

## Ingrés d'Acadèmics corresponents

# LA TERÀPIA FOTODINÀMICA ANTIMICROBIANA COM ESTRATÈGIA PER COMBATRE LES MALALTIES INFECCIOSES

Montserrat AGUT i BONSFILLS

El dia 27 de maig de 2016, el rotatiu americà Washington Post va treure una notícia que duia per títol "La superbacteria que els metges han estat tement acaba d'arribar als EUA". S'havia aïllat una *Escherichia coli* resistent a colistina, un antibiòtic d'últim recurs. Així la premsa reproduïa part de la informació publicada el dia anterior per Patrick McGann i altres autors a la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*<sup>1</sup>. Aquest fet il·lustra que no només la comunitat científica sinó la societat en general han pres consciència del perill que suposen els bacteris resistents als antibiòtics.

Com és conegut, al 1929, Fleming descobreix la penicil·lina, el primer antibiòtic. Aquest fàrmac va ser produït en grans quantitats a la dècada de 1940. L'èxit va portar a noves investigacions. Al 1944, Waksman i el seu equip van descobrir l'estreptomocina, que es va utilitzar ràpidament per tractar la tuberculosi. Havia començat l'era dels antibiòtics.

Amb el control de les infeccions, els metges van transformar la medicina. Les cirurgies invasives es van convertir en rutina. Avui, la quimioteràpia immunosupressora en el tractament del càncer o en pacients sotmesos a trasplantament d'òrgans és també una pràctica habitual. Tot s'ha traduït en què les persones vivim millor i durant més anys.

Però ara tot això està en perill; el control dels microorganismes està amenaçat per l'aparició de soques cada vegada més resistents. Al món, cada any 17 milions de persones moren per infeccions bacterianes i, d'entre aquestes, més de 13 milions de les morts s'atribueixen a malalties infeccioses emergents o al ressorgiment de malalties prèviament controlades pels antibiòtics.

L'existència de bacteris resistents ja va ser observada per primer cop a l'any 1940 per Abraham i Chain<sup>2</sup>. Llavors, aquests s'aïllaven només d'ambients hospitalaris. Ara és un fet comú. L'ampli ús d'antibiòtics en medicina humana i veterinària, així com en producció animal i en l'agricultura, han contribuït a la seva selecció. El proble-

ma ha augmentat molt ràpidament i alguns consideren que hem arribat a l'era post-antibiòtica. Per fer-hi front, cal disposar de nous fàrmacs i de tractaments alternatius als que els microorganismes no puguin desenvolupar-hi resistències. En aquest escenari, la teràpia fotodinàmica (TFD) pot tenir molt futur i, curiosament, ens torna als orígens del control del microorganismes, quan els colorants estaven entre els antimicrobians sintètics més utilitzats.

Els agents patògens resistents a antimicrobians, considerats com a principals amenaces per a la salut pública, es poden reunir en 4 grups:

1. Soques de *Staphylococcus aureus* resistent a la meticil·lina (MRSA).
2. Bacteris gramnegatius resistents a múltiples fàrmacs o a tots els antibiòtics d'ús comú que, tot i ser molt menys freqüent que els MRSA i d'altres grampositius, es tracta d'un grup de patògens oportunistes crítics en pacients malalts o immunodeficients com ara soques d'*Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Burkholderia cepacia*.
3. Soques de *Mycobacterium tuberculosis*, moderada i extremadament resistents: els primers, són resistents a la isoniazida i la rifampicina, mentre que els segons, són també resistents a la fluoroquinolona i almenys a un agent injectable de segona línia, com l'amikacina, kanamicina i/o capreomicina.
4. Llevats del gènere *Candida*: patògens oportunistes amb gran incidència en pacients immunodeficients i, també en presència de certs factors de risc. Les infeccions per *Candida* representen la tercera causa més comuna d'infecció relacionada amb els catèters, podent produir també infeccions greus en pacients amb implants i pròtesis.

## LA TERÀPIA FOTODINÀMICA ANTIMICROBIANA (TFDa)

No sabem exactament quan els éssers humans vam utilitzar la llum per primera vegada com a teràpia, però és ben sabut que les antigues civilitzacions dels egipcis, xinesos i indis combinaven la llum solar amb extractes de plantes per curar trastorns com la psoriasi. L'any 1900, Oskar Raab va descriure per primer cop la possibilitat de treure la vida a microorganismes, en concret protozous, mitjançant la combinació de la llum visible i l'eosina, un colorant fotosensibilitzador (FS)<sup>3</sup>.

La teràpia fotodinàmica (TFD) és la combinació de tres elements no tòxics per si mateixos; el primer, un producte químic capaç d'absorbir la llum; el segon, la llum i el tercer, l'oxigen<sup>4</sup>. Així, la TFDa requereix l'exposició microbiana a l'energia de la llum visible la qual provoca l'excitació de les molècules fotosensibilitzadores exògenes o endògenes, provocant la producció d'oxigen singlet i/o altres espècies reactives d'oxigen (EROs) que reaccionen amb els components intracel·lulars, donant com a resultat la destrucció o dany de les cèl·lules microbianes.

En medis biològics, l'efecte fotodinàmic que causa la fotooxidació de biomolècules tals com els àcids nucleics, proteïnes o lípids, amb la conseqüent mort cel·lular, es pot aconseguir mitjançant dos mecanismes diferents coneguts com de tipus I i de tipus II. En el de tipus I, el FS en el seu estat singlet o triplet excitat reacciona amb un substrat a través de transferència d'electrons o abstracció d'hidrogen produint radicals lliures que, en reaccionar amb l'oxigen, formen radicals peròxids i, al seu torn, inicien una reacció en cadena dels radicals. En el mecanisme de tipus II, el FS, comunament en el seu estat triplet, transfereix la seva energia a l'oxigen molecular en el seu estat elemental, portant al FS al seu estat fonamental i originant una molècula d'oxigen singlet ( $^1O_2$ ), espècie d'oxigen molt reactiva amb substrats rics en electrons, com les biomolècules cel·lulars.

El FS és òbviament un dels actors principals. El FS ideal ha de tenir propietats fotoquímiques adequades: un temps de vida llarg de l'estat triplet excitat, un alt rendiment quàntic per a la generació de les EROs, alts coeficients d'absorció en les regions vermell/infraroig proper de l'espectre on la penetració de la llum en el teixit és màxima i una alta fotoestabilitat<sup>5</sup>. El FS cal que es localitzi preferentment i millor exclusivament en les cèl·lules diana per evitar efectes colaterals. Això és el resultat d'un disseny químic apropiat. A més si s'empra

un FS exogen, la nanotecnologia pot millorar els tractaments, afavorint l'arribada de fàrmacs al seu objectiu o perquè algunes nanopartícules per se contribueixen a la mort microbiana<sup>6</sup>.

La TFDa, respecte a l'ús d'agents antimicrobians, té moltes avantatges; en citaré sis:

1. Presenta una doble selectivitat aconseguida per l'ús d'un FS amb una afinitat preferencial per a les cèl·lules microbianes junt amb aplicar la llum només a la zona a tractar<sup>5,7</sup>.
2. Pot exhibir un ampli espectre terapèutic gràcies a FSs capaços de combatre bacteris grampositius i gramnegatius, fongs, protozous i virus, o fins i tot estructures de resistència com espores i cists.
3. Inactiva microorganismes i virus ràpidament, en tan sols uns minuts.
4. Elimina als microbis resistents als antimicrobians tan fàcilment com a les soques no resistents de la mateixa espècie<sup>8</sup>.
5. Com que el dany que inactiva les cèl·lules és conseqüència d'un procés multi-diana no específic, la probabilitat dels microorganismes de desenvolupar resistència a la TFDa és realment baixa<sup>9</sup>, fins i tot permetent repeticions del tractament<sup>10</sup>.
6. Com que el mecanisme d'acció de la TFDa no es basa en impedir processos cel·lulars vitals, pot eliminar qualsevol cèl·lula, ja sigui activa o latent, per exemple de microorganismes que viuen adherits a substrats formant biopel·lícules.

### Factors microbians que tenen influència en la susceptibilitat a la TFDa

Entre els principals factors intrínsecs dels microorganismes que modifiquen la seva susceptibilitat als tractaments fotodinàmics tenim la grandària de la cèl·lula, la paret bacteriana i les seves espores, la cèl·lula fúngica i els cists produïts per alguns protozous.

En TFDa la mida sí que importa. Les cèl·lules més grans són menys sensibles que les més petites; això es tradueix en què els eucariotes, fongs i protozous, són *a priori* més resistents que els bacteris a la fotoinactivació<sup>11</sup>. El nombre de dianes d'una cèl·lula eucariota pot ser cinquanta vegades més gran que en un bacteri, requerint per tant una dosi més alta de FS. A més, la grandària de la cèl·lula és important pel propi mecanisme d'acció de la TFDa ja que es creu que el mecanisme

de tipus II, en el què participa l'oxigen singlet i no altres EROs, és el que predomina i contribueix principalment al dany cel·lular. L' $^1O_2$  és un estat excitat entre les espècies d'oxigen reactiu que té la peculiaritat de no interconvertir-se a una altra ERO, pel que la característica més important de l' $^1O_2$  en relació amb la TFD és la seva vida útil, el seu temps de vida abans de tornar al seu estat fonamental. No està clar quin és el valor d'aquest paràmetre en l'entorn cel·lular on  $^1O_2$  pot reaccionar amb les diverses biomolècules però, en qualsevol cas, el seu temps de vida determina a quina distància màxima es pot desplaçar dins de la cèl·lula a partir del seu lloc de generació. En un entorn d'aigua la seva mobilitat màxima es situa al voltant de 270 nm<sup>12</sup>. Aquesta és una distància molt petita inclús en l'escala de dimensions de les cèl·lules. En conseqüència, les reaccions primàries de  $^1O_2$  en una cèl·lula es produeixen a un nivell de difusió curt, a nivell molecular, i per tant el lloc on és generat l' $^1O_2$  és rellevant<sup>12-15</sup>.

El tipus de paret bacteriana influeix també en l'efecte que podran exercir els agents antimicrobians. Els bacteris grampositius estan envoltats principalment per només una capa de peptidoglicà i són relativament porosos en comparació amb els gramnegatius. Aquests últims tenen una membrana citoplasmàtica interna i una membrana externa, separades per l'espai periplàsmic que conté el peptidoglicà.

Els bacteris grampositius poden fàcilment captar molècules com ara FSs neutres o aniònics sent fàcilment fotodesactivats<sup>16</sup>. Per contra, els gramnegatius, degut a la seva superfície altament carregada negativament, són poc sensibles a aquest FSs més tradicionals en ser relativament impermeables als mateixos. Per això, ha calgut dissenyar i sintetitzar FSs catiònics<sup>17,18</sup>, així com utilitzar altres estratègies per millorar l'afinitat dels colorants tradicionals pel bacteris gramnegatius, com per exemple, unir covalentment FSs a estructures més grans, ja siguin nanopartícules<sup>19,20</sup> o biomolècules<sup>21-24</sup>.

En resposta a condicions adverses, alguns grampositius produeixen espores, estructures de resistència latents que preserven el material genètic. Les espècies productores solen habitar sòls i aigües, però n'hi ha unes poques d'importància mèdica com les que causen el carboncle, el botulisme o el tètanus, per citar-ne algunes. Malgrat les espores són sovint resistents a tractaments fotodinàmics capaços de conduir a la mort de les cèl·lules vegetatives que les originen, tenir-les en una consideració especial permet també fotoinactivar-les<sup>25</sup>.

Pel que fa als fongs, la seva paret cel·lular presenta una permeabilitat intermèdia entre els bacteris grampositius i els gramnegatius, pel que és preferible utilitzar FSs menys catiònics i amb propietats més lipofíliques<sup>5</sup>.

Alguns protozous d'interès mèdic com *Giardiantestinalis* o *Entamoebahystolytica* produeixen cists durant el seu cicle vital que resisteixen millor als tractaments fotodinàmics que els trofozoïts. Així doncs, la inactivació dels cists formats per aquests protozous representa un desafiament que és assolible<sup>26</sup>.

## APLICACIONS DE LA TFD

La TFD podria arribar a ser útil en tot tipus d'infeccions, des de lleus a greus, sent d'especial interès per tractar infeccions cròniques. Ara bé, gran part dels estudis publicats s'han realitzat només in vitro, per exemple, pel tractament de la sinusitis crònica recurrent<sup>27</sup>, pel control de l'otitis mitjana<sup>28</sup> o pel tractament de queratitis. Tanmateix, per que fa a la queratitis, hi autors que assenyalen que els danys que pot provocar la TFD sobre les cèl·lules de la còrnia serà un factor absolutament limitant per a la seva utilització clínica en el futur<sup>29</sup>.

Avui, l'ús clínic més estès de la TFDa és pel tractament de la periodontitis i d'altres infeccions dentals. La periodontitis és una malaltia comuna que en esdevenir crònica, és la principal causa de pèrdua de dents en la població adulta. La TFDa resulta molt adient com a tractament adjuvant a l'eliminació mecànica de les biopel·lícules bacterianes<sup>30</sup>.

En dermatologia, podria tenir moltes aplicacions encara que actualment no hi cap indicació aprovada per ser emprada en clínica. No obstant, hi ha força estudis finalitzats o en curs que definiran el seu ús en el futur per tractar les infeccions de la pell i de les fàneres<sup>31</sup>. La pell juga un paper bàsic impeding el pas als invasors microbians. Les infeccions comencen quan aquesta barrera és violada per traumes com ferides, abrasions i cremades. La TFDa pot ser una molt bona opció tant pel control de patògens primaris com pel d'espècies fàcilment invasores com *Pseudomonasaeruginosa* o *Acinetobacterbaumannii*, fins i tot quan es tracta de soques multi-resistents a antibiòtics<sup>8</sup>. La TFDa s'ha assajat també pel tractament d'úlceres cròniques, de l'acne vulgar, de les tonyes i de les onicomicosis. De fet, són nombrosos els estudis fets sobre l'ús d'aquest tipus de teràpia pel tractament de les micosis i en particular de la candidiasi<sup>7,32</sup>. Les infeccions fúngiques són una de les causes

principals de les infeccions nosocomials, provocant des de micosis superficials a trastorns sistèmics greus.

L'aplicació més important de la aPDT en el control de protozoous és el seu ús per al tractament de la leishmaniosi transmesa per la mosca de la sorra. La leishmaniosi cutània és la forma més comuna d'infecció per espècies de *Leishmania* a tot el món; provoca lesions de la pell que poden persistir durant un llarg període, de vegades anys<sup>31</sup>.

Quant al control dels virus, agents infecciosos no cel·lulars, l'aplicació més estudiada és per inactivar-ne diverses espècies, com per exemple, les de les hepatitis B i C, el virus de l'herpes simple, el citomegalovirus i el virus de la immunodeficiència humana presents en productes de la sang i plasma<sup>35</sup>. Altres treballs expliquen la seva eficàcia en el tractament del condiloma acuminat atribuït als virus del papil·loma humà i del mol·lusc contagiós causat per poxvirus.

El potencial dels tractaments fotodinàmics no es limita al control d'infeccions, sinó que es pot estendre a la desinfecció de productes derivats de la sang, com s'acaba d'esmentar, o a la desinfecció d'aigües, aliments, ambients, etc. Actualment, s'utilitzen en oncologia i en altres patologies no infeccioses, extrems que no he contemplat en aquest discurs.

## CLOENDA

Crec fermament que la TFDa tindrà un paper rellevant en el control dels patògens, sobre tot gràcies al seu potencial per eradicar les soques resistents als antimicrobians. Si no som capaços de combatre'ls eficaçment, fins i tot la cirurgia menor tornarà a ser un risc important per a la vida.

Molts creuen que el fet de disposar d'antibiòtics va provocar que s'abandonés l'ús dels tractaments fotodinàmics just després d'haver-los descobert. Ara tenim una segona oportunitat, tant si és cert que ja estem a l'era post-antibiòtica com si no. L'ús d'antimicrobians i la teràpia fotodinàmica no són dues opcions que s'exclouin l'una a l'altra. Cal pensar en l'estratègia d'utilitzar tractaments combinant un antimicrobià convencional amb un FS; ja hi ha alguns estudis que demostren que s'obtenen bons resultats. Aprofitem doncs per a trobar-hi sinèrgies i fer front amb quantes eines millor al desafiament microbià.

## Agraïments

La meva gratitud als Membres de l'Acadèmia que m'ha permès l'entrada a aquesta distingida Corporació. És un gran honor que rebo amb responsabilitat. Gràcies a la Dra. Maria dels Àngels Calvo Torras i a totes les persones, familiars, amics, companys de feina, professors i mestres, alumnes, als qui col·laboreu o heu col·laborat amb mi en fer recerca, a totes les persones de qui he après o aprenc, que m'heu ajudat a arribar fins aquí. Mercès al meu marit, Miquel Bayó Boada pel seu suport en tot moment i per haver revisat aquest manuscrit.

## Referències bibliogràfiques

1. McGann P, Snesrud E, Maybank R, et al. (2016) *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60: 4420-4421.
2. Abraham EP, Chain E (1940) *Nature* 146:837.
3. Raab O (1900) *Zeitung für Biol* 39:524-526.
4. Nonell S, Agut M, Semino CE, et al.(2015) "Monografías de Dermatología: Terapia Fotodinámica en Dermatología"; 3-10. Aula Médica.
5. Sharma SK, Dai T, Kharkwal GB, et al.(2011) *Current Pharmaceutical Design* 17: 1303-1319.
6. Planas O, Boix-Garriga E, Rodríguez-Amigo B, et al.(2015) "Photochemistry" 42, 233-278. The Royal Society of Chemistry, London.
7. Rezusta A, López-Chicón P, Paz-Cristobal MP, et al. (2012) *Photochemical & Photobiological Sciences* 88: 613-619.
8. Ragàs X, Dai T, Tegos GP, et al.(2010) *Lasers in Surgery and Medicine* 42: 384-390.
9. Ruiz-González R, White JH, Agut M, et al. (2012) *Photochemical & Photobiological Sciences* 11: 1411-1413.
10. Francesco G, Manuele M, Annalisa C, et al. (2010) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 637-642.
11. Demidova TN, Hamblin MR (2005) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:2329-2335.
12. Moan J (1990) *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 6: 343-347.
13. Ragàs X, Agut M, Nonell S (2010) *Free Radical Biology and Medicine* 49: 770-776.
14. Ragàs X, He X, Agut M, et al. (2013) *Molecules* 18: 2712-2725.
15. Delcanale P, Pennacchiotti F, Maestrini G, et al. (2015) *Scientific Reports* 5: 15564.
16. Hamblin MR, Hasan T (2004) *Photochemical and Photobiological Sciences* 3: 436-450.
17. Ragàs X, Sánchez-García D, Ruiz-González R, et al.(2010) *Journal of Medicinal Chemistry* 53: 7796-7803

18. Ruiz-González R, Agut M, Reddi E, Nonell S (2015) *International Journal of Molecular Sciences* 16: 27072–27086.
19. Planas O, Bresolí-Obach R, Nos J, et al. (2015) *Molecules* 20: 6284- 6298.
20. Planas O, Macia N, Agut M, et al. (2016) *Journal of the American Chemical Society* 138: 2762- 2768.
21. Comas-Barceló J, Rodríguez-Amigo B, Abbruzzetti S, et al. (2013) *RscAdvances* 3: 17874-17879
22. Dosselli R, Tampieri C, Ruiz-González R, et al. (2013) *Journal of Medicinal Chemistry* 56: 1052- 1063
23. Dosselli R, Ruiz-González R, Agnolon V, et al. (2014) *Journal of Medicinal Chemistry* 57: 1403-1415.
24. Rodríguez-Amigo B, Delcanale P, Rotger G, et al.(2015) *Journal of Dairy Science* 98: 89- 94.
25. da Silva RN, Tomé AC, Tomé JPC, et al. (2012) *Microbiology Immunology* 56: 692–699.
26. Jori G, Coppellotti O (2007) *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 6: 119-131.
27. Biel MA, Jones JW, Pedigo L, et al. (2012) *Laryngoscope* 122: 2628-2631.
28. Luke-Marshall NR, Mang TS, Hansen LA, Campagnari AA (2014) *Lasers in surgeryandmedicine* 46: 712-717.
29. Goh YW, McGhee CN, Patel DV, et al. (2014) *Clinical& experimental optometry* 97: 274-277.
30. Mongardini C, Di Tanna GL, Pilloni A (2014) *Lasers in Medical Science* 29: 1-8.
31. García-Malinis AJ, Aspiroz C, Rezusta A, Gilaberte Y (2015) “*Monografías de Dermatología: Terapia Fotodinámica en Dermatología*”; 67-75. Editorial: Aula Médica.
32. López-Chicón P, Paz-Cristobal MP, Rezusta A, et al.(2012) *Photochemical &Photobiological Sciences* 11: 1099-1107.
33. Mohr H, Knuver-Hopf J, Gravemann U, et al. (2004) *Transfusion* 44: 886-890.