hacia el valor curativo de la luz, el aire y los baños de sol (67). Pero fue Oscar Raab en el año 1900, en Munich, el primero que realizó y publicó un estudio con método científico en TFD (68). Raab documentó por primera vez el proceso de fotooxidación biológica intuyendo el poder de un FS en presencia de luz y oxígeno. Demostró que el FS naranja de acridina aplicado junto con la luz era capaz de producir daño a paramecios (66,69). Por otra parte, Niels Ryberg Finsen, médico y científico danés, solo un año después, en 1901, publicó el primer libro de

fototerapia (64,65). Finsen observó que la luz roja e infrarroja generaba cierto calentamiento en las reacciones mientras que la luz azul no producía este efecto, y no inducía respuestas inflamatorias perjudiciales, como sí lo hacía la luz ultravioleta pero, aun así, mataba ciertas bacterias (65). Usó sus conocimientos para crear varias lámparas que empleó para tratar infecciones de la piel como, por ejemplo, la viruela, la tuberculosis cutánea y el lupus vulgaris. Por estos tratamientos, en 1903 fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina (64,65). En ese mismo año, Tappeiner junto con Jesionek realizaron los primeros estudios clínicos de TFD en pacientes con cáncer de piel, lesiones sifilíticas y tuberculosas utilizando eosina como FS (66,69). Previamente, en el Instituto Pasteur de Paris, Ledoux-Lebards, en 1902 se había demostrado que el oxígeno molecular era un componente necesario para hacer reaccionar un FS (66). En este sentido, el propio Tappeiner en colaboración con Jodbauer, en 1904, introdujeron por primera vez el término “reacción fotodinámica” en una de sus obras. La idea de Tappeiner era que el efecto estaba basado en la fluorescencia. Paralelamente, Neisser junto con Halberstaedter y, por otro lado, Georges Dreyer describieron que el tipo de sensibilización que se producía dependía de la luz blanca. En 1908, Hausuman ensayó los efectos de la hematoporfirina (Hp), la porfirina de la sangre, sobre eritrocitos, paramecios y ratones. En 1911 publicó que la Hp era inocua en la oscuridad, mientras que si se exponía a la luz del Sol provocaba necrosis en la piel de los ratones. En 1912, Friedrich Meyer-Betz se inyectó a sí mismo una dosis de Hp observando que se producía una ulceración en la zona de la aplicación, seguida de una reacción fototóxica generalizada al exponerse a la luz del Sol. Finalmente, en 1931, se aprobó la Hp como fármaco bajo el nombre de “Photodyn” para lesiones cancerosas en Alemania y, a partir de la década de los 30, la TFD centró sus esfuerzos en el tratamiento del cáncer en buena medida debido a los estudios realizados por Policard en 1924 y, posteriormente, por Auler y Banzer en 1942 (66,69). En ambos estudios se constató que la Hp se concentraba en los tejidos cancerosos al verse fluorescencia roja en diferentes cánceres de pacientes inyectados

previamente con Hp. Esto fue corroborado en 1948 por Figge *et al.* (64,66) que lo utilizó para el diagnóstico de diversos tumores abriendo este nuevo camino. En 1955 Schwartz *et al.* desarrollaron un derivado de la Hp, la dihematoporfirina (HpD), útil para la identificación y localización de carcinomas, y que fue utilizado en pacientes nueve años más tarde por Lipson *et al.* (65,66). Entre 1978 y 1989, los estudios realizados por Dougherty *et al.* con porfirinas sentaron las bases del primer FS que sería aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) USA, en 1995 para el tratamiento del cáncer esofágico por medio de TFD, una versión purificada de la HpD llamada Photofrin<sup>®</sup> (65,66,69).

En 1990 Kennedy *et al.* comunicaron el primer caso de TFD utilizando tópicamente un reactivo pro-porfirínico, el ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) tópico. Este reactivo no es un FS en sí, sino un bioprecursor de las porfirinas naturales generadas en todas las células. Por lo tanto, es capaz de incorporarse a la vía de biosíntesis de las porfirinas y dar lugar al cúmulo intracelular del verdadero FS, la protoporfirina IX (PpIX) (66,69). El ALA al 20 % fue aprobado por la FDA y comercializado bajo el nombre de Levulan<sup>®</sup> en 1999 para tratar las queratosis actínicas no hiperqueratósicas, las lesiones precancerígenas y el cáncer cutáneo (70). En el 2001, fue aprobado en Europa el empleo de la TFD con metil éster del ALA, metil aminolevulinato o aminolevulinato de metilo (MAL) al 16% bajo la denominación de Metvix<sup>®</sup> para el tratamiento de las queratosis actínicas y del carcinoma basocelular nodular y superficial. Posteriormente, fue aprobado su uso en el carcinoma escamoso *in situ* o enfermedad de Bowen. En la actualidad, son numerosos los FS que han sido probados eficaces frente a diversos tumores (71,72).

En cuanto a la TFDA, pese a que ya en los años 70 se realizaban estudios de foto-inactivación de bacterias (73), la idea de poder aplicar esta técnica en la clínica hospitalaria comenzó a extenderse como un concepto factible a principios de los años 90 gracias a experimentos como los de Nitzan *et al.* que redescubrieron la capacidad biocida de las porfirinas frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (74). Actualmente, son muchos los FS que han

demostrado ser eficaces *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de distintos agentes infecciosos (56,59,62).

## 2.3. Componentes de la terapia fotodinámica

La TFD tiene tres componentes fundamentales: oxígeno molecular ( $O_2$ ), luz y FS.

### 2.3.1. El oxígeno

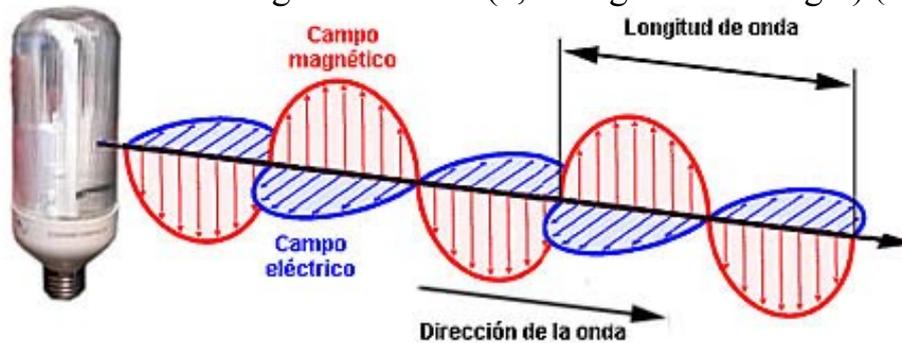
El oxígeno es uno de los elementos más reactivos de la tabla periódica. En forma de gas diatómico constituye la base de la respiración celular en los organismos aerobios. Sin embargo, a elevadas concentraciones resulta tóxico *per se* incluso para las especies aerobias (75).

La eficacia de la TFD está directamente relacionada con la capacidad que tenga el FS de formar especies reactivas de oxígeno (ERO) (en idioma inglés reactive oxygen species, ROS). Este hecho, dependerá, además del FS, de la biodisponibilidad de  $O_2$  en la zona a tratar. Por tanto, es crucial que el FS pueda encontrarse con el  $O_2$  para poder llevar a cabo una TFD efectiva (56,58).

### 2.3.2. La luz

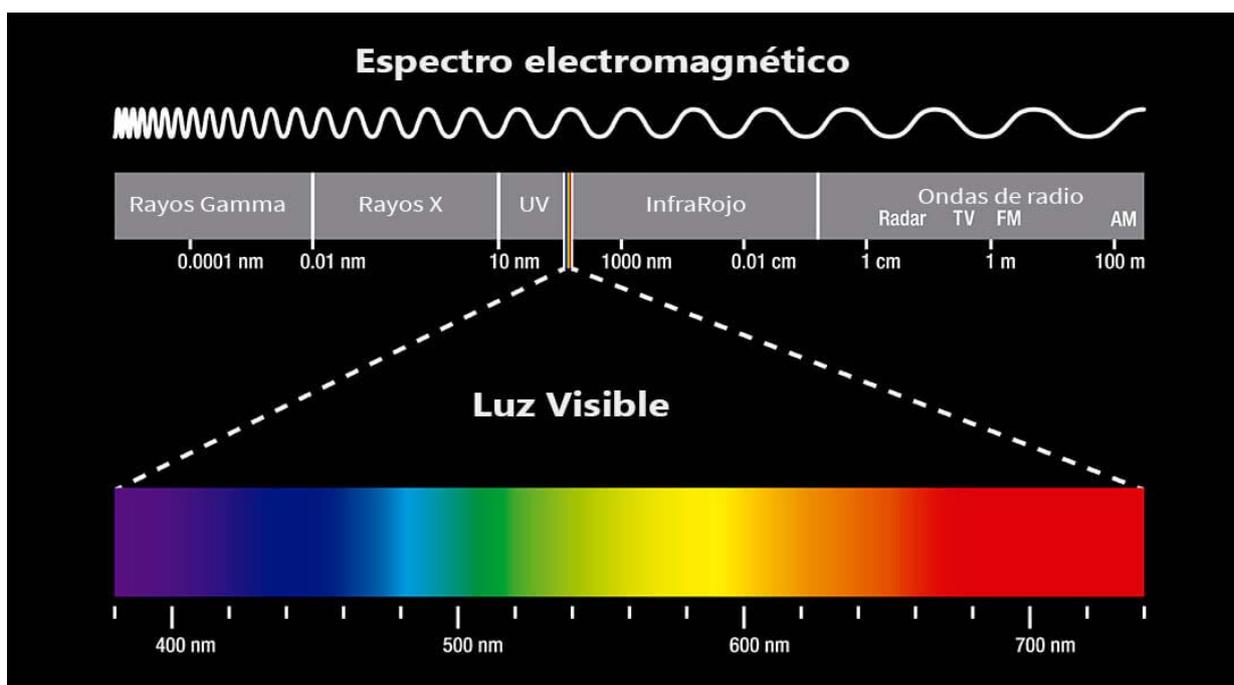
La luz, como todas las radiaciones electromagnéticas, está formada por partículas elementales desprovistas de masa denominadas fotones y por ondas portadoras de energía que se propagan a través del espacio mediante la combinación de campos eléctricos y magnéticos (figura 6). Sus propiedades físicas se deben a la dualidad onda/partícula. Para caracterizar las ondas se mide

la distancia existente entre dos crestas consecutivas de la onda, y a este parámetro se le denomina longitud de onda ( $\lambda$ , en inglés wavelength) (64,76).



**Figura 6. Ondas electromagnéticas:** representación en el espacio de las ondas electromagnéticas de las que se compone la luz. En azul, oscilaciones de los campos eléctricos; En rojo, el campo magnético que oscila de la misma manera pero en un plano perpendicular al campo eléctrico; En negro, la dirección de propagación; Longitud de onda, distancia entre dos crestas consecutivas (77).

La expresión luz visible señala específicamente la radiación en el espectro visible (figura 7). Aproximadamente está comprendido entre los 400 a 750 nm de  $\lambda$ . Es la luz que se utiliza habitualmente para TFD.

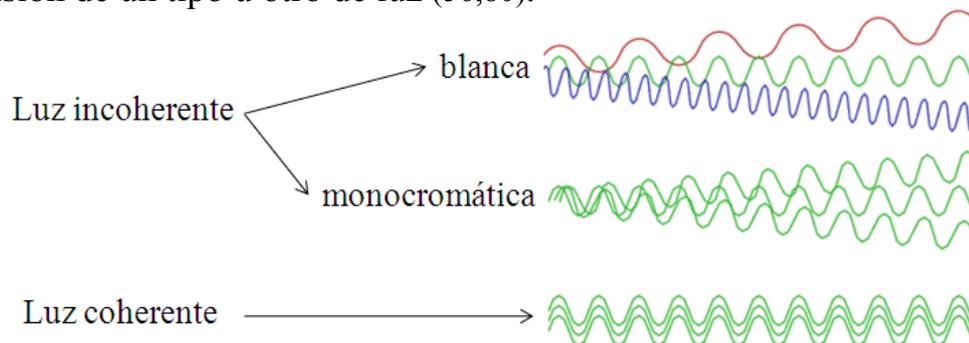


**Figura 7. Luz visible del espectro electromagnético:** representación de la parte de luz visible en referencia al espectro electromagnético (78).

La elección entre las diferentes fuentes de emisión dependerá de la localización de la zona a tratar, la dosis de luz requerida y el FS que se use. La superioridad de una sobre otra a nivel general no ha sido demostrada y, por tanto, depende de cada aplicación particular (79,80). Como requisito común, los dispositivos de administración de luz deben estar clínicamente orientados para proporcionar dosimetría suficiente con estandarización que muestre la máxima eficacia en la inactivación microbiana a la par que una lesión tisular mínima (81).

### 2.3.2.1 Clasificación y tipos de fuentes de luz

Cuando las ondas se suman o se restan, produciendo intensidades máximas o mínimas, se denomina luz incoherente. En cambio, cuando todas las ondas emitidas tienen la misma  $\lambda$  y la misma orientación se denomina luz coherente (figura 8). Podemos clasificar las fuentes de luz para TFD en función de la emisión de un tipo u otro de luz (56,80).



**Figura 8. Tipos de luz:** representación gráfica de la emisión de ondas en los diferentes tipos de luz.

#### 2.3.2.1.1. Fuentes de luz no coherentes

**-Luz solar:** la luz blanca del Sol es la principal fuente de luz. Mantiene la vida en la Tierra siendo la fotosíntesis el proceso dependiente de esta más importante en la biosfera (64). Su espectro es prácticamente plano para todas las frecuencias, colores visibles (76). Para propósitos fototerapéuticos, destaca por su disponibilidad y su nulo coste (64). Por estos motivos fue la fuente de luz elegida en el Estudio 6 que se presenta en esta Tesis (82). Pero, en general, se

considera que no es lo suficientemente conveniente (quemaduras solares y cáncer de piel) ni confiable (dosis indeterminada) para el uso rutinario (64).

**-Lámparas halógenas**, por ejemplo, con el filamento de tungsteno: emiten un haz muy grande y divergente por lo que no pueden focalizarse en zonas pequeñas (76,80) a no ser que se utilice una lente convergente adecuada para focalizar esta luz. Producen luz por incandescencia y, por tanto, generan calor. Como lámparas son baratas y han sido usadas a lo largo de la historia en TFD (64).

**-Lámparas de haluro metálico o halogenuros metálicos**, son generalmente de alta potencia con una alta eficacia luminosa en términos de lúmenes por vatio. Producen una luz blanca y natural porque tienen un amplio espectro de emisión. Por estas características son, en cierta medida, homólogas a la luz solar y válidas para la excitación de diversos FS. Por estos motivos se usó una lámpara de halogenuro metálico como fuente de luz en el Estudio 1 de la presente Tesis Doctoral (83). Además, también se siguió utilizando en los Estudios 3 (84) y 4 (85). Entre sus inconvenientes está que requieren un período de calentamiento de hasta varios minutos para alcanzar su máximo de luz de salida (80).

**-Lámparas de arco**, por ejemplo, de xenón: son un tipo especial de lámpara de descarga de gas. Utilizan gas de xenón ionizado a alta presión. Producen una luz blanca brillante de amplio espectro bastante semejante a la luz natural del Sol. A diferencia de las de arco de mercurio, no necesita enfriamiento (64,80).

**-Lámparas fluorescentes**: son un grupo de características heterogéneas en función de los componentes que la formen. En general, espectro de  $\lambda$  de emisión más o menos ancho con picos marcados (80).

**-Lámparas de diodos emisores de luz (LED**, de las siglas del inglés Light Emitting Diode): estas lámparas son dispositivos basados en elementos semiconductores activados por la corriente eléctrica. La luz emitida se produce mediante un proceso de electroluminiscencia y por tanto, no generan apenas

calor (64). Son fuentes de luz direccional con la máxima potencia emitida en dirección perpendicular a la superficie emisora (81). Aunque su potencia es baja, generan luz de suficiente energía en las  $\lambda$  deseadas con un ancho de banda suficientemente estrecho (76,80,86). Además, el LED es compacto, liviano y requiere poca energía para obtener la  $\lambda$  deseada. Las empresas Quantum Devices (Barnweld, Wisconsin, EE.UU) y EXFO (Missassauga, Ontario, Canadá) son los principales fabricantes de este sistema a nivel mundial con potencias de salida de hasta 150 mW (81). Existen varios diseños que se han probado en TFD. Los más utilizados en la clínica permiten el tratamiento de áreas de hasta 144 cm<sup>2</sup> como, por ejemplo, Aktelite<sup>®</sup>, la más utilizada en España con pico de emisión a 631nm, o Rhodo-LED<sup>®</sup> aunque, también existen algunos dispositivos más pequeños y focalizados como Ambulight<sup>®</sup> (87). Todas ellas tienen una  $\lambda$  de emisión alrededor de 630 nm. En nuestro laboratorio contamos con una lámpara LED de la marca Showtec que emite en rojo, verde y azul (RVA o RGB de las siglas en inglés de red, green y blue) y por tanto se puede elegir si emite en rojo (pico en 625 nm), verde (pico en 515 nm), azul (pico en 460 nm), colores intermedios por suma de dos de estos, o en blanco por suma de los tres. Esta lámpara emitiendo en rojo se ha empleado en los Estudios 2 (88) y 3 (84) de esta Tesis, en verde en los Estudios 2, 3 y 4 (85), y emitiendo en azul en el Estudio 5 (89).

**-Lámparas de luz pulsada intensa (IPL, de las siglas del inglés intense pulsed light):** son una fuente de luz policromática de alta intensidad, con un espectro de  $\lambda$  de emisión entre los 515 nm y los 1200 nm. Puede obtenerse, mediante diversos filtros una  $\lambda$  concreta, luz parcialmente monocromática y unidireccional similar a un haz láser, pero con una menor intensidad (80).

### 2.3.2.1.2 Fuentes de luz coherente

Los láseres (del acrónimo del inglés LASER, Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) son dispositivos que producen un haz

monocromático, coherente y colimado con un amplio rango de potencia de salida como resultado de una emisión estimulada (79). Poseen ciertas ventajas frente a las fuentes de luz no coherentes como su capacidad de producir luz de alta energía en un rango estrecho de  $\lambda$  que permite la aplicación en zonas muy concretas y con un tiempo de aplicación muy corto (76,80,86). Además, pueden ser incorporados mucho más fácilmente a sondas (86). Por ejemplo, catéteres de globo y fibras ópticas que a su vez pueden tener compatibilidad con instrumentación clínica como endoscopios. Estos dispositivos de entrega de luz se emplean para lograr suficiente potencia y  $\lambda$  apropiada para la activación del FS con una penetración óptima en el tejido diana, consiguiendo una distribución espacial de la luz correspondiente con la zona a tratar (81). Pero a pesar de las ventajas que parece presentar la implantación de los láseres en cuanto a su optimización en la clínica, el hecho de reducir el tiempo de los tratamientos fotodinámicos utilizando una mayor densidad de energía lumínica, reduce la eficacia debido a una menor oxigenación del tejido (86).

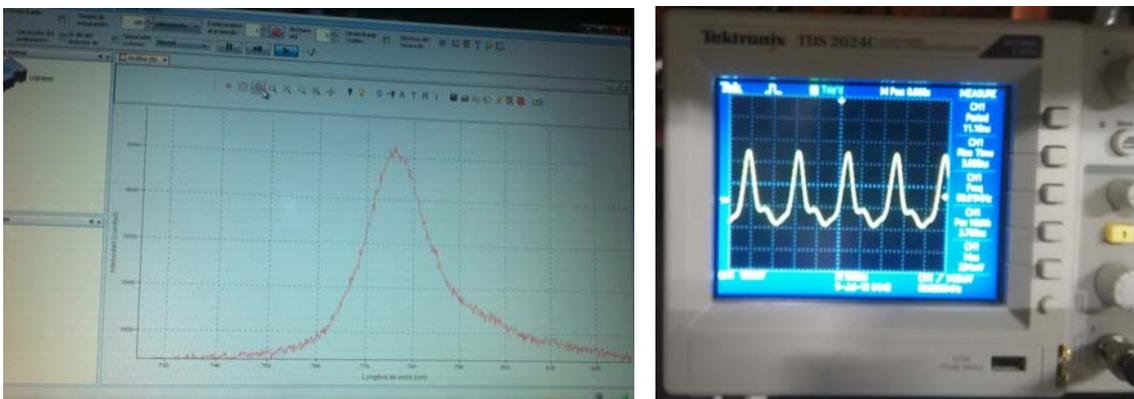
Algunos ejemplos son:

**-Láseres de colorantes bombeados por argón:** son los más utilizados para la TFD clínica. El fabricante Coherent (Santa Clara, CA, EE.UU.) fue el primero que diseñó un sistema láser de argón/colorante para TFD clínica utilizando una  $\lambda$  de 630 nm para la activación de Photofrin<sup>®</sup> (81).

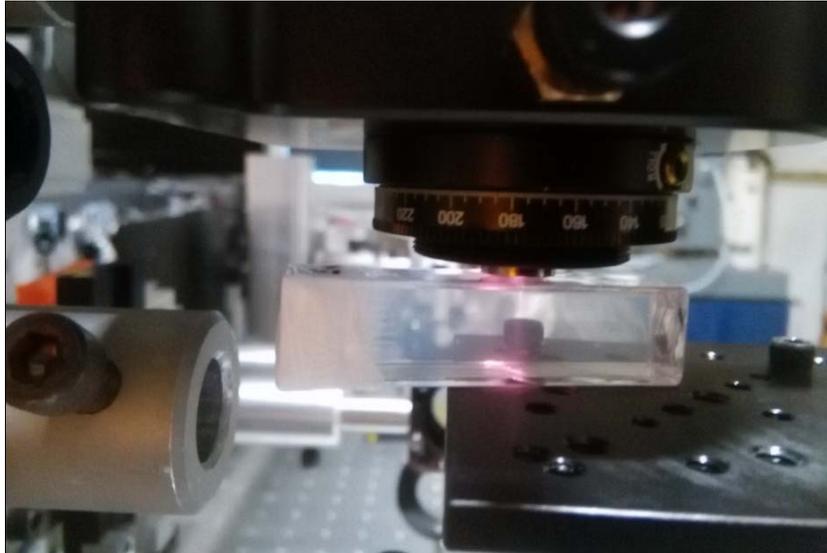
**-Láseres de diodo** como el láser de Arseniuro de Galio-Aluminio (GaAlAs o AlGaAs): son fuentes de luz semiconductoras sin las configuraciones ópticas de los sistemas láser estándar utilizados en TFD. Diomed Inc. (Andover, MA, EE. UU.) obtuvo la aprobación de la FDA para la comercialización de un láser de diodo con una  $\lambda$  de emisión a 630 nm para el uso de Photofrin<sup>®</sup> en patologías esofágicas y pulmonares en el año 2000. Asimismo, Biolitec (East Longmeadow, MA, EE. UU.) fabricó un láser de diodo de 652 nm y recibió la aprobación en Europa para el uso de Foscan<sup>®</sup>. Este sistema tiene ventajas, como el uso sencillo, no ser muy costoso y tener una potencia de salida estable durante un período prolongado (81).

**-Láseres de vapor de metal:** el de oro podría generar una  $\lambda$  de 628 nm con suficiente potencia para estudios clínicos o experimentales. Sin embargo, este láser resulta caro debido a la necesidad de cargas regulares de oro. El de cobre cuesta menos de mantener, no obstante, necesita un módulo de láser de colorante en el paquete (81).

**-Láseres de femtosegundos:** a diferencia de todos los anteriores que son de emisión continua, son láseres que producen luz pulsada con duraciones de pulso del orden de femtosegundos. Emiten en el infrarrojo por lo que su penetración en el tejido es potencialmente mayor y podría aumentar la profundidad del tratamiento fotodinámico. Sin embargo, sus posibles ventajas son superadas por sus limitaciones actuales, son caros, difíciles de mantener y manejar y por ello requerirían personal especializado adicional (80). Están en fase inicial de investigación. La figura 9 ilustra el espectro de emisión y el modo pulsado visto en un osciloscopio de un láser de femtosegundos (titanio:zafiro) y la figura 10 muestra un ejemplo de la irradiación usando ese mismo láser en una cubeta con suspensión bacteriana colocada sobre una mesa de traslación. Estas fotos han sido tomadas en el Laboratorio de Láseres de Pulsos Ultracortos y Procesamiento de Materiales del Departamento de Óptica del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en Baja California, México.

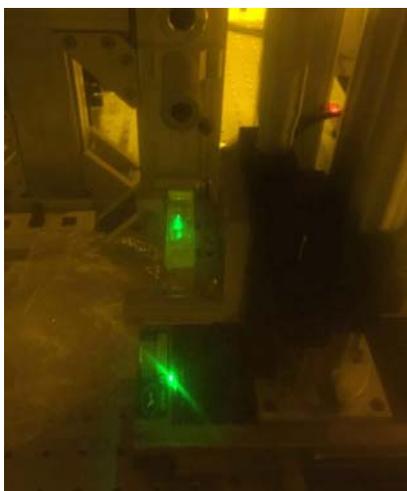


**Figura 9. Espectro de emisión del láser de femtosegundos (Ti:zafiro) (izquierda) y la imagen en osciloscopio de su modo pulsado (derecha).**



**Figura 10.** Ejemplo de irradiación con láser de femtosegundos en una muestra de suspensión bacteriana en cubeta de plástico colocada sobre la mesa de traslación. La lente de procesamiento que se utiliza en este ejemplo para enfocar el haz láser sobre la muestra es una lente de microprocesado de 4 mm que se encuentra en la montura negra que se ve en la parte superior.

-**Láser de Nd:YAG** (neodimio, y acrónimo del inglés yttrium aluminium garnet) emite a una  $\lambda$  de 1064 nm. Muy empleado en la práctica médica (64,80). Son de emisión continua pero pueden emitir en régimen de pulsos de nanosegundos. La figura 11 es un ejemplo de irradiación con un láser de nanosegundos Nd:YAG en el Laboratorio de Láseres de Pulsos Ultracortos y Procesamiento de Materiales en el CICESE.



**Figura 11.** Ejemplo de irradiación con el láser de nanosegundos (Nd:YAG). Muestra de suspensión bacteriana en cubeta de cuarzo colocada sobre un soporte que la sujeta por los bordes. Nótese como el haz atraviesa la suspensión.

**-Láser KTP** (de las siglas de sus elementos potasio-titanio-fosfato), no es un medio láser propiamente, es un cristal con propiedades ópticas no lineales que permite duplicar la frecuencia de la energía (reducir a la mitad la  $\lambda$ ), por ejemplo, de un láser de Nd:YAG emitiendo a 1064 nm para obtener una emisión de luz en 532 nm (verde) (80).

Destacar que los láseres pulsados en el régimen de nanosegundos a femtosegundos con frecuencias de repetición entre unos cuantos Hz a MHz permiten establecer un escenario térmico controlado de tal forma que se puede modular la producción de calor durante la irradiación, de acuerdo a la aplicación específica. Considerando lo expuesto, por ejemplo, se puede pensar en un caso de eliminación de microorganismos de una herida y un mecanismo cauterización donde se utilice un tren de pulsos de forma que cada pulso ejerza una acción de inactivación microbiana y la envolvente del tren de pulsos proporcione una componente térmica que induzca la cauterización.

Al margen de la TFDA, la inactivación microbiana mediante láseres es una técnica con grandes ventajas entre las que destaca la eliminación de requerir un FS, disminución del tiempo de aplicación y posibilidad de aplicación en zonas muy concretas. Contrario al mecanismo de generación de ERO que sucede en la TFD mediante el uso de un FS y luz de la  $\lambda$  adecuada en exposiciones prolongadas, el uso de láseres, y en particular de láseres pulsados, ofrece una alternativa de daño celular o del tejido mediante mecanismos físicos como la generación de onda de choque y burbujas de cavitación, o bien por calentamiento controlado (tal como se ha explicado en el párrafo anterior), o directamente por perforación de la pared celular por rompimiento dieléctrico denominado ablación. Estos mecanismos de interacción han sido poco explorados en términos de inactivación microbiana y representan un terreno propicio para la investigación básica puesto que todas las aplicaciones tanto clínicas como no clínicas de la TFDA podrían potencialmente llevarse a cabo usando láseres. Esta línea de investigación es la que se exploró durante la

estancia de investigación de seis meses realizada en el Departamento de Óptica del CICESE, Baja California, México, durante el periodo de investigación del doctorado.

### **2.3.2.2. Penetración de la luz en los tejidos**

La penetración de la luz a través de un tejido es muy compleja ya que la luz se esparce y absorbe cuando entra en el tejido y la extensión de ambos procesos depende tanto de la  $\lambda$  de la luz como del tipo de tejido (81).

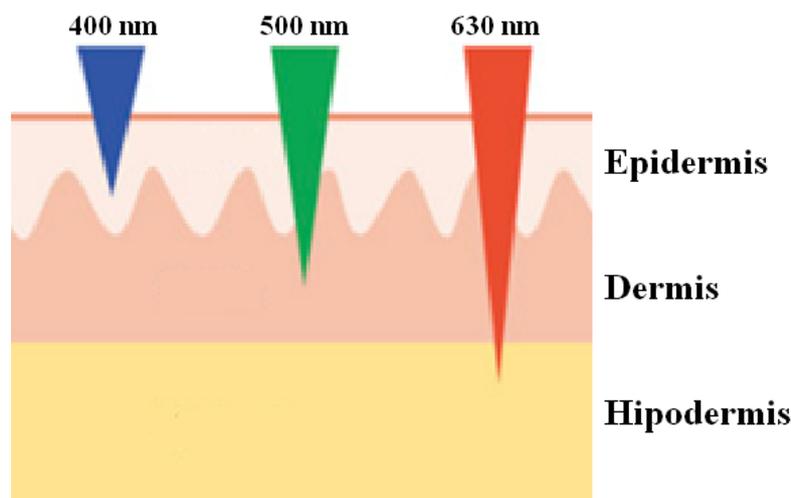
Respecto a la  $\lambda$ , cuanto mayor es, mayor es la penetración tisular (81,90). La capacidad de absorción de la luz de los tejidos disminuye con el aumento de la  $\lambda$ , por lo tanto,  $\lambda$  mayores penetran más eficazmente a través del tejido (81).

En relación al tejido, la penetración está influida por el esparcimiento óptico dentro de él y por la absorción óptica debida a los cromóforos tisulares endógenos, como la hemoglobina que absorbe  $\lambda$  inferiores a 600 nm y otras moléculas como el nicotin adenin dinucleótido en su forma reducida (NADH), el colágeno, y los lipopigmentos (81,90). El más relevante para la penetración de la luz en la piel es la melanina que absorbe en todo el espectro visible y que además tiene la habilidad de inactivar ERO (91). Por tanto, es importante considerar el fototipo de cada persona que viene definido por su cantidad de melanina para estimar el grado de penetración de la luz en su piel (56).

El agua tisular absorbe  $\lambda$  superiores a 1.200-1.300 nm, mientras que  $\lambda$  inferiores son absorbidas por los cromóforos tisulares, lo cual resulta en una alta fotosensibilidad de la piel. En consecuencia aparece esta horquilla entre 600 y 1.200 nm que se denomina ventana óptica del tejido y que a su vez es la ventana fototerapéutica de la TFD, ya que es el rango de  $\lambda$  que se puede emplear para tratar lesiones o infecciones (81,92). Por otra parte hay que considerar que  $\lambda$  mayores a 850 nm no son suficientes para que se produzca la reacción fotodinámica con eficacia. Por tanto, resulta un intervalo aproximadamente entre 650-850 nm que se denomina ventana fototerapéutica óptima. En consecuencia,

los FS deben absorber en este rango (entre el rojo y el infrarrojo cercano) para que el esparcimiento de la luz sea mínimo y la penetración en el tejido máxima produciendo el mayor rendimiento de la luz emitida por la lámpara, que sin embargo, no siempre es una prioridad. Los FS que absorben en la zona del azul tienen mayor rendimiento energético pero menor penetración tisular que aquellos que los que absorban en la zona del rojo (81). Así, mientras que para la TFD antitumoral se utilizan como FS moléculas derivadas de un núcleo tetrapirrólico, de baja toxicidad, de localización selectiva en células tumorales y con absorción de luz a  $\lambda$  cercanas al infrarrojo, donde la penetración de la luz en los tejidos es máxima, para la TFDA frente a agentes causantes de infecciones en piel y mucosas es posible utilizar otro tipo de moléculas FS, con máximos de absorción a  $\lambda$  menores (93).

La penetración de la luz es alrededor de 1-2 mm para una  $\lambda$  de 400-500 nm, entre 5-10 mm para 630 nm y aproximadamente el doble para  $\lambda$  entre 700-850 nm, como norma general. Sin embargo, en la piel, debido al alto esparcimiento de la luz en este tejido, la penetración real es inferior, por ejemplo con una  $\lambda$  630 nm es de 1-3 mm (figura 12) (92).



**Figura 12. Penetración de la luz en la piel:** esquema de la piel y la penetración de la luz en función de la longitud de onda ( $\lambda$ ) de irradiación. Adaptado de Vicentini *et al.* (94).

### 2.3.2.3. Dosimetría de la luz

Conceptos básicos de magnitud de luz que se emplean en TFD (56,76):

-La **potencia** es la velocidad a la que se consume la energía, es decir, la cantidad de energía entregada o absorbida por un elemento en un momento determinado. Se mide en vatios, su símbolo es W (Watt). Un W es el equivalente a 1 Julio/segundo (J/s). El Julio es una magnitud de energía, trabajo y calor, su símbolo es J (Joule) (76).

-La **irradiancia** es un término intercambiable con el de densidad de potencia. Es la magnitud utilizada para describir la potencia por unidad de superficie de todo tipo de radiación electromagnética. Se expresa en  $W/cm^2$  (76).

-La **fluencia**, también denominada densidad o dosis de energía, es la tasa de energía aplicada, es decir, la relación existente entre la energía suministrada por la fuente de luz y la superficie que se irradia. Se puede obtener al multiplicar la irradiancia (expresada en  $W/cm^2$ ) por el tiempo de exposición (expresado en s). Se mide en  $J/cm^2$ . En TFD cuando se habla de dosis de luz aplicada, nos referimos a este concepto (76). En cuanto a la dosis de luz que hay que administrar, es necesario ajustarla en cada caso, y dependerá de la fuente que se utilice, la patología a tratar o el experimento que se realice. Se debe considerar que con dosis de luz demasiado bajas se produce un daño tisular subletal que es reparado, mientras que a dosis demasiado altas se produce una depleción de oxígeno que disminuye la eficacia terapéutica (95). De esta forma, si se aplica una fuente de luz con intensidad menor pero durante más tiempo, se prolonga la oxigenación del tejido, con lo que el daño oxidativo es mayor (86).

### 2.3.3. Moléculas fotosensibilizantes

Los FS son cromóforos capaces de interaccionar con los fotones de una radiación de  $\lambda$  determinada, para formar un estado de excitación electrónica de alta energía el cual es capaz de ceder energía para formar ERO (63).

La transferencia continuada de energía lumínica al FS y las ERO formadas promueven la descomposición total o parcial de dicho FS ocasionando su pérdida de actividad en un proceso denominado fotoblanqueamiento o aclaración del FS (76).

### **2.3.3.1. Características ideales de un fotosensibilizante**

El tipo de tratamiento fotodinámico condiciona las propiedades que se buscan en un FS, no obstante, un FS ideal ha de reunir las siguientes características genéricas para ser óptimo (56,81,96–98):

1. Altamente selectivo para las células diana ya sean microbianas o cancerosas.
2. Rápida acumulación en las células diana (junto con la alta selectividad, hace que se minimice el tiempo y los posibles daños en el organismo, es decir, baja toxicidad sistémica).
3. Toxicidad mínima en oscuridad y solo ser citotóxico en presencia de luz de una  $\lambda$  definida (inocuo en oscuridad).
4. Velocidad de fotoblanqueamiento adecuada (si es muy rápido puede no llegar a erradicar las células diana, mientras que si es muy lento puede provocar reacciones de hipersensibilidad a la luz).
5. No generar subproductos tóxicos para el paciente (productos del fotoblanqueamiento inocuos).
6. Distribución homogénea en las células diana.
7. Fácil administración.
8. Manejo sencillo (fácil de disolver y debería ser capaz de formularse).
9. Capaz de activarse químicamente con la radiación de una zona concreta del espectro dependiendo de la profundidad de la lesión a tratar.
10. Alta reactividad fotoquímica *in vivo* con altos rendimientos en la producción del estado triplete, con largos tiempos de vida de este y siendo capaz de producir efectivamente oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y otras ERO (elevada producción de ERO equivale a mayor daño potencial en la célula diana).

11. Fácil obtención o síntesis.
12. Composición conocida que sea homogénea, químicamente puro.
13. Estable a temperatura ambiente.
14. Precio asequible y disponible comercialmente que permita promover la utilización extensa del tratamiento.

### 2.3.3.2. Clasificación y tipos de fotosensibilizantes

Los FS actuales pueden clasificarse atendiendo a su estructura química en compuestos tricíclicos de estructura A-B-C, policíclicos como las porfirinas y los que tienen cierta semejanza estructural con ellas ya sean homo o heterocíclicos y los que no responden a estas estructuras (56):

#### 2.3.3.2.1. Compuestos Tricíclicos (tabla 1):

**Tabla 1. Principales familias de fotosensibilizantes tricíclicos.**

Adaptado de Pérez-Laguna *et al.* (56).

Familia	Estructura química A-B-C	Miembros principales
Acridinas	Benceno-Piridina-Benceno	Naranja de acridina
Antraquinonas	Benceno-Bencenona-Benceno	Hipericina y sus sales (derivado de quinonas), hipocrelina
Fenotiazinas	Benceno-Tiazina-Benceno	MB y sus derivados (NMB, DMMB, TBO)
Furanocumarinas	Oxazol-Benceno-Pirilo/Pirilona	Psolarenos
Flavinas	Benceno-Pirazina-Pirimidina	Riboflavina
Xantenos	Benceno-Pirilo-Benceno	RB, eosina, eritrosina, fluoresceína-5-isotiocianato, rodaminas

DMMB: 1,9-dimetil azul de metileno; MB: azul de metileno; NMB: azul de metileno nuevo; RB: rosa de bengala; TBO: azul de toulidina O.

**-Acridinas:** son colorantes relacionados con el antraceno, estructura tribencénica. El naranja de acridina es el padre de esta familia. Los picos de absorción máxima de las acridinas se encuentran en torno a 500 nm. Se ha demostrado la producción de  $^1\text{O}_2$  como mecanismo fotodinámico mayoritario de muerte celular en células tumorales (99,100).

**-Antraquinonas:** es un grupo de moléculas con estructura también relacionada con el antraceno pero con grupos funcionales cetónicos como sustituyentes principales en la estructura tricíclica. Su espectro de absorción posee una banda de absorción débil pero generalmente muy ancha en la zona entre los 350-500 nm dependiente del disolvente en el que se encuentre (101,102).

**-Fenotiazinas:** es una familia ampliamente usada en TFDA (61,103,104). Estas moléculas destacan por su elevada capacidad de generar  $^1\text{O}_2$ . El pico de absorción máxima se encuentra entre los 600-700 nm en disoluciones acuosas. El azul de metileno (MB, del inglés methylene blue) es el padre de esta familia (105) y de él se derivan el resto de los miembros, el azul de metileno nuevo (NMB, new methylene blue), el 1,9-dimetil azul de metileno (DMMB, 1,9-dimethylmethylene blue) o el azul de toulidina O (TBO, toluidine blue O) entre otros (61,104). El FS MB se emplea en los Estudios 1 (83), 2 (88), 3 (84) y 6 (82) de la presente Tesis Doctoral y tiene una excelente capacidad para inactivar microorganismos mediante TFDA como se demuestra en dichos estudios.

**-Furocumarinas o Furanocumarinas:** son compuestos caracterizados por tener un anillo furánico en su estructura tricíclica. El grupo más conocido es el de los psolarenos y sus derivados que se emplean en fototerapia desde sus comienzos ya que pueden presentarse en plantas. Los picos de absorción máxima de las cumarinas rondan los 300-350 nm. Cuando se emplean con radiación ultravioleta A la terapia se denomina PUVA (por las siglas del inglés de psoralen and ultraviolet A) (106,107).

**-Flavinas:** la riboflavina o vitamina B2 es la estructura tricíclica con mayor número de nitrógenos en sus anillos. Absorbe en picos en el rango de 200 a 500 nm (108). Se han probado eficaces en la inactivación *in vitro* de diversos organismos mediante el uso de luz ultravioleta (109,110).

**-Xantenos:** es un grupo muy numeroso de compuestos halogenados que han sido ampliamente estudiados para TFDA, particularmente por su producción de  $^1\text{O}_2$  (104). Poseen un pico de absorción máxima en la zona entre los 400-600 nm en disoluciones acuosas. Entre sus miembros destaca el rosa de bengala (RB,

del inglés rose bengal) (103,111,112) que nuestro grupo ha usado en los Estudios 1, 2, 3 y 4 de esta Tesis Doctoral con buenos resultados en inactivación microbiana (83–85,88). Otros ejemplos son la eritrosina y la eosina que también han sido ampliamente utilizadas por otros autores (104).

### 2.3.3.2.2. Compuestos con estructuras policíclicas relacionados con las porfirinas (tabla 2):

**Tabla 2. Principales familias de fotosensibilizantes policíclicos relacionados con las porfirinas.** Adaptado de Pérez-Laguna *et al.* (56).

Origen	Familia	Miembros principales
Natural	Porfirinas, derivados y precursores	Hp, PpIX, ALA, MAL, TMPyP4
	Clorofilas y derivados	Clorofila a y b, Clorinas, bacterioclorina, Isobacterioclorina, mTHPC, Feoforbides, HPPH
Síntesis Artificial	Porfícenos	Porfíceno CPO, tetraalquilporfícenos y derivados del tetrafenilo
	Ftalocianinas	Ftalocianina 6, Ftalocianinas hidroxialumínicas, Glicoftalocianinas, RLP068/Cl, PC4
	(Metallo)-Purpurinas	Octaetil-purpurina (NT2) y etiopurpurina (ET2) + Sn o Zn (SnNT2, ZnET2, SnET2)
	Texafirinas	Motexafina con gadolinio o con lutecio

ALA: ácido metil aminolevulínico; Hp: hematóporfirina; HPPH: 2-(1-hexiloxietil)-2-devinil pirofeoforbida-a; MAL: aminolevulinato de metilo; mTHPC: meta(tetra)hidrofenilclorina; PC4: ftalocianina 4; PpIX: protoporfirina IX; RLP068/Cl: cloruro de ftalocianina tetracationic Zn(II); TMPyP4: tetra-(N-metil-4-piridil) porfirina.

**-Porfirinas, derivados y precursores:** consisten en una estructura central con cuatro anillos de pirrol, que suele ir acompañada de un elemento, generalmente metálico, formando complejo con los átomos de nitrógeno centrales. El espectro de absorción de los tetrapirroles posee su máximo de absorción en la zona entre 300-400 nm, denominada “banda de Soret”, y un grupo de bandas de menor intensidad en la zona entre 500-700 nm conocidas como “banda Q” (104,113). La Hp, un ejemplo de ésta familia, se encuentra en forma reducida en los eritrocitos como PpIX, la cual se acompleja con el hierro para formar el grupo hemo, que es el grupo prostético de la hemoglobina (114). La PpIX se emplea como FS en TFD fundamentalmente mediante la aplicación

de sus precursores MAL y ALA (59,96) si bien también se usan nuevas porfirinas (71).

**-Clorofilas y derivados:** son moléculas con cierta semejanza estructural a las porfirinas clásicas. La clorina presenta una insaturación menos que la porfirina, y la bacterioclorina e isobacterioclorina dos menos. Se caracterizan por encontrarse acomplejadas por un átomo de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) (115). Presentan gran absorción en la parte del espectro de la luz visible con excepción de la zona verde (56), de hecho, la intensidad de su pico de absorción es alrededor de diez veces mayor que el de las porfirinas (116,117). Son insolubles en agua pero se pueden vehicular con maltosa, glucosa (97) o maltotriosa (118) para aumentar su solubilidad. Mayoritariamente utilizadas en TFD frente a cáncer (71), por ejemplo, la meta(tetra)hidrofenilclorina comercializada como Foscan<sup>®</sup> y sus derivados destacan entre los FS más activos para TFD antitumoral (119).

**-Porfícenos y porfirinoides:** son isómeros estructurales de las porfirinas. Poseen un espectro de absorción similar a ellas. Se han demostrado útiles tanto para TFD antitumoral (115) como para TFDA (120,121).

**-Ftalocianinas:** son tetrapirroles que, si se encuentran acomplejados con metales como el aluminio o el zinc, son capaces de generar alta producción de  $^1O_2$ . Presentan un pico máximo de absorción a 650-700 nm (56). Son altamente hidrofóbicas (104) y completamente inocuas en ausencia de luz. Se han utilizado en TFD antitumoral y los conjugados de este FS con zinc han sido patentados tanto para TFDA y fotodiagnóstico de enfermedades infecciosas (116) como para el tratamiento del cáncer (71).

**-Métalo-purpurinas:** son clorinas modificadas, generalmente a partir de productos de la degradación de las clorofilas, con marcada absorción en el rojo (630-715 nm) (56). Solo las que se encuentran acomplejadas con  $Sn^{2+}$  o al  $Zn^{2+}$  poseen eficacia fotodinámica. La Purlytin SnET2 es la más representativa y se encuentra en fase de estudio preclínico para cáncer (71,117).

**-Texafirinas:** son porfirinas patentadas acomplejadas con lantánidos. Las de mayor capacidad fotosensibilizadora se encuentran acomplejadas con lutecio.

Absorben en la región entre 730-770 nm. Se denominan Lutex, Antrin, Lutrin, u Optrin y están en diferentes fases de ensayos clínicos frente a diversos tipos de cáncer (71).

### 2.3.3.2.3. Otros compuestos (tabla 3):

**Tabla 3. Otros fotosensibilizantes.** Adaptado de Pérez-Laguna *et al.*(56).

Origen	Estructura característica	Familia	Miembros principales
Natural	Diferuloilmetano	Curcuminoides	Cúrcuma y derivados
Síntesis Artificial	Núcleo de 6 átomos de Mo	Complejos de Mo	$[\text{Mo}_6\text{I}_8(\text{CH}_3\text{COO})_6]^{2-}$
	Policíclica formando esferas	Compuestos fullerénicos	BF4, BF6, BF21, BF24, FC <sub>4</sub> S, C <sub>60</sub> -(Glc)1, C70, C82, C84

BF4: fullereno mono-pirrolidinio; BF6: fullereno de tris-pirrolidinio; BF21 y BF24: fullerenos tetrakis-catiónicos; C<sub>60</sub>-(Glc)1: fullereno monoglicosilado; C70, C82 y C84: fullerenos con 70, 82 o 84 átomos de carbono respectivamente; FC<sub>4</sub>S: fullereno hexakis-aniónico;

**-Cúrcuma y derivados:** El FS más conocido de esta familia es la curcumina (CUR) que tiene una absorción máxima a 430 nm (56,104). Es un colorante natural aprobado como aditivo alimentario (E100) (122) que se extrae de diferentes plantas, principalmente *Curcuma longa*. La seguridad de su uso en cuanto a baja toxicidad (123) junto con que se ha demostrado su capacidad fototóxica tanto frente a células bacterianas como células cancerosas hace que la CUR y sus diversos derivados denominados curcuminoides sean una familia particularmente prometedora de FS para TFD (71,124–126). De hecho, el FS CUR se emplea en el Estudio 1 de la presente Tesis Doctoral mostrando capacidad de inactivación bacteriana (83).

**-Complejos de molibdeno:** Grupo de síntesis artificial basado en el Mo (II). Es un grupo nuevo pero con cierto recorrido histórico. En 1981 por primera vez se sintetiza  $\text{Mo}_6\text{Cl}_{14}^{2-}$  y se describen sus propiedades luminiscentes (127). En 1990 se describe la generación de oxígeno singlete por parte del clúster  $[\text{Mo}_6\text{X}_8\text{Y}_6]^{2-}$  (128). En 1996 se encapsula  $\text{Mo}_6\text{Cl}_{12}$  en polivinilpirrolidona (PVP) mejorando la generación de  $^1\text{O}_2$  (129). En 2011 se describe el nuevo clúster  $[\text{Mo}_6\text{I}_8(\text{n-CF}_3\text{COO})_6]^{2-}$  (130) y en 2012 se plantea el uso como material

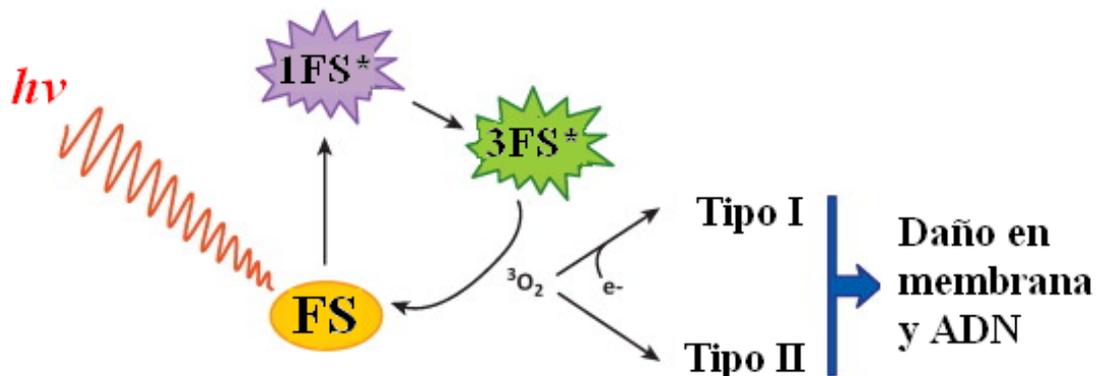
fotoactivo aplicable a superficies textiles que resulten bactericidas al ser irradiados con luz solar (131). En 2016 se sintetizó y caracterizó la familia completa de derivados (132). En ese mismo año, nuestro grupo probó por primera vez el complejo  $[\text{Mo}_6\text{I}_8(\text{CH}_3\text{COO})_6]^{2-}$  enlazado a un polímero de tipo poliestireno macroporoso (pico de absorción a 430 nm) como FS para TFDA con éxito (89). Esta labor se recoge en el Estudio 5 de la presente Tesis Doctoral. La principal novedad es conceptual, dado que es el primer ejemplo de complejo de Mo utilizado en TFDA. Además de la alta eficiencia en la destrucción de bacterias, se ha observado que el polímero con este complejo es muy fotoestable, es decir, no se autodestruye fácilmente con la luz, mientras que otros FS acaban degradándose con la irradiación (89,133). La eficiencia y estabilidad que tienen otros complejos de Mo y cómo influyen otros polímeros como soporte, continúa en estudio. A este respecto, recientemente hemos reportado que el complejo  $[\text{Mo}_6\text{I}_8(\text{CH}_3\text{COO})_6]^{2-}$  enlazado a un polímero de poliestireno tipo macroporoso da mejores resultados fotobactericidas que cuando se une a un poliestireno tipo gel (133) como puede consultarse en el estudio al respecto que se presenta en el Anexo II de publicaciones secundarias relacionadas con la Tesis.

**-Compuestos fullerénicos:** su estructura no está relacionada con las porfirinas aunque es también policíclica pero formando esferas. Absorben en las regiones del azul y verde (56,104). Se han utilizado en TFDA y TFD antitumoral. Son de síntesis artificial. Hay numerosos ejemplos como los citados en la tabla 3 (134,135).

## 2.4. La reacción fotodinámica

La reacción fotodinámica es el proceso en el que intervienen los tres componentes de la TFD, luz, FS y oxígeno, y de una forma simplificada es el siguiente:

Se necesita una fuente de luz que emita a una  $\lambda$  coincidente con la  $\lambda$  de absorción del FS para que sea capaz de excitar al FS que pasa de su estado basal a un estado transitorio singlete ( $^1\text{FS}^*$ ) y finalmente alcanza su estado de excitación triplete ( $^3\text{FS}^*$ ). En la reversión a su estado basal, la energía que se libera reacciona con el oxígeno molecular y hace que se formen ERO que son las que dañan las células diana. Si las ERO que se generan son anión superóxido, peróxido de hidrógeno o radical hidroxilo, se denomina reacción de tipo I y, si se genera oxígeno singlete, de tipo II (figura 13) (55,56).

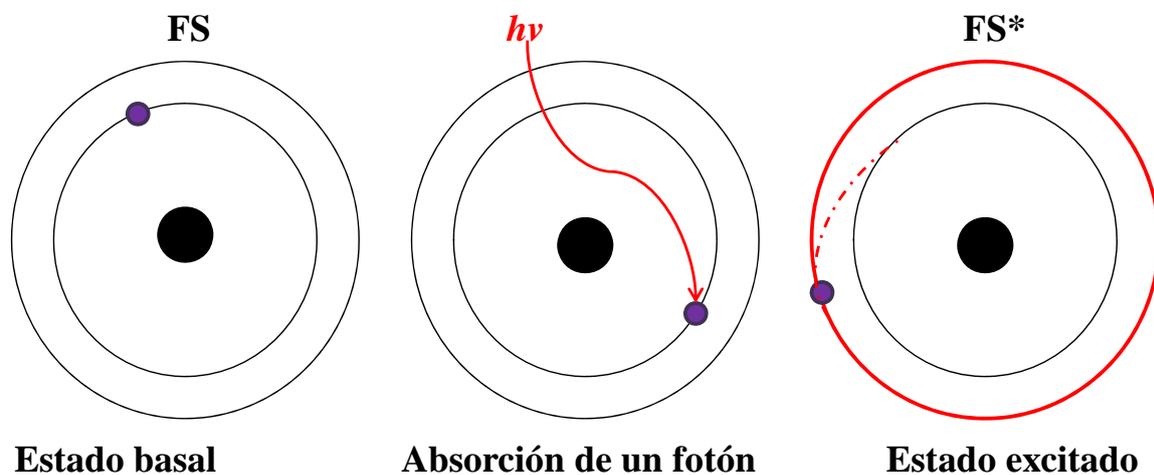


**Figura 13. Mecanismo de acción simplificado de la terapia fotodinámica:** diagrama básico del mecanismo de acción de la terapia fotodinámica. FS: fotosensibilizante en estado basal;  $^1\text{FS}^*$ : fotosensibilizante en su estado singlete;  $^3\text{FS}^*$ : fotosensibilizante en estado triplete excitado;  $h\nu$ : fotones. Adaptado de García-Quintanilla *et al.* (55).

### 2.4.1. Proceso fotofísico y fotoquímico

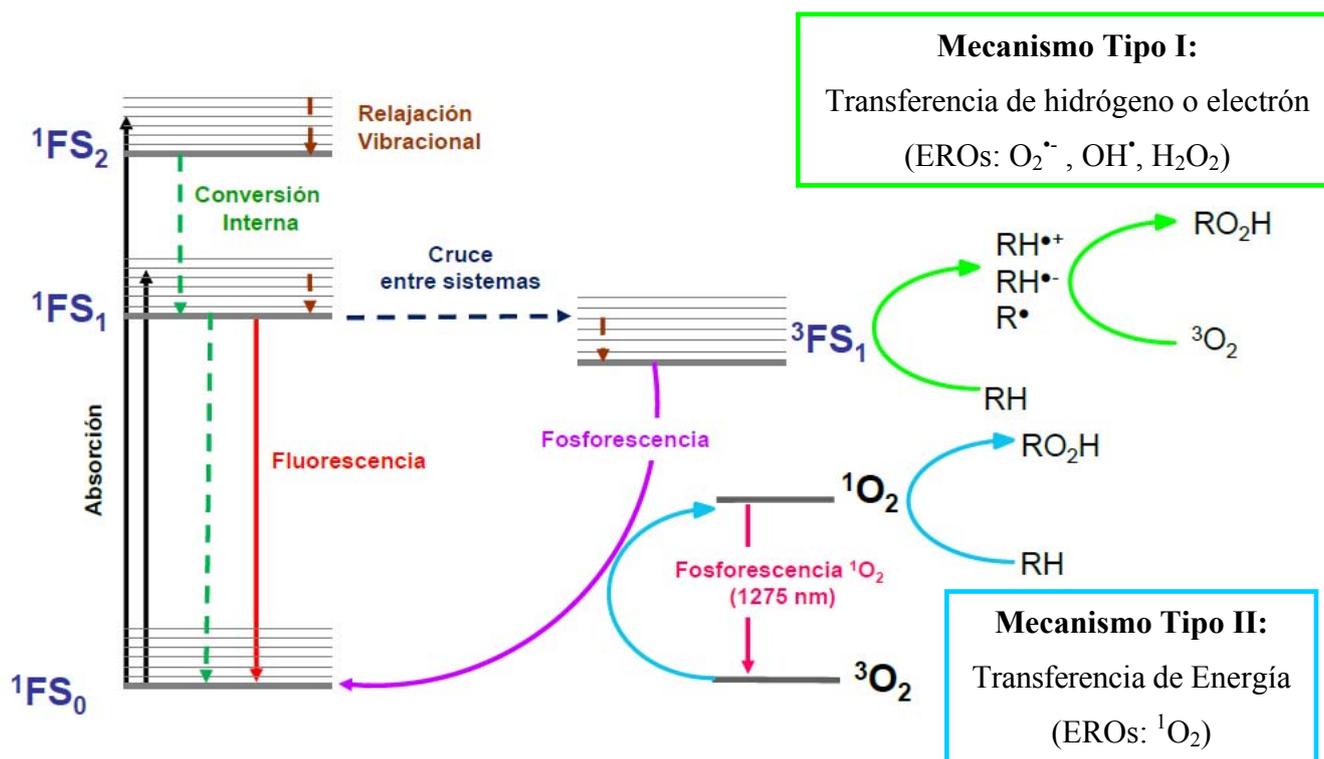
Los FS son moléculas capaces de presentar un aumento en su reactividad en combinación con ciertas radiaciones que, en general, se encuentran en el

espectro de la luz visible y, por tanto, son inofensivas *per se*. De este modo, los FS en estado basal o fundamental, es decir, con todos los electrones con espines apareados y en orbitales de baja energía, modifican su estructura electrónica mediante una radiación de  $\lambda$  adecuada, la  $\lambda$  de absorción del FS. El FS absorbe un fotón ( $h\nu$ ) y alcanza un estado electrónicamente excitado denominado singlete  $^1\text{FS}^*$  ( $\text{FS} + h\nu \rightarrow \text{FS}^*$ ) (figura 14). Este hecho sucede debido a la interacción de los electrones más externos del FS con fotones de la radiación (136–138).



**Figura 14. Excitación de un fotosensibilizante:** ilustración simplificada de cómo un fotosensibilizante en su estado basal (FS) pasa a su estado excitado (FS\*) por absorción de un fotón ( $h\nu$ ):  $\text{FS} + h\nu \rightarrow \text{FS}^*$

En el estado excitado  $^1\text{FS}^*$ , los espines de los electrones del orbital de mayor energía se encuentran emparejados lo que confiere al FS una reactividad aparente baja. Sin embargo, este estado es transitorio volviendo a su estado basal liberando 1) calor o 2) energía electromagnética (64,138) (figura 15).



**Figura 15. Reacción fotodinámica:** diagrama modificado de Jablonski que resume los procesos fotoquímicos radiativos, no radiativos y mecánicos (tipo I y tipo II) que pueden darse durante el proceso de TFD. Adaptado del libro “Chemical Aspects of Photodynamic Therapy” (64).

### 1) Calor (ver figura 15):

El  $^1FS^*$  puede desactivarse y regresar a su estado fundamental retornando su energía en forma de calor mediante los siguientes procesos no radiativos (64,138):

-Relajación vibracional: el FS excitado disminuye su energía vibracional dentro de un mismo estado electrónico ( $^1FS_2$ )

-Conversión interna: el FS excitado disminuye su energía vibracional mediante una transición entre dos estados electrónicos con la misma multiplicidad de espín, generalmente seguida de una relajación vibracional ( $^1FS_2 \rightarrow ^1FS_1 / ^1FS_1 \rightarrow ^1FS_0$ )

-Cruce entresistemas, también denominado  $K_{ISC}$ : el FS excitado disminuye su energía vibracional mediante una transición entre dos

estados electrónicos con distinta multiplicidad de espín, generalmente seguida de una relajación vibracional ( $^1\text{FS}_1 \rightarrow ^3\text{FS}_1$ )

## 2) Energía electromagnética (ver figura 15):

El  $^1\text{FS}^*$  también puede desactivarse y regresar a su estado fundamental retornando su energía en forma de radiación electromagnética, mediante los siguientes procesos radiativos (64,138):

-Fluorescencia: emisión espontánea de radiación durante la transición entre dos estados electrónicos con la misma multiplicidad de espín ( $^1\text{FS}_1 \rightarrow ^1\text{FS}_0$ )

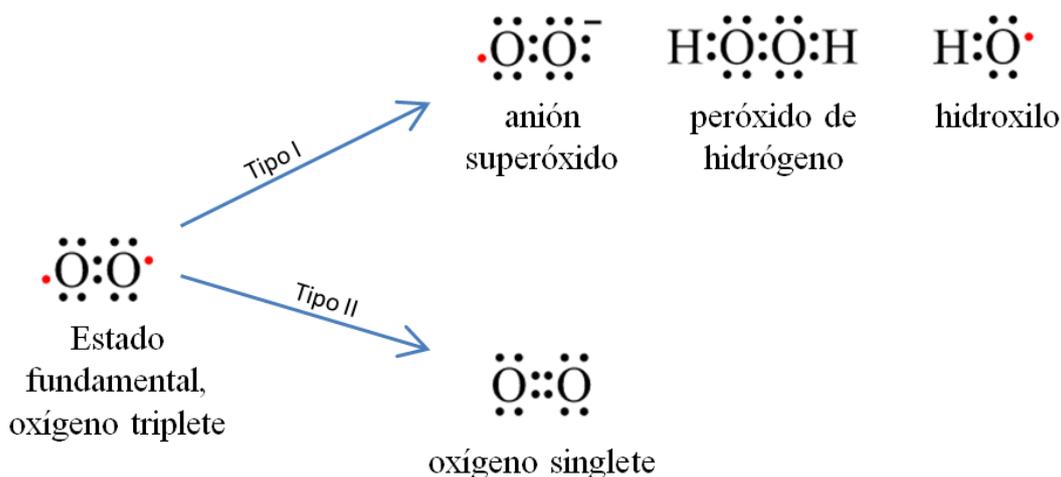
-Fosforescencia: emisión espontánea de radiación durante la transición entre dos estados electrónicos con distinta multiplicidad de espín ( $^3\text{FS}_1 \rightarrow ^1\text{FS}_0$ )

Respecto al estado triplete excitado  $^3\text{FS}_1^*$ , estas moléculas presentan una inversión en el espín de uno de sus electrones dando lugar a un desemparejamiento que hace que sea mucho más reactivo que el estado transitorio  $^1\text{FS}_1^*$  (63,138). Cuando se generan, pueden liberar su energía de excitación transfiriéndola a otra molécula presente en el medio por dos vías: mediante el mecanismo tipo I por reacciones fotoquímicas, como la transferencia electrónica o abstracción de H en el estado excitado, o bien por el mecanismo tipo II por sensibilización del oxígeno singlete  $^1\text{O}_2$  (figura 15) (64,138). Estos procesos se explican en detalle en el siguiente punto (ver apartado 2.4.2).

En consecuencia, la fotosensibilización es un proceso por el cual una alteración fotoquímica o fotofísica de una entidad molecular ocurre como resultado de una absorción inicial de radiación por otra entidad molecular. En TFD el proceso que se da es un caso particular de la fotosensibilización donde el FS es el que absorbe la radiación y la entidad que sufre la alteración es el oxígeno molecular ( $^3\text{O}_2$ ) (138).

## 2.4.2. Vías de generación de especies reactivas de oxígeno

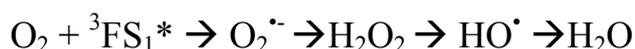
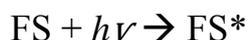
Existen dos mecanismos principales por los que un  $^3\text{FS}_1^*$  por su interacción con el oxígeno molecular ( $^3\text{O}_2$ ) puede formar ERO. Se denominan reacciones de tipo I y de tipo II. En las de tipo I se forman ERO como el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) o peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) mientras que en las de tipo II se caracterizan por la formación de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (64,138) (figura 16).



**Figura 16. Oxígeno molecular y las especies reactivas de oxígeno (ERO):** Representación gráfica de los enlaces y la configuración electrónica de las moléculas mediante diagrama de Lewis.

### 2.4.2.1. Mecanismo tipo I

El FS en su estado excitado ( $\text{FS}^*$ ) reacciona con un substrato (R) para formar radicales libres. Estos rápidamente reaccionarán con el oxígeno molecular para formar radicales peróxidos que iniciarán reacciones en cadena y formarán ERO. El esquema de transferencia de energía química por este mecanismo sufre el siguiente proceso general:



Concretamente, la reacción entre el FS excitado y el sustrato es por 1) transferencia electrónica o por 2) abstracción de hidrógeno:

**1) Transferencia electrónica:  $FS^* + R \rightarrow FS^{\cdot+} + R^{\cdot-}$**

Es el caso del  $FS^*$  al reaccionar con el  $O_2$ , formando el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ):



El superóxido por sí mismo no es muy reactivo debido a que vuelve a oxidarse fácilmente a oxígeno molecular. Sin embargo, la forma protonada, el radical hidropéroxido, sufre una dismutación espontánea que genera oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ):



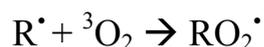
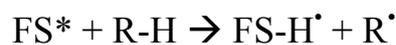
A su vez, el  $H_2O_2$  puede experimentar la reducción de un electrón generando el radical  $HO^{\cdot}$  en sistemas biológicos a través de una reacción tipo Fenton:

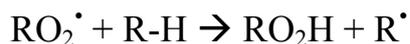


Estos radicales hidroxilo tienen un radio de acción muy limitado espacialmente por lo que su acción se ve limitada al espacio concreto donde se forman (139).

**2) Abstracción de hidrógeno:**

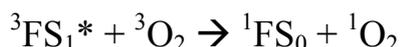
Implica la transferencia de un átomo de hidrógeno (reducción) al FS de estado excitado ( $FS^*$ ). Esto genera radicales libres capaces de reaccionar rápidamente con el oxígeno molecular y crear una mezcla compleja de compuestos intermedios de oxígeno reactivos, incluidos los peróxidos reactivos capaces de desencadenar un torrente de eventos citotóxicos, que pueden culminar en daño celular y muerte (117).





### 2.4.2.2. Mecanismo tipo II

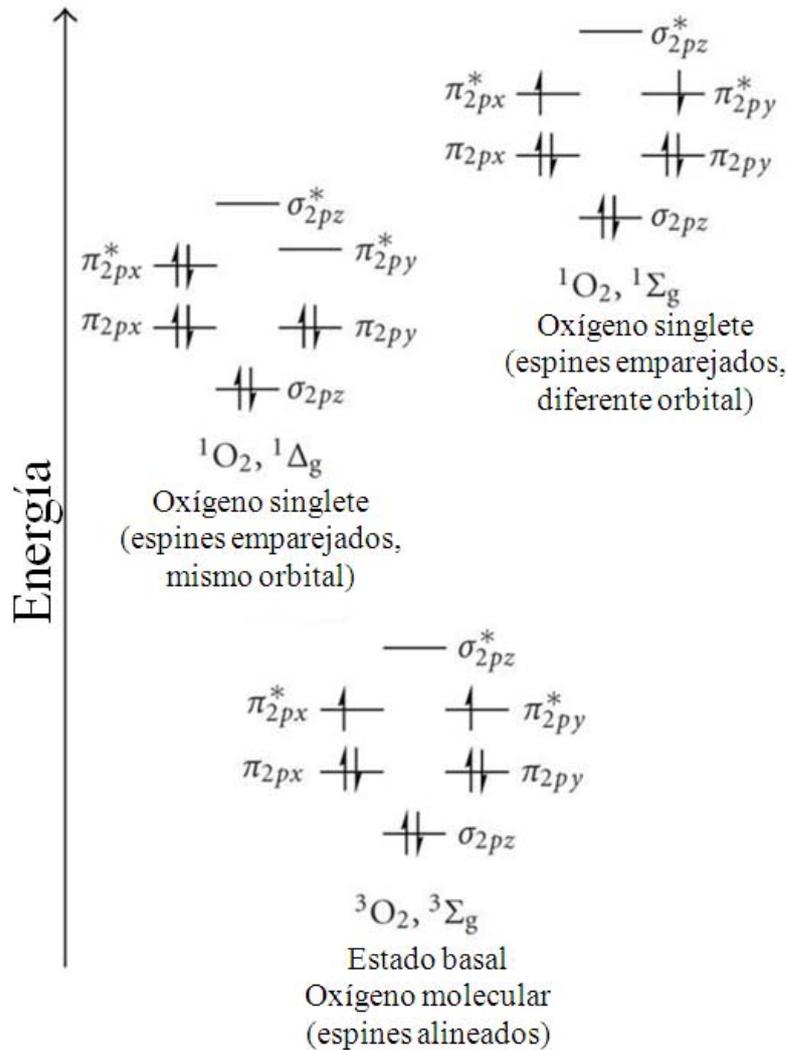
Implica una transferencia directa de energía entre el  $^3\text{FS}_1^*$  y el oxígeno molecular. El esquema de transferencia de energía de este mecanismo sufre el siguiente proceso general:



Se genera un radical de corta duración (<40 ns en sistemas biológicos) y de muy corto radio de acción (5-20 nm), por lo que su efecto se encuentra limitado al lugar donde se forme, pero de un alto poder oxidante, llamado oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), el cual es capaz de dañar directamente al material biológico (71,117,140).

Cuando el  $^3\text{FS}_1^*$  colisiona con el oxígeno molecular, elimina el triplete invirtiendo un espín de los electrones más externos del oxígeno molecular ( $^3\text{O}_2$ ), generando dos formas de oxígeno singlete (figura 17), mientras simultáneamente se vacía el estado excitado de triplete del  $\text{FS}^*$  (117).

El estado de  $^1\text{O}_2$  de mayor energía tiene una vida muy corta y se relaja rápidamente al estado excitado de energía más baja. Es, por lo tanto, esta forma de menor energía del  $^1\text{O}_2$  la que está implicada en la lesión celular y la muerte celular (117).



**Figura 17. Diagrama de orbitales moleculares del oxígeno singlete.**

Adaptado de Josefsen y Boyle (117).

### 2.4.3. Efecto en biosistemas

La formación de ERO es habitual en sistemas biológicos, derivada de diferentes procesos y como consecuencia del envejecimiento de las células. Para protegerse de los efectos de las ERO, las células disponen de diferentes sistemas de amortiguación: enzimas como la superóxido dismutasa (que desactiva el  $O_2^{\cdot-}$ ) y la catalasa (que desactiva el  $H_2O_2$ ), péptidos antioxidantes como el glutatión o azúcares antioxidantes como el ácido ascórbico (ambos desactivan el  $OH^{\cdot}$ ) (141,142). Sin embargo, las ERO formadas durante el proceso de fotooxidación

en la TFD sobrepasan el efecto protector de estos sistemas de choque y se presentan insuficientes a la hora de proteger a la célula (59,136).

La capacidad de un FS de producir daño está condicionada por la capacidad que éste tenga de formar mayor o menor número de moléculas de FS excitado en estado triplete ( $^3\text{FS}_1^*$ ) (63). La consecuencia de esta serie de reacciones culmina con la formación de ERO que en un sistema biológico provocan daño a diversos sustratos siendo capaces de destruir múltiples células (59,136).

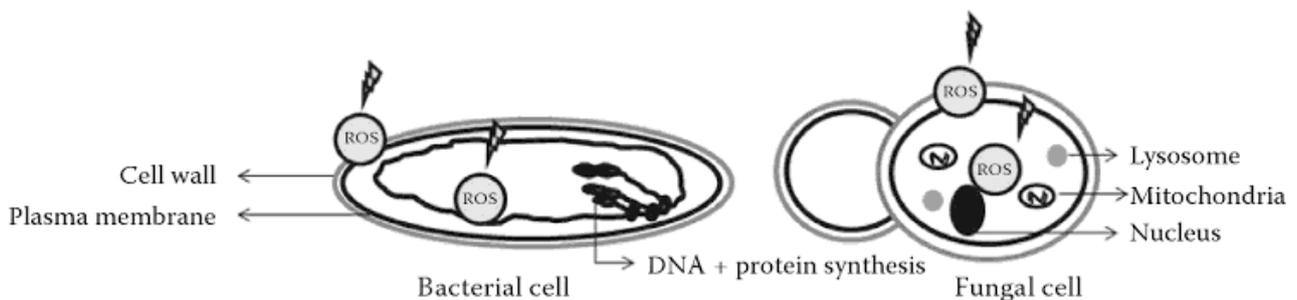
El mecanismo tipo II da lugar a  $^1\text{O}_2$  que reacciona con sustratos ricos en electrones como los alquenos, anillos aromáticos, fenoles, aminas y tioéteres que se encuentran en biomoléculas como los lípidos insaturados, colesterol,  $\alpha$ -aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. Asimismo, también se conoce que la formación de ERO por el mecanismo tipo I por parte de algunos FS es crucial para la oxidación de biomoléculas esenciales en ciertos sistemas biológicos (143).

Ambos mecanismos han sido propuestos para explicar el daño en los ácidos nucleicos y en la membrana citoplásmica letal para las células bacterianas (79). No obstante, en TFD se acepta que la ERO más importante es el  $^1\text{O}_2$  y que es adecuado para matar bacterias, virus y hongos en sitios localizados por el corto tiempo de vida y el escaso radio de acción. Por ello, el tejido circundante no se ve afectado por el daño del  $^1\text{O}_2$  haciendo de las reacciones tipo II la vía ideal para el tratamiento de infecciones tópicas (143).

La muerte celular que se da principalmente mediante apoptosis, necrosis o autofagia puede definirse como una pérdida irreversible de la integridad de la membrana plasmática (144). El camino que sigue una célula como consecuencia de la reacción fotodinámica depende, en su mayoría, de cuales sean las dianas celulares del FS, las ERO formadas y del tipo de célula, es decir, de su complejidad celular (143). Por ejemplo, en TFD frente a células cancerosas, se ha visto que los FS que se acumulan en la membrana citoplasmática son más susceptibles de provocar muerte celular por necrosis, como es el caso de los FS

monocatiónicos y dicatiónicos. Aun así, un mismo FS es capaz de inducir procesos pro-apoptóticos y pro-necróticos, y en equilibrio con éstos, procesos de autofagia dependiendo en gran medida de su concentración, del tiempo de contacto con la célula y de la dosis de luz utilizada (145).

Respecto a la TFDA, los estudios han demostrado que los efectos fotooxidativos causados por la mayoría de los FS en las células microbianas causan daño a múltiples dianas como el ADN, la integridad de la membrana, la actividad de la proteasa y el lipopolisacárido (LPS) (figura 18) (143).



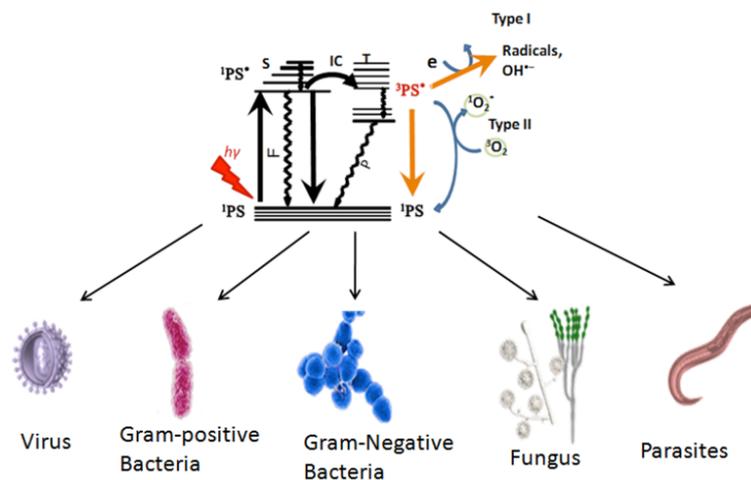
**Figura 18. Multiplicidad de dianas:** ilustración adaptada de Hamblin *et al.* (143) que representa la multiplicidad de dianas de las especies reactivas de oxígeno (ERO, o ROS en inglés) en una célula bacteriana (izquierda) y célula fúngica (derecha).

Cada FS presenta diferente grado de permeabilidad en cada tipo de célula y distinta afinidad por cada estructura celular. Además, a medida que avanza el proceso de fotoactivación, el daño celular que van ocasionando las ERO, hace que los FS puedan alcanzar otras estructuras celulares generando en ellas ERO y dañándolas también. Esta multiplicidad de dianas de las ERO en TFDA dificulta la aparición de resistencias porque el hecho de que los FS no tengan una única diana específica en la célula hace que al ser irradiado se produzcan ERO en diferentes estructuras de la misma y ocasionen su destrucción de distintas formas. En consecuencia, que se produzca selección de resistentes a múltiples niveles es muy poco probable y esto apoya la hipótesis de que la TFDA puede

ser una alternativa viable frente a los antibióticos, ya que no se conoce que los microorganismos adquieran resistencia contra este tratamiento (79,143,146).

## 2.5. Dianas de la terapia fotodinámica antimicrobiana

Las dianas celulares de la TFDA son todo tipo de microorganismos (bacterias, hongos y parásitos) incluyendo los virus (figura 19) (56,59,136,147).



**Figura 19. Tipos de dianas:** esquema de Sharma *et al.* (147) que ilustra las posibles dianas de la TFDA.

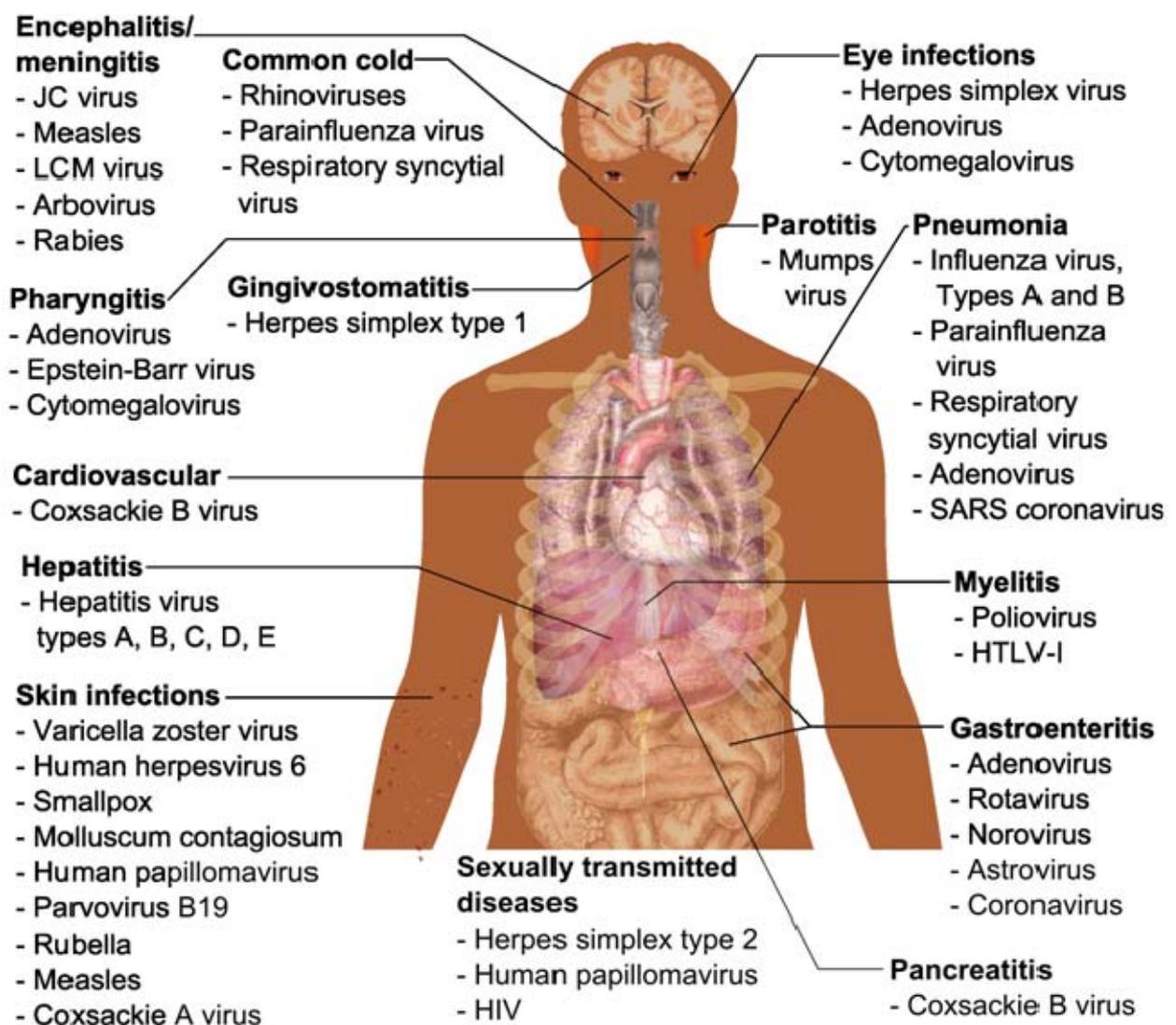
### 2.5.1. Los virus

Los virus son agentes infecciosos que se replican dentro de las células vivas de otros organismos. Su estructura es muy simple: se componen de material genético que puede ser ADN o de ARN, y una cubierta proteica que lo protege llamada cápside. Además, algunos también poseen una bicapa lipídica que los rodea cuando se encuentran fuera de la célula a la que infectan denominada envoltura vírica (148).

No todos provocan enfermedades puesto que algunos se reproducen sin causar daño significativo al organismo infectado, por contra, otros causan

enfermedades graves. Las infecciones que ocasionan son de carácter agudo o crónico, cuando el virus continúa multiplicándose en el cuerpo evadiendo los mecanismos de defensa del huésped (149).

En humanos provocan un amplio abanico de enfermedades más y menos graves (figura 20) (150). En los animales, pueden ser importantes patógenos del ganado, por ejemplo, en casos de enfermedades como la fiebre aftosa y la lengua azul (151), y en los animales de compañía en casos como la parvovirus canina (152).



**Figura 20. Infecciones víricas:** esquema que ilustra la localización de las principales infecciones víricas de humanos y las principales especies involucradas en éstas (150).

Los antibióticos no tienen ningún efecto sobre los virus, pero se han desarrollado varios medicamentos antivirales y, en algunos casos, la respuesta inmune para impedir la infección también puede producirse mediante vacunas que confieren una inmunidad adquirida artificialmente. Aun así, hay dificultad para combatir ciertos virus con medios convencionales (153,154). La necesidad de nuevas estrategias para eliminarlos ha abierto el camino a la TFDA, que además se encuentra con la ventaja que supone la estructura simple de los virus para que, con su mecanismo de acción mediante ERO, le resulte más fácil su eliminación en comparación con otros agentes infecciosos como bacterias y hongos mucho más complejos estructuralmente (56,136).

Como resultado, gran parte de los estudios clínicos iniciales de TFDA se dirigieron a lesiones virales (136). Por ejemplo, en 1973 se publicó el primer caso de herpes tratado con TFD usando la proflavina como FS (155) y enseguida se fueron sucediendo otros casos (156). En los últimos años, se han llevado a cabo varios ensayos clínicos de TFDA contra infecciones víricas, especialmente frente al virus del papiloma humano con el fin de tratar la papilomatosis (136,157). Cabe destacar que al comparar la susceptibilidad entre los virus, varios informes concluyeron que los que tienen envoltura de lípidos son más susceptibles a la TFDA que los que no, aunque no aclaran los motivos. No obstante, la mayoría de los trabajos sobre virus y TFDA son *in vitro* y se han orientado al uso de esta metodología para la esterilización de sangre o productos sanguíneos (140). Incluso se han realizado estudios de TFDA con el fin de disminuir la carga viral plasmática de pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana mediante fotoféresis (136).

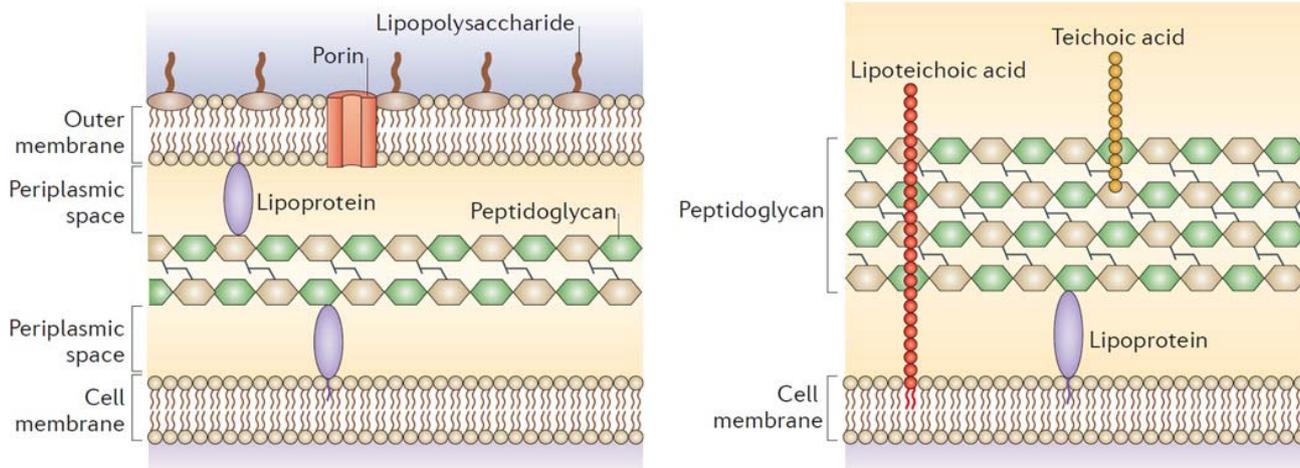
## 2.5.2. La célula bacteriana

Las bacterias, en la clásica clasificación taxonómica, constituyen el Reino Monera. Son organismos procariotas y como tales carecen de núcleo y orgánulos delimitados por membranas.

La membrana citoplasmática es una bicapa lipídica compuesta fundamentalmente de fosfolípidos en la que se insertan proteínas. Realiza numerosas funciones entre las que se incluyen las de barrera osmótica, transporte, transducción de energía, centro de replicación de ADN y punto de anclaje para los flagelos (158).

La técnica de tinción de membranas de bacterias desarrollada por Hans Christian Gram (159) en 1884, se denomina tinción de Gram y se usa para clasificar a las bacterias: las Gram positivas son las que se visualizan de color morado y las bacterias Gram negativas se visualizan de color rosa. La tinción diferencial se debe a las diferencias en la estructura y los componentes entre los dos tipos de bacterias que se visualizan con este método de tinción.

Externamente a la membrana celular, la mayoría de bacterias poseen una pared celular compuesta por peptidoglicano. En las Gram positivas esta pared es más gruesa, llegando a estar constituida por varias decenas de capas. En las Gram negativas la pared suele ser muy fina, incluso monocapa, pero además, presentan una segunda membrana lipídica, es decir, tienen una membrana externa rodeando a la delgada pared celular. El espacio comprendido entre la membrana citoplasmática y la pared celular y, en el caso de las Gram negativas, también el espacio entre la pared y la membrana externa se denomina espacio periplásmico (56,158,160) (figura 21).



**Figura 21. Pared y membrana de una bacteria:** esquema de la pared celular y la membrana celular de una célula bacteriana: izquierda, Gram negativa con su membrana externa; derecha, Gram positiva (158).

Las diferencias entre las bacterias Gram positivas y negativas hacen que tengan una sensibilidad desigual a la TFDA resultando las Gram positivas más sensibles (56,161). Mientras que las bacterias Gram positivas se inactivan con FS catiónicos, aniónicos e incluso neutros, sólo los FS catiónicos son activos frente a las Gram negativas (56,162). La clave se encuentra en que la pared compuesta por peptidoglicanos y ácidos lipídicos de las Gram positivas permite el paso de los FS mientras que en las Gram negativas, la doble membrana dificulta su paso (56,161). Si se quiere solventar este inconveniente a la hora de atravesar la membrana de las bacterias Gram negativas por parte de los FS que no son catiónicos, una opción es unir estos FS a un vehículo molecular catiónico como a la poli-L-lisina (161). Otro enfoque para solventar esta dificultad es combinar el tratamiento de TFDA con diversas moléculas que aumenten la permeabilidad, por ejemplo, utilizando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que induce un desequilibrio electrostático en su estructura mediante el quelado de metales divalentes, lo cual conduce a su desorganización como consecuencia de la repulsión entre las cargas negativas de elementos estructurales (61). No obstante, varias familias de FS, por ejemplo, las fenotiazinas, ftalocianinas o porfirinas, son catiónicas y a valores de pH fisiológicos pueden unirse a la superficie tanto

de bacterias Gram positivas como de Gram negativas, desplazando a los metales divalentes que estabilizan las cargas negativas estructurales presentes en la superficie externa, ya que poseen constantes de afinidad de 2 a 4 órdenes de magnitud mayores. Además, debido al carácter anfífilico de los FS, el mismo FS puede actuar como elemento de desorganización de la pared. Por ello, empleando estos tipos de FS es posible fotoinactivar bacterias Gram negativas sin necesidad de una combinación o un tratamiento previo (60).

Continuando en términos estructurales, las micobacterias se merecen una mención aparte porque son un tipo especial de bacterias que aunque entran dentro de la categoría de Gram positivas no se tiñen con la tinción de Gram. Son bacterias ácido-alcohol resistentes. Esta peculiaridad radica en que todas las especies de *Mycobacterium* spp. tienen la pared celular más gruesa, rica en ácidos micólicos y en lípidos que hacen que su superficie sea hidrófoba. Dicha pared celular proporciona una mayor protección a este género de bacterias y de ahí la dificultad de combatirlos tradicionalmente (163). Respecto a la TFDA, a pesar de que ciertas publicaciones han demostrado su eficacia frente a micobacterias *in vitro* son escasos los estudios *in vivo* (146,164).

Respecto al estado en el que se encuentran las bacterias en el medio, en su forma libre, se denominan bacterias planctónicas, pero ciertas Gram positivas, Gram negativas, e incluso levaduras como *Candida albicans*, pueden formar parte de un tipo de estructura de agregación particular que recibe el nombre de biofilm o de biopelícula. Concretamente, estos términos equivalentes describen a una comunidad sésil, formada por microorganismos de la misma especie o no, que se caracteriza porque las células están unidas irreversiblemente a un substrato o interfaz o entre sí, y están incrustadas en una matriz extracelular de sustancias poliméricas que han producido. Exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y transcripción de genes en comparación con las células en estado planctónico (165).

Las biopelículas son universales y se producen en sistemas acuáticos e industriales, así como en una gran cantidad de entornos y dispositivos médicos

relevantes para la salud pública. La importancia radica en que los microorganismos que se encuentran en este estado se hallan muy protegidos del medio externo. Como resultado, son altamente resistentes a los agentes antimicrobianos y al sistema inmune del huésped, y se ha demostrado que están asociados con varias enfermedades y con la naturaleza crónica de las infecciones, un ejemplo lo encontramos en la fibrosis quística (165).

La TFDA se ha demostrado eficaz tanto frente a bacterias en estado planctónico como en biopelícula, pero al comparar una misma especie bacteriana en los dos estados, en biofilm se requiere una dosis significativamente mayor (cantidad de fluencia y/o de FS) para la inactivación microbiana (56,166) como así se puede observar en el Estudio 4 de la presente Tesis Doctoral sobre TFDA usando RB contra la misma cepa de *S. aureus* en estado planctónico y formando biofilm (85). Para intentar solventar este hecho, en ciertos estudios de TFDA contra biopelículas, el tratamiento fotodinámico se combina con el empleo de ciertas moléculas disruptoras (166).

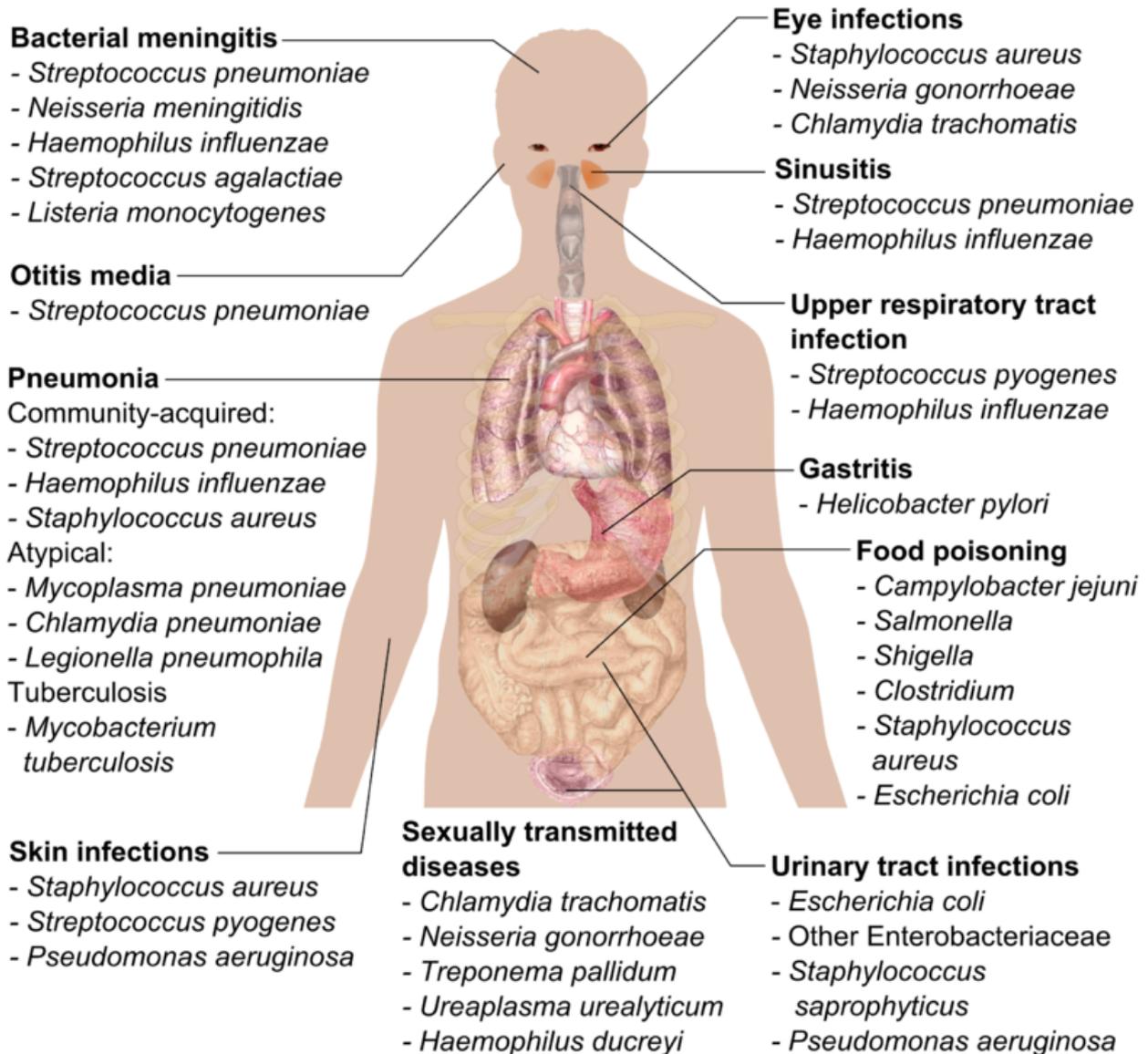
En cuanto al papel de las bacterias en la naturaleza, son organismos muy abundantes y ubicuos (167,168):

- Resultan imprescindibles para el reciclaje de los elementos, pues muchos procesos fundamentales de los ciclos biogeoquímicos dependen de estas, por ejemplo, la fijación del nitrógeno atmosférico.

- En la industria, las bacterias son importantes en procesos tales como el tratamiento de aguas residuales, en la producción de mantequilla, queso, vinagre, yogur, etc., y en la fabricación de medicamentos y de otros productos químicos (168).

- En el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces más células bacterianas que células eucariotas, la mayor parte se encuentran en el tracto digestivo y en la piel (167).

Solo una pequeña parte de las bacterias causan enfermedades en los seres humanos pudiendo provocar un amplio abanico de mayor o menor gravedad (figura 22) (150):



**Figura 22. Infecciones bacterianas:** esquema que ilustra la localización de las principales infecciones bacterianas humanas y las principales especies involucradas en estas (150).

Cabe destacar que las bacterias de los géneros *Staphylococcus* o *Streptococcus*, que se consideran parte de la flora humana normal y generalmente se encuentran en la piel o en la mucosa bucal y nasal sin causar ninguna enfermedad, pueden llegar a causar infecciones en la piel, neumonía,

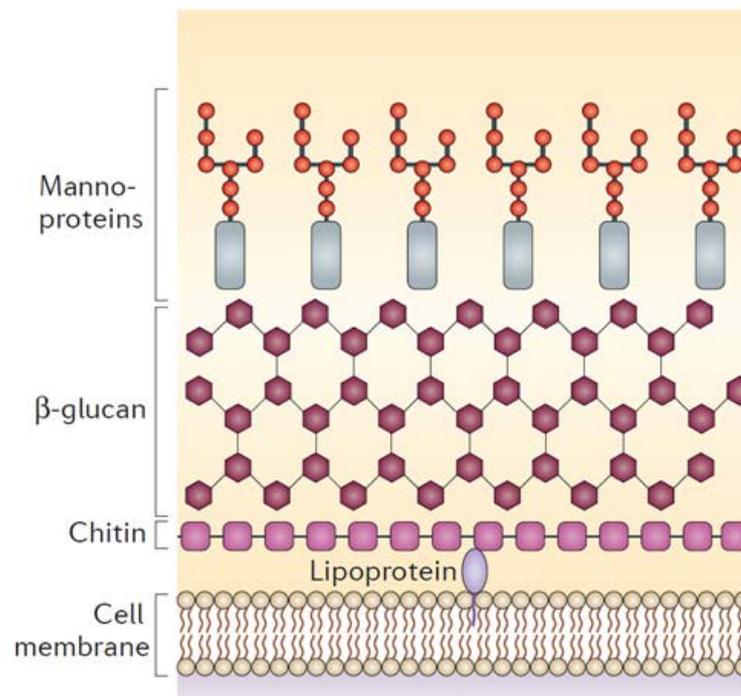
meningitis e incluso sepsis, una respuesta inflamatoria sistémica que produce shock, vasodilatación masiva y puede acabar en deceso (169). Además, recordar que *S. aureus* es uno de los microorganismos del grupo ESKAPE muy importante en el problema de la resistencia a los antibióticos (15,17). También hay que tener en cuenta que bacterias de ambos géneros se encuentran formando biofilm habitualmente (165). Como consecuencia, por la gravedad de las enfermedades que pueden causar y la dificultad para combatir las mediante los antimicrobianos clásicos, estas células son dianas frecuentes de los estudios de TFDA y, en especial, la inactivación de *S. aureus* es un objetivo prioritario de la TFDA (146). Concretamente, en nuestros trabajos *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* fueron elegidos como microorganismos diana de los Estudios 1 (83) y 2 (88), y *S. aureus* de los Estudios 3 (84), 4 (85) y 5 (89) de la presente Tesis Doctoral. Además el Anexo II de publicaciones secundarias relacionadas con la Tesis incluye un trabajo descriptivo centrado en diferentes cepas de *S. pseudintermedius* que pasan de actuar como comensales en perros a patógenas en humanos inmunosuprimidos (7).

Otro género a destacar es *Pseudomonas* cuya especie de mayor relevancia en la clínica es *P. aeruginosa*, también con capacidad de formar biopelículas y miembro del grupo ESKAPE (14,17). Asimismo, es objetivo diana de numerosos estudios de TFDA (59) y fue elegida como microorganismo diana junto con *S. aureus* en un estudio de TFDA llevado a cabo por nuestro grupo (133) que se recoge en el Anexo II de publicaciones secundarias como apartado 2. En dicho estudio se fotoinactivó con éxito, aunque, en comparación con *S. aureus*, para los mismos porcentajes de inhibición se requerían dosis de fluencia significativamente mayores lo cual es relativamente frecuente al comparar tratamientos de TFDA frente a Gram positivos como es el caso de *S. aureus* con Gram negativos como es *P. aeruginosa*, por las diferencias en su estructura ya comentadas en este mismo apartado (56).

### 2.5.3. La célula fúngica

Los hongos en la clásica clasificación taxonómica constituyen el Reino Fungi y se subdividen en cinco phylas: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota (170).

Son organismos eucariotas con metabolismo quimioheterótrofo. En general, presentan carga negativa (143). La membrana celular con ergosterol regula el paso de sustancias hacia el interior y el exterior de la célula. La pared celular, compuesta en general por quitina, glucanos y mananoproteínas, es una estructura esencial. La quitina es un polisacárido lineal que proporciona a la estructura celular resistencia y rigidez, así como la propiedad de que sea insoluble en agua y en solventes orgánicos. Los glucanos son los polisacáridos ramificados estructurales más importantes, actuando también como reservorio energético. Las mananoproteínas son las responsables de la porosidad e interacción con el medio (56,158,171) (figura 23).



**Figura 23. Pared y membrana de un hongo:** esquema de la pared celular y la membrana celular de una célula fúngica (158).

Cabe destacar que la capa exterior de los hongos tiene una permeabilidad relativa, intermedia entre las bacterias Gram positivas y las Gram negativas, pero el hecho de la existencia de una membrana nuclear y el gran tamaño/volumen de estos en comparación con las bacterias hace que sean más resistentes a la TFDA que cualquiera de los dos tipos de bacterias (56,143).

Los FS para la TFD antifúngica idealmente deben tener propiedades hidrofílicas y carga positiva para una mejor penetración a través de la pared celular. En un primer momento, la localización de los FS es restringida al citoplasma porque la membrana nuclear limita la penetración molecular en el núcleo. Después, las ERO mediante los mecanismos de daño fotodinámico perforan las paredes celulares y las membranas permitiendo al FS ocasionar daño a todos los niveles y acabar fotoinactivando la célula fúngica (56,143).

En cuanto al papel de los hongos en el medio, en general, son imprescindibles en los ecosistemas ya que descomponen mediante enzimas extracelulares la materia muerta reciclando así elementos vitales. También, son importantes debido a que hay plantas que dependen de la simbiosis con ciertos hongos para formar las micorrizas, estructuras que contribuyen a que sus raíces absorban minerales y agua del suelo (170).

Respecto a los seres humanos, utilizan ciertas partes de algunos hongos como alimentos (setas comestibles), o se valen de ellos para producir productos alimenticios (pan, cerveza, vino, queso, etc.) y antimicrobianos. Pese a que en su mayoría nos aportan beneficios, algunos hongos producen infecciones que se denominan micosis. Los microorganismos responsables de estas patologías son 1) ciertas levaduras y 2) algunos hongos filamentosos (170):

#### **1) Levaduras:**

Hongos unicelulares no filamentosos, con forma oval o esférica y con tamaño celular que generalmente oscila entre 2 y 4  $\mu\text{m}$  de diámetro pero puede llegar a los 40  $\mu\text{m}$  (172).

Las especies clínicamente más relevantes pertenecen al género *Candida*. Son saprofitas pero bajo ciertas circunstancias de alteración de las defensas del huésped se genera una conducta patogénica oportunista. Así, dan lugar a candidiasis cutáneas o mucosas, que si son localizadas pueden no dar lugar a mayores repercusiones, pero pueden ser sistémicas y llegar a ser letales (173–175). La más destacada por su interés clínico es *C. albicans*, comensal de la microbiota habitual del tracto intestinal del ser humano, ha sido descrita como la tercera causa de infecciones del torrente sanguíneo (176), así como la principal causa de infecciones nosocomiales fúngicas (177). Por su importancia, se eligió como uno de los microorganismos diana del Estudio 1 de la presente Tesis Doctoral (83).

Otras especies relevantes del mismo género son *Candida krusei*, comensal que se encuentra generalmente en las mucosas (51,178) y *Candida parapsilosis*, que se hallan principalmente en ambientes hospitalarios y que está ganando importancia como agente patógeno oportunista (173,179). Además, estas especies presentan un problema particular ya que tienen la capacidad de crecer en estado de biofilm en los dispositivos médicos implantados, generando así una resistencia casi total a los fármacos antifúngicos (51,177,180,181).

Otro género importante en la patología clínica es *Malassezia* que produce fundamentalmente pitiriasis versicolor. La infección se produce cuando se da un desequilibrio en la microbiota cutánea. Generan lesiones asintomáticas, a excepción de algún ligero picor. Las infecciones se caracterizan por la aparición de máculas de distinta tonalidad que al ir extendiéndose forman grandes placas con bordes delimitados y con una descamación tan ligera que en ocasiones no se aprecia (182).

## 2) Hongos dermatofitos:

Los dermatofitos son hongos filamentosos pluricelulares del género *Trichophyton*, *Microsporum* o *Epidermophyton* (183). Taxonómicamente

se engloban en la división Ascomycota y pertenecen a la clase Plectomycetes, orden Onygenales y familia Arthrodermataceae (184).

Algunos de estos hongos están considerados patógenos debido a que invaden tejidos queratinizados, como la piel, uñas y pelo debido a que poseen una enzima, la queratinasa que les permite degradar este tipo de tejidos y utilizarlos como fuente de nutrientes. Esta colonización causa multitud de infecciones superficiales en seres humanos y animales, denominadas dermatofitosis o tiña, la infección fúngica cutánea más común en todo el mundo (185). Las condiciones óptimas para que desarrollen una infección se dan con temperatura y humedad elevadas, así como si se produce maceración u oclusión cutánea como ocurre en los pies o los pliegues corporales. Igual que en las micosis causadas por las levaduras, las tiñas son frecuentes en individuos inmunodeprimidos (186,187). Se estima que entre el 20 y el 25% de la población mundial está infectada por dermatofitos (188). Las dermatofitosis son infecciones con tendencia a recurrir, que pueden ser agudas o crónicas, y que suelen ser difíciles de eliminar requiriendo tratamientos antifúngicos tediosos y de larga duración, especialmente en las onicomicosis (46,183).

La TFDA ofrece una modalidad de tratamiento diferente y novedosa para las infecciones fúngicas (56,189). De hecho, se ha mostrado eficaz en la inactivación *in vitro* e *in vivo* tanto de levaduras como de dermatofitos patógenos de animales y de humanos (82,83,189,190). En este sentido, destacar el Estudio 6 de la presente Tesis Doctoral donde se identifica molecularmente a *Arthroderma vanbreuseghemii* por primera vez como agente causal de dermatofitosis en un rebaño de ovejas y se trata mediante TFDA usando el FS MB y luz solar (82).

### 2.5.3. Los parásitos

Los parásitos son organismos eucariotas muy diversos que viven en o sobre un organismo huésped y que obtienen su alimento de o a expensas de él. Si el huésped es el ser humano o es un animal, les pueden causar enfermedad. Las infecciones parasitarias causan elevadas tasas de enfermedades en los trópicos y los subtropicos, pero también en las zonas de climas más templados (191). Estas enfermedades por afectar principalmente a países con pocos recursos, han sufrido en gran medida la falta de atención por parte de la comunidad en términos de salud pública, pero también generan problemas en países desarrollados, y son un reto para la salud global (192).

En general, se pueden clasificar en tres grupos principales: 1) protozoos, 2) helmintos y 3) ectoparásitos (191).

#### 1) Protozoos:

Son organismos microscópicos unicelulares que pueden ser de naturaleza libre o parasitaria. Son capaces de multiplicarse en el hospedador, lo que contribuye a su supervivencia y puede hacer que desarrollen infecciones graves a partir de un solo organismo. La transmisión de protozoos que viven en el intestino normalmente ocurre a través de la vía fecal-oral, por ejemplo, por medio de comida o agua contaminada o por contacto directo. Los protozoos que viven en la sangre o los tejidos se transmiten mediante un vector como artrópodos a través de su picadura (191).

Ejemplos son *Entamoeba* spp., *Babesia* spp., *Giardia lamblia*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Balantidium coli*, *Plasmodium* spp. y *Cryptosporidium* spp. De ellos destacar al género *Plasmodium* causante de la malaria, enfermedad que mata aproximadamente a 660.000 personas cada año, la mayoría de ellos niños pequeños en el África subsahariana (191).

## 2) Helmintos:

Son organismos multicelulares grandes, generalmente macroscópicos en su etapa adulta. Al igual que los protozoos, pueden ser de naturaleza libre o parasitaria. Hay tres grupos principales de helmintos: gusanos planos o platelmintos que incluyen los trematodos y cestodos (tenias); los gusanos de cabeza espinosa o acantocéfalos y las lombrices intestinales o nematodos. En general, se relacionan con el tracto gastrointestinal pero en algunos casos se desplazan a través de la sangre, del sistema linfático o de los tejidos subcutáneos. Como consecuencia, pueden causar enfermedad en diversos órganos del cuerpo (191).

## 3) Ectoparásitos:

Son organismos pluricelulares grandes. Aunque el término ectoparásito puede incluir ampliamente a artrópodos chupadores de sangre como los mosquitos, generalmente se usa para referirse a organismos como garrapatas, pulgas, piojos y ácaros que se adhieren o se esconden en la piel y permanecen allí durante períodos de tiempo relativamente largos (191).

Son importantes porque causan enfermedades por sí mismos, pero aún más importantes como vectores ya que transmiten muchos patógenos y son responsables de una gran parte de la morbilidad y mortalidad asociada de las enfermedades que estos ocasionan (191).

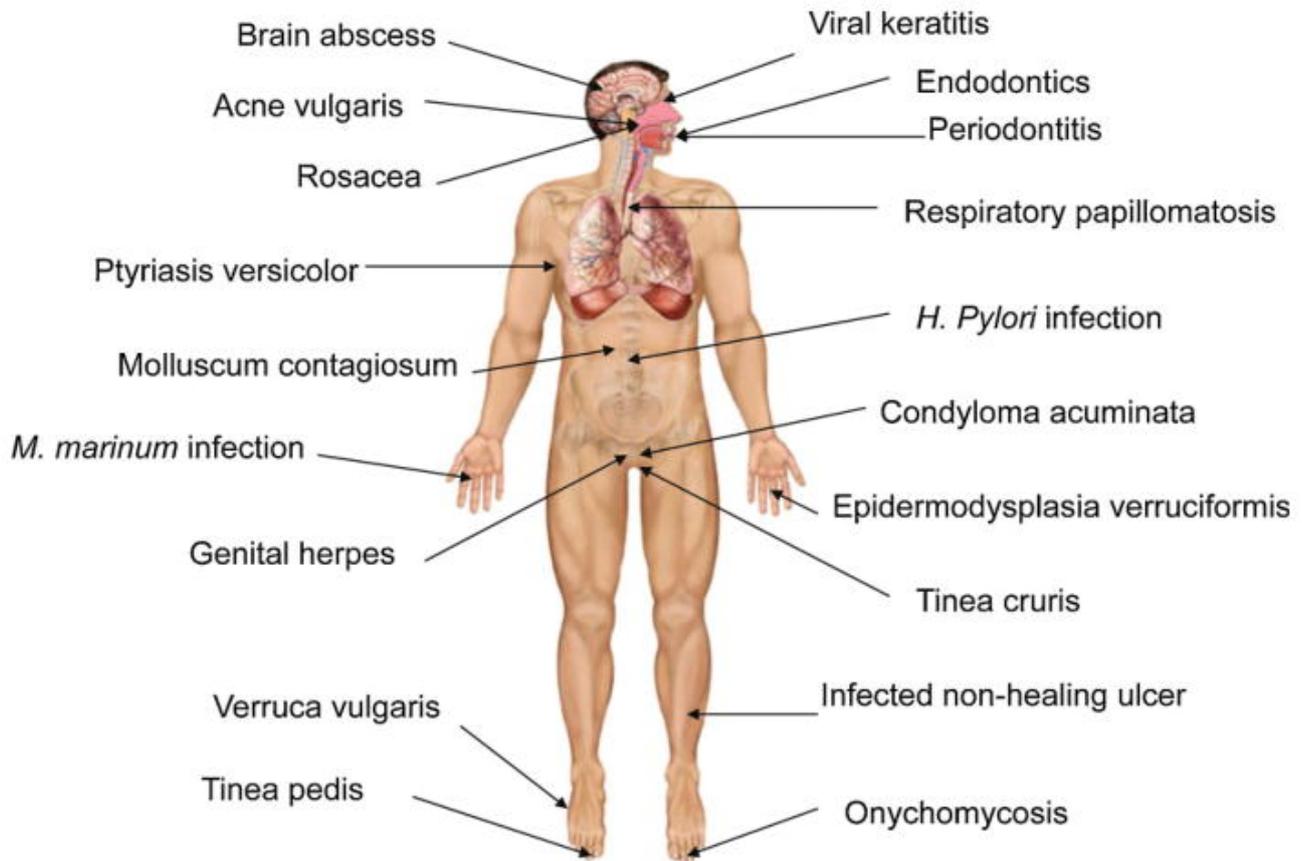
Respecto a la TFD también ha demostrado su efectividad en la lucha frente a los parásitos, especialmente contra los protozoos, como es el caso de la inactivación de *Plasmodium falciparum* (malaria) y *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas) (140) y numerosos casos clínicos que han demostrado la efectividad de la TFD con diferentes FS (193) e incluso usando luz solar para tratar la leishmaniosis (194). En cuanto a los helmintos, por ejemplo, cabe

mencionar un estudio de TFD donde los huevos de helmintos humanos en aguas residuales se inactivaron mediante una porfirina catiónica meso-sustituida (195). Frente a los ectoparitos, la TFD parece una opción prometedora en ciertos sectores como la acuicultura para luchar directamente contra *Ichtyobodo*, *Dactylogyrus*, *Trichodina*, y *Argulus* (196) mientras que en la lucha contra los ectoparásitos que actúan como vectores los estudios de TFD se han centrado principalmente en la eliminación de las larvas usando protoporfirinas y luz solar (56,197,198).

## **2.6. Aplicaciones de la terapia fotodinámica antimicrobiana**

### **2.6.1. Aplicaciones clínicas: Tratamiento de infecciones en piel y mucosas**

La TFDA que se ha probado eficaz en la inactivación de virus, bacterias, levaduras, hongos filamentosos y parásitos, ha sido aplicada para tratar clínicamente diversas infecciones de piel y mucosas (56,59,136). A modo de ejemplo citar la queratitis, la otitis, la fascitis necrotizante, abscesos, infecciones de heridas, cutáneas, quirúrgicas, fúngicas, gástricas por *Helicobacter pylori*, sinusitis, patógenos dentales, tuberculosis localizada, leishmaniasis, quemaduras, cistitis bacteriana, y herpes genital (57,136). La figura 24 ilustra algunas de estas patologías infecciosas que han sido tratadas mediante TFDA con éxito (136). En consecuencia, la TFDA se plantea como una posible alternativa de tratamiento para ellas (56,57,60,61).



**Figura 24. Infecciones de piel y mucosas tratadas con terapia fotodinámica antimicrobiana:** representación de los ejemplos de infecciones de piel y mucosas humanas que han sido tratadas clínicamente con TFDA (136).

El campo en el que más se utiliza la TFDA es en la odontología (136,199). Las aplicaciones incluyen aspectos variados de periodoncia, endodoncia e infecciones de la mucosa bucal (200). Pese a que en los últimos años ha habido un número creciente de estudios *in vitro*, como por ejemplo los Estudios 1 (83) y 2 (88) de la presente Tesis, así como otros estudios *ex vivo* en dientes e *in vivo* que muestran resultados positivos con respecto a la TFDA en odontología, aún no hay consenso sobre un protocolo estándar (200). No obstante, existen dispositivos comerciales que utilizan FS del grupo de las fenotiazinas como el MB o el TBO para desinfecciones dentarias con protocolos de aplicación definidos (Periowave<sup>®</sup>, FotoSan<sup>®</sup>) (201,202).

Otro campo en el que la TFDA está actualmente en uso es el de la micología. Existen casos clínicos de onicomycosis causadas por dermatofitos

(203) y de micosis interdigitales de los pies tratados con TFDA con ALA (204). Asimismo, hay descritos algunos casos clínicos de infecciones superficiales por hongos no dermatofitos tratadas con la TFDA con MAL (Metvix<sup>®</sup>), (205) y algunas infecciones causadas por levaduras, como las del género *Candida* tratadas con TFDA utilizando MB (190). El Estudio 6 de la presente Tesis Doctoral es otro ejemplo de infección causada por un hongo dermatofito en un rebaño de ovejas tratadas con TFDA-MB (82).

También es frecuente el uso de la TFDA en la clínica diaria frente al acné (59,92) donde hay una base acumulativa de pruebas para su uso, utilizando, por ejemplo, TFDA con ALA (206) aunque todavía se requieren estudios para disponer de un protocolo optimizado (92).

Este apartado de aplicaciones clínicas se encuentra ampliado en el artículo de revisión sobre los efectos antimicrobianos de la TFD (56) realizado por nuestro grupo que se recoge como publicación secundaria de la Tesis y que se presenta a modo de anexo (Anexo II apartado 3).

## **2.6.2. Aplicaciones no clínicas**

**-Desinfección y saneamiento de aguas:** la potabilización de aguas fecales mediante TFDA resulta un recurso importante para el ahorro de agua y la prevención de enfermedades epidémicas. En esta línea de investigación, existen diversos estudios que muestran la posible aplicación (197,198,207,208). Todos estos estudios hacen presagiar un gran futuro a la fotoinactivación de patógenos de las aguas debido a la alta versatilidad y bajo coste de la TFDA (56,59) especialmente si se usa una fuente de luz de coste nulo y accesible como es la solar (197,198).

**-Desinfección de sangre:** la transfusión de sangre entera o de ciertos componentes como plasma o trombocitos resulta fundamental en la medicina actual. Sin embargo, si contiene patógenos puede dar lugar a la transmisión de enfermedades (209). En este campo, se encuentra establecida la desinfección

mediante fotoinactivación usando el FS MB (210). Este tipo de tratamiento, bajo determinadas condiciones, no discrimina entre hongos, virus o bacterias siendo capaz de inactivarlos a todos al mismo tiempo siendo capaz de preservar la integridad de las células sanguíneas (56,59,209–211).

**-Creación de materiales biocidas:** desde hace casi 25 años, la creación de materiales bactericidas activados por la luz constituye una línea de aplicación de la TFDA (56,212). Un ejemplo actual es el desarrollo de complejos de Molibdeno utilizados como FS para el desarrollo de materiales fotobiocidas en el que ha participado nuestro grupo y que es el tema principal en torno al que se realizó el Estudio 5 de esta Tesis Doctoral (89) y un estudio posterior (133) que se presenta a modo de publicación secundaria en forma de anexo (Anexo II apartado 2). Otros ejemplos son la creación de superficies autodesinfectantes basadas en nylon (poliamida) con FS del grupo de las protoporfirinas (213). En el ámbito oftalmológico se han diseñado lentes intraoculares con derivados porfirínicos capaces de activarse con luz solar y que mantendrían en asepsia la zona en el postoperatorio (214). Mediante métodos similares, se han creado coberturas con FS para sondas endoscópicas, catéteres y otros accesorios de un solo uso utilizados directamente sobre pacientes que evitarían infecciones hospitalarias que pueden comprometer la vida de pacientes inmunosuprimidos (215,216).

## 2.7. Ventajas de la terapia fotodinámica antimicrobiana

Las ventajas de la TFDA se pueden resumir en las siguientes (56):

- **No se observa aparición de resistencias** (217,218), debido a su mecanismo de acción multidiana que genera baja especificidad en las dianas bioquímicas (59,199) y posibilidad de atacar a diferentes niveles celulares (219).

- **Su uso no contribuye al aumento de la resistencia** frente a los antimicrobianos (59).
- **Eficacia independiente del patrón de resistencias** a antimicrobianos que posea el microorganismo. Por ejemplo, se ha demostrado su eficacia *in vitro* frente a bacterias como *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) (220) y levaduras como *C. albicans* resistente a fluconazol (221).
- **Versatilidad**, tiene un amplio espectro de acción que permite a ciertos FS actuar sobre virus, hongos, bacterias, y parásitos (57,59,136).
- **Puede erradicar patógenos en biopelículas** (59). La TFDA es efectiva para disminuir la viabilidad celular de una cepa tanto en estado planctónico como formando biopelículas (140,199). Un ejemplo lo encontramos en esta misma tesis en el Estudio 4 (84).
- **Activa frente a factores de virulencia** (59), ya que sustancias como los LPS y las proteínas secretadas pueden ser altamente vulnerables a la oxidación por las ERO generadas durante la TFDA (136).
- **Selectividad**: la tasa metabólica, tanto de un microorganismo como de una célula tumoral, es mucho más elevada que la de una célula eucariota en estado no tumoral. Este hecho fomenta un grado de internalización diferencial del FS, por tanto, a tiempos de incubación más cortos, genera selectividad fototóxica (222). Además hay selectividad debida a la aplicación localizada del FS y/o de la luz. Por ello, la TFDA se considera segura para los tejidos humanos (59).
- En general, se puede considerar un **tratamiento barato** (59). Un ejemplo del escaso coste que puede suponer el tratamiento mediante TFDA lo podemos encontrar en el Estudio 6 de la presente Tesis Doctoral donde un rebaño de ovejas es tratado con MB y luz solar (82).
- **Los resultados son inmediatos** en contraposición a los antimicrobianos que incluso aunque sean efectivos contra el microorganismo diana en cuestión tardan algún tiempo en hacer efecto (59).

- 
- **La efectividad no depende del grado de cumplimiento de la dosis y pauta de administración que el paciente haga** al salir de la consulta como sí suele ocurrir con los antimicrobianos (59).
  - **Posibilidad de repetir tratamiento** (59). Los estudios a largo plazo muestran seguridad sobre el uso repetido de TFDA (223).
  - **Posibilidad de combinar la TFDA con otros procedimientos.** Por ejemplo, puede ser una terapia adjunta a la técnica convencional para el tratamiento de varias enfermedades en el contexto dental (200). Además, se puede usar a la vez que el tratamiento antibiótico con ciertos efectos sinérgicos como se demuestran en los Estudios 3 y 4 que presentamos en la presente Tesis Doctoral (84,85) y se recoge en la revisión al respecto de Wozniak y Grinholc (164).
  - Puede ser **efectiva en tejidos muertos o dañados** donde los antimicrobianos sistémicos no llegan (59).
  - Si la TFDA utiliza como fuente de luz la luz solar, contribuye a la **producción de Vitamina D** que puede jugar un papel beneficioso en el tratamiento de ciertas enfermedades infecciosas (224,225).
  - Las lesiones cutáneas **presentan buena curación y excelente resultado cosmético post-tratamiento** (223). La TFDA puede ejercer un efecto positivo en los procesos de inflamación, la cicatrización de tejidos y los efectos colaterales como el dolor post-operatorio o la hipersensibilidad dental post-tratamiento (226,227).
  - Además, varios estudios observan **mejoras en aspectos del fotoenvejecimiento** (223).

## 2.8. Limitaciones actuales de la terapia fotodinámica antimicrobiana

Pese al potencial enorme como alternativa a los antimicrobianos de la TFDA este tipo de terapia tiene considerables limitaciones que se pueden englobar en los cinco puntos siguientes (54,56,136):

- **No utilidad en infecciones diseminadas** (54,136): Se debe a la dificultad al aplicar la fuente de luz en zonas intersticiales dada la limitación en la penetración de la luz y a que la administración de luz es casi por definición un proceso localizado, por ello sólo resulta útil en infecciones localizadas. Para el uso generalizado de la TFDA, las principales barreras son la complejidad y la disponibilidad de los sistemas de administración de luz. Entre ellos, destaca la falta de tecnología de entrega de luz avanzada (81). Conjuntamente hay que tener en cuenta el requerimiento de oxígeno y el escaso radio de acción de las ERO (54,136).
- **Fototoxicidad y dolor** (54,136): La TFDA es una modalidad de tratamiento bien tolerada por los pacientes. Sin embargo, el manejo del dolor o malestar relacionado con el tratamiento es un desafío en una minoría de pacientes (223). De hecho, el dolor que puede ocasionar durante la iluminación se considera el principal efecto adverso (94). Se debe a la producción de fototoxicidad en algunos tejidos o células del huésped principalmente por la falta de especificidad de FS (54,136). Por ello, la selectividad efectiva del FS para los microorganismos en lugar de las células del tejido del huésped en el área de la infección es una preocupación para evitar un grado inaceptable de daño de la TFDA (56).
- El tratamiento dura el tiempo que dura la iluminación. Así, en el caso de que los gérmenes no hayan muerto, el tratamiento frente a la infección **puede fracasar** (54,136).

- Como regla general **no existen protocolos clínicos estandarizados** para la aplicación de la TFDA frente a las enfermedades infecciosas, lo cual limita mucho su empleo en comparación a todo su posible potencial (54,136). Actualmente, son muchos los FS que han demostrado ser eficaces *in vitro* e *in vivo* en modelos animales para el tratamiento de distintos agentes infecciosos sin embargo, pocos han sido probados en humanos y la cantidad de ensayos clínicos es muy escasa (59,62,64,228). Incluso existen varios FS optimizados que tienen cientos o miles de veces la potencia de los que se usan actualmente, pero no han sido sometidos a estudios toxicológicos y de seguridad necesarios para su aprobación en uso humano (136).
- **Tintura:** los FS generalmente son compuestos de color intenso, por lo que se debe considerar la posibilidad de que la zona tratada quede con un color desagradable después del uso de la TFDA. En este caso, puede haber pacientes reticentes al uso de la TFD para combatir la infección por este asunto (136).

## 2.9. Perspectivas de futuro de la terapia fotodinámica antimicrobiana

Pese a que el uso de la TFDA para tratar infecciones en piel y mucosas se conoce desde hace tiempo, podemos considerar que está en sus inicios porque puede haber numerosas aplicaciones futuras. En la actualidad, la resistencia a múltiples antimicrobianos es un fenómeno alarmante y de rápido crecimiento, y se requiere con urgencia métodos alternativos de lucha contra los agentes patógenos. A este hecho, se suma que para ciertas infecciones localizadas, los antimicrobianos administrados por vía oral o intravenosa no son efectivos, ya sea porque los patógenos están infectando un tejido que no está bien perfundido, o porque se encuentren formando biopelículas, estado en el que se reduce

drásticamente la susceptibilidad a los antimicrobianos. Además, el aumento del número de pacientes inmunosuprimidos (con trasplante de órganos, cáncer, etc.) ha llevado a una mayor incidencia de infecciones difíciles de tratar con los métodos clásicos. En consecuencia, podemos prever que la TFDA se convertirá en una opción de tratamiento para combatir infecciones localizadas de piel y mucosas que de otra manera requerirían tratamientos complejos (140).

En cuanto a la metodología necesaria para tratar más enfermedades con TFDA, cabe esperar que se desarrolle en el transcurso del tiempo (136). Se han publicado numerosos estudios, la mayor cantidad *in vitro* demostrando la capacidad de inactivar números agentes infecciosos. No obstante, se requieren más estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* en animales, pero especialmente se requiere la realización de ensayos clínicos para aumentar el conocimiento sobre la aplicación de la TFDA para infecciones humanas reales (54,136,161). En cuanto a los modelos animales, el modelo murino es el más utilizado (228,229), aunque modelos con invertebrados como *Galleria mellonella* también han sido probados con éxito para realizar experimentos de TFDA y se plantean como opciones de modelo animal (230,231). Es necesario investigar sobre las estrategias que mejoren la tolerabilidad y siguen existiendo muchos interrogantes en cuanto al uso de nuevas técnicas de iluminación, FS específicos o la modificación de los esquemas terapéuticos (reducción del tiempo de incubación, iluminación fraccionada...) (94).

Respecto a la luz, el desarrollo de dispositivos de administración apropiados con los parámetros dosimétricos definidos es clave para aumentar su utilidad (infecciones más profundas y diseminadas) y para la implantación en la práctica clínica (232). El suministro preciso de la luz al tejido exacto se puede lograr mediante la combinación de fuentes de emisión adecuadas y sistemas óptimos de administración como, por ejemplo, el uso de fibras ópticas de cuarzo con puntas cilíndricas difusoras, sistemas de haces de fibra óptica, LED implantables o mediante iluminación directa de un área expuesta (81,140).

Respecto a los FS, el principal reto es aumentar su selectividad. En la práctica clínica de la TFDA, los FS se aplican mediante inyección intersticial, rociando con espray aerosol, por instilación (aplicación por goteo) y, en su mayoría, mediante pomadas (59,136). La aplicación tópica resulta adecuada para problemas superficiales, como son las infecciones localizadas de piel o mucosas, y limita su zona de actuación al área de aplicación pero no resuelve el problema de la selectividad del FS. Este reto se puede afrontar conjugando los FS con diferentes ligandos de receptores celulares específicos (71,216,233), o empleando bacteriófagos (234). Otra posibilidad es uniéndolos con ciertas moléculas que tengan atracción por los microorganismos como con péptidos policatiónicos (146,235) o polímeros catiónicos como, por ejemplo, en nuestros estudios con complejos de Mo, uno de los cuales se recoge como publicación del cuerpo de esta Tesis Doctoral (Estudio 5) (89) y el otro como anexo (Anexo II apartado 2) (133). Además, la nanotecnología ha hecho una contribución significativa a la TFD, dando lugar a la entrega del FS mediante nanopartículas (146,236), el uso de nanopartículas como vehículo para facilitar la aplicación del FS (237,238) y el uso de nanopartículas de conversión ascendente para aumentar la penetración de luz en el tejido (71,239). Asimismo, se pueden unir los FS con ciertos compuestos que aumenten su capacidad de excitación (240).

En general, las bases para una metodología exitosa y bien definida de aplicación de la TFDA están sentadas tanto en lo referente a la luz como a los FS. Las direcciones futuras incluyen la internalización fotoquímica, proteínas fotosensibilizadoras genéticamente codificadas, el teranóstico, la TFDA de absorción de dos fotones, la terapia sonodinámica utilizando ultrasonidos (71) y la adición de diferentes compuestos que pueden potenciar el efecto de TFDA como el quitosano (241,242), el EDTA (243), la urea (244) o el yoduro de potasio (245). Otras opciones para potenciar el efecto fotodinámico sobre los microorganismos es el empleo combinado de la TFDA con la electroporación (rompe la pared celular) o con disruptores de biopelícula como la N-acetilcisteína (146). Otra posibilidad es el tratamiento combinando de TFDA con

antimicrobianos comunes para lograr un efecto terapéutico aditivo o sinérgico como se explora en los Estudios 3 y 4 que se incluyen en la presente Tesis Doctoral (84,85). Este enfoque original abre el camino a nuevas aplicaciones y podría ayudar a implementar el uso de TFDA, reducir la cantidad de antibióticos utilizados habitualmente y con ello reducir el problema de MDR (164,246). Además, podría solventar el problema de la posible multiplicación de los gérmenes que hayan sobrevivido al periodo de irradiación, haciéndoles frente con los antibióticos y minimizando así la posibilidad de fracaso del tratamiento frente a la infección (136,164).

Sin embargo, a menos que se desarrolle TFDA que pueda estimular el sistema inmune del anfitrión, el resto de enfermedades infecciosas no relacionadas con la piel y las mucosas seguirán necesitando otras terapias. A este respecto, está bien establecido que la TFD anticancerígena puede inducir la respuesta inmune del huésped tanto con componentes del sistema inmune innato como del adaptativo. En principio, el mismo proceso debería operar en TFDA y constituye una vía abierta de investigación en el área de la infección (136). En este sentido se han ido sucediendo algunos trabajos que apoyan la hipótesis de que la TFDA puede estimular la respuesta inmune contra la infección y, por tanto, apoyan la hipótesis de que sería útil para cualquier tipo de infección (231,247,248).

## *JUSTIFICACIÓN*

---

La lucha contra las enfermedades infecciosas es uno de los principales retos de la medicina actual debido al aumento y la tendencia creciente de la resistencia a los antimicrobianos por parte de los microorganismos (18,19). De hecho, actualmente mueren unas 700.000 personas al año en el mundo a causa de las resistencias (1) y, si no cambia la situación, es probable que se llegue a 10 millones en el año 2050 pudiendo convertirse en la principal causa de muerte (1,21).

En este contexto, la TFDA puede ser una opción de tratamiento alternativa a los antimicrobianos para combatir los agentes infecciosos de piel y mucosas (56,57,59–61,249). A su favor tiene que se ha demostrado eficaz frente a los microorganismos que las causan independientemente de su patrón de resistencias antimicrobianas y que su uso evitaría el uso de antimicrobianos que favorecen las resistencias (56,220,221). Pero, a pesar de los importantes avances en el campo de la TFDA en los últimos tiempos, sigue siendo un procedimiento no habitual en la práctica clínica por desconocimiento del fundamento de la terapia y sobre sus posibles indicaciones (56). En consecuencia, se han desarrollado los seis Estudios que se recogen en la presente Tesis elaborada mediante la modalidad de compendio de publicaciones con la intención de ampliar el conocimiento sobre la TFDA para contribuir a su uso.

El Estudio 1 (83) partió de la odontología, uno de los campos donde más se ha investigado en TFDA y a su vez donde más se utiliza en la clínica. Sin embargo, aún no hay consenso sobre un protocolo estándar (200). Se planteó este Estudio 1 con el fin de ahondar en el conocimiento sobre la TFDA frente a microorganismos cariogénicos. Por ello se realizó un diseño experimental *in vitro* con múltiples variables en cuanto a las células dianas (microorganismos procariotas, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus mutans*, y eucariotas, *C.*

*albicans*) y en cuanto al uso de diferentes FS clásicos ampliamente utilizados en TFDA (MB, RB y CUR).

Tras los resultados obtenidos con el Estudio 1 (83), se planteó el Estudio 2 (88) con el propósito de despejar qué pasaba cuando las suspensiones bacterianas no eran puras (de *S. sanguinis* o de *S. mutans*) sino que estaban formadas por una mezcla de especies (*S. sanguinis* y *S. mutans*), una situación más próxima a la realidad. Además, en este caso se utilizó como fuente de luz lámparas LED de emisión específica coincidente con el espectro de absorción de los FS, para comparar los resultados con los obtenidos con la lámpara de amplio espectro usada en el Estudio 1. No se realizó preincubación (puesto que no aportaba ventajas) y sólo se emplearon los FS RB y MB (que resultaron más efectivos) de acuerdo a las conclusiones del Estudio 1 (83).

Para el Estudio 3 (84) elegimos como célula diana *S. aureus* por ser una de las especies del grupo ESKAPE, presentándose cada vez más resistente a los antibióticos, por estar implicada en infecciones de piel y mucosas, y por haberse convertido en el patógeno aislado más comúnmente involucrado en enfermedades de relevancia clínica (17,250,251). El Estudio se planteó con la intención de avanzar en la TFDA como estrategia para combatirlo. Nos basamos en nuestra experiencia en los Estudios 1 (83) y 2 (88) ya que usamos igualmente una bacteria Gram positiva, los mismos FS RB y MB y como fuente de luz tanto luces LED como blanca de amplio espectro. Además, como la inactivación de *S. aureus* se realiza asiduamente mediante antibióticos y teniendo en cuenta el problema del aumento de las resistencias a los antimicrobianos y la necesidad de reducir el uso de antimicrobianos (8,14,16), decidimos hacer también experimentos de combinación de tratamiento fotodinámico con antibiótico. Para ello elegimos los antibióticos linezolid y mupirocina (un antibiótico sistémico y uno tópico respectivamente) que son utilizados habitualmente frente a esta especie (252,253).

En el Estudio 4 (85), siguiendo la línea de trabajo del Estudio 3 (84), se planteó un nuevo diseño experimental con *S. aureus*, en este caso combinando TFDA con RB y gentamicina, porque la combinación de antibióticos con RB había sido más efectiva que con MB. Se eligió el antibiótico gentamicina, porque es usado para tratar infecciones de piel y mucosas con cierta resistencia a otros antibióticos y que sirve tanto para Gram negativas como para *Staphylococcus* spp (254). Además, se decidió realizar el experimento con la cepa bacteriana en estado de suspensión acuosa y en biofilm para que la investigación fuera más completa. Con este fin se colaboró con el Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla, España, que cuenta con experiencia de trabajo en investigación con biofilm.

El Estudio 5 (89) surge por la inquietud de investigar la utilidad de nuevos FS en TFDA. Se eligió como célula diana a *S. aureus* por la importancia de este microorganismo (17) y nuestra experiencia previa con ella en los Estudios 3 (84) y 4 (85). Así, se investigó la capacidad fotoinactivante de un nuevo polímero con Molibdeno desarrollado entre la Universidad Estatal de Novosibirsk y el Instituto Nikolaev de Química Inorgánica, que forma parte de la Academia Rusa de Ciencias, ambos en Novosibirsk, Rusia. Dicho compuesto es proporcionado por el Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad Jaime I (UJI) de Castellón de la Plana, España, donde se caracterizó su capacidad para llevar a cabo reacciones fotocatalíticas, su fotoestabilidad y su reciclabilidad.

El Estudio 6 (82), se originó por la necesidad de iniciar la traslación de nuestra investigación a la experimentación *in vivo* en animales. Para ello colaboramos con el Departamento de Patología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España, tras surgir un caso clínico de dermatofitosis

en un rebaño de ovejas. En este tipo de patología ovina no se suele determinar el agente causal concreto y el tratamiento con antifúngicos no siempre se aplica por motivos económicos; además, está el problema de aplicar este tipo de tratamientos en animales de abasto dentro de la Comunidad Económica Europea. Por la experiencia y los recursos del Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza se pudo llegar a determinar el agente causal y el reto de un tratamiento alternativo lo concebimos como una oportunidad para testar *in vivo* la TFDA con MB que en nuestros experimentos *in vitro* de los Estudios previos (Estudios 1 (83), 2 (88) y 3 (84)) nos había resultado eficaz aunque en bacterias pero hay estudios que avalan el uso de la TFDA-MB frente a dermatofitos incluso llevados a cabo por miembros de nuestro grupo (255). Destacar que como fuente de luz se eligió la luz solar a la que están expuestas habitualmente las ovejas basándonos también en nuestra experiencia con lámparas de luz blanca de amplio espectro de emisión en cierta medida homólogas a la luz solar.

*COMPENDIO DE PUBLICACIONES:  
ESTUDIOS PRINCIPALES*

---

A continuación, se especifica la justificación, la hipótesis, los objetivos, el material, los métodos y las conclusiones de los trabajos principales que constituyen la presente Tesis Doctoral elaborada mediante la modalidad de compendio de publicaciones. Los resultados y la discusión quedan expuestos con la inclusión de los artículos científicos.

Los trabajos se referencian en los siguientes apartados de acuerdo a la denominación abajo expuesta para simplificar su exposición.

El listado de publicaciones que constituyen el cuerpo de la Tesis es:

### **Estudio 1:**

Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta Alfonso J, **Pérez-Laguna V**, García Luque I, Revillo MJ, Rezusta A. *In vitro* effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. BMC Microbiology. 2015 Sep 26; 15(1):187.

### **Estudio 2:**

**Pérez-Laguna V**, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Camacho-López S, García-Luque I, Revillo MJ, Nonell S, Gilaberte Y, Rezusta A. Comparative effect of photodynamic therapy on separated or mixed cultures of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017 Sep; 19:98-102.

### **Estudio 3:**

**Pérez-Laguna V**, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, García-Luque I, Ballesta S, Nonell S, Paz-Cristobal MP, Gilaberte Y, Rezusta A. Bactericidal effect of photodynamic therapy, alone or in combination with mupirocin or linezolid, on *Staphylococcus aureus*. Front Microbiol. 2017 May 31; 8:1002.

#### Estudio 4:

**Pérez-Laguna V**, García-Luque I, Ballesta S, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Soria-Lozano P, Rezusta A, Gilaberte Y. Antimicrobial photodynamic activity of Rose Bengal, alone or in combination with Gentamicin, against planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus*. Photodiag Photodyn Ther. 2018 Mar; 21:211-216.

#### Estudio 5:

Beltrán A, Mikhailov M, Sokolov MN, **Pérez-Laguna V**, Rezusta A, Reville MJ, Galindo F. A photobleaching resistant polymer supported hexanuclear molybdenum iodide cluster for photocatalytic oxygenations and photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. J. Mater. Chem. B, 2016, 4, 5975

#### Estudio 6:

**Pérez-Laguna V**, Rezusta A, Ramos JJ, Ferrer LM, Gene J, Reville MJ, Gilaberte Y. Daylight photodynamic therapy using methylene blue to treat sheep with dermatophytosis caused by *Arthroderma vanbreuseghemii*. Small Ruminant Research, 2017 May 1; 150:97-101

## *HIPÓTESIS*

---

La terapia fotodinámica antimicrobiana puede servir para inactivar diferentes tipos de microorganismos causantes de infecciones en piel y mucosas y, por tanto, constituir una opción de tratamiento viable frente al problema de la resistencia a los antimicrobianos.

## *OBJETIVOS*

---

# 1. Objetivo general

Evaluar la eficacia de diversos fotosensibilizantes con diferentes condiciones de iluminación frente a agentes causantes de infecciones en piel y/o mucosas.

## 2. Objetivos de cada publicación

### Estudio 1:

#### Objetivo principal:

Fotoinactivar *in vitro* los microorganismos cariogénicos *S. mutans*, *S. sanguinis* y *C. albicans* con azul de metileno (MB), rosa de bengala (RB) y curcumina (CUR).

#### Objetivos secundarios:

- 1) Comparar el efecto fotodinámico *in vitro* del MB, el RB y la CUR frente a *S. mutans*, *S. sanguinis* y *C. albicans*.
- 2) Estudiar *in vitro* la eficacia de la luz blanca en el proceso fotodinámico.
- 3) Valorar el efecto del tiempo de incubación con el fotosensibilizante previo a la irradiación en la eficacia del tratamiento.

## Estudio 2:

### Objetivo principal:

Comparar el efecto fotodinámico producido frente a suspensiones puras de *S. mutans* y *S. sanguis* con el efecto fotodinámico frente a una suspensión formada por ambas especies.

### Objetivos secundarios:

1) Comparar *in vitro* el efecto fotodinámico de los fotosensibilizantes MB y RB frente a suspensiones de bacterias puras y mixtas.

2) Estudiar el grado de fotoinactivación al utilizar una lámpara de diodo emisor de luz (LED) que emite a la máxima longitud de onda de absorción para cada FS.

## Estudio 3:

### Objetivo principal:

Estudiar el efecto *in vitro* de la TFDA por sí sola y en combinación con los antibióticos mupirocina y linezolid frente a suspensiones de *S. aureus*.

### Objetivos secundarios:

- 1) Comparar el efecto bactericida de la TFDA frente a *S. aureus*:
- a) por sí sola utilizando el fotosensibilizante RB vs. MB.
  - b) utilizando diferentes fluencias (18 vs. 37 J/cm<sup>2</sup>)
  - c) utilizando RB en combinación con dosis subterapéuticas de mupirocina vs. con linezolid
  - d) utilizando MB en combinación con dosis subterapéuticas de mupirocina vs. con linezolid
  - e) utilizando como fuente de luz lámparas LED de  $\lambda$  de emisión coincidente con los picos de absorción de cada FS vs. lámpara de halogenuro metálico de luz blanca, con emisión de amplio espectro, válida para excitar a todos ellos.

## **Estudio 4:**

### **Objetivo principal:**

Estudiar el efecto bactericida *in vitro* de la TFDA en combinación con el antibiótico gentamicina frente a *S. aureus*.

### **Objetivos secundarios:**

1) Comparar fotoinactivación producida en suspensión acuosa *vs.* formando biofilm:

a) de la TFDA por si sola.

b) de la TFDA en combinación con gentamicina.

2) Comparar el efecto bactericida en *S. aureus* de la TFD con RB en combinación con gentamicina *vs.* el efecto de la combinación con mupirocina y *vs.* con linezolid del Estudio 3.

## **Estudio 5:**

### **Objetivo principal:**

Probar un nuevo fotosensibilizante para TFDA.

### **Objetivos secundarios:**

1) Diseño de un nuevo fotosensibilizante, hexanúcleo de molibdeno unido a un polímero reticular.

2) Caracterización del compuesto:

a) determinar su capacidad para llevar a cabo reacciones fotocatalíticas, su fotoestabilidad y su reciclabilidad.

3) Valorar su acción en TFDA frente a *S. aureus*.

## **Estudio 6:**

### **Objetivo principal:**

Testar *in vivo* en animales la eficacia de la TFDA con MB al 1% empleando luz solar como fuente de luz para tratar la tiña de un rebaño de ovejas.

### **Objetivos secundarios:**

- 1) Identificar el agente causal de tiña en un rebaño de ovejas.
- 2) Comparar la evolución de las lesiones:
  - a) tratadas con aplicación de MB una *vs.* dos veces a la semana.
  - b) lesiones limpiadas antes del tratamiento *vs.* no limpiadas previamente.
  - c) lesiones tratadas (TFDA con MB con luz de día) *vs.* no tratadas (solo tratadas con luz de día).

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

---

# 1. Material

## 1.1. Reactivos y medios

### 1.1.1. Reactivos generales

Agua destilada estéril no tamponada (pH ~ 5,5) de Fresenius Kabi® (España). Etanol 70 % de Alcohocel (España). Dimetil sulfóxido (DMSO) de Panreac® (Barcelona, España) (Estudios 1,2, 3, 4 y 5).

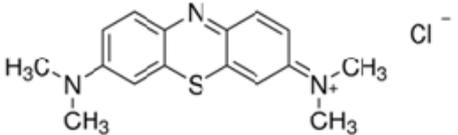
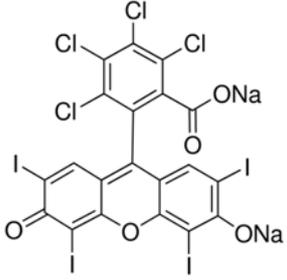
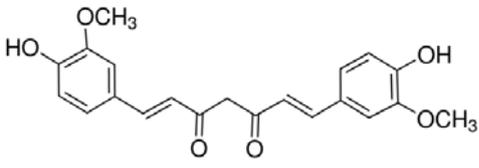
### 1.1.2. Fotosensibilizantes

Azul de metileno (MB) de Sigma-Aldrich® (Madrid, España y Steinheim, Alemania) (Tabla 4). Tiene un longitud de onda ( $\lambda$ ) de máxima absorción a 665 nm (Estudios 1, 2, 3 y 6).

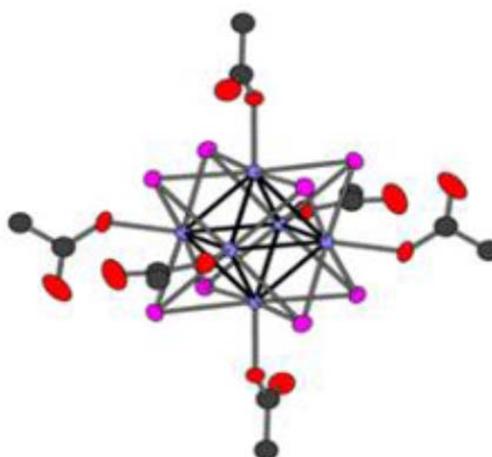
Rosa Bengala (RB) de Sigma-Aldrich-Fluka® (Madrid, España) (Tabla 4). Tiene una  $\lambda$  de máxima absorción a 557 nm (Estudios 1, 2, 3 y 4).

Curcumina (CUR) de Sigma-Aldrich® (Madrid, España) (Tabla 4).  $\lambda$  de máxima absorción a 430 nm (Estudio 1).

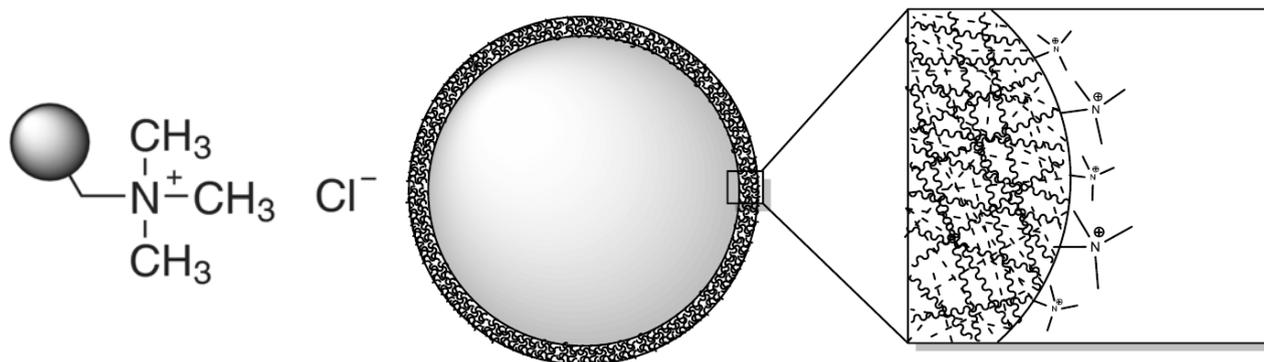
**Tabla 4. Moléculas de azul de metileno, rosa de bengala y curcumina:** Representación de la estructura con sus respectivas formula empíricas. Adaptado de Sigma-Aldrich.

Azul de Metileno	Rosa de Bengala	Curcumina
		
$C_{16}H_{18}ClN_3S$ .	$C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5$	$[HOC_6H_3(OCH_3)CH=CHCO]_2CH_2$

Molibdeno hexanuclear (figura 25) vinculado al polímero reticular Amberlite<sup>®</sup> IRA-900 de Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Madrid, España) en forma de cloruro con tamaño de partícula de 650-820  $\mu\text{m}$  (figura 26) (Pol-Mo6). Fue proporcionado por el Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universitat Jaume I de Castellón de la Plana (España) tras el trabajo previo de síntesis del cluster por parte de investigadores del Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences de Novosibirsk (Rusia). La  $\lambda$  de máxima absorción es a 400 nm (Estudio 5).



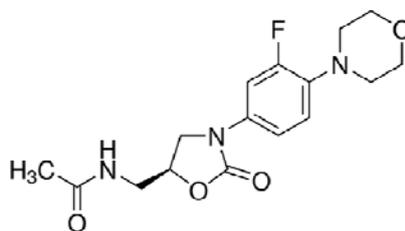
**Figura 25. Estructura química del hexanúcleo de Molibdeno:** representación de la estructura química de fórmula  $[Mo_6I_8Ac_6]^{2-}$  donde Ac es acetato. En color lila el núcleo de seis átomos de Mo; en rosa I.



**Figura 26. Polímero reticular:** representación esquemática del polímero reticular. Izquierda: detalle del radical según Sigma-Aldrich; derecha: detalle de la estructura de la matriz [119].

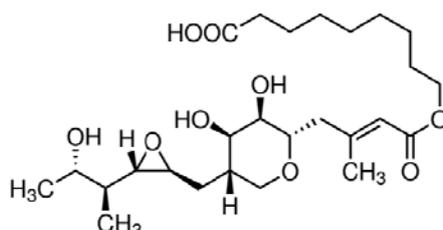
### 1.1.3. Antibióticos

Linezolid (LN) de Sigma-Aldrich® (Madrid, España) (figura 27). Utilizado a concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml (Estudio 3).



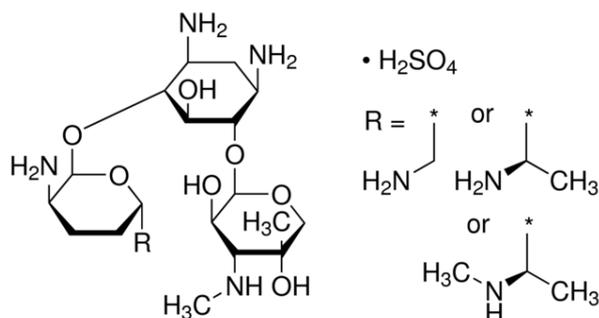
**Figura 27. Estructura química del linezolid:** representación de la molécula de LN de fórmula empírica C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Sigma-Aldrich.

Mupirocina (MU) de Sigma-Aldrich® (Madrid, España) (figura 28). Usada a concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml (Estudio 3).



**Figura 28. Estructura química de la mupirocina:** representación de la molécula de MU de fórmula empírica C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>9</sub>. Sigma-Aldrich.

Gentamicina (GN) de Sigma-Aldrich® (Madrid, España) (figura 29). Usada a concentraciones de 1 µg/ml, 10 µg/ml y 64 µg/ml (Estudio 4).



**Figura 29. Estructura química de la gentamicina:** representación de la molécula de GN de fórmula empírica general C<sub>21</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>. Sigma-Aldrich.

### 1.1.4. Medios de cultivo

Medio agar sangre Columbia (Oxoid®; Madrid, España) (AS) (Estudios 1, 2, 3, 4 y 5).

Medio Sabouraud dextrosa agar pH 5,6 ± 0,2 CM0041 de Oxoid® Thermo Scientific (Hampshire, Inglaterra) suplementado con Chloranphenicol® a 50 mg/L Sigma® (St. Louis, USA) (SB) (Estudio 1 y 6).

Medio de prueba de Dermatofitos (DTM, por las siglas en inglés de Dermatophyte test médium) (Oxoid®, stock básico, Reino Unido) (Estudio 6).

Medio agar de patata y dextrosa (Oxoid®, Stock básico, Reino Unido) con 50 mg/L de cloranfenicol añadido (Estudio 6).

## 1.2. Microorganismos y población de estudio

### 1.2.1. Especies de colección

Adquiridas de las colecciones American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA):

- Bacterias: *S. mutans* ATCC 35668 (Estudios 1 y 2), *S. sanguinis* ATCC 10556 (Estudios 1 y 2) y *S. aureus* ATCC 29213 (Estudio 3, 4 y 5).
- Levadura: *C. albicans* ATCC 10231 (Estudio 1).

## 1.2.2. Población de estudio

La población de estudio (Estudio 6) la conforma un rebaño de ovejas infectado de Zaragoza, España, del que se tomaron muestras para la identificación del agente causal a 10 ovejas con lesiones. La especie aislada en la clínica fue el dermatofito *Arthroderma vanbreuseghemii* (Estudio 6).

## 1.3. Instrumentación

### 1.3.1. Fuentes de luz

#### 1.3.1.1. Lámpara de haluro metálico (Estudios 1 y 3)

Lámpara fabricada por el Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Zaragoza, España (figura 30).

Es una lámpara de amplio espectro de  $\lambda$  de emisión, 420–700 nm. La fluencia usada en los experimentos de inactivación microbiana fue de 18 y 37 J/cm<sup>2</sup>, el tiempo de irradiación para alcanzar esa fluencia es 3 minutos y 25 segundos y 6 min y 51 s respectivamente a una distancia entre la fuente de luz y la diana, la placa con la suspensión microbiana, de 10 cm a la que el diámetro del haz de luz es de 21 cm y la irradiancia de 90 mW/cm<sup>2</sup>. El calor que genera a los 10 cm de distancia no llega a aumentar la temperatura de una suspensión que se irradia por encima de los 40°C en los tiempos utilizados.

### **1.3.1.2. Lámpara de diodos emisores de luz** (Estudios 2, 3, 4 y 5)

Showtec LED Par 64 Short 18 x RGB 3-in-1 LED de Highlite International B.V. España (figura 31).

Es una lámpara que emite en RVA (de las siglas rojo, verde y azul) por lo que puede emitir en el espectro del color rojo, verde o azul y en sus diferentes combinaciones (rojo+verde; rojo+azul; verde+ azul) incluyendo el blanco por suma de los tres colores. El pico de  $\lambda$  de emisión es 625 nm en el rojo, 515 nm en el verde y 460 nm en el azul. La irradiancia a una distancia de 17 cm es de 7 mW/cm<sup>2</sup> para el rojo, 5.8 mW/cm<sup>2</sup> para el verde y 13 mW/cm<sup>2</sup> para el azul y el diámetro del haz es aproximadamente 25 cm.

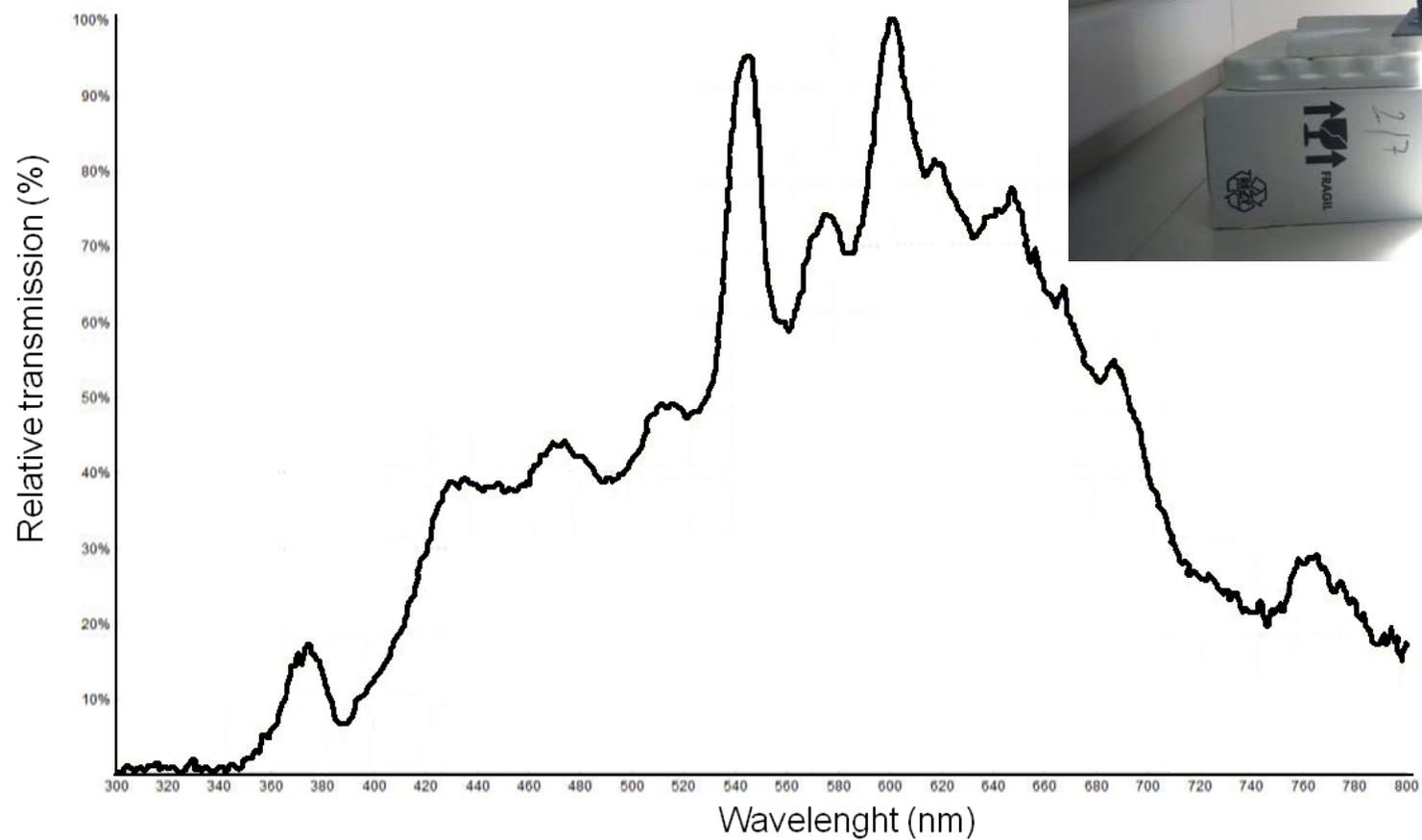
La fluencia usada fue de 18 y 37 J/cm<sup>2</sup> en los experimentos realizados con fluencia constante y concentraciones variables de FS (Estudios 2, 3 y 4) y en el rango de 10 a 120 J/cm<sup>2</sup> tomando alícuotas para contaje de colonias cada 10 J/cm<sup>2</sup> en los experimentos de fluencia variable y concentración fija de FS (Estudio 5).

El tiempo de irradiación para alcanzar 18 J/cm<sup>2</sup> emitiendo en rojo es de 42,86 min, emitiendo en verde 51,72 min y en azul 23,08 min (Estudio 2, 3 y 4), para alcanzar 37 J/cm<sup>2</sup> es de 88,10 min, 106,32 min y 47,44 min (Estudios 3 y 4) y para cada 10 J/cm<sup>2</sup> es 23,81 min, 28,73 min y 12,82 min respectivamente (Estudio 5).

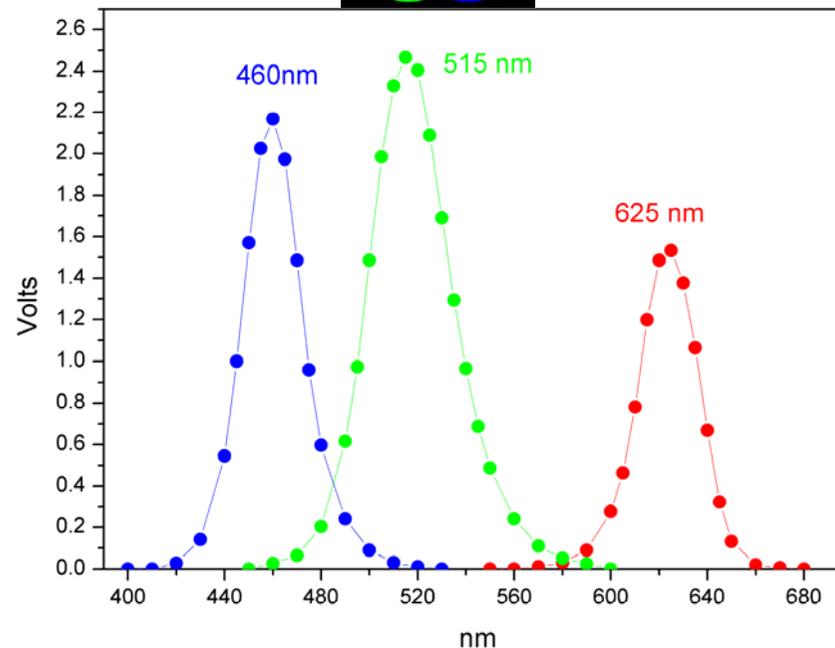
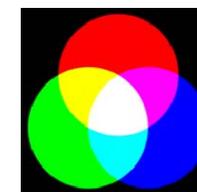
A la distancia de irradiación utilizada, 17 cm, no genera calor de forma medible.

### **1.3.1.3. Sol** (Estudio 6)

Luz solar,  $\lambda$  emisión en el rango entre 100-10<sup>6</sup> nm aproximadamente.



**Figura 30. Lámpara de halogenuro metálico y su espectro de emisión:** lámpara de halogenuro metálico de amplio espectro empleada para la irradiación de muestras en los experimentos de fotoinactivación antimicrobiana y gráfico de su espectro de emisión.



**Figura 31. Lámpara LED y su espectro de emisión:** lámpara de diodos encendida en color azul, verde y rojo (esquina superior izquierda) y blanca por suma de los tres (inferior izquierda) empleada para la irradiación de muestras en los experimentos de fotoinactivación antimicrobiana. Gráfico de su espectro de emisión RVA con esquema del modelo de formación de colores (superior).

### 1.3.2. Materiales generales

Agitador multifunción de Grant Bio modelo PS-M3D.

Autoclave a 121°C

Asa de siembra.

Balanza de precisión calibrada y forma parte de la acreditación ISO 15189.

Cámara frigorífica del laboratorio o frigorífico a 4°C. Controlada mediante sonda que forma parte de la acreditación ISO 15189

Campana de flujo laminar. Adaptado a la acreditación ISO 15189

Congelador de -80°C con temperatura controlada mediante sonda que forma parte de la acreditación ISO 15189

Congelador de -20°C que forma parte de la acreditación ISO 15189.

Contador automático de colonias Flash and Go<sup>®</sup> (IUL, Instruments S.A, España) conectado a un ordenador con el Flash & Go Software de recuento básico y recuento avanzado de colonias.

Esterilizador de asa.

Espectrofotómetro (colorímetro) DINKO<sup>®</sup> D-100 código 1.9301.00 ( $\lambda$  420-680 nm) con porta-cubetas redondo de 16 mm. El dispositivo cuenta con medición de la turbidez en escala McFarland (McF). Controlado mediante recuento en cada experimento y forma parte de la acreditación ISO 15189.

Estufa de temperatura programable y con sensor que registra la temperatura. Utilizada a temperatura constante de 35°C y controlada mediante sonda que forma parte de la acreditación ISO 15189

Micropipetas desde 0,1  $\mu$ l a 1 ml con calibración que forma parte de la acreditación ISO 15189.

Papel de aluminio.

Parafilm<sup>®</sup> M. Roll, 250 Length x 2 Width de Amazon y Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, España.

Placas de contacto RODAC (por las siglas del inglés Replicate Organism Detection And Counting).

Placas de microtiter de 96 pocillos.

Tubos cónicos para centrífuga Falcon<sup>®</sup> de 15 ml de Fisher Scientific (parte de Thermo Fisher Scientific), España.

Tubos aptos para micocentrífuga Eppendorf<sup>®</sup> Safe-Lock de 1.5 ml color natural y opacos de Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Madrid, España.

Vortex Biosan Bio Vortex V-1.

## 2. Métodos

### 2.1. Cultivos y condiciones de crecimiento

#### 2.1.1. Cultivo de bacterias y de levaduras (Estudios 1, 2, 3, 4 y 5)

**-Preparación de las suspensiones microbianas que se sometieron a TFDA o se usaron como controles:**

A partir de un vial que contenía suspensión congelada de las cepas de referencia conservado en el congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se sembró en placa de cultivo por agotamiento con el fin de obtener colonias aisladas (figura 32).



**Figura 32. Placa de cultivo sembrada por agotamiento.** Se ven colonias de bacterias aisladas.

Las especies son cultivadas en AS (bacterias) y SB (levaduras) durante 24 h (a excepción de *S. mutans* que se dejó durante 48-72 h) a 35°C en estufa y en condiciones aerobias. Las placas resultantes se utilizan como “placas madres” puesto que de ellas se hacen resiembras 24 h (48-72 h en el caso de *S. mutans*) previas a la preparación del inóculo microbiano para la realización de los experimentos de TFDA. El procedimiento que se siguió es tomar colonias aisladas con asa de siembra estéril, sembrar siguiendo el método de agotamiento en placa de AS para las bacterias o SB para *C. albicans* y colocarlas en estufa a 35°C en condiciones aerobias durante 24h (48-72 h en el caso de *S. mutans*). De estas placas se tomaron colonias aisladas con asa de siembra estéril para la preparación de los inóculos (Punto 2.2. de este apartado). Las “placas madres” de las que se tomaron las colonias como se ha explicado, se conservaron en nevera a 4 °C selladas con Parafilm y se renovaron cada mes. Se trabajó en campana de flujo laminar.

#### **-Evaluación del efecto de la TFDA sobre las suspensiones microbianas:**

La siembra de las muestras tratadas con TFDA y de todos los controles se realizó bajo las mismas condiciones que para la preparación de las suspensiones descrita en el apartado anterior (igual tiempo de incubación, 24, 48 o 72h, a temperatura de 35 °C, medio AS o SB y estado aerobio) pero mediante siembra en recuento, por tanto, con reparto homogéneo en la placa y tras haber realizado la dilución o diluciones pertinentes con el fin de poder hacer un contaje de Unidades Formadoras de Colonias (UFC o Colony-forming unit, CFU) preciso.

La cantidad que se determinó como apropiada para el contaje se estableció en <200 UFC por cada placa. Para realizar las diluciones que se requirieron en cada caso se empleó como disolvente agua destilada en Eppendorfs o en pocillos de placas de microtiter. Para agitar se utilizó vortex en caso de haber empleado Eppendorfs o micropipeta con los pocillos.

### **2.1.2. Aislamiento, cultivo e identificación de dermatofito** (Estudio 6)

**-Aislamiento y posterior identificación del agente causal de una dermatofitosis tratada mediante TFDA *in vivo*:**

Se tomaron muestras de las lesiones activas seleccionadas de 10 ovejas infectadas. Para la recogida de las muestras, con el fin de evitar microorganismos contaminantes, en primer lugar se realizó una limpieza mecánica de los excesos de materia orgánica rascando con el bisturí y después, tras una desinfección con alcohol 70%, se cogieron las muestras de la zona de los bordes de las lesiones activas (figura 33).



**Figura 33. Toma de muestras:** imagen del procedimiento de toma de muestras de un borde de lesión activa en una oveja infectada.

Los raspados cutáneos de las lesiones seleccionadas de las 10 ovejas infectadas por una parte se trataron con KOH 20% mezclado con la misma parte de blanco de calcoflúor para examinación directa al microscopio y por otra parte

se cultivaron en medio SB con cloranfenicol, DTM que contiene cicloheximida y agar de patata y dextrosa con cloranfenicol añadido (figura 34) durante 7-12 días a 30 °C en condiciones aerobias. Las muestras negativas se guardaron durante 4 semanas antes de descartarlas como negativas.



**Figura 34. Subcultivos:** foto de subcultivos de las placas con los tres medios utilizados (SB, DTM y patata-dextrosa) para cultivo de cada muestra.

La identificación molecular del hongo se realizó a partir de dos aislados de diferentes animales seleccionados al azar porque todas las muestras parecían coincidentes macroscópicamente y microscópicamente.

El ADN genómico total se extrajo de micelio fresco obtenido de las colonias cultivadas en el agar de patata y dextrosa con cloranfenicol añadido tras siete días a 25°C utilizando el kit FastPrep (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN se cuantificó utilizando el aparato Nanodrop 3000 (Thermo Scientific, Madrid, España). Se amplificó una región que abarca el espaciador transcrito interno 1 (ITS1) y el ITS2 y el gen 5.8 S del ADN ribosómico utilizando los pares de cebadores ITS4 e ITS5 de acuerdo al protocolo de White *et al.*, 1990. Los productos amplificados se

purificaron con el sistema de purificación Diffinity RapidTip (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su secuenciación. La secuenciación se realizó en ambas direcciones con el mismo par de cebadores que se utilizó para la amplificación, en MacroGen Europe (MacroGen Inc., Amsterdam, Países Bajos). Las secuencias de consenso se obtuvieron usando SeqMan versión 7.0.0 (DNASarLasergene, Madison, WI).

Las secuencias obtenidas se compararon para su identificación con las secuencias de referencia disponibles en varias bases de datos públicas, como The National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), la base de datos The International Society for Human & Animal Mycology (ISHAM) (<http://its.mycologylab.org>) y la base de datos de alineación de secuencias Center for Biological Sequence Analysis (CBS Pairwise) ([www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)).

## **2.2. Preparación de los inóculos para estudios *in vitro*** (Estudios 1, 2, 3, 4 y 5)

Para la realización de los inóculos de trabajo se tomaron colonias aisladas de las placas preparadas previamente para ello (explicado en el punto 2.1.1 de este apartado). Las suspensiones fueron realizadas en agua destilada estéril y se empleó el espectrofotómetro para ajustar la cantidad de microorganismos.

El procedimiento fue el siguiente: En primer lugar, se prepara un “autozero” o blanco con un tubo con el diluyente, el agua destilada. Después, a partir de los cultivos de bacterias o levaduras para la realización de los experimentos de TFDA *in vitro* antes descritos, se toma de la placa para realización de inóculo tocando ligeramente las colonias aisladas en el cultivo mediante un asa de siembra estéril y se adiciona al tubo con el que se preparó el

blanco. Utilizando un vortex se homogeniza la suspensión de las células en el tubo y se realiza la medida turbidimétrica. Se ajusta adicionando más agua o más colonias a las medidas de  $0,5 \pm 0,03$  McF para bacterias y de  $4,5 \pm 0,05$  McF para levaduras, correspondientes a concentraciones celulares de  $\sim 1 \times 10^8$  UFC / ml y  $\sim 1 \times 10^{6-7}$  UFC / ml respectivamente. Estas suspensiones son las que se emplearon como inóculos para los experimentos *in vitro*. Todas las preparaciones de los inóculos fueron llevadas a cabo bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

## 2.3. Preparación de los fotosensibilizantes

### 2.3.1. Realización de las disoluciones

El MB que se empleó en los estudios *in vitro* (Estudios 1, 2 y 3) tiene una presentación comercial en estado líquido disuelto en etanol. Para preparar las disoluciones de trabajo se tomó de la disolución original comercial una alícuota y se diluyó con la parte correspondiente de agua destilada estéril empleando un eppendorf opaco y homogenizando con el vortex. A partir de este eppendorf se realizaron disoluciones seriadas a 1/2 con agua destilada estéril para disponer de una batería de eppendorf a las diferentes concentraciones de trabajo. Para ello, se emplearon eppendorfs opacos. Se hizo inmediatamente antes de su uso o con fecha inferior a un mes, guardándose en cámara a 4°C y tanto cuando fueron preparadas como cuando se trabajó con ellas se procuró exponer la batería de eppendorf con las diferentes concentraciones lo menos posible a la luz.

El MB que se empleó en el estudio *in vivo* (Estudio 6) tiene una presentación en polvo. La solución stock MB se preparó en agua destilada y se diluyó con agua destilada a la concentración deseada. Se prepararon inmediatamente antes de su uso o con fecha inferior a una semana, guardándose a temperatura ambiente. Todas las disoluciones se prepararon y manejaron en

condiciones restrictivas de luz (como ejemplo, los tubos Falcon que contienen la disolución se envolvían en papel de aluminio).

El RB que se empleó tiene una presentación comercial en estado sólido en polvo. El procedimiento que se siguió es equivalente al del MB para estudios *in vitro* salvo que se comienza pesando en báscula de precisión y disolviéndolo con la parte correspondiente de agua destilada para disponer de una disolución concentrada a partir de la cual preparar el resto (Estudios 1, 2, 3 y 4).

La CUR también tiene una presentación comercial en polvo. A diferencia del RB, la CUR se pesa y en primer momento se diluyó en DMSO. En las disoluciones posteriores se empleó como solvente un porcentaje de DMSO decreciente y creciente de agua destilada (Estudio 1).

El Pol-Mo6 se recibió desde Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad Jaime I (UJI) de Castellón de la Plana, España. El envío se realizó en botes de cristal cerrados con parafilm que contenían las esferas de Pol-Mo6. Se conservan en oscuridad a temperatura ambiente. Se pesó inmediatamente antes de cada uso (figura 35). A la cantidad de esferas deseada para cada experimento se le adiciona la correspondiente cantidad de suspensión bacteriana preparada en medio acuoso pero las esferas no se disuelven, quedan suspendidas y se ven macroscópicamente (Estudio 5).



**Figura 35. Pesaje:** Izquierda, bote con las esferas. Derecha, balanza de precisión pesando 200 mg en placa RODAC.

## 2.3.2. Concentraciones de trabajo empleadas

Para los experimentos *in vitro*, las disoluciones de trabajo de MB, RB y CUR de los Estudios 1, 2, 3 y 4 se realizaron de forma seriada a un medio desde 12.800 µg/ml hasta 0,3 µg/ml. De esta forma el rango de concentraciones finales que se utilizó en los experimentos *in vitro* va de 1280 µg/ml a 0,03 µg/ml porque en cada pocillo de las placas de microtiter que previamente contiene 90 µl de suspensión microbiana se le echo 10 µl de las diferentes disoluciones del FS y por tanto quedan diluidas 1/10.

En el caso del Estudio 5 que empleo Pol-Mo6, se usa una concentración fija de 200 mg cada 5 ml de suspensión bacteriana, es decir, a una concentración de 40 mg/ml.

Para el estudio *in vivo* con MB (Estudio 6), la solución stock MB se preparó diluyendo con agua destilada a la concentración deseada de 1:100 MB (10 g disueltos en un litro de agua, esterilización a 121 °C), es decir, al 1%.

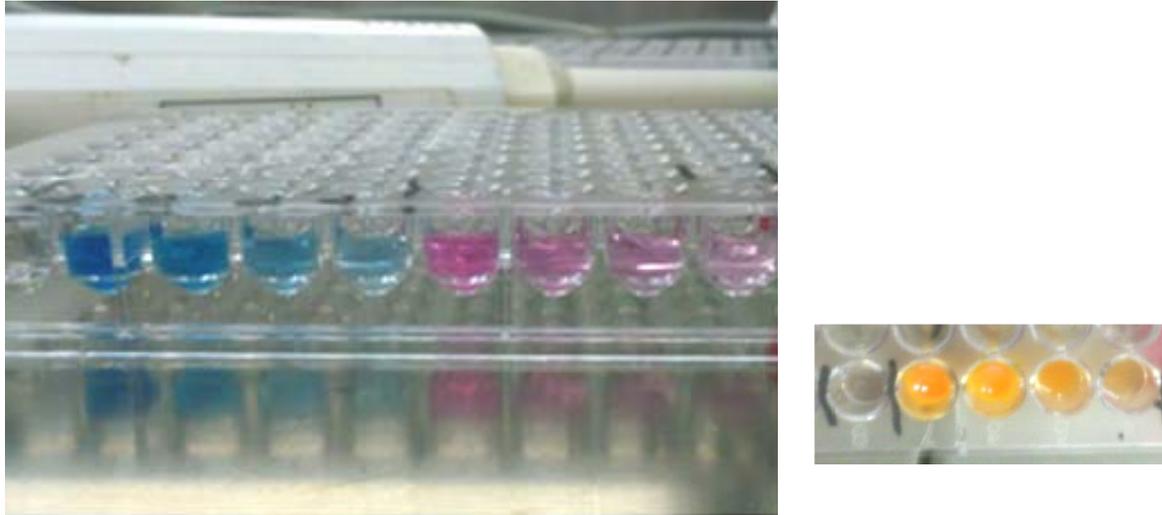
## 2.4. Tratamiento fotodinámico

### 2.4.1. Experimentos *in vitro*

#### 2.4.1.1. Con concentraciones variables de FS y fluencia fija (Estudios 1, 2, 3 y 4)

En campana de flujo laminar, en una placa de microtiter se depositó 90 µl en cada pocillo de inóculo con suspensión acuosa de microorganismo *S. aureus*, *S. sanguinis*, *S. mutans* y *C. albicans* ( $0.5 \pm 0.03$  McF  $\sim 1 \times 10^8$  UFC/ml para bacterias y 4-5 McF  $\sim 1 \times 10^{6-7}$  UFC/ml para levaduras tal como se ha detallado en el punto 2.2) mas 10 µl de la dilución con la concentración correspondiente de FS (realizadas de acuerdo al punto 2.3) resultando un volumen final por pocillo de 100 µl. En experimentos que mezclan dos cepas bacterianas (Estudio 2) (*S.*

*sanguinis* y *S. mutans*) se puso 90  $\mu$ l de cada suspensión de las cepas y se añadió 20  $\mu$ l de las diferentes soluciones de FS siendo en este caso el volumen final por pocillo de 200  $\mu$ l. En ambos casos, resultó una fila de pocillos con inóculo y concentraciones seriadas de FS a  $\frac{1}{2}$  (figura 36).



**Figura 36. Diluciones seriadas de fotosensibilizante en cada pocillo:** preparación para experimentos de TFDA *in vitro* con concentraciones variables de FS. Izquierda, disoluciones seriadas a  $\frac{1}{2}$  en una placa de microtiter de MB (azul) y RB (rosa); Derecha, disoluciones seriadas de CUR (amarillo).

La placa de microtiter con las suspensiones ya preparadas, en el caso de no realizar incubación previa, se irradiaba inmediatamente con la fuente de luz seleccionada para cada experimento aplicando una fluencia fija de 18 o 37  $\text{J}/\text{cm}^2$  (Estudios 1, 2, 3 y 4). Si se realizaba incubación previa a la irradiación, se dejaba la placa de microtiter en oscuridad dentro de la estufa a 35°C durante 30 min, 1 h, o 3 h. Cuando la incubación era de 24 h, las suspensiones en vez de en placas de microtiter, se preparaban en eppendorfs y tras las 24 h se agitaban con el vortex y se transferían a los pocillos de una placa de microtiter. Pasado el tiempo de incubación, se sometían a irradiación (Estudio 1).

Tras la irradiación realizada con la lámpara elegida para cada experimento, a la distancia precisa y durante el tiempo concreto para aplicar la

fluencia deseada, las suspensiones de cada pocillo se sembraron en placas de medio como se detalla en el apartado correspondiente a este punto (2.1.1. Cultivo de bacterias y de levaduras) para posteriormente proceder al recuento de UFC y poder cuantificar el efecto fotodinámico (apartado 2.5.1).

#### 2.4.1.2. Con concentraciones variables de FS, con adición de antibiótico y fluencia fija (Estudios 3 y 4)

La diferencia con el punto anterior es que en estos experimentos se incluyen antibióticos. El procedimiento detallado es el siguiente:

Trabajando en campana de flujo laminar, en una placa de microtiter se depositó 90  $\mu$ l en cada pocillo de inóculo acuoso con suspensión bacteriana de *S. aureus* ( $0.5 \pm 0.03$  McF  $\sim 1 \times 10^8$  UFC/ml realizada según el punto 2.2). En cada pocillo se añadió 10  $\mu$ l de dilución de FS a las diferentes concentraciones (punto 2.3), y 10  $\mu$ l de antibiótico (a la misma concentración para todos los pocillos). De esta forma el volumen final por pocillo fue de 110  $\mu$ l y resultó una fila de pocillos con inóculo, antibiótico con una concentración final de 1 o 10  $\mu$ g/ml y concentraciones seriadas de FS a  $\frac{1}{2}$  (figura 37).



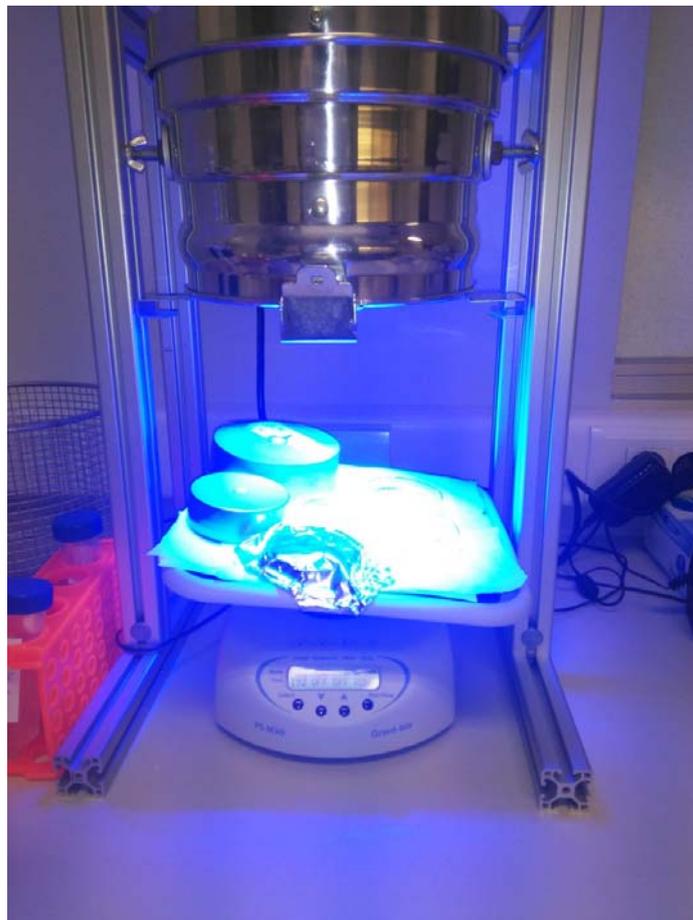
**Figura 37. Diluciones seriadas de fotosensibilizante en cada pocillo con y sin antibiótico:** Preparación para experimentos de TFDA *in vitro* con concentraciones seriadas a  $\frac{1}{2}$  de FS MB en una placa de microtiter. Parte superior, sin antibiótico; parte inferior con antibiótico LN, realizado en paralelo.

La placa de microtiter, con las suspensiones por pocillo preparadas, se sometió a la irradiación con la fuente de luz seleccionada para cada experimento aplicando una fluencia de 18 o 37 J/cm<sup>2</sup>.

Tras la irradiación, las suspensiones de cada pocillo se sembraron en placas de medio como se ha detallado en el apartado correspondiente a este punto (2.1.1) para después contar las UFC y poder cuantificar el efecto fotodinámico (se explica en el punto 2.5.1).

#### **2.4.1.3. Con concentración fija de FS y fluencia creciente** (Estudio 5)

En una placa RODAC se pesó 200 mg de Pol-Mo6 y se añadió 5 ml del inóculo de *S. aureus* de cultivo fresco en suspensión acuosa ( $0.5 \pm 0.03$  McF  $\sim 1 \times 10^8$  UFC/ml, punto 2.2 y 2.3). Inmediatamente se irradió con LED azul mientras se agitaba con el agitador de forma continua (figura 38).



**Figura 38. Irradiación en agitación:** imagen del proceso de irradiación *in vitro* de suspensión de *S. aureus* con PolMo6 en placas RODAC sobre agitador. Las placas que se ven tapadas corresponden a controles de oscuridad. El soporte de la lámpara permite ajustar la distancia de irradiación para que tras

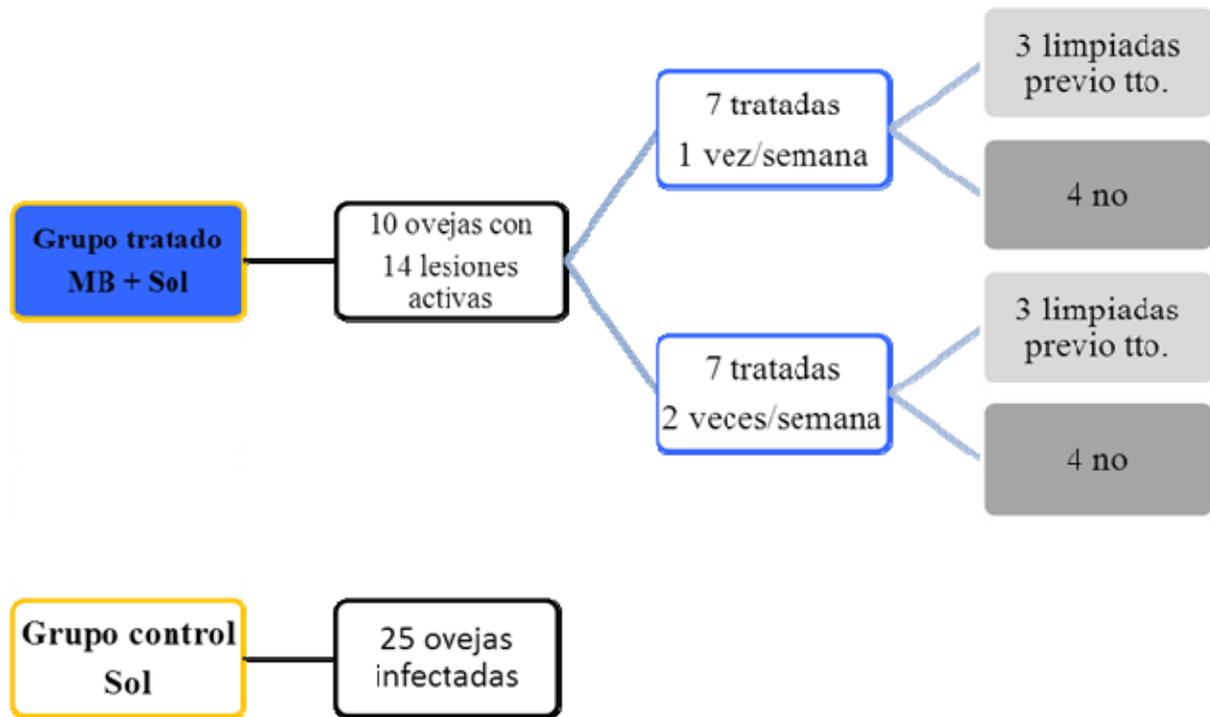
colocar el agitador, la distancia entre la fuente de luz y la placa siga siendo la adecuada.

De cada placa ROCAC se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  para sembrar en medio AS a cada tiempo correspondiente a 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  de irradiación (lo cual equivale a cada 12,82 min de irradiación con las condiciones utilizadas) en el rango de fluencia de 50 a 120  $\text{J}/\text{cm}^2$ , es decir, a los tiempo de 50, 60, 70, 80... hasta 120  $\text{J}/\text{cm}^2$ . La irradiación es continua desde el momento 0 hasta el tiempo correspondiente a haber aplicado una fluencia de 120  $\text{J}/\text{cm}^2$ . La siembra en placas se realizó como se detalla en el apartado correspondiente a este punto (punto 2.1.1.) para después contar las UFC y poder cuantificar el efecto fotodinámico (se detalla en el punto 2.5.1).

Todos los experimentos *in vitro* detallados en los apartados anteriores (punto 2.4.1. Experimentos *in vitro*; subapartados 2.4.1.1, 2.4.1.2 y 2.4.1.3) se repitieron probando cada condición experimental al menos 3 veces (Estudios 1, 2, 3, 4 y 5).

### **2.4.2. Experimento *in vivo*** (Estudio 6)

Se aplicó una concentración fija del FS MB al 1% (preparado y manejado como se explica en el punto 2.3) rociándolo sobre las lesiones tratadas una o dos veces por semana durante 4 semanas y tras haber limpiado previamente la lesión o no sobre 14 lesiones de 10 ovejas infectadas por el hongo dermatofito y se expusieron a la luz solar (figura 39). La fluencia usada no fue determinada. El tiempo de irradiación fue equivalente al tiempo de luz solar diario, aproximadamente 10 h / día, durante las 4 semanas. La eficacia del tratamiento fotodinámico se realizó tal como se explica en el punto 2.5.2.



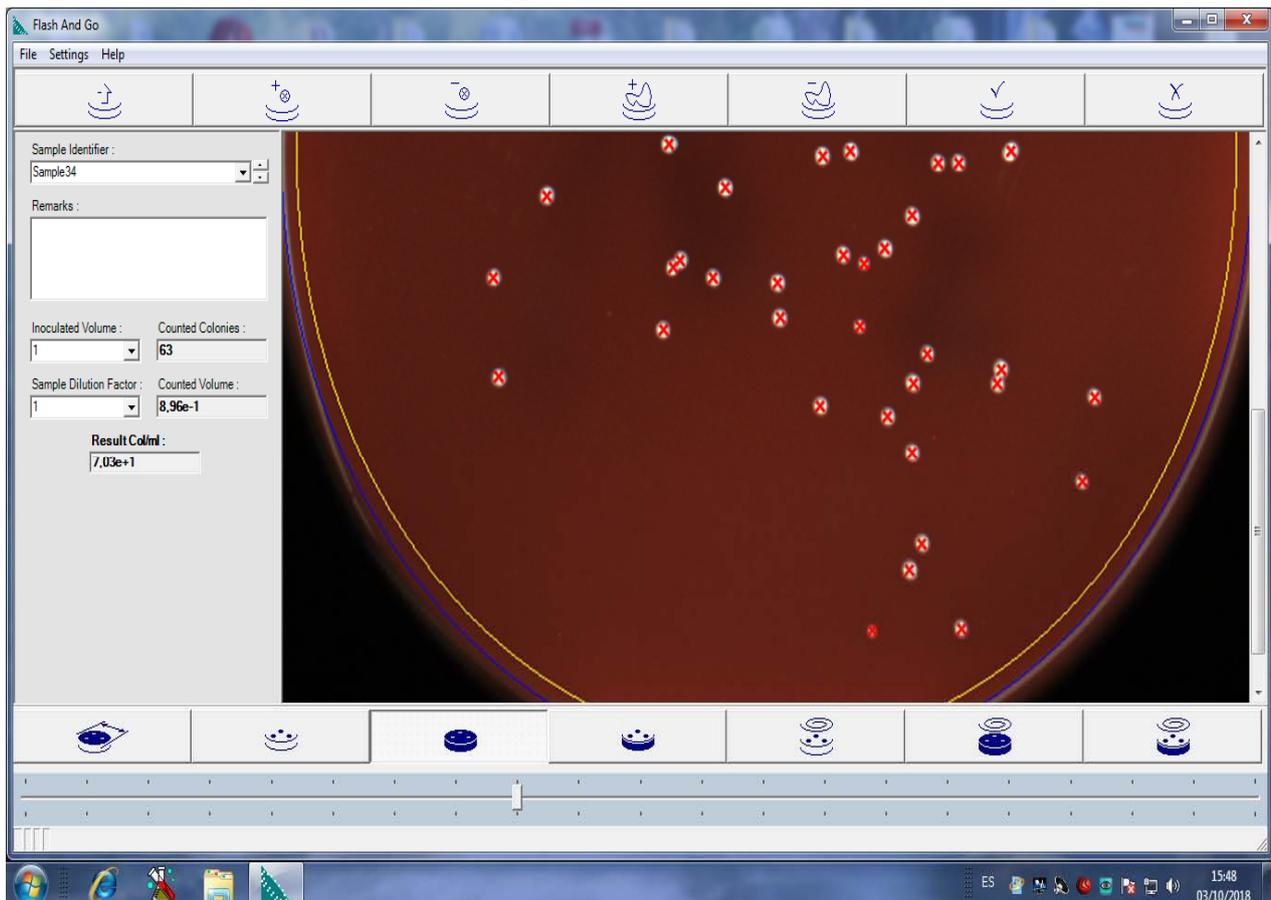
**Figura 39. Pauta de tratamiento de las lesiones:** esquema que representa el protocolo seguido para el tratamiento de las lesiones de las ovejas tratadas con MB y luz solar. Tto.: Tratamiento.

## 2.5. Cuantificación del efecto antimicrobiano

### 2.5.1 Experimentos *in vitro* (Estudios 1, 2, 3, 4 y 5)

#### 2.5.1.1. Contaje de colonias

El efecto antimicrobiano se determinó contando la cantidad de UFC por placa por conteo manual o con contador automático (figura 40).



**Figura 40. Contador automático de colonias:** a la derecha, el aparato Flash and Go<sup>®</sup> haciendo una lectura de placa. En la foto superior, el Software de recuento realizando el contaje.



Para el cálculo del número de UFC/ml se revierte la dilución que se ha hecho antes de sembrar cada placa y, en el caso que no se haya sembrado 1 ml sino un volumen inferior, se calcula por proporcionalidad el número que habría si se hubiera sembrado un 1 ml.

Los efectos del tratamiento fotodinámico se cuantificaron tras contar las UFC/ml de cada muestra tratada con las diferentes concentraciones de FS y

sometidas a irradiación y comparando estos resultados con el número de UFC/ml que se cuenta en el control del inóculo inicial y considerando el resto de controles.

Un ejemplo lo encontramos en la figura 41, en la que podemos ver tres placas de contaje de colonias para saber las UCF con la siembra de inóculos de muestras de diferentes concentraciones de FS. Para cuantificar el efecto del tratamiento fotodinámico tenemos que referir las UFC/ml que tengamos en estas placas respecto al control irradiado y los controles de oscuridad.



**Figura 41. Contaje de colonias en agar:** fotografía de placas de AS para recuento de UFC. De izquierda a derecha, las tres placas corresponden a la siembra del mismo volumen y a igual dilución de suspensiones microbianas de *S. aureus* sometidas de menos a más concentración de FS a igual tiempo de irradiación. En la placa de la izquierda hay una cantidad incontable de UFC por lo que para poder hacer el recuento se tendrá que hacer en una placa en la que se siembre menos volumen y/o mas diluido. En la del centro se puede contar y por tanto calcular el número de UFC de la suspensión bacteriana. En la de la derecha no hay crecimiento de UFC por lo que se tendrá que sembrar mas volumen y/o menos diluido para comprobar si no hay crecimiento porque se ha producido una inactivación total o si es parcial y el número de UFC se encuentra por debajo del rango que se puede calcular considerando el volumen sembrado y la dilución que se había hecho.

Alcanzar una reducción de 6 Log<sub>10</sub> UFC/ml respecto a los controles se definió como bactericida y es el objetivo de los Estudios *in vitro* que se realizaron.

### 2.5.1.2 Controles empleados

**-Control de inóculo inicial** (Estudio 1, 2, 3, 4 y 5): Inóculo inicial sin irradiación ni FS, también denominado 0 o C<sub>0</sub> en las publicaciones. Es el control respecto al que se refieren los resultados de las muestras tratadas con TFDA y el resto de controles. Sirve para comprobar que efectivamente el inóculo inicial contenía las UFC deseadas de acuerdo a la medida de McF con la que se preparó.

**-Control de irradiación** (Estudio 1, 2, 3, 4 y 5): Inóculo inicial irradiado pero sin FS, también denominado IRR o C<sub>IRR</sub> en las publicaciones. Evalúa la toxicidad de la luz, es decir, la reducción en el número de UFC que se produce solo por el efecto de la irradiación.

**-Control del FS** (Estudio 1, 2, 3, 4 y 5): Muestras con los inóculos microbianos y con las mismas concentraciones de FS empleadas e incluso superiores fueron sometidas a las mismas condiciones de tratamiento fotodinámico en cuanto a tiempo (de incubación si lo hay y el tiempo correspondiente al tiempo de irradiación) y temperatura pero mantenidas en oscuridad. Por tanto, es el inóculo inicial con FS y sin irradiación. Evalúa la toxicidad del FS en oscuridad, es decir, lo que mata el FS y no se debe al efecto fotodinámico.

**-Control del disolvente del FS** (Estudio 1, 2, 3, 4 y 5): Controles de los volúmenes de etanol para el MB y de DMSO de la CUR de las disoluciones de trabajo fueron realizados utilizando los mismos porcentajes de estos que en las disoluciones de trabajo y empleándolos en paralelo pero sin tener FS. Se hicieron con los inóculos microbianos y con las mismas partes proporcionales de disolvente de etanol o DMSO de las concentraciones de FS empleadas e incluso superiores pero sin llevar FS y se les sometió a las

mismas condiciones de tratamiento fotodinámico. Evalúa lo que mata el disolvente y por tanto permite descartar que cierta cantidad de muerte en el número de UFC se deba al etanol o el DMSO.

**-Control del polímero al que se vincula el FS (Estudio 5):** Inóculo inicial en ausencia del FS (sin el complejo de Mo6) pero con el polímero al que se vincula (es decir, el polímero “vacío”) y tanto sometido a irradiación como mantenido en oscuridad. Evalúa la toxicidad que puede generar el polímero *per se* con o sin irradiación y sirve para descartar que el efecto observado con Pol-Mo6 no se debe a la acción del polímero únicamente.

**-Control de antibiótico (Estudio 3 y 4):** Inóculo inicial sin irradiación ni FS pero con antibiótico, también denominado  $C_{0-AN}$ , en las publicaciones. Evalúa el efecto del antibiótico, la reducción en el número de UFC que se produce solo por el efecto de la adición del antibiótico a la concentración a la que se empleó en todo el experimento y durante el mismo tiempo que en el resto de muestras.

**-Control de antibiótico irradiado (Estudio 3 y 4):** Inóculo inicial sin FS pero con antibiótico y sometido a irradiación, también denominado  $C_{IRR-AN}$ , evalúa el efecto de la irradiación sumado al efecto del antibiótico.

Todos los controles fueron sometidos a los mismos tiempos de incubación, las mismas condiciones de crecimiento y método de contaje que el resto de muestras. Para poder realizar el recuento se realizaron las diluciones adecuadas correspondientes. Los resultados de los controles se establecieron haciendo un recuento del número de UFC / placa, posteriormente el valor fue expresado en términos de UFC / ml realizando la conversión.

### 2.5.1.3 Análisis estadístico (Estudios 2 y 4)

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión en español 19.0 (Inc, Chicago, Illinois, USA).

Los resultados de reducción logarítmica del número de UFC/ml se expresaron como media y desviación estándar. Las diferencias entre medias se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró la significación estadística con  $p \leq 0.05$ .

### 2.5.2. Experimento *in vivo* (Estudio 6)

La eficacia del tratamiento fotodinámico con MB y luz solar se evaluó por comparación de las fotografías tomadas periódicamente de la evolución de las 14 lesiones de las 10 ovejas infectadas seleccionadas para conformar el grupo tratado vs. las 25 ovejas infectadas con lesiones activas que no recibieron tratamiento (expuestas a la luz solar sin MB) que fueron el grupo control de la acción del MB.

Los resultados de la respuesta clínica de las lesiones dentro del grupo tratado se compararon en función del protocolo empleado: aplicación del MB una o dos veces por semana (figura 42) y limpieza o no de la lesión previamente a su aplicación.



**Figura 42. Evolución de las lesiones:** evolución de las lesiones de las ovejas a lo largo de cuatro semanas. Fila superior, ejemplo de aplicación de azul de metileno dos veces a la semana. Fila inferior, una vez a la semana.

### 3. Resumen de los materiales y la metodología

Tabla 5. Resumen de los materiales y la metodología de los principales Estudios que constituyen la Tesis Doctoral:

Estudio	Microorganismo diana	Tipo de Estudio	FS empleados	Combinación con antibióticos	Pre-incubación	Fuente de luz	$\lambda$ de emisión	Fluencia J/cm <sup>2</sup>	UFC/mL iniciales
1	<i>S. mutans</i> ; <i>S. sanguis</i> ; <i>C. albicans</i>	<i>in vitro</i> : planctónico	MB, RB, CUR	no	no; si	halogenuro metálico	420–700 nm	36	>10 <sup>6</sup>
2	<i>S. mutans</i> ; <i>S. sanguis</i> y mixto	<i>in vitro</i> : planctónico	MB, RB	no	no	LED rojo y verde	625 nm y 515 nm	18	>10 <sup>6</sup>
3	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> : planctónico	MB, RB	LN, MU	no	halogenuro metálico, LED rojo y LED verde	420–700 nm, 625 nm y 515 nm	18; 36	>10 <sup>8</sup>
4	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> : planctónico y biofilm	RB	GN	no; si	halogenuro metálico y LED rojo	420–700 nm y 625 nm	18; 36	>10 <sup>8</sup>
5	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> : planctónico	Pol Mo6	no	no	LED azul	460 nm	hasta 120	>10 <sup>8</sup>
6	<i>A. vanbreuseghemii</i>	<i>in vivo</i> : animales	MB	no	no	Sol	100-10 <sup>6</sup> nm	no datos	lesiones

CUR: curcumina; FS: fotosensibilizantes; GN: gentamicina; LED: diodo emisor de luz; LN: linezolid; MB: azul de metileno; MU: mupirocina; PolMo6: polímero con Molibdeno hexanuclear; RB: rosa bengala; t: tiempo; UFC: unidades formadoras de colonias.

## 4. Summary of materials and methodology

**Table 6. Summary of the materials and methodology of the main studies that constitute the Doctoral Thesis:**

Study	Target microorganism	Type of study	usedPS	Combination with antibiotics	Pre-incubation	Light source	$\lambda$ emission	Fluence J/cm <sup>2</sup>	Initials CFU/mL
1	<i>S. mutans</i> ; <i>S. sanguis</i> ; <i>C. albicans</i>	<i>in vitro</i> : planktonic	MB, RB, CUR	no	no; yes	metal halide	420–700 nm	36	>10 <sup>6</sup>
2	<i>S. mutans</i> ; <i>S. sanguis</i> and mix of both	<i>in vitro</i> : planktonic	MB, RB	no	no	Red and green LED	625 nm y 515 nm	18	>10 <sup>6</sup>
3	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> : planktonic	MB, RB	LN, MU	no	metal halide, red LED and green LED	420–700 nm, 625 nm y 515 nm	18; 36	>10 <sup>8</sup>
4	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> : planktonic & <i>biofilm</i>	RB	GN	no; yes	metal halide and red LED	420–700 nm and 625 nm	18; 36	>10 <sup>8</sup>
5	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> : planktonic	Pol Mo6	no	no	Blue LED	460 nm	up to 120	>10 <sup>8</sup>
6	<i>A. vanbreuseghemii</i>	<i>in vivo</i> : animals	MB	no	no	Sun	100-10 <sup>6</sup> nm	no data	lesions

CFU: colony-forming unit; CUR: curcumin; GN: gentamicin; LED: light-emitting diode; LN: linezolid; MB: methylene blue; MU: mupirocin; Pol Mo6: polymer supported hexanuclear molybdenum iodide; PS: photosensitizer; RB: rose bengal

## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

---

## *ESTUDIO 1*

---

## *ESTUDIO 2*

---

### *Highlights*

- aPDT with RB and MB using a specific LED lamp has a significant bactericidal effect on *S. mutans* and *S. sanguinis* strains.
- RB is slightly more efficient than MB.
- Effects are the same *in vitro*, either for separate bacteria or on the samples constituted by both bacteria.

## *ESTUDIO 3*

---

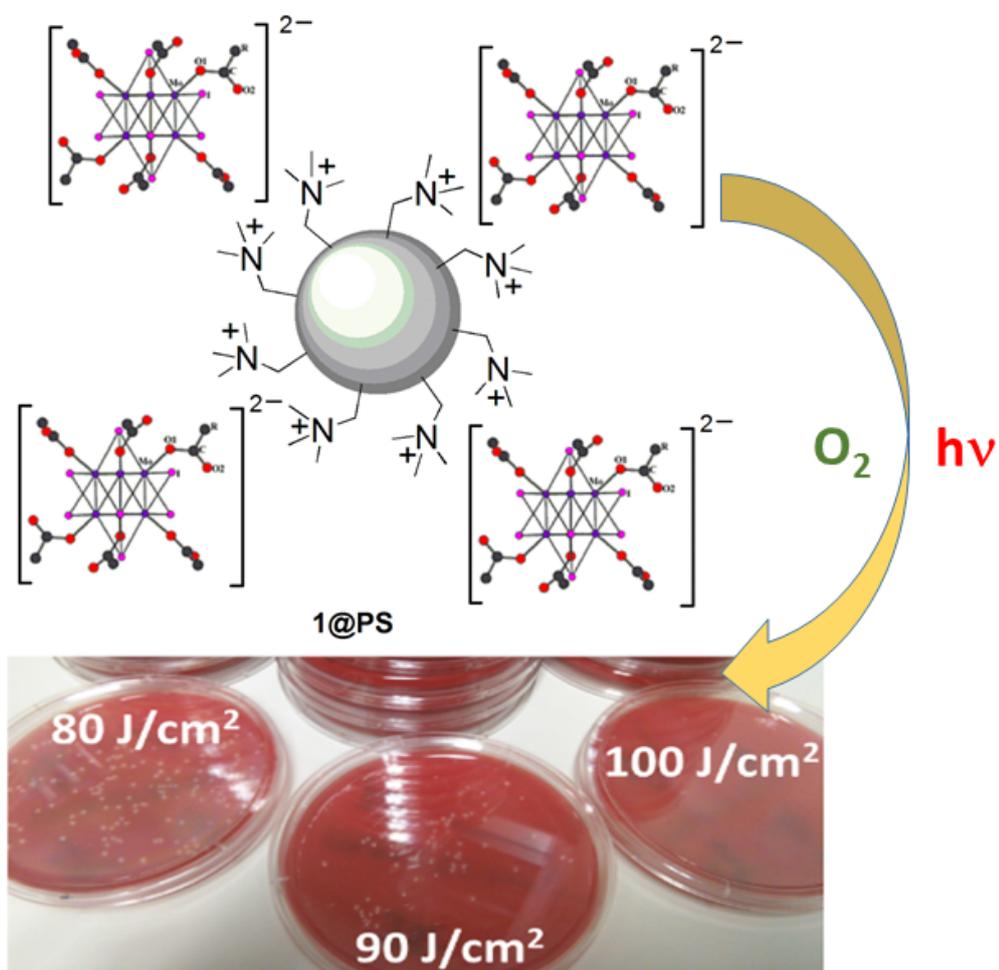
## *ESTUDIO 4*

---

## ESTUDIO 5

---

### Graphical abstract

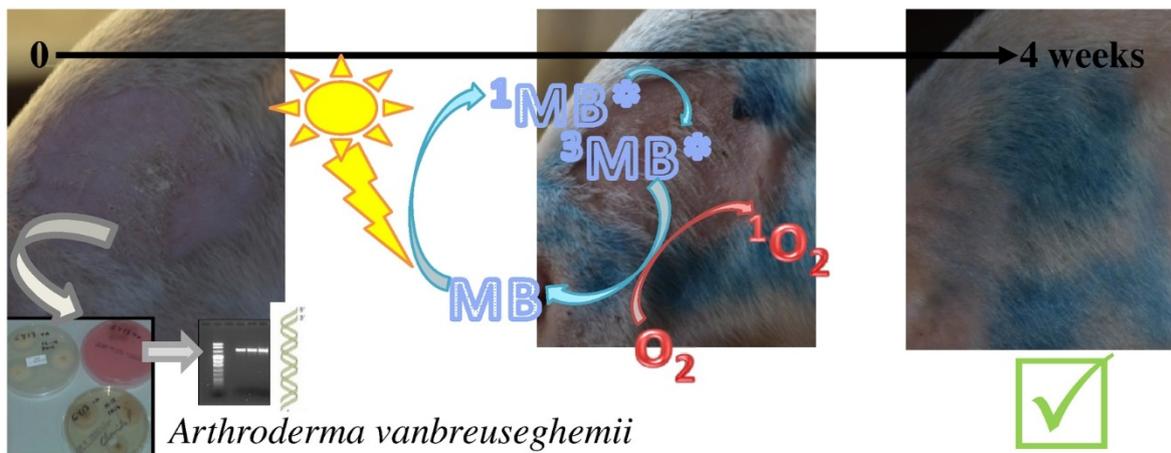


**$^1O_2$  mediated photoinactivation of *S. aureus***

## ESTUDIO 6

---

### Graphical abstract



### Highlights

- *Arthroderma vanbreuseghemii* was identified as the causative agent of dermatophytosis in a flock of sheep.
- Antimicrobial daylight photodynamic therapy (aDL-PDT) using 1% methylene blue solution was tested.
- aDL-PDT seems to be effective, safe and efficient to treat dermatophytosis in sheep.

# 1. Resumen de los resultados

**Tabla 7. Resumen de los resultados de los principales Estudios que constituyen la Tesis Doctoral:**

Estudio	Microorganismo diana	Tipo de estudio	FS empleados	Combi. con antibi	Fuente de luz	Fluencia J/cm <sup>2</sup>	UFC/mL iniciales	Red. log <sub>10</sub>	Destacado
1	<i>S. mutans</i> ; <i>S. sanguis</i> ; <i>C. albicans</i>	<i>in vitro</i> : planctónico	MB, RB, CUR	no	halogenuro metálico	36	>10 <sup>6</sup>	>6	Luz blanca adecuada para TFDA
2	<i>S. mutans</i> ; <i>S. sanguis</i> y mezcla de ambos	<i>in vitro</i> : planctónico	MB, RB	no	LED rojo y verde	18	>10 <sup>6</sup>	>6	Cultivo puro y mixto=respuesta a TFDA
3	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> : planctónico	MB, RB	LN, MU	halogenuro metálico, LED rojo y LED verde	18; 36	>10 <sup>8</sup>	>6	TFDA+LN o +MU >efecto que solo TFDA
4	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> : planctónico y biopelícula	RB	GN	halogenuro metálico y LED rojo	18; 36	>10 <sup>8</sup>	>6	TFDA+GN >efecto que solo TFDA
5	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> : planctónico	Pol-Mo6	no	LED azul	hasta 120	>10 <sup>8</sup>	>6	Pol-Mo6 es FS válido
6	<i>A. vanbreuseghemii</i>	<i>in vivo</i> : animal	MB	no	Sol	no datos	lesiones	Cura en < tiempo	Sol-TFDA-MB es efectiva

Combi.: Combinación; CUR: curcumina; FS: fotosensibilizantes; GN: gentamicina; LED: diodo emisor de luz; LN: linezolid; MB: azul de metileno; MU: mupirocina; Red: reducción; PolMo6: polímero con Molibdeno hexanuclear; RB: rosa bengala; UFC: unidades formadoras de colonias.

## 2. Summary of of the results

**Table 8. Summary of the result of the main studies that constitute the Doctoral Thesis:**

Study	Target microorganism	Type of study	PS employees	Combination with antibiotics	Light source	Fluence J/cm <sup>2</sup>	Initials CFU/mL	Log <sub>10</sub> red.	Highlights
1	<i>S. mutans</i> ; <i>S. sanguis</i> ; <i>C. albicans</i>	<i>in vitro</i> planktonic	MB, RB, CUR	no	metal halide	36	>10 <sup>6</sup>	>6	white light suitable for aPDT
2	<i>S. mutans</i> ; <i>S. sanguis</i> and mix of both	<i>in vitro</i> planktonic	MB, RB	no	red and green LED	18	>10 <sup>6</sup>	>6	Pure and mixed culture= response to aPDT
3	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> planktonic	MB, RB	LN, MU	metal halide, red LED and green LED	18; 36	>10 <sup>8</sup>	>6	aPDT+LN or MU > effect than aPDT alone
4	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> planktonic & biofilm	RB	GN	metal halide and red LED	18; 36	>10 <sup>8</sup>	>6	aPDT+GN > effect than aPDT alone
5	<i>S. aureus</i>	<i>in vitro</i> planktonic	Pol Mo6	no	blue LED	up to 120	>10 <sup>8</sup>	>6	Pol-Mo6 is a suitable PS
6	<i>A. vanbreuseghemii</i>	<i>in vivo</i> : animal	MB	no	Sun	no data	lesions	< cure time	daylight-aPDT-MB is effective

CFU: colony-forming unit; CUR: curcumin; GN: gentamicin; LED: light-emitting diode; LN: linezolid; MB: methylene blue; MU: mupirocin; red.: reduction; Pol Mo6: polymer supported hexanuclear molybdenum iodide; PS: photosensitizer; RB: rose bengal

## *CONCLUSIONES*

---

La TFDA inactiva diferentes microorganismos causantes de infecciones en piel y mucosas y, por tanto, podría constituir una opción de tratamiento para las mismas.

### Estudio 1:

La eficacia de la TFD con cada uno de los FS varía de acuerdo con el microorganismo diana:

-la TFDA con RB, MB o CUR y luz blanca es eficaz frente a cepas de *S. mutans* y *S. sanguinis*, resultando la TFDA-MB y la TFDA-RB más eficientes que la TFDA-CUR.

-*C. albicans* requirió concentraciones más altas de todos los FS para obtener un efecto fungicida, siendo la TFDA-MB la más eficiente y la TFDA-CUR ineficaz.

El tiempo de incubación previo a la irradiación no tuvo ningún efecto en los resultados de los experimentos con ninguno de los FS.

El empleo de la luz blanca con diferentes FS podría ser un enfoque prometedor para tratar infecciones en las que estén implicados diferentes microorganismos.

### Estudio 2:

El uso de lámparas LED, que emiten a una  $\lambda$  específica cercana o coincidente con el pico de absorción de los FS MB o RB, es eficaz para fotoinactivar *S. mutans* y *S. sanguinis* tanto por separado como en suspensiones mixtas.

La lámpara LED emitiendo a una  $\lambda$  específica para cada FS resulta más eficiente que la luz blanca.

### **Estudio 3:**

La combinación de los antibióticos MU o LN a dosis subterapéuticas con TFDA-RB/MB *in vitro* ocasiona un efecto bactericida sinérgico sobre *S. aureus*.

La combinación de TFDA-RB con MU fue la más eficiente en la fotoinactivación.

### **Estudio 4:**

La combinación de TFDA-RB con el antibiótico GN produce un efecto bactericida sinérgico sobre *S. aureus* planctónico. Para obtener el efecto sinérgico sobre biopelícula se deben utilizar las concentraciones máximas probadas tanto de RB como de GN (64 µg/ml y 40 µg/ml respectivamente).

El uso de TFDA con RB sola o en combinación con GN podría ser una buena opción para trasladar a la clínica en el tratamiento de las infecciones recalcitrantes o persistentes causadas por *S.aureus*.

### **Estudio 5:**

El pol-Mo6 es capaz de realizar fotooxigenaciones catalíticas con excelente reciclabilidad, habiéndose comprobado que hasta siete ciclos no hay pérdida de actividad.

El pol-Mo6 logra la fotoinactivación de *S. aureus*.

### **Estudio 6:**

La TFDA con solución de MB al 1% con luz solar podría ser un tratamiento eficaz para la tiña de animales, especialmente en aquellos casos causados por *A. vanbreuseghemii*.

Este tratamiento podría implementarse, además de en explotaciones ganaderas, en clínicas veterinarias para otros tipos de infecciones superficiales y en otras especies de animales.

*A. vanbreuseghemii* fue identificado por primera vez como agente causal de dermatofitosis en un rebaño de ovejas.

## CONCLUSIONS

---

aPDT inactivates different microorganisms that cause skin and/or mucous infections and, therefore, it is presented as a possible treatment.

### Study 1:

The photodynamic efficiency of each FS varies according to the target microorganism:

-aPDT with RB, MB or CUR and white light is effective against *S. mutans* and *S. sanguinis*. MB-aPDT and RB-aPDT are more efficient than CUR-aPDT.

-*C. albicans* required higher concentrations of all FS to obtain a fungicidal effect. MB-aPDT is the most efficient and CUR-aPDT ineffective.

The pre-incubation time before irradiation has no effect on the results of the experiments with any of the PS.

The white light use with different PS could be a promising approach to treat infections in which different microorganisms are involved.

### Study 2:

The use of LED lamps emitting at a specific wavelength close to or coincident with the absorption peak of MB or RB is effective for photoinactivating *S. mutans* and *S. sanguinis* both separately and in mixed suspensions.

LED lamp emitting at a specific  $\lambda$  for each PS is more efficient than white light.

### Study 3:

The combination of MU or LN with *in vitro* RB / MB-aPDT causes a synergistic bactericidal effect on *S. aureus*.

RB-aPDT with MU was the most efficient in the photoinactivation.

#### **Study 4:**

The combination of RB-aPDT with the antibiotic GN produces a synergistic bactericidal effect on planktonic *S. aureus*. To obtain the synergistic effect on biofilm, the maximum concentrations of RB and GN should be used (64 µg/ml and 40 µg/ml respectively).

The use of RB-aPDT alone or in combination with GN could be a good option for clinical use in the treatment of persistent or recalcitrant *S.aureus* infections.

#### **Study 5:**

The pol-Mo6 is able to perform catalytic photo-oxygenations with excellent recyclability, up to seven cycles there is no loss of activity.

Pol-Mo6 achieves *S. aureus* photoinactivation.

#### **Study 6:**

Daylight MB-aPDT could be a promising treatment for ringworm, especially in those cases caused by *A. vanbreuseghemii*.

This treatment could be implemented, in addition to livestock, in veterinary clinics for other types of superficial infections and in other animal species.

*A. vanbreuseghemii* was identified for the first time as a causative agent of dermatophytosis in a flock of sheep.

## *BIBLIOGRAFÍA*

---

1. Comisión Europea: A European One Health action plan against antimicrobial resistance (AMR) [Internet]. [citado 5 de septiembre de 2018]. Disponible en: [https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr\\_action\\_plan\\_2017\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_action_plan_2017_en.pdf)
2. Wright GD. The antibiotic resistome. *Expert Opin Drug Discov.* agosto de 2010;5(8):779-88.
3. Rice L. B. BRA. Manual of clinical microbiology-Tema 66: Mechanisms of resistance to antibacterial agents. 10.<sup>a</sup> ed. Versalovic J, editor. Vol. 2. Washington, DC: ASM Press; 2011. 1082-1114 p.
4. Martínez JL, Coque TM, Baquero F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(2):116-23.
5. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* septiembre de 2010;74(3):417-33.
6. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 20 de noviembre de 2008;13(47).
7. Lozano C, Rezusta A, Ferrer I, Pérez-Laguna V, Zarazaga M, Ruiz-Ripa L, et al. *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N.* 2017;17(4):268-70.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Antibiotic resistance threats in the United States [Internet]. [citado 5 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
9. European Academies Science Advisory Council, editor. Tackling antibacterial resistance in Europe. London: The Royal Society; 2007. 33 p. (EASAC policy report).
10. Fries R. Conclusions and activities of previous expert groups: the Scientific Steering Committee of the EU. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* noviembre de 2004;51(8-9):403-7.
11. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science.* 20 de enero de 2006;311(5759):374-7.
12. Mølbak K. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans--the public health consequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* noviembre de 2004;51(8-9):364-9.
13. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 1991;35(9):1697-704.
14. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother.* septiembre de 2009;64 Suppl 1:i29-36.
15. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Res Int.* 2016;2016:2475067.
16. Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 28 de agosto de 2013;12:22.
17. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 de enero de 2009;48(1):1-12.
18. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos [Internet]. 2018 feb [citado 5 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibióticos>
19. Organization WH. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Geneva: World Health Organization; 2014. 232 p.

20. Comisión Europea - Comunicado de prensa: Resistencia a los antimicrobianos: la Comisión intensifica la lucha mediante el nuevo plan de acción [Internet]. [citado 5 de septiembre de 2018]. Disponible en: [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-17-1762\\_es.pdf](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-17-1762_es.pdf)
21. O'neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally - AMR Review [Internet]. [citado 5 de septiembre de 2018]. Disponible en: [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf)
22. OMS. 7 millones de muertes cada año debidas a la contaminación atmosférica. Comunicado de prensa [Internet]. 2014. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/es/>
23. WHO. Global hepatitis report 2017. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf;jsessionid=479DDD01FB69E5CA56B57CBF3671134B?sequence=1>
24. Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;(10 (6)):701-6.
25. Comisión Europea. Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo [Internet]. 2011 nov [citado 5 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://studylib.es/doc/5074744/plan-de-acci%C3%B3n-contra-la-amenaza-creciente-de-las-resiste...>
26. Dellit TH, Owens RC, McGowan JE Jr, Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP, Huskins WC, Paterson DL, Fishman NO, Carpenter CF, Brennan PJ, Billeter M, Hooton TM; Infecti. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis.* 15 de enero de 2007;44(2):159-77.
27. Rodríguez-Baño J, Paño-Pardo JR, Alvarez-Rocha L, Asensio A, Calbo E, Cercenado E, et al. [Programs for optimizing the use of antibiotics (PROA) in Spanish hospitals: GEIH-SEIMC, SEFH and SEMPSPH consensus document]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* enero de 2012;30(1):22.e1-22.e23.
28. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Proyecto Resistencia Zero. 2014 [Internet]. [citado 4 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.seguridaddelpaciente.es/resources/documentos/131007-Presentacion-resistencia-zero-RZ.pdf>
29. Arason VA, Sigurdsson JA, Erlendsdottir H, Gudmundsson S, Kristinsson KG. The role of antimicrobial use in the epidemiology of resistant pneumococci: A 10-year follow up. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 2006;12(3):169-76.
30. de Man P, Verhoeven BA, Verbrugh HA, Vos MC, van den Anker JN. An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *Lancet Lond Engl.* 18 de marzo de 2000;355(9208):973-8.
31. Willemsen I, Cooper B, van Buitenen C, Winters M, Andriess G, Kluytmans J. Improving quinolone use in hospitals by using a bundle of interventions in an interrupted time series analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2010;54(9):3763-9.
32. Comisión Europea. Decisión de Ejecución de la Comisión, de 12 de noviembre de 2013, sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos [notificada con el número C(2013) 7145] Texto pertinente a efectos del EEE. 12 de noviembre de 2013;14.
33. ECDC\_EMEA. The bacterial challenge, time to react: a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Stockholm: ECDC; 2009. 42 p. (ECDC/EMEA joint technical report).
34. Bassetti M, Righi E. Development of novel antibacterial drugs to combat multiple resistant organisms. *Langenbecks Arch Surg.* febrero de 2015;400(2):153-65.
35. Singh SB, Young K, Silver LL. What is an «ideal» antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochem Pharmacol.* 01 de 2017;133:63-73.

36. Zhanel GG, Chung P, Adam H, Zelenitsky S, Denisuik A, Schweizer F, et al. Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/ $\beta$ -lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs*. enero de 2014;74(1):31-51.
37. Tuon FF, Rocha JL, Formigoni-Pinto MR. Pharmacological aspects and spectrum of action of ceftazidime-avibactam: a systematic review. *Infection*. abril de 2018;46(2):165-81.
38. Giamarellou H. Treatment options for multidrug-resistant bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 1 de agosto de 2006;4(4):601-18.
39. Srinivas P, Rivard K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. *Curr Infect Dis Rep*. 11 de septiembre de 2017;19(11):38.
40. Wang R, Liu Y, Zhang Q, Jin L, Wang Q, Zhang Y, Wang X, Hu M, Li L, Qi J, Luo Y, Wang H. The prevalence of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from food animals in China: coexistence of *mcr-1* and *bla<sub>NDM</sub>* with low fitness cost. *Int J Antimicrob Agents*. mayo de 2018;51(5):739-44.
41. ECDC: Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [Internet]. [citado 6 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf>
42. Infectious Diseases Society of America. The 10 x '20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de abril de 2010;50(8):1081-3.
43. IMI mission and objectives [Internet]. IMI Innovative Medicines Initiative. [citado 7 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.imi.europa.eu/about-imi/mission-objectives>
44. Boucher HW, Talbot GH, Benjamin DK, Bradley J, Guidos RJ, Jones RN, et al. 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de junio de 2013;56(12):1685-94.
45. WHO: Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. [Internet]. [citado 4 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258965/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf?sequence=1>
46. J.R. Maestre LA. Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. *Rev Esp Quimioter*. 2001;(14):17-21.
47. Wiederhold NP. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist*. 2017;10:249-59.
48. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis*. 15 de agosto de 2017;216(suppl\_3):S445-51.
49. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med*. enero de 2012;125(1 Suppl):S3-13.
50. Mazu TK, Bricker BA, Flores-Rozas H, Ablordeppey SY. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. *Mini Rev Med Chem*. 2016;16(7):555-78.
51. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. *Front Microbiol*. 2016;7:2173.
52. Ball AR, Tegos GP. Emerging antimicrobial drug-discovery strategies: an evolving necessity. En: Tegos A, Mylonakis E, editores. *Antimicrobial drug discovery: emerging strategies* [Internet]. Wallingford: CABI; 2012 [citado 10 de julio de 2018]. p. 7-25. Disponible en: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20123306541>

53. Allen HK, Trachsel J, Looft T, Casey TA. Finding alternatives to antibiotics. *Ann N Y Acad Sci.* septiembre de 2014;1323:91-100.
54. Dehghan Esmatabadi MJ, Bozorgmehr A, Hajjari SN, Sadat Sombolestani A, Malekshahi ZV, Sadeghizadeh M. Review of new insights into antimicrobial agents. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr.* 28 de febrero de 2017;63(2):40-8.
55. García-Quintanilla M, Pulido MR, López-Rojas R, Pachón J, McConnell MJ. Emerging therapies for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Trends Microbiol.* marzo de 2013;21(3):157-63.
56. Pérez-Laguna V, García-Malinis AJ, Aspiroz C, Rezusta A, Gilaberte Y. Antimicrobial effects of photodynamic therapy: an overview. *G Ital Dermatol E Venereol Organo Uff Soc Ital Dermatol E Sifilogr.* 19 de abril de 2018;
57. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* junio de 2006;38(5):468-81.
58. Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St Denis TG, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol.* 2012;3:120.
59. Dai T, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* diciembre de 2009;6(3-4):170-88.
60. Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J Environ Pathol Toxicol Oncol Off Organ Int Soc Environ Toxicol Cancer.* 2006;25(1-2):505-19.
61. Sperandio FF, Huang Y-Y, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* agosto de 2013;8(2):108-20.
62. Huang L, Dai T, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2010;635:155-73.
63. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* julio de 1998;42(1):13-28.
64. Woodburn K. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy By Raymond Bonnett (University of London). Gordon and Breach Science Publishers: London and Newark [Internet]. Vol. 123. 2001 [citado 7 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/ja0048228>
65. Sellera FP SC, Hamblin MR. Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice. Chapter 1. History of PDT [Internet]. Sellera FP NC, Ribeiro MS, editores. Springer International Publishing; 2017 [citado 7 de septiembre de 2018]. XV, 228. Disponible en: <https://www.springer.com/us/book/9783319450063>
66. Szeimies R. M. DJ, Abels C. LM. Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology. Chapter 1: History and Basics [Internet]. 1.<sup>a</sup> ed. Calzavara-Pinton P. SRM, Ortel B., editores. Vol. 2. [citado 7 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/photodynamic-therapy-and-fluorescence-diagnosis-in-dermatology/calzavara-pinton/978-0-444-50828-7>
67. Kirshfeld F, Boyle W. *Nature Doctors: Pioneers in Naturopathic Medicine.* 2nd edition. East Palestine, Ohio: NCM Press; 1994. 351 p.
68. Raab O. Uber die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. *Zeitschr Biol.* 1900;39:524-46.
69. Hamblin M. Advances in photodynamic therapy: basic, translational and clinical. Chapter 1: History of PDT; The first hundred years [Internet]. Artech House, Inc; 2008 [citado 4 de septiembre de 2018]. (Engineering in Medicine & Biology). Disponible en: <http://www.webmedbooks.com/asu/content/productdetail.aspx/upc=c47ee885-5dae-4e02-b3d9-42bf35795842>

70. Schleyer V, Szeimies R. Photodynamic Therapy with ALA: A Clinical Handbook. Chapter 3: ALA/MAL-PDT in dermatology. Pottier RH, editor. Royal Society of Chemistry; 2006. 291 p.
71. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 15 de febrero de 2016;473(4):347-64.
72. Gheewala T, Skwor T, Munirathinam G. Photosensitizers in prostate cancer therapy. *Oncotarget.* 2 de mayo de 2017;8(18):30524-38.
73. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol.* enero de 1992;55(1):89-96.
74. Acher AJ, Juven BJ. Destruction of coliforms in water and sewage water by dye-sensitized photooxidation. *Appl Environ Microbiol.* mayo de 1977;33(5):1019-22.
75. Spielvogeli H. El lado oscuro del oxígeno. *Scientifica.* 2008;1:57-61.
76. Verhoeven JW. Glossary of terms used in photochemistry (IUPAC Recommendations 1996). *Pure Appl Chem.* 1 de enero de 1996;68(12):2223-86.
77. Óptica con microondas - III. La polarización de las ondas [Internet]. [citado 2 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/anilandro/03626-microondas-opt-03>
78. Qué es la luz azul y por qué debería importarte [Internet]. [citado 2 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://linazasoro-optika.eus/la-luz-azul-deberia-importarte/>
79. Kishen A. Endodontic Microbiology. Chapter 13: Topical Antimicrobials in Endodontics [Internet]. 2.<sup>a</sup> ed. Ashraf FF, editor. Wiley-Blackwell; 2017 [citado 7 de septiembre de 2018]. 472 p. Disponible en: <https://www.wiley.com/en-us/Endodontic+Microbiology%2C+2nd+Edition-p-9781118975503>
80. Brancalion L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):173-86.
81. Yoon I, Li JZ, Shim YK. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc.* enero de 2013;46(1):7-23.
82. Pérez-Laguna V, Rezusta A, Ramos JJ, Ferrer LM, Gené J, Revillo MJ, et al. Daylight photodynamic therapy using methylene blue to treat sheep with dermatophytosis caused by *Arthroderma vanbreuseghemii*. *Small Rumin Res.* 1 de mayo de 2017;150:97-101.
83. Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J, et al. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiol.* 26 de septiembre de 2015;15:187.
84. Pérez-Laguna V, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, García-Luque I, Ballesta S, Nonell S, et al. Bactericidal Effect of Photodynamic Therapy, Alone or in Combination with Mupirocin or Linezolid, on *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* 2017;8:1002.
85. Pérez-Laguna V, García-Luque I, Ballesta S, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Samper S, et al. Antimicrobial photodynamic activity of Rose Bengal, alone or in combination with Gentamicin, against planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* marzo de 2018;21:211-6.
86. Huang Z, Xu H, Meyers AD, Musani AI, Wang L, Tagg R, et al. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors--potential and technical challenges. *Technol Cancer Res Treat.* agosto de 2008;7(4):309-20.
87. Juzeniene A, Juzenas P, Ma L-W, Iani V, Moan J. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2004;19(3):139-49.
88. Pérez-Laguna V, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, López SC, García-Luque I, Revillo MJ, et al. Comparative effect of photodynamic therapy on separated or mixed cultures of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* septiembre de 2017;19:98-102.

89. Beltrán A, Mikhailov M, Sokolov MN, Pérez-Laguna V, Rezusta A, Revillo MJ, et al. A photobleaching resistant polymer supported hexanuclear molybdenum iodide cluster for photocatalytic oxygenations and photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. *J Mater Chem B*. 14 de septiembre de 2016;4(36):5975-9.
90. Anderson RR. Clinical Photomedicine. Chapter 2: Optics of the Skin [Internet]. Anderson RR, Lim H, Soter N, editores. 2017 [citado 7 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/>
91. Bustamante J, Bredeston L, Malanga G, Mordoh J. Role of melanin as a scavenger of active oxygen species. *Pigment Cell Res*. octubre de 1993;6(5):348-53.
92. Morton CA, Brown SB, Collins S, Ibbotson S, Jenkinson H, Kurwa H, et al. Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group. *Br J Dermatol*. abril de 2002;146(4):552-67.
93. Wainwright M. «Safe» photoantimicrobials for skin and soft-tissue infections. *Int J Antimicrob Agents*. julio de 2010;36(1):14-8.
94. Vicentini C, Tylcz J-B, Maire C, Mordon S, Mortier L. Terapia fotodinámica. *EMC - Dermatol*. 1 de septiembre de 2017;51(3):1-8.
95. Gilaberte Y, Serra-Guillén C, Heras DL, Elena M, Ruiz-Rodríguez R, Fernández-Lorente M, et al. Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 1 de marzo de 2006;97(2):83-102.
96. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. junio de 2010;7(2):61-75.
97. Kataoka H, Nishie H, Hayashi N, Tanaka M, Nomoto A, Yano S, et al. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann Transl Med*. abril de 2017;5(8):183.
98. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X-H, Childs CJ, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. mayo de 2004;1(1):27-42.
99. Fotia C, Avnet S, Kusuzaki K, Roncuzzi L, Baldini N. Acridine Orange is an Effective Anti-Cancer Drug that Affects Mitochondrial Function in Osteosarcoma Cells. *Curr Pharm Des*. 2015;21(28):4088-94.
100. Kusuzaki K, Matsubara T, Murata H, Logozzi M, Iessi E, Di Raimo R, et al. Natural extracellular nanovesicles and photodynamic molecules: is there a future for drug delivery? *J Enzyme Inhib Med Chem*. diciembre de 2017;32(1):908-16.
101. Markovi Z. Electronic Absorption Spectra of Substituted Anthraquinones and Their Simulation Using ZINDO/S Method. 2008;2(2):7.
102. Marioni J, Bresolí-Obach R, Agut M, Comini LR, Cabrera JL, Paraje MG, et al. On the mechanism of *Candida tropicalis* biofilm reduction by the combined action of naturally-occurring anthraquinones and blue light. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181517.
103. Kariminezhad H, Amani H, Khanbabaie R, Biglarnia M. Photodynamic Inactivation of *E. coli* PTCC 1276 Using Light Emitting Diodes: Application of Rose Bengal and Methylene Blue as Two Simple Models. *Appl Biochem Biotechnol*. julio de 2017;182(3):967-77.
104. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol*. 2014;5:405.
105. Ragàs X, Dai T, Tegos GP, Agut M, Nonell S, Hamblin MR. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: in vitro and in vivo studies. *Lasers Surg Med*. julio de 2010;42(5):384-90.
106. Melough MM, Lee SG, Cho E, Kim K, Provatias AA, Perkins C, et al. Identification and Quantitation of Furocoumarins in Popularly Consumed Foods in the U.S. Using QuEChERS Extraction Coupled with UPLC-MS/MS Analysis. *J Agric Food Chem*. 21 de junio de 2017;65(24):5049-55.

107. Nordlund JJ. The Medical Treatment of Vitiligo: An Historical Review. *Dermatol Clin.* abril de 2017;35(2):107-16.
108. Kornilovskiy IM, Kasimov EM, Sultanova AI, Burtsev AA. Laser-induced corneal cross-linking upon photorefractive ablation with riboflavin. *Clin Ophthalmol Auckl NZ.* 2016;10:587-92.
109. del Buey MA, Cristóbal JA, Casas P, Goñi P, Clavel A, Mínguez E, et al. Evaluation of in vitro efficacy of combined riboflavin and ultraviolet a for *Acanthamoeba* isolates. *Am J Ophthalmol.* marzo de 2012;153(3):399-404.
110. Schrier A, Greebel G, Attia H, Trokel S, Smith EF. In vitro antimicrobial efficacy of riboflavin and ultraviolet light on *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Refract Surg Thorofare NJ* 1995. septiembre de 2009;25(9):S799-802.
111. Fracalossi C, Nagata JY, Pellosi DS, Terada RSS, Hioka N, Baesso ML, et al. Singlet oxygen production by combining erythrosine and halogen light for photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* septiembre de 2016;15:127-32.
112. Ishiyama K, Nakamura K, Kanno T, Niwano Y. Bactericidal Action of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) with Photosensitizers Used as Plaque-Disclosing Agents against Experimental Biofilm. *Biocontrol Sci.* 2016;21(3):187-91.
113. Moore MR. An Historical Introduction to Porphyrin and Chlorophyll Synthesis. En: *Tetrapyrroles* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2009 [citado 4 de septiembre de 2018]. p. 1-28. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-78518-9\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-78518-9_1)
114. Gajdos A. [Quantitative regulation of porphyrins and heme biosynthesis]. *G Clin Med.* enero de 1968;49(1):1-6.
115. Stockert JC, Cañete M, Juarranz A, Villanueva A, Horobin RW, Borrell JI, et al. Porphycenes: facts and prospects in photodynamic therapy of cancer. *Curr Med Chem.* 2007;14(9):997-1026.
116. Roncucci G, Fantetti L, Filippis MPD, Dei D, Jori G. Substituted metal-phthalocyanines, their preparation and the use thereof [Internet]. US7749991B2, 2010 [citado 10 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/US7749991B2/en>
117. Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met-Based Drugs.* 2008;2008:276109.
118. Narumi A, Tsuji T, Shinohara K, Yamazaki H, Kikuchi M, Kawaguchi S, et al. Maltotriose-conjugation to a fluorinated chlorin derivative generating a PDT photosensitizer with improved water-solubility. *Org Biomol Chem.* 14 de abril de 2016;14(14):3608-13.
119. Senge MO, Brandt JC. Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)--a second-generation photosensitizer. *Photochem Photobiol.* diciembre de 2011;87(6):1240-96.
120. Ragàs X, Sánchez-García D, Ruiz-González R, Dai T, Agut M, Hamblin MR, et al. Cationic porphycenes as potential photosensitizers for antimicrobial photodynamic therapy. *J Med Chem.* 11 de noviembre de 2010;53(21):7796-803.
121. Ruiz-González R, Agut M, Reddi E, Nonell S. A Comparative Study on Two Cationic Porphycenes: Photophysical and Antimicrobial Photoinactivation Evaluation. *Int J Mol Sci.* 12 de noviembre de 2015;16(11):27072-86.
122. EFSA. Scientific Opinion on the re-evaluation of curcumin (E 100) as a food additive. *EFSA J.* 1 de septiembre de 2010;8(9):1679.
123. Chainani-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med N Y N.* febrero de 2003;9(1):161-8.

124. Nardo L, Maspero A, Penoni A, Palmisano G, Ferrari E, Saladini M. Excited state dynamics of bis-dehydroxycurcumin tert-butyl ester, a diketo-shifted derivative of the photosensitizer curcumin. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175225.
125. Hegge AB, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photoinactivation of *Staphylococcus epidermidis* biofilms and suspensions by the hydrophobic photosensitizer curcumin--effect of selected nanocarrier: studies on curcumin and curcuminoides XLVII. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 30 de agosto de 2012;47(1):65-74.
126. Singh R, Tønnesen HH, Kristensen S, Berg K. The influence of Pluronic® on dark cytotoxicity, photocytotoxicity, localization and uptake of curcumin in cancer cells: studies of curcumin and curcuminoids XLIX. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol*. marzo de 2013;12(3):559-75.
127. Maverick AW, Gray HB. Luminescence and redox photochemistry of the molybdenum(II) cluster Mo<sub>6</sub>Cl<sub>14</sub>2-. *J Am Chem Soc*. 1 de marzo de 1981;103(5):1298-300.
128. Jackson JA, Turro C, Newsham MD, Nocera DG. Oxygen quenching of electronically excited hexanuclear molybdenum and tungsten halide clusters. *J Phys Chem*. 1 de mayo de 1990;94(11):4500-7.
129. Jackson JA, Newsham MD, Worsham C, Nocera DG. Efficient Singlet Oxygen Generation from Polymers Derivatized with Hexanuclear Molybdenum Clusters. *Chem Mater*. 1 de enero de 1996;8(2):558-64.
130. Sokolov MN, Mihailov MA, Peresyphkina EV, Brylev KA, Kitamura N, Fedin VP. Highly luminescent complexes [Mo<sub>6</sub>X<sub>8</sub>(n-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>COO)<sub>6</sub>]<sup>2-</sup> (X = Br, I). *Dalton Trans*. 7 de junio de 2011;40(24):6375-7.
131. Kirakci K, Kubát P, Dušek M, Fejfarová K, Šícha V, Mosinger J, et al. A Highly Luminescent Hexanuclear Molybdenum Cluster – A Promising Candidate toward Photoactive Materials. *Eur J Inorg Chem*. 1 de julio de 2012;2012(19):3107-11.
132. Mikhailov MA, Brylev KA, Abramov PA, Sakuda E, Akagi S, Ito A, et al. Synthetic Tuning of Redox, Spectroscopic, and Photophysical Properties of {Mo<sub>6</sub>I<sub>8</sub>}<sup>4+</sup> Core Cluster Complexes by Terminal Carboxylate Ligands. *Inorg Chem*. 6 de septiembre de 2016;55(17):8437-45.
133. Felip-León C, Valle CA del, Pérez-Laguna V, Millán-Lou MI, Miravet JF, Mikhailov M, et al. Superior performance of macroporous over gel type polystyrene as a support for the development of photo-bactericidal materials. *J Mater Chem B*. 2 de agosto de 2017;5(30):6058-64.
134. Huang Y-Y, Sharma SK, Yin R, Agrawal T, Chiang LY, Hamblin MR. Functionalized fullerenes in photodynamic therapy. *J Biomed Nanotechnol*. septiembre de 2014;10(9):1918-36.
135. Hamblin MR. Fullerenes as photosensitizers in photodynamic therapy: pros and cons. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol*. 25 de julio de 2018;
136. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang Y-Y, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med*. septiembre de 2011;43(7):755-67.
137. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B*. mayo de 1997;39(1):1-18.
138. Vermeersch G, Ronfard-Haret JC, Bazin M, Carillet V, Morliere P, Santus R. Type I and type II photosensitization by the antibacterial drug nalidixic acid. A laser flash photolysis study. *Photochem Photobiol*. noviembre de 1991;54(5):661-6.
139. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. agosto de 2011;61(4):250-81.
140. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol*. mayo de 2004;3(5):436-50.

141. St Denis TG, Dai T, Izikson L, Astrakas C, Anderson RR, Hamblin MR, et al. All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence*. diciembre de 2011;2(6):509-20.
142. Golab J, Nowis D, Skrzycki M, Czacot H, Baranczyk-Kuzma A, Wilczynski GM, et al. Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. *J Biol Chem*. 3 de enero de 2003;278(1):407-14.
143. Eichner A, Pereira Gonzales F, Maisch T. Handbook of Photomedicine. Chapter 34: Antimicrobial PDT for clinical Infectious Diseases [Internet]. Hamblin MR, Huang Y, editores. 2013 [citado 11 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Photomedicine/Hamblin-Huang/p/book/9781439884690>
144. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. marzo de 2018;25(3):486-541.
145. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 17 de junio de 1998;90(12):889-905.
146. Liu Y, Qui R, Zaat S, Breukink e, Heger M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *J Clin Transl Res*. 2015;1:140-67.
147. Sharma SK, Dai T, Kharkwal GB, Huang Y-Y, Huang L, De Arce VJB, et al. Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models. *Curr Pharm Des*. 2011;17(13):1303-19.
148. Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV. The ancient Virus World and evolution of cells. *Biol Direct*. 19 de septiembre de 2006;1:29.
149. Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN. Introduction to modern virology. 6. ed., [Nachdr.]. Malden, Mass.: Blackwell; 2008. 516 p.
150. Fisher B, Harvey R, Champe P. Lippincott Illustrated Reviews: Microbiology. Chapter 33. Third, North American edition. Harvey R, Cornelissen C, editores. LWW; 2012. 448 (367-392).
151. Goris N, Vandenbussche F, De Clercq K. Potential of antiviral therapy and prophylaxis for controlling RNA viral infections of livestock. *Antiviral Res*. abril de 2008;78(1):170-8.
152. Carmichael LE. An annotated historical account of canine parvovirus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. octubre de 2005;52(7-8):303-11.
153. Magden J, Kääriäinen L, Ahola T. Inhibitors of virus replication: recent developments and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. marzo de 2005;66(6):612-21.
154. Witthöft T, Möller B, Wiedmann KH, Mauss S, Link R, Lohmeyer J, et al. Safety, tolerability and efficacy of peginterferon alpha-2a and ribavirin in chronic hepatitis C in clinical practice: The German Open Safety Trial. *J Viral Hepat*. noviembre de 2007;14(11):788-96.
155. Felber TD, Smith EB, Knox JM, Wallis C, Melnick JL. Photodynamic Inactivation of Herpes Simplex: Report of a Clinical Trial. *JAMA*. 15 de enero de 1973;223(3):289-92.
156. Kaufman RH, Gardner HL, Brown D, Wallis C, Rawls WE, Melnick JL. Herpes genitalis treated by photodynamic inactivation of virus. *Am J Obstet Gynecol*. 15 de diciembre de 1973;117(8):1144-6.
157. Wang H-W, Zhang L-L, Miao F, Lv T, Wang X-L, Huang Z. Treatment of HPV infection-associated cervical condylomata acuminata with 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. junio de 2012;88(3):565-9.
158. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*. octubre de 2015;13(10):620-30.

- 
159. Gram C. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschr Med.* 1884;2:185-9.
  160. Sharma SK, Chiang LY, Hamblin MR. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream? *Nanomed.* diciembre de 2011;6(10):1813-25.
  161. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol.* diciembre de 2004;17(3):245-54.
  162. Sabbahi S, Ben Ayed L, Boudabbous A. Cationic, anionic and neutral dyes: effects of photosensitizing properties and experimental conditions on the photodynamic inactivation of pathogenic bacteria. *J Water Health.* diciembre de 2013;11(4):590-9.
  163. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología médica. Capítulo 22: Mycobacterium y bacterias ácido-alcohol resistentes relacionadas* [Internet]. 8.<sup>a</sup> ed. Elsevier; 2017 [citado 11 de septiembre de 2018]. 848 p. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/microbiologia-medica-studentconsult-en-espanol-studentconsult/murray/978-84-9113-076-5#>
  164. Wozniak A, Grinholc M. Combined Antimicrobial Activity of Photodynamic Inactivation and Antimicrobials-State of the Art. *Front Microbiol.* 2018;9:930.
  165. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* abril de 2002;15(2):167-93.
  166. de Melo WCMA, Avci P, de Oliveira MN, Gupta A, Vecchio D, Sadasivam M, et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* julio de 2013;11(7):669-93.
  167. Sears CL. A dynamic partnership: celebrating our gut flora. *Anaerobe.* octubre de 2005;11(5):247-51.
  168. Ishige T, Honda K, Shimizu S. Whole organism biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol.* abril de 2005;9(2):174-80.
  169. Engelkirk PG, Duben-Engelkirk J. *Laboratory diagnosis of infectious diseases: essentials of diagnostic microbiology. Chapter 9: Gram-Positive Cocci.* Baltimore: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins; 2008. 754 p. (The point).
  170. Kirk PM, Ainsworth GC. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi.* 10.<sup>a</sup> ed. CAB International; 2013. 772 p.
  171. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* agosto de 2006;28(8):799-808.
  172. Walker K, Skelton H, Smith K. Cutaneous lesions showing giant yeast forms of *Blastomyces dermatitidis*. *J Cutan Pathol.* 9 de diciembre de 2002;29(10):616–618.
  173. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, et al. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* abril de 2000;30(4):662-78.
  174. Castrillon L, Ramos AP, Desgarenes CP. Virulence factors of *Candida* sp. *Dermatol Rev Mex.* 1 de enero de 2005;49:12-27.
  175. Chapman SW, Sullivan DC, Cleary JD. In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2008;119:197-215; discussion 215-216.
  176. Kibbler CC, Seaton S, Barnes RA, Gransden WR, Holliman RE, Johnson EM, et al. Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. *J Hosp Infect.* mayo de 2003;54(1):18-24.

177. Suleyman G, Alangaden GJ. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(4):1023-52.
178. Ricardo E, Miranda IM, Faria-Ramos I, Silva RM, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. In vivo and in vitro acquisition of resistance to voriconazole by *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* agosto de 2014;58(8):4604-11.
179. Paula-Mattiello S, Oliveira SD de, Medina-Silva R. In vitro evaluation of hydrolytic enzyme activity and biofilm formation of *Candida parapsilosis* species complex from a nosocomial environment. *Rev Soc Bras Med Trop.* agosto de 2017;50(4):558-61.
180. García-Sánchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo J-M, d'Enfert C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell.* abril de 2004;3(2):536-45.
181. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun.* febrero de 2002;70(2):878-88.
182. Karray M, McKinney WP. Tinea, Versicolor. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 [citado 12 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482500/>
183. Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Pathogenesis of Dermatophytosis: Sensing the Host Tissue. *Mycopathologia.* febrero de 2017;182(1-2):215-27.
184. Simpanya MF. Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi. Chapter 1: Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity [Internet]. RKS Kushwaha, J Guarro, editores. *Revista Iberoamericana de Micología*; 2000 [citado 12 de septiembre de 2018]. 1-12 p. Disponible en: <https://www.dermatophytes.reviberoammicol.com/>
185. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol.* 1 de marzo de 2010;28(2):197-201.
186. Berg JC, Hamacher KL, Roberts GD. Pseudomycetoma caused by *Microsporum canis* in an immunosuppressed patient: a case report and review of the literature. *J Cutan Pathol.* mayo de 2007;34(5):431-4.
187. Costa JEF, Neves RP, Delgado MM, Lima-Neto RG, Morais VMS, Coêlho MRCD. Dermatophytosis in patients with human immunodeficiency virus infection: clinical aspects and etiologic agents. *Acta Trop.* octubre de 2015;150:111-5.
188. Lopes G, Pinto E, Salgueiro L. Natural Products: An Alternative to Conventional Therapy for Dermatophytosis? *Mycopathologia.* febrero de 2017;182(1-2):143-67.
189. Paz-Cristobal MP, Gilaberte Y, Alexandre C, Pardo J, Revillo MJ, Rezusta A. In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Trichophyton* spp. *Mycopathologia.* octubre de 2014;178(3-4):221-5.
190. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* febrero de 2002;93(2):155-60.
191. CDC - Parasites [Internet]. 2018 [citado 12 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/index.html>
192. CDC - Parasites - Neglected Parasitic Infections (NPIs) in the United States [Internet]. 2018 [citado 12 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/npi/index.html>
193. van der Snoek EM, Robinson DJ, van Hellemond JJ, Neumann H a. M. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* agosto de 2008;22(8):918-22.

194. Enk CD, Nasereddin A, Alper R, Dan-Goor M, Jaffe CL, Wulf HC. Cutaneous leishmaniasis responds to daylight-activated photodynamic therapy: proof of concept for a novel self-administered therapeutic modality. *Br J Dermatol.* 2015;172(5):1364-70.
195. Alouini Z, Jemli M. Destruction of helminth eggs by photosensitized porphyrin. *J Environ Monit JEM.* octubre de 2001;3(5):548-51.
196. Häder D-P, Schmidl J, Hilbig R, Oberle M, Wedekind H, Richter P. Fighting fish parasites with photodynamically active chlorophyllin. *Parasitol Res.* junio de 2016;115(6):2277-83.
197. Fabris C, Ouédraogo RK, Coppellotti O, Dabiré RK, Diabaté A, Di Martino P, et al. Efficacy of sunlight-activatable porphyrin formulates on larvae of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *An. arabiensis*: a potential novel biolarvicide for integrated malaria vector control. *Acta Trop.* septiembre de 2012;123(3):239-43.
198. Coppellotti O, Fabris C, Soncin M, Magaraggia M, Camerin M, Jori G, et al. Porphyrin photosensitised processes in the prevention and treatment of water- and vector-borne diseases. *Curr Med Chem.* 2012;19(6):808-19.
199. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* agosto de 2007;86(8):694-707.
200. Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio R a. C, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys.* diciembre de 2016;26(12).
201. Fekrazad R, Seraj B, Chiniforush N, Rokouei M, Mousavi N, Ghadimi S. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on the counts of salivary *Streptococcus mutans* in children with severe early childhood caries. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* junio de 2017;18:319-22.
202. Berakdar M, Callaway A, Eddin MF, Ross A, Willershausen B. Comparison between scaling-root-planing (SRP) and SRP/photodynamic therapy: six-month study. *Head Face Med.* 5 de abril de 2012;8:12.
203. Piraccini BM, Rech G, Tosti A. Photodynamic therapy of onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*. *J Am Acad Dermatol.* noviembre de 2008;59(5 Suppl):S75-76.
204. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Capezzer R, Sala R, Zane C. Photodynamic therapy of interdigital mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* junio de 2004;20(3):144-7.
205. Gilaberte Y, Aspiroz C, Martes MP, Alcalde V, Espinel-Ingroff A, Rezusta A. Treatment of refractory fingernail onychomycosis caused by nondermatophyte molds with methylaminolevulinate photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol.* septiembre de 2011;65(3):669-71.
206. Wang H-W, Lv T, Zhang L-L, Guo M-X, Stepp H, Yang K, et al. Prospective study of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of moderate to severe acne vulgaris in Chinese patients. *J Cutan Med Surg.* octubre de 2012;16(5):324-33.
207. Maraccini PA, Wenk J, Boehm AB. Photoinactivation of Eight Health-Relevant Bacterial Species: Determining the Importance of the Exogenous Indirect Mechanism. *Environ Sci Technol.* 17 de 2016;50(10):5050-9.
208. Sassoubre LM, Nelson KL, Boehm AB. Mechanisms for photoinactivation of *Enterococcus faecalis* in seawater. *Appl Environ Microbiol.* noviembre de 2012;78(21):7776-85.
209. Wainwright M. The emerging chemistry of blood product disinfection. *Chem Soc Rev.* marzo de 2002;31(2):128-36.
210. Politis C, Kavallierou L, Hantziara S, Katsea P, Triantaphylou V, Richardson C, et al. Quality and safety of fresh-frozen plasma inactivated and leucoreduced with the Theraflex methylene blue system including the Blueflex filter: 5 Years' experience. *Vox Sang.* 1 de junio de 2007;92:319-26.

211. Wainwright M. Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *Int J Antimicrob Agents*. diciembre de 2000;16(4):381-94.
212. Bonnett R, Buckley DG, Burrow T, Galia ABB, Saville B, Songca SP. Photobactericidal materials based on porphyrins and phthalocyanines. *J Mater Chem*. 1 de enero de 1993;3(3):323-4.
213. Bozja J, Sherrill J, Michielsen S, Stojiljkovic I. Porphyrin-based, light-activated antimicrobial materials. *J Polym Sci Part Polym Chem*. 1 de agosto de 2003;41(15):2297-303.
214. Brady C, Bell SEJ, Parsons C, Gorman SP, Jones DS, McCoy CP. Novel porphyrin-incorporated hydrogels for photoactive intraocular lens biomaterials. *J Phys Chem B*. 25 de enero de 2007;111(3):527-34.
215. Wilson M. Light-activated antimicrobial coating for the continuous disinfection of surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*. octubre de 2003;24(10):782-4.
216. Galstyan A, Schiller R, Dobrindt U. Boronic Acid Functionalized Photosensitizers: A Strategy To Target the Surface of Bacteria and Implement Active Agents in Polymer Coatings. *Angew Chem Int Ed Engl*. 21 de agosto de 2017;56(35):10362-6.
217. Lauro FM, Pretto P, Covolo L, Jori G, Bertoloni G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol*. julio de 2002;1(7):468-70.
218. Tavares A, Carvalho CMB, Faustino MA, Neves MGPM, Tomé JPC, Tomé AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs*. 20 de enero de 2010;8(1):91-105.
219. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med*. 1996;18(3):253-9.
220. Tang HM, Hamblin MR, Yow CMN. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*. abril de 2007;13(2):87-91.
221. Mang TS, Mikulski L, Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. junio de 2010;7(2):98-105.
222. Cassidy CM, Tunney MM, McCarron PA, Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B*. 4 de mayo de 2009;95(2):71-80.
223. Morton CA, McKenna KE, Rhodes LE, British Association of Dermatologists Therapy Guidelines and Audit Subcommittee and the British Photodermatology Group. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol*. diciembre de 2008;159(6):1245-66.
224. Juzeniene A, Grigalavicius M, Juraleviciute M, Grant WB. Phototherapy and vitamin D. *Clin Dermatol*. octubre de 2016;34(5):548-55.
225. Jarrett P, Scragg R. A short history of phototherapy, vitamin D and skin disease. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol*. 16 de marzo de 2017;16(3):283-90.
226. Bjordal JM, Johnson MI, Iversen V, Aimbire F, Lopes-Martins RAB. Low-level laser therapy in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomed Laser Surg*. abril de 2006;24(2):158-68.
227. Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers Surg Med*. 2002;30(1):60-6.

- 
228. Fila G, Kasimova K, Arenas Y, Nakonieczna J, Grinholc M, Bielawski KP, et al. Murine Model Imitating Chronic Wound Infections for Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy Efficacy. *Front Microbiol.* 2016;7:1258.
229. Silva ZS, Bussadori SK, Fernandes KPS, Huang Y-Y, Hamblin MR. Animal models for photodynamic therapy (PDT). *Biosci Rep.* 28 de septiembre de 2015;35(6).
230. Chibebe Junior J, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB, et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. *BMC Microbiol.* 1 de octubre de 2013;13:217.
231. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, et al. Photodynamic therapy can induce a protective innate immune response against murine bacterial arthritis via neutrophil accumulation. *PLoS One.* 2012;7(6):e39823.
232. Pogue BW, Elliott JT, Kanick SC, Davis SC, Samkoe KS, Maytin EV, et al. Revisiting photodynamic therapy dosimetry: reductionist & surrogate approaches to facilitate clinical success. *Phys Med Biol.* 7 de abril de 2016;61(7):R57-89.
233. Berthiaume F, Reiken SR, Toner M, Tompkins RG, Yarmush ML. Antibody-targeted photolysis of bacteria in vivo. *Biotechnol Nat Publ Co.* julio de 1994;12(7):703-6.
234. Embleton ML, Nair SP, Heywood W, Menon DC, Cookson BD, Wilson M. Development of a novel targeting system for lethal photosensitization of antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2005;49(9):3690-6.
235. Gad F, Zahra T, Francis KP, Hasan T, Hamblin MR. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol.* mayo de 2004;3(5):451-8.
236. Calixto GMF, Bernegossi J, de Freitas LM, Fontana CR, Chorilli M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Mol Basel Switz.* 11 de marzo de 2016;21(3):342.
237. Rout B, Liu C-H, Wu W-C. Photosensitizer in lipid nanoparticle: a nano-scaled approach to antibacterial function. *Sci Rep.* 11 de agosto de 2017;7(1):7892.
238. Trigo Gutierrez JK, Zanatta GC, Ortega ALM, Balastegui MIC, Sanitá PV, Pavarina AC, et al. Encapsulation of curcumin in polymeric nanoparticles for antimicrobial Photodynamic Therapy. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187418.
239. Sun J, Kormakov S, Liu Y, Huang Y, Wu D, Yang Z. Recent Progress in Metal-Based Nanoparticles Mediated Photodynamic Therapy. *Mol Basel Switz.* 12 de julio de 2018;23(7).
240. Ung P, Clerc M, Huang H, Qiu K, Chao H, Seitz M, et al. Extending the Excitation Wavelength of Potential Photosensitizers via Appendage of a Kinetically Stable Terbium(III) Macrocyclic Complex for Applications in Photodynamic Therapy. *Inorg Chem.* 17 de julio de 2017;56(14):7960-74.
241. Tsai T, Chien H-F, Wang T-H, Huang C-T, Ker Y-B, Chen C-T. Chitosan augments photodynamic inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* mayo de 2011;55(5):1883-90.
242. Chen C-P, Hsieh C-M, Tsai T, Yang J-C, Chen C-T. Optimization and Evaluation of a Chitosan/Hydroxypropyl Methylcellulose Hydrogel Containing Toluidine Blue O for Antimicrobial Photodynamic Inactivation. *Int J Mol Sci.* 1 de septiembre de 2015;16(9):20859-72.
243. Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* enero de 2008;52(1):299-305.

244. Nuñez SC, Yoshimura TM, Ribeiro MS, Junqueira HC, Maciel C, Coutinho-Neto MD, et al. Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. *J Photochem Photobiol B*. septiembre de 2015;150:31-7.
245. Wen X, Zhang X, Szweczyk G, El-Hussein A, Huang Y-Y, Sarna T, et al. Potassium Iodide Potentiates Antimicrobial Photodynamic Inactivation Mediated by Rose Bengal in In Vitro and In Vivo Studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(7).
246. Barra F, Roschetto E, Soriano AA, Vollaro A, Postiglione I, Pierantoni GM, et al. Photodynamic and Antibiotic Therapy in Combination to Fight Biofilms and Resistant Surface Bacterial Infections. *Int J Mol Sci*. 28 de agosto de 2015;16(9):20417-30.
247. Dos Santos JD, de Alvarenga JA, Rossoni RD, García MT, Moraes RM, Anbinder AL, et al. Immunomodulatory effect of photodynamic therapy in *Galleria mellonella* infected with *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog*. septiembre de 2017;110:507-11.
248. Huang Y-Y, Tanaka M, Vecchio D, Garcia-Diaz M, Chang J, Morimoto Y, et al. Photodynamic therapy induces an immune response against a bacterial pathogen. *Expert Rev Clin Immunol*. julio de 2012;8(5):479-94.
249. Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St Denis TG, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol*. 2012;3:120.
250. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*. octubre de 1993;6(4):428-42.
251. Orrett FA, Land M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence: current susceptibility patterns in Trinidad. *BMC Infect Dis*. 5 de mayo de 2006;6:83.
252. Saderi H, Owlia P, Habibi M. Mupirocin resistance among Iranian isolates of *Staphylococcus aureus*. *Med Sci Monit*. octubre de 2008;14(11):BR210-3.
253. Cattaneo D, Orlando G, Cozzi V, Cordier L, Baldelli S, Merli S, et al. Linezolid plasma concentrations and occurrence of drug-related haematological toxicity in patients with gram-positive infections. *Int J Antimicrob Agents*. junio de 2013;41(6):586-9.
254. Chen C, Chen Y, Wu P, Chen B. Update on new medicinal applications of gentamicin: evidence-based review. *J Formos Med Assoc*. febrero de 2014;113(2):72-82.
255. García-Malinis AJ, Milagro Beamonte A, Torres Sopena L, García-Callen O, Puertolas-Villacampa P, Gilaberte Y. Cutaneous sporotrichosis treated with methylene blue-daylight photodynamic therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. marzo de 2018;32(3):e90-1.

## *ANEXOS*

---

## ANEXO I

### ÁREA TEMÁTICA, FACTOR DE IMPACTO Y APORTACIÓN DEL DOCTORANDO EN COMPENDIO DE PUBLICACIONES.

	Referencia	Factor de impacto	Área temática	Categoría	Cuartil	Aportación del doctorando
Estudio 1	Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez Artiaga L, Lampaya Pérez V, Aporta Alfonso J, Pérez-Laguna V, García Luque I, Revillo MJ, Rezusta A. <i>In vitro</i> effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. BMC Microbiol. 2015 Sep 26;15(1):187.	2.644	Microbiology	Immunology and Microbiology: Microbiology	Q2	VLP conducted some experiments and helped to draft the manuscript. VPL is studying the photodynamic effect in co-cultures of <i>C. albicans</i> and <i>S. mutans</i> and she checked our results. She also revised the manuscript and contributed to the resolution of reviewer's reports.
				Medicine: Microbiology (medical)	Q1	
Estudio 2	Pérez-Laguna V, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Camacho-López S, García-Luque I, Revillo MJ, Nonell S, Gilaberte Y, Rezusta A. Comparative effect of photodynamic therapy on separated or mixed cultures of <i>Streptococcus mutans</i> and <i>Streptococcus sanguinis</i> . Photodiag Photodyn Ther. 2017 May 22.	2.212	Oncology	Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: Biophysics	Q3	Diseño del Estudio; Realización de experimentos; Análisis de resultados; Elaboración del manuscrito
				Medicine: Dermatology	Q2	
				Medicine: Oncology	Q3	
				Pharmacology (medical)	Q2	
Estudio 3	Pérez-Laguna V, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, García-Luque I, Ballesta S, Nonell S, Paz-Cristobal MP, Gilaberte Y, Rezusta A. Bactericidal Effect of Photodynamic Therapy, Alone or in Combination with Mupirocin or Linezolid, on <i>Staphylococcus aureus</i> . Front Microbiol. 2017 May 31;8:1002.	4.076	Microbiology	Immunology and Microbiology: Microbiology	Q1	VP participated in the design of the study, conducted all experiments, performed the figures and drafted the manuscript.
				Medicine: Microbiology (medical)	Q1	

<b>Estudio 4</b>	Pérez-Laguna V, García-Luque I, Ballesta S, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Soria-Lozano P, Rezusta A, Gilaberte Y. Antimicrobial photodynamic activity of Rose Bengal, alone or in combination with Gentamicin, against planktonic and biofilm <i>Staphylococcus aureus</i> . Photodiag Photodyn Ther. 2017	2.212	Oncology	Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: Biophysics	Q3	Participación en el diseño del Estudio; Realización de experimentos en suspensión; Análisis de resultados; Elaboración del manuscrito.
				Medicine: Dermatology	Q2	
				Medicine: Oncology	Q3	
				Pharmacology (medical)	Q2	
<b>Estudio 5</b>	Beltrán A, Mikhailov M, Sokolov MN, Pérez-Laguna V, Rezusta A, Revillo MJ, Galindo F. A photobleaching resistant polymer supported hexanuclear molybdenum iodide cluster for photocatalytic oxygenations and photodynamic inactivation of <i>Staphylococcus aureus</i> . J. Mater. Chem. B, 2016, 4, 5975	4.543	Materials Science, Biomaterials	Engineering: Biomedical engineering	Q1	Participación en el diseño del Estudio de inactivación de <i>S. aureus</i> ; Realización de experimentos de TFDA; Análisis de resultados; Participación en la elaboración del manuscrito (parte de TFDA)
				Chemistry: Chemistry (miscellaneous)	Q1	
				Materials Science: Material science	Q1	
				Medicine: Medicine (miscellaneous)	Q1	
<b>Estudio 6</b>	Pérez-Laguna V, Rezusta A, Ramos JJ, Ferrer LM, Gene J, Revillo MJ, Gilaberte Y. Daylight photodynamic therapy using methylene blue to treat sheep with dermatophytosis caused by <i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> . Small Ruminant Research, 2017 May 1; 150:97-101	0.947	Agriculture, Dairy & Animal Science	Agricultural and Biological Sciences: Animal science and zoology	Q2	Participación en el diseño del Estudio; Recogida de muestras; Realización de experimentos; Seguimiento del tratamiento; Elaboración del manuscrito
				Veterinary: Food animals	Q2	

### PUBLICACIONES SECUNDARIAS RELACIONADAS CON LA TESIS

- 1.- Lozano C, Rezusta A, Ferrer I, **Pérez-Laguna V**, Zarazaga M, Ruiz-Ripa L, Revillo MJ, Torres C. ***Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission.** Vector Borne Zoonotic Dis. 2017 Apr;17(4):268-270.
  
- 2.- Felip-León C, Arnau del Valle C, **Pérez-Laguna V**, Millán-Lou MI, Miravet JF, Mikhailov M, Sokolov MN, Rezusta-López A, Galindo F. **Superior performance of macroporous over gel type polystyrene as a support for the development of photo-bactericidal materials.** J. Mater. Chem. B, 2017,5, 6058-6064
  
- 3.- **Pérez-Laguna V**, García-Malinis AJ, Aspiroz C, Rezusta A, Gilaberte Y **Antimicrobial effects of photodynamic therapy: an overview.** G Ital Dermatol Venereol. 2018 Apr 19.

### ANEXO III

#### ÁREA TEMÁTICA, FACTOR DE IMPACTO Y APORTACIÓN DEL DOCTORANDO EN PUBLICACIONES SECUNDARIAS.

Referencia	Factor de impacto	Área temática y Categoría	Cuartil	Aportación del doctorando	Relación con la Tesis
Lozano C, Rezusta A, Ferrer I, Pérez-Laguna V, Zarazaga M, Ruiz-Ripa L, Revillo MJ, Torres C. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. Vector Borne Zoonotic Dis. 2017 Apr;17(4):268-270.	2.045	Medicine: Infectious diseases	Q2	Toma de muestras: Participación en realización de experimentos.	Estudio descriptivo de infección en piel y mucosas. Ilustra la idea One Health.
		Immunology and Microbiology: Microbiology	Q2		
		Immunology and Microbiology: Virology	Q2		
Felip-León C, Arnau del Valle C, Pérez-Laguna V, Millán-Lou MI, Miravet JF, Mikhailov M, Sokolov MN, Rezusta-López A, Galindo F. Superior performance of macroporous over gel type polystyrene as a support for the development of photo-bactericidal materials. J. Mater. Chem. B, 2017,5, 6058-6064	4.543	Engineering:Biomedical engineering	Q1	Participación en el diseño de la inactivación de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> ; Realización de experimentos de TFDA; Análisis de resultados y participación en la elaboración del manuscrito (parte de TFDA).	Continúa la línea de investigación del Estudio 3.
		Chemistry: Chemistry (miscellaneous)	Q1		
		Materials Science: Material science (miscellaneous)	Q1		
		Medicine: Medicine (miscellaneous)	Q1		
Pérez-Laguna V, García-Malinis AJ, Aspiroz C, Rezusta A, Gilaberte Y. Antimicrobial effects of photodynamic therapy: an overview. G Ital Dermatol Venereol. 2018 Apr 19. doi: 10.23736/S0392-0488.18.06007-8.	1.311	Medicine: Dermatology	Q3	Revisión de artículos y participación en la elaboración del manuscrito.	Artículo de revisión concebido a partir del trabajo realizado para la elaboración de la parte de introducción de la presente Tesis.
		Medicine: Medicine (miscellaneous)	Q2		



