



# TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Medicina

## TERAPIA FOTODINÁMICA ANTIMICROBIANA: POTENCIAL ESTRATEGIA FRENTE A PATÓGENOS MULTIRRESISTENTES

*Unidad predepartamental de Medicina, Dep. de Química Inorgánica y Orgánica,  
Universitat Jaume I, Castellón, España.*

Alumna: Verónica Albarrán Vidal  
Tutora: Rosa de Llanos Frutos





## TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA

**EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A** hace constar su **AUTORIZACIÓN** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

**TÍTULO del TFG: TERAPIA FOTODINÁMICA ANTIMICROBIANA:  
POTENCIAL ESTRATEGIA FRENTE A PATÓGENOS MULTIRRESISTENTES**

**ALUMNO/A:** Verónica Albarrán Vidal

**DNI:** 48675542K

**PROFESOR/A TUTOR/A:** Dra. Rosa de Llanos Frutos

Firmado por ROSA MARIA DE LLANOS FRUTOS - NIF:33461646G el día 01/06/2021  
con un certificado emitido por ACCVCA-120

Fdo (Tutor/a): .....

**COTUTOR/A INTERNO/A (Sólo en casos en que el/la Tutor/a no sea profesor/a de la Titulación de Medicina):**

Fdo (CoTutor/a interno): .....

---

## ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>EXTENDED SUMMARY</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTOD</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Fuente de luz</b>	
<b>2.2. Síntesis de los fotosensibilizadores</b>	
<b>2.3. Medios de cultivo microbianos</b>	
<b>2.4. Especies microbianas</b>	
<b>2.5. Condiciones de cultivo y preparación de las suspensiones bacterianas</b>	
<b>2.6. Ensayo de fotoinactivación (aPDI)</b>	
<b>2.7. Estadística</b>	
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>20</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>27</b>
<b>6. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>28</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>28</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>29</b>



## RESUMEN

El progresivo aumento de las resistencias microbianas es un problema actual que hay que afrontar sin demora. Pese a haber antibióticos de última generación, no siempre son eficaces frente a microorganismos multirresistentes, concretamente frente a *Pseudomonas aeruginosa*. La terapia fotodinámica antimicrobiana se plantea como una oportunidad para abordar este problema mundial, y su potencial uso en la práctica clínica. Para llevar a cabo esta terapia se ha empleado el rosa de bengala como fotosensibilizador y un foco de luz LED como fuente de irradiación. Los resultados obtenidos tras su aplicación indican que las colonias de *P. aeruginosa* se redujeron en su totalidad ( $8 \log_{10}$  UFC/mL) después de 30 minutos de irradiación con luz visible a concentraciones de rosa de bengala de 3 mg/g y 1,5 mg/g; no siendo así cuando las muestras bacterianas se encontraban en condiciones de oscuridad, cuyos resultados no mostraron un descenso considerable. Con concentraciones menores de rosa de bengala (0,5 mg/g y 0,1 mg/g), no se constataron disminuciones estadísticamente significativas en la población de *P. aeruginosa* trascurridos 30 minutos. Teniendo presente estos resultados, la terapia fotodinámica puede considerarse como una valiosa herramienta para el control y tratamiento de infecciones producidas por patógenos resistentes a antibióticos.

**PALABRAS CLAVE:** Terapia fotodinámica antimicrobiana, *Pseudomonas aeruginosa*, rosa de bengala, resistencia antibiótica, fotosensibilizador.

## ABSTRACT

The progressive increase in microbial resistance is a current problem that must be addressed without delay. Despite having the latest generation antibiotics, they are not always effective against multi-resistant microorganisms, specifically against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial photodynamic therapy is presented as an opportunity to address this global problem, and its potential use in clinical practice. To carry out this therapy rose bengal has been used as a photosensitizer and a LED light source as a source of radiation. The results obtained after its application indicate that the colonies of *P. aeruginosa* were reduced ( $8 \log_{10}$  CFU/mL) after 30 minutes of irradiation with visible light at a rose bengal concentration of 3 mg/g and 1.5 mg/g. This was not the case when the bacterial samples were in dark conditions, whose results did not show a considerable decrease. With lower concentrations of rose bengal (0.5 mg/g and 0.1 mg/g), no statistically significant decreases were observed in *P. aeruginosa* population after 30 minutes. Bearing these results in mind, this therapy could be considered a valuable tool for the control and treatment of infections caused by antibiotics-resistant pathogens.

**KEYWORDS:** Antimicrobial photoinactivation, *Pseudomona aeruginosa*, Rose bengal, antibiotic resistance, photosensitizer.

### EXTENDED SUMMARY

In the light of the widespread use of antibiotics, the prevalence of resistance to new drugs has been increasing. Since then, due to this disadvantage, the search by pharmaceutical companies has focused on more specific medicines to deal with resistant species; not necessarily obtaining good results. Despite constant efforts by the scientific community, current effective therapeutic options are very scarce, as resistance is primarily associated with nosocomial environment. At the same time, leaving hospital causes aside, we find other circumstances that have influenced this growth of microbial resistance. Some of the globalization's consequences are the rise in trade and the constant movement of people, which determines that infectious agents, including drug-resistant ones, spread very quickly. This has made health workers, researchers, legislators, and politicians take it into account, although the proposed strategy is not going at the pace they should.

The WHO has already taken charge of alleging this fact, and on the GLASS platform, which collects data from 66 countries around the world, can be appreciated that those reports reveal disturbingly high rates of resistance among antimicrobials that have been used to treat common bacterial infections. Both at European level and nationally, a range of indications have been established to address this problem, from human and animal health to environmental health.

In addition, in the matter of the COVID-19 pandemic, the World Health Organization has already reported that the excessive use of antibiotics, will drive the boost in bacteria resistant and, with it, the number of deaths caused by this problem.

Infections caused by *Pseudomona aeruginosa* are of particular concern, as it is one of the most common gram-negative hospital-acquired pathogens. *Pseudomonas aeruginosa* likewise is an aerobic gram-negative bacterium that causes community-acquired and hospital-acquired infections. In truth, it is a ubiquitous, opportunistic, and enduring pathogen in water and soil. Moreover, this bacterium takes advantage of various pathogenicity mechanisms, as well as antimicrobial resistance, which poses a challenge in treating these infections. That is why we consider the need for a new bactericidal mode of action based on antimicrobial inactivation that does not generate resistance over time.

Thus, the intention of this study is to see what effect antimicrobial photodynamic inactivation (aPDI) exerts on *Pseudomona aeruginosa*. For this we will use a photosensitizer

(Rose Bengal) and a LED white light bulb as light source. This photosensitizer, thanks to aerobic environment, produces reactive oxygen species (ROS), including singlet oxygen, which causes protein changes by oxidizing certain essential amino acid groups. Such system prevents cell growth and, therefore, causes their death.

Our work shows the inactivation of gram-negative bacteria has been successful and may be acceptable as a potential antimicrobial therapy for the treatment of local infections caused by multidrug-resistant *P. aeruginosa*. Combining the light with RB, we obtained a total eradication in cell survival after 30 minutes of irradiation, if we used an RB concentration of 3 mg/g and 1,5 mg/g. It should be noted that the application of light in shorter periods of time (5, 10 and 20 minutes) also resulted in a decrease in microbial survival at all RB concentrations, which may be of great clinical relevance. Although we used lower concentrations of RB, we did not observe results as encouraging as the previous ones, even using a total light dose of 144 J/cm<sup>2</sup> (30 minutes of irradiance). This effect was minor, and actually meaningless, for RB concentrations of 0,5 mg/g and 0,1 mg/g.

However, the simultaneous use of RB, in the same concentrations, in the dark reveals very different data. Bacterial samples that have not been exposed to light do not reflect a reduction in growth at any of the photosensitizer concentrations, so RB is certainly only effective if it is coupled to the light source.

With these data we want to emphasize that for *P. aeruginosa* the maximum effect is obtained after 30 minutes of irradiation for minimum concentrations of ~1.5mg/g of RB, but perhaps with lower concentrations the same effect could be achieved by increasing the time of exposure to light.

So, obtaining these promising data, we consider that it may become an alternative as a therapy in infections caused by multi-resistant bacteria. Despite being an emerging therapy in recent years, we believe that we must make efforts to promote, encourage and strengthen aPDI to prevent the hasty rise in microbial resistance and to deal with those that exist today.

## OBJETIVOS

En las últimas décadas, la terapia fotodinámica (TFD) ha experimentado un rápido avance, pues es una herramienta prometedora para resolver ciertas patologías de carácter muy diverso, sobre todo en cuanto se refiere a afecciones dermatológicas, pero también como tratamiento en enfermedades oncológicas, y como alternativa cuando aparece resistencia a agentes antibacterianos. Mientras que la TFD del cáncer ha evidenciado una buena aceptación clínica en los últimos años, la inactivación fotodinámica antimicrobiana (aPDI), que viene incluso de hace más años, no ha tenido tanto éxito hasta el momento [37].

Ante el panorama actual de las resistencias microbianas, nos planteamos la posibilidad de emplear la terapia fotodinámica como método terapéutico alternativo que no genere resistencias a la larga. La intención de este estudio es ver el efecto que ejerce la inactivación fotodinámica antimicrobiana sobre *Pseudomonas aeruginosa*, en particular un sistema fotosensibilizador que consiste en el empleo de rosa de bengala como fotosensibilizador sintetizado sobre microesferas de las resinas de intercambio iónico Amberlite® IRA-900.

Como objetivos específicos nos planteamos analizar:

1. El efecto inhibitorio sobre *Pseudomonas aeruginosa* empleando diferentes concentraciones del fotosensibilizador (3 mg/g; 1,5 mg/g; 0,5 mg/g; 0,1 mg/g y 0mg/g).
2. Efecto antimicrobiano de esta terapia en distintos periodos de tiempo que, a su vez, equivalen a distintas afluencias de luz.

De esta manera, examinaremos la concentración mínima del fotosensibilizador y el tiempo, o fluencia, mínima en la que la aPDI necesaria para generar una reducción significativa de una población de *P. aeruginosa*.

## ABREVIATURAS

<b>RB</b>	Rosa de Bengala
<b>aPDI</b>	<i>Antimicrobial photodynamic inactivation</i> . Inactivación fotodinámica antimicrobiana
<b>PACT</b>	<i>Photodynamic Antimicrobial chemotherapy</i> . Quimioterapia fotoantimicrobiana
<b>TFD</b>	Terapia fotodinámica
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i> . Especies reactivas del oxígeno
<b>FS</b>	Fotosensibilizador
<b>AMR</b>	<i>Antimicrobial Resistance</i> . Resistencia antimicrobiana
<b>AMC</b>	<i>Antimicrobial Consumption</i> . Consumo antimicrobiano
<b>PRAN</b>	Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos
<b>NIH</b>	<i>National Institute of Health</i> . Institutos Nacionales de Salud
<b>CDC</b>	<i>Centres for Disease Control and Prevention</i> . Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
<b>GLASS</b>	<i>Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System</i> . Sistema mundial de vigilancia de resistencia a los antimicrobianos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>M-H</b>	Mueller-Hinton
<b>UFC</b>	Unidad Formadora de Colonias
<b>AMP</b>	<i>Antimicrobial peptides</i> . Péptidos antimicrobianos
<b><math>^1\text{O}_2</math></b>	Oxígeno singlete
<b><math>\text{O}_2</math></b>	Oxígeno molecular
<b>OH</b>	Radical hidroxilo

## 1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones microbianas han representado durante mucho tiempo la principal causa de muerte en humanos. Con la introducción de los primeros compuestos con actividad antimicrobiana, en especial la penicilina en 1929, se logró vencer muchas enfermedades, como la neumonía o la tuberculosis [1]. Este descubrimiento supuso una revolución en cuanto al tratamiento de las infecciones bacterianas, con lo que se asentó una época dorada de los antibióticos en las décadas siguientes, en las que se han estado utilizando fármacos antibacterianos naturales y sintéticos de amplio espectro. Con el amplio uso que se ha dado a estos medicamentos, la prevalencia de la resistencia a los fármacos utilizados ha ido aumentando. Desde entonces, debido a esta desventaja, las empresas farmacéuticas se han centrado en buscar antimicrobianos con principios activos más específicos para hacer frente a especies resistentes; no siempre obteniendo buenos resultados. A pesar de los esfuerzos constantes por parte de la comunidad científica, las opciones terapéuticas efectivas actuales son muy escasas, ya que la resistencia se asocia principalmente (aunque ya no exclusivamente) con el entorno nosocomial [2].

Debemos de tener en cuenta que la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural; cuando se hace uso de un nuevo agente antimicrobiano en el ámbito sanitario, se detectan seguidamente cepas de microorganismos resistentes al mismo. Esta resistencia puede ser una característica propia de la especie, o bien desarrollarse en cepas sensibles que adquieren resistencia por mutación o transferencia genética. Es más, pueden ser resistentes a un antimicrobiano concreto, a otros antimicrobianos de la misma clase y, a veces, a compuestos de distintos grupos.

Al mismo tiempo, dejando a un lado las causas intrahospitalarias, encontramos otros fenómenos que han influido en este crecimiento de resistencias microbianas. Algunas de las consecuencias de la globalización son el auge del comercio y de los movimientos constantes de las personas, lo cual condiciona que los agentes infecciosos, incluidos los farmacorresistentes, se propaguen de manera muy rápida. Si bien, en los países más desarrollados, en su mayoría, se puede confiar todavía en la eficacia de los medicamentos antimicrobianos de última generación para tratar las infecciones resistentes, en muchas otras partes del mundo, el acceso a tales fármacos a menudo es limitado, llegando incluso a carecer de ellos completamente.

La actual crisis de resistencia a los antimicrobianos ha calado en la conciencia de sanitarios, investigadores, legisladores, y políticos, aunque los planes estratégicos propuestos no van al ritmo que deberían. Hoy en día, los microorganismos multirresistentes constituyen

una de las amenazas más serias para la salud pública, causando 33.000 muertes al año en Europa y generando un gasto sanitario adicional de unos 1.500 millones de euros [3]. El desarrollo y la amplia distribución de mecanismos de resistencia en patógenos bacterianos, junto con el fracaso en el descubrimiento de nuevas drogas, ha hecho que enfermedades que antes eran fácilmente curables sean mortales nuevamente [4]. Tal y como afirma la OMS “Un creciente número de infecciones, como la neumonía, la tuberculosis, la septicemia, la gonorrea o las enfermedades de transmisión alimentaria, son cada vez más difíciles —y a veces imposibles— de tratar, a medida que los antibióticos van perdiendo eficacia” [5].

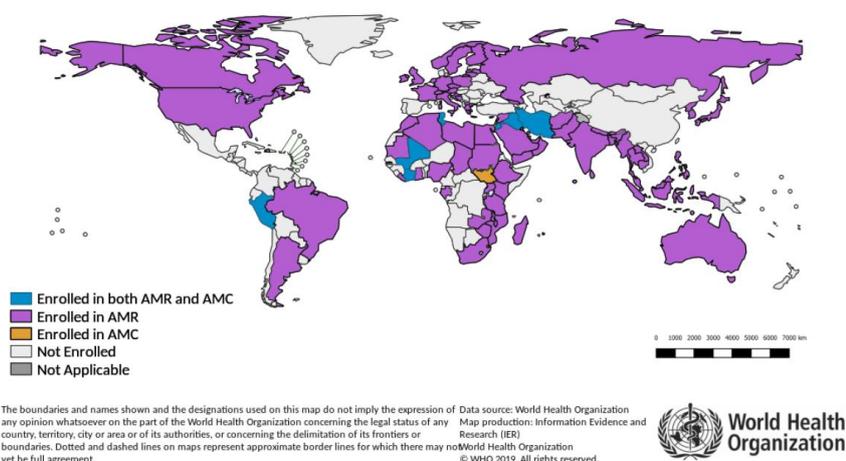
Sin ir más lejos, hace más de una década el Senado de los E.E.U.U. presentó la ley basada en estrategias para abordar la resistencia a los antimicrobianos, donde se proponía establecer una Oficina de Resistencia a los Antimicrobianos en el Departamento de Salud y Servicios Humanos, dirigida por los Institutos Nacionales de Salud (NIH), los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y otras agencias con el fin de desarrollar un plan estratégico para combatir las resistencias antimicrobianas [2]. Esta Oficina monitorizaría la aparición de patógenos resistentes, estudiaría la epidemiología de estos patógenos, evaluaría la eficacia de las intervenciones y estudiaría los problemas asociados con el uso de antimicrobianos, enviando estos datos a la comunidad académica y científica

Asimismo, el Consejo de la Unión Europea (UE) estableció en mayo de 2012 una serie de indicaciones para el abordaje de este problema, desde la salud humana, la sanidad animal y la salud medioambiental. En España existe el Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN), un proyecto que comienza en 2014 con el objetivo de disminuir el riesgo de selección y diseminación de resistencia a los antibióticos [3].

Cuando un microorganismo adquiere resistencia, los tratamientos se vuelven ineficaces y se multiplica el riesgo de diseminación a personas, animales, alimentos y al medio ambiente. Esta amenaza progresiva afecta a todas las partes del mundo y diversos sectores gubernamentales ya han tomado medidas para frenar esta realidad.

Todo ello nace a raíz de que, en las últimas décadas, el número de infecciones sistémicas causadas por bacterias en humanos ha ido aumentando notablemente. Esto es debido, en parte, al uso excesivo de antimicrobianos, a la mayor esperanza de vida y al incremento del número de pacientes inmunocomprometidos [6]. Esta resistencia está asociada a la necesidad de una mayor concentración mínima inhibitoria, a peores resultados clínicos y a infecciones concomitantes durante el tratamiento y la profilaxis [7]. Para que esta adversidad se produzca se deben producir al menos cuatro mecanismos de resistencia, siendo el más conocido la inducción de bombas de expulsión que conducen a una menor concentración del fármaco en sangre [8].

Por añadidura, en el contexto de la pandemia de COVID-19, la OMS ya ha informado que el uso excesivo de los antibióticos desde que comenzó esta crisis sanitaria impulsará el aumento de bacterias resistentes a futuros tratamientos y, con ello, el número de muertes provocadas por este problema [5]. La OMS ya se ha encargado de poner en manifiesto este hecho y en la plataforma GLASS (*Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System*), donde se recogen datos de más de dos millones de pacientes de 66 países del mundo, se revelan inquietantes tasas altas de resistencia entre los antimicrobianos que se han usado para tratar infecciones bacterianas comunes; este hecho conllevaría un aumento de las infecciones provocadas por bacterias resistentes a antibióticos (Figura 1) [9].



**Figura 1.** Mapa de países participantes en el estudio GLASS (abril 2020) [9]. **AMR:** resistencia antimicrobiana. **AMC:** consumo de antimicrobiano

Con datos sobre la resistencia antimicrobiana (AMR) y el consumo de antimicrobianos (AMC), GLASS ofrece un enfoque universal e integral para identificar las tendencias y las circunstancias impulsoras de AMR [9].

Ante el aumento de dichas resistencias a escala mundial se está apostando por recurrir a otras estrategias antimicrobianas, como es el caso de la inactivación fotodinámica antimicrobiana (aPDI). En este estudio nos fijamos en el efecto que ejerce la aPDI; y especialmente, cuáles son los factores influyentes en este proceso, el cual se produce gracias a la acción de tres elementos: un fotosensibilizador, luz y oxígeno [16, 17]. Entre las bacterias multirresistentes que son de especial preocupación por causar importantes infecciones nosocomiales se encuentra *Pseudomonas aeruginosa* [10]. *P. aeruginosa* es una bacteria gramnegativa aeróbica que provoca infecciones adquiridas tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario. Precisamente, se trata de un patógeno ubicuo, oportunista y perdurable en el agua y en el suelo [11], y puede crecer entre 20 y 43°C, lo que la diferencia del resto de especies de *Pseudomonas* [12]. Igualmente, esta bacteria posee la cualidad de producir una

serie de proteasas y otras enzimas capaces de degradar múltiples proteínas inmunorreguladoras, además de un flagelo que le confiere motilidad, y la secreción de una biopelícula para evadir las células inmunes del huésped [11]. Principalmente, sus efectos nocivos los produce en el tracto respiratorio, aunque también puede causar infecciones corneales y queratitis, infecciones urinarias, infecciones de herida quirúrgica, e incluso sepsis [13].

Esta bacteria se aprovecha de diversos mecanismos de patogenicidad, así como de mostrar amplia resistencia a antimicrobianos, lo que supone un desafío el tratamiento de las infecciones que causa. Además, la mortalidad asociada se estima en un 20%, aunque puede llegar hasta el 50% en algunos casos [11, 14].

Al margen de los factores del huésped que contribuyen al desarrollo de la infección, la vía principal de transmisión de esta bacteria son las superficies y aguas contaminadas, en especial la flora normal residente de las manos del personal sanitario y los sistemas de ventilación, los cuales generan corrientes de aire hacia todas las zonas del hospital [15]. En relación con el instrumental médico utilizado como medida terapéutica se encuentra la ventilación mecánica, los drenajes, los sondajes, los catéteres, etc.

Es por ello por lo que nos planteamos la necesidad de un modo de acción bactericida basado en la terapia fotodinámica antimicrobiana que no genere resistencias a largo plazo.

En las últimas décadas, la terapia fotodinámica (TFD) ha experimentado un desarrollo acelerado puesto que es una herramienta prometedora para afrontar problemas de salud importantes, como el tratamiento de patologías tumorales y la resistencia a agentes antibacterianos. Sin embargo, el término “acción fotodinámica” viene de muchos años atrás. Fue acuñado en 1904 por Tappeiner en sus estudios con el dermatólogo Jesionek, donde comentaron el tratamiento de un tumor de piel mediante la aplicación tópica de eosina e irradiación con luz blanca [17]. Posteriormente, en la década de los 1970, Dougherty, pionero en el uso de TFD, empleó este proceso reactivo al tratamiento del cáncer, tanto cutáneo como de otros aparatos y sistemas [28]. Hoy en día, la terapia fotodinámica está ya establecida en nuestro país como alternativa a distintas afecciones dermatológicas, como son las queratosis actínicas, la enfermedad de Bowen y determinados tipos de carcinoma basocelular. Además, se están ampliando cada vez más su espectro terapéutico con elevada eficacia y muy buen resultado cosmético [17, 30].

Gracias a las lecciones que nos ha dado la historia del descubrimiento de antibióticos y la comprensión de la acción de los mismos, tenemos los conocimientos suficientes para proporcionar nuevos métodos de tratamiento para el siglo XXI capaces de controlar las infecciones en la era de la resistencia [4].

Los fotosensibilizadores son compuestos que, en su estado basal, no presentan actividad citotóxica, pero que, gracias a la luz visible y en presencia de oxígeno, poseen la capacidad de activarse, potenciando los efectos de la radiación luminosa. Para ser más concretos, estos compuestos, excitados a una longitud de onda adecuada, generan especies altamente reactivas de oxígeno. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) dan lugar a productos tóxicos para dichos microorganismos, entre ellos, oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) o radicales hidroxilo (OH) [7], lo que impide su crecimiento y diseminación, y por tanto, ocasionando la muerte celular.

Entre los fotosensibilizadores con actividad antimicrobiana se encuentra el rosa de bengala (RB), tiene la capacidad de convertir el átomo de oxígeno molecular,  $\text{O}_2$ , de su estado fundamental a un estado excitado o activado ( $^1\text{O}_2$ ). Profundizando más en esta reacción, cuando el RB absorbe radiación a una longitud de onda apropiada ( $\sim 550$  nm), se excita a un estado triplete. Con el fin de eliminar esa excitación sobreañadida, el fotosensibilizador es capaz de transferir esa energía al oxígeno molecular mediante el intercambio de electrones, quedándose así en un estado inferior de energía, tal y como se muestra en la Figura 2 [18]. Esto implica que el oxígeno se encuentre en un estado de mayor energía y, por tanto, más inestable y con mayor tendencia a reaccionar con otros átomos. Esto es lo que se conoce como oxígeno singlete [19].

De todas las especies reactivas del oxígeno, los radicales libres de oxígeno son los que mayor reactividad poseen, pues las células bacterianas no poseen enzimas antioxidantes que puedan neutralizar este radical de oxígeno [20]. El radical hidroxilo actúa de manera rápida e inespecífica sobre algunos componentes celulares, como el ADN, proteínas y/o lípidos [21]; en cambio, el oxígeno singlete, también altamente reactivo, causa alteraciones en las proteínas, oxidando ciertos grupos esenciales de aminoácidos, a la vez que va generando más radicales de oxígeno [22, 23]. Esto indica que los radicales y el  $^1\text{O}_2$  formados en el mismo lugar que en la membrana plasmática producen un daño específico en la membrana; no obstante, pueden actuar, en algunos casos, mediante un mecanismo secundario común en presencia de oxígeno [24].

En el caso que nos concierne, el oxígeno singlete reacciona con la bicapa lipídica de la membrana celular de bacterias, generando reacciones de oxidación nocivas para estos patógenos, más conocido como estrés celular. Se trata de mecanismos moleculares específicos que ejercen su acción sobre dianas exactas esenciales para la inactivación microbiana, entre ellas, la membrana celular [25, 26]. Cuando se produce un desequilibrio entre las sustancias antioxidantes y prooxidantes (ROS) aparece el llamado estrés oxidativo y, por consiguiente, el daño celular o, incluso, la muerte celular [27].

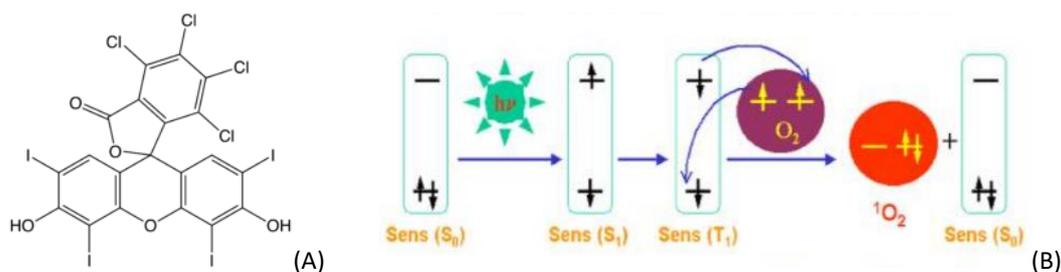


Figura 2. (A) Molécula del Rosa de Bengala [28]. (B) Mecanismo del proceso de fotosensibilización para la generación de oxígeno singlete por transferencia de energía [18]. Sens = sensibilizador;  $S_0$  = estado fundamental del sensibilizador;  $S_1$  y  $T_1$  son los estados excitados singlete y triplete del sensibilizador, respectivamente;  $h\nu$  representa el proceso de absorción de un fotón de luz UV por parte del sensibilizador.

Entre la diversa gama de fotosensibilizadores que se emplean en esta estrategia, se decidió utilizar RB dada su fuerte banda de absorción a 546 nm y por su naturaleza aniónica. Esta propiedad, basada en su polaridad negativa, le confiere afinidad por moléculas cargadas positivamente. La envoltura celular de las bacterias gramnegativas está compuesta por dos membranas (interna y externa), ambas formadas por una bicapa lipídica. Esta envoltura confiere a la célula un medio interno con carga negativa, por lo que el RB no penetra en el interior de la célula a menos que esta sea permeable [39].

Mientras que la TFD del cáncer ha evidenciado una buena aceptación clínica en los últimos años, la quimioterapia antimicrobiana fotodinámica, que viene incluso de hace más años, no ha tenido tanto éxito [38]. En consecuencia, creemos que debemos hacer esfuerzos en promover, fomentar y reforzar esta terapia para prevenir el aumento de las resistencias microbianas.

En nuestro trabajo, examinamos los efectos combinados de aPDI con Rosa de Bengala sobre *P. aeruginosa*, una especie patógena multirresistente y causante de infecciones nosocomiales.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Fuente de luz

La fuente de luz empleada para llevar a cabo la técnica de fotoinactivación fue un foco de luz blanca LED TENKO ECO de 50W (5700 K) para activar el fotosensibilizador RB). El fotosensibilizador tiene un máximo de absorción a 546 nm en agua, por lo que la luz policromática empleada (emisión entre 400 nm y 750 nm) es apropiada para llevar a cabo la excitación.

La irradiación se llevó a cabo durante varios períodos de tiempo (5, 10, 20 y 30 minutos) y sobre un agitador orbital (Fisherbrand) a una velocidad de 120 rpm y situado a 2,5 cm de distancia del foco (Figura 3).

## 2.2. Medios de cultivo microbiano

El medio de cultivo empleado para crecer *P. aeruginosa* fue el medio agar Mueller-Hinton (M-H) a pH  $7,3 \pm 0,1$  (Sentmenat, Barcelona, España).

## 2.3. Especies microbianas

La cepa bacteriana empleada en este estudio fue *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, procedente de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EE. UU.) El cultivo de *P. aeruginosa* se realizó en placas petri de medio agar M-H y se incubó aeróbicamente a 37°C durante 24 horas.

## 2.4. Condiciones de cultivo y preparación de las suspensiones celulares

El inóculo de trabajo se obtuvo a partir de la preparación de una suspensión de colonias crecidas en las placas de agar MH en agua destilada, hasta alcanzar un nivel de concentración de aproximadamente  $10^8$  bacterias/ml, concentración que se consigue al ajustar la turbidez del inóculo a una turbidez estándar de  $0,50 \pm 0,03$ , empleando para ello la escala de McFarland (McFarland Equivalence Turbidity standards, Remel).

## 2.5. Ensayos de fotoinactivación con RB sobre Amberlite IRA-900

El sistema fotosensibilizador empleado, rosa de bengala (RB) sobre Amberlite® IRA-900 en formato de microesferas, nos fue proporcionado por el Profesor Francisco Galindo (Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universitat Jaume I). Brevemente, la preparación de las microesferas de resina de intercambio iónico IRA-900 (Amberlite® IRA-900) cargadas con RB se realizó mezclando 50 ml de solución de sal sódica de rosa de Bengala (RB, Sigma-Aldrich) en Etanol puro ( $30 \mu\text{M}$ ) con 1 g de Amberlite® IRA-900 (Sigma-Aldrich, en forma de cloruro); las resinas de intercambio iónico Amberlite® IRA-900 se lavaron previamente con etanol y se secaron al vacío durante la noche [31].

Para el estudio de fotoinactivación se prepararon diez grupos de microesferas de Amberlite® IRA-900: cinco para la irradiación con luz y cinco como controles en la oscuridad,

cada uno de ellos con una concentración diferente de RB: 3 mg de RB/g de resina; 1,5 mg/g; 0,5 mg/g; 0,1 mg/g; y 0 gr/g.

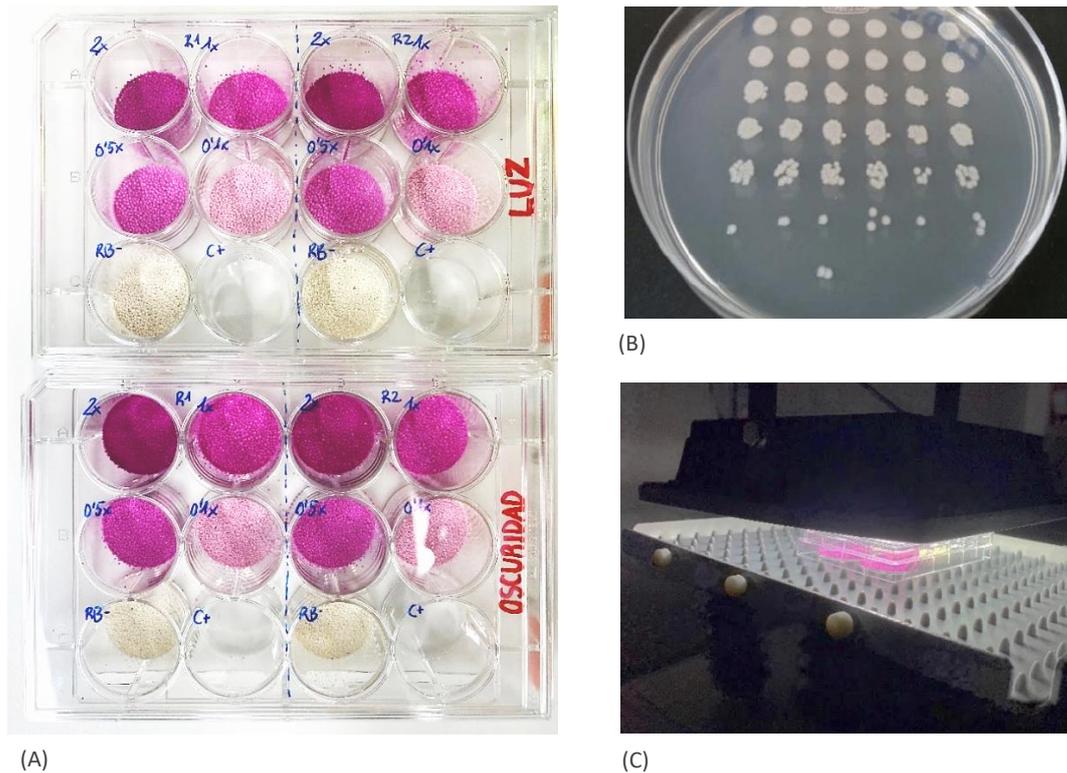
En base a ensayos previos en los que se empleó este material como fotosensibilizador, se concluyó que la cantidad de microesferas óptima para llevar a cabo este estudio era de 0,25 gramos para cada condición. Por tanto, de los diez grupos se prepararon muestras de 0,25 gramos de microesferas, las cuales fueron esterilizadas, previamente al experimento, en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### 2.6. *Ensayo de fotoinactivación aPDI*

Para preparar el ensayo de fotoinactivación se repartieron 2mL del inóculo preparado de *P. aeruginosa* (aproximadamente  $10^8$  bacterias/mL) en cada pocillo de placas de cultivo estériles de 12 pocillos (Sarstedt), en los que se añadió 0,25 g de RB a diferentes concentraciones, tal y como se muestra en la Figura 3.

La irradiación se realizó sobre las placas de 12 pocillos, mediante una lámpara de luz blanca LED que emite en el intervalo 400-750 nm con una irradiancia de 80 mW/cm<sup>2</sup> medida a una distancia de 2,5 cm (dosis total de luz emitida de hasta 144 J/cm<sup>2</sup> para el tiempo máximo de 30 minutos). En paralelo, se preparó una segunda placa de 12 pocillos con las mismas condiciones de estudio (diferentes concentraciones de RB sobre microesferas) que se mantuvo en oscuridad (control oscuridad). Ambas se colocaron sobre un agitador a 120 rpm durante el tratamiento fotodinámico.

Para estudiar la actividad antimicrobiana del tratamiento fotodinámico, (RB a distintas concentraciones sobre microesferas) a lo largo del tiempo se tomaron alícuotas de 75 µL de cada pocillo de la placa expuesta a luz a los 5, 10, 20 y 30 minutos. De la placa no expuesta a la luz solo se tomó una alícuota de 75 µL a los 30 minutos.



**Figura 3.** (A) Placas de 12 pocillos en las que se añadieron las microesferas de poliestireno con Rosa de Bengala en distintas concentraciones: **2X** (3mg/g); **1X** (1,5 mg/g); **0,5X** (0,5 mg/g); **0,1X** (0,1 mg/g) y **RB-** (0 mg/g), además del control positivo (**C+**) del inóculo. Se realizaron dos réplicas de cada condición (**R1** y **R2**). (B) Ejemplo de placa petri con las distintas diluciones del inóculo. (C) Fuente de luz situado a 2,5 cm de la placa.

A continuación, se realizaron diluciones seriadas de todas las alícuotas, en placas estériles de 96 pocillos y se sembraron por goteo (5 $\mu$ L) en placas petri de medio con agar M-H, con la ayuda de una pipeta multicanal.

Se incubaron a 37<sup>o</sup> durante 24 horas y se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias/mL en aquellas diluciones en las que podían contar entre 15 y 100 colonias. En cada ensayo se incluyó también un control negativo, el cual se trataba del agua utilizada para realizar las diluciones seriadas. Es importante destacar que estos volúmenes de inóculo, así como la cantidad de microesferas empleadas y la distancia de la lámpara de luz, se han establecido en base a ensayos previos con otras especies, en concreto con la especie fúngica *Candida albicans*. En cada ensayo de fotoinactivación se incluyeron dos réplicas de cada condición de estudio (microesferas con diferentes concentraciones de RB y el control positivo) y la siembra por goteo en las placas M-H para el recuento se realizó en triplicado. Además, se llevaron a cabo tres réplicas biológicas, manteniendo siempre las mismas condiciones experimentales.

### 2.7. Estadística

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Excel y el programa estadístico SPSS. Se aplicó el método de distribución t de Student y ANOVA para un factor. La significancia en el valor de p está marcada con asteriscos, siendo este valor inferior a 0,05, lo que demuestra que los datos marcados son estadísticamente significativos. Las diferencias entre grupos se realizaron mediante el análisis de varianza. El resultado de la inactivación fotodinámica se expresa como el promedio de tres réplicas biológicas independientes, incluyendo en cada ensayo dos réplicas técnicas.

## 3. RESULTADOS

La resina de intercambio iónico utilizada en estos ensayos, Amberlite® IRA-900, consiste básicamente en un poliestireno macroporoso reticulado. Este ha sido usado popularmente en catálisis, cromatografía y remediación ambiental, entre otras. Con anterioridad se han estudiado las propiedades fotoquímicas y fotobiológicas de diversos polímeros sintéticos unidos a RB, y en especial su actividad fotodinámica contra las células de melanoma [32]. Como han demostrado en su estudio Del Valle et al. [31], la metodología empleada para la generación del polímero (Amberlite® IRA-900) unido al fotosensibilizador (RB) es apta para aplicarla a esta terapia, y así valorar su actividad antimicrobiana. En tal sentido, ponemos en el punto de mira la supervivencia celular de *P. aeruginosa* tras esta terapia.

Se han evaluado los factores empleados en la aPDI con RB frente a *P. aeruginosa*. Estos factores son la concentración de RB y el tiempo de irradiación, los cuales se han analizado mediante la disminución de la viabilidad bacteriana expresado como la reducción logarítmica del número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), a partir de suspensiones bacterianas iniciales de  $\sim 10^8$  UFC/mL (Figura 5 del Anexo).

Los resultados gráficos de la Figura 4 exponen los valores de UFC/mL de *P. aeruginosa* en función de la concentración de RB en los distintos tiempos de irradiación, y los valores de UFC/mL de *P. aeruginosa* en función de la concentración de RB a un único tiempo de 30 minutos, en luz y oscuridad. Estos valores corresponden a las medias obtenidas de los tres experimentos realizados bajo las mismas condiciones (réplicas biológicas).

En el apartado (A) de la Figura 4 se muestra la supervivencia de *P. aeruginosa* en los distintos periodos de tiempo bajo exposición a luz. Se demuestra mediante el análisis de la varianza que el modelo general de estos datos es estadísticamente significativo ( $p$  valor = 0,017).

También se muestra significancia estadística al comparar entre 0 y 20 minutos, y entre 0 y 30 minutos (*p* valor para ambos = 0,007) cuando se emplean las concentraciones 3 mg/g y 1,5 mg/g.

Si nos fijamos en los periodos de tiempo 5 y 10 minutos, estos no muestran diferencias significativas entre sí.

Se observa una reducción completa ( $8 \log_{10}$  UFC/mL) de *P. aeruginosa* cuando se utiliza RB a una concentración de 3 mg/g, e incluso a una concentración menor de 1,5 mg/g, tras aplicar luz durante 20 y 30 minutos. Partiendo de una suspensión celular de  $\sim 10^8$  UFC/mL, a los 5 minutos ya se puede apreciar una reducción de tres logaritmos para la concentración de 3 mg/g de RB, y de un logaritmo para la concentración de 1,5 mg/g de RB. A los 10 minutos, también se estima una reducción de un logaritmo en base 10 para ambas concentraciones de RB.

En referente a las concentraciones menores de RB (0,5 mg/g y 0,1 mg/g), pese a no ser estadísticamente significativos los resultados obtenidos de las muestras, también se observa una disminución en el crecimiento celular bacteriano. Para la concentración de 0,5 mg/g de RB, se observó una reducción de las UFC/ml de *P. aeruginosa* de  $4,5 \log_{10}$  y  $6 \log_{10}$  a los 20 y 30 minutos, respectivamente. Las colonias bacterianas descendieron discretamente en el caso de la concentración 0,1 mg/g de RB:  $2 \log_{10}$  a los 30 minutos de la aPDI. La aPDI sobre los cultivos celulares en ausencia de RB (RB-) no tuvo efecto antibacteriano, es decir, no supuso una disminución en el número de colonias, y fueron similares a las obtenidas del control positivo del inóculo de *P. aeruginosa* ( $\sim 10^8$  UFC/mL) (Figura 4).

En la Figura 4B se representan las UFC/ml de *P. aeruginosa* expresadas en unidades logarítmicas en base 10 después de 30 minutos de exposición a la luz (dosis total de luz emitida  $144 \text{ J/cm}^2$ ) y el mismo tiempo en oscuridad. La prueba ANOVA factorial entre sujetos indica que el modelo general del análisis es estadísticamente significativo. La variable luz/oscuridad y la variable concentración de rosa de bengala también muestran significancia estadística, así como la combinación de ambas, siendo el *p* valor  $< 0,001$  en ambos casos. Una vez que se ha determinado que existen diferencias entre las medias observadas, se valora cuáles de ellas difieren mediante el estudio de todas las parejas de combinaciones posibles de la variable concentración rosa de bengala; para lo cual se ha usado la prueba de comparación múltiple de Scheffer. Aquellas que demuestran ser estadísticamente significativas son las diferencias entre las concentraciones 0mg/g y 0,5 mg/g de RB (*p* valor = 0,015); 0 mg/g y 1,5 mg/g (*p* valor =  $< 0,001$ ); 0 mg/g y 3mg/g (*p* valor = 0,001); 0,1 mg/g y 1,5 mg/g (*p* valor = 0,01); y 0,1 mg/g y 3 mg/g (*p* valor = 0,012) bajo la condición de luz.

Cuando se compara las medias de la variable concentración de RB en condición de oscuridad, no se ve ningún cambio en cuanto a la supervivencia bacteriana, todas ellas manteniéndose en una concentración aproximada a la inicial de  $10^8$  UFC/mL.

Tampoco se observan diferencias significativas al compararlo con el control positivo del inóculo, el cual no contenía polímero, cuando se encuentra sometido a condiciones de luz y oscuridad ( $p$  valor= 0,9565); ocurre lo mismo si comparamos el control positivo del inóculo con la concentración 0 mg/g de RB en condiciones de luz: no se observan diferencias estadísticamente significativas ( $valor$  de  $p$  = 0,095). En la concentración más baja de RB (0,1 mg/g se observa una bajada de UFC más discreta, sin ser esta una diferencia estadísticamente significativa. El intervalo de confianza de este estudio fue del 95%.

Se pudo apreciar, en última instancia, un cambio en el aspecto de las microesferas a partir de 10 minutos de irradiación. El volumen de estas había aumentado notablemente y, a su vez, había disminuido la intensidad de color fucsia, característico de este fotosensibilizador. A los 30 minutos las microesferas eran prácticamente blanquecinas y duplicaban su volumen respecto al del inicio de esta terapia.

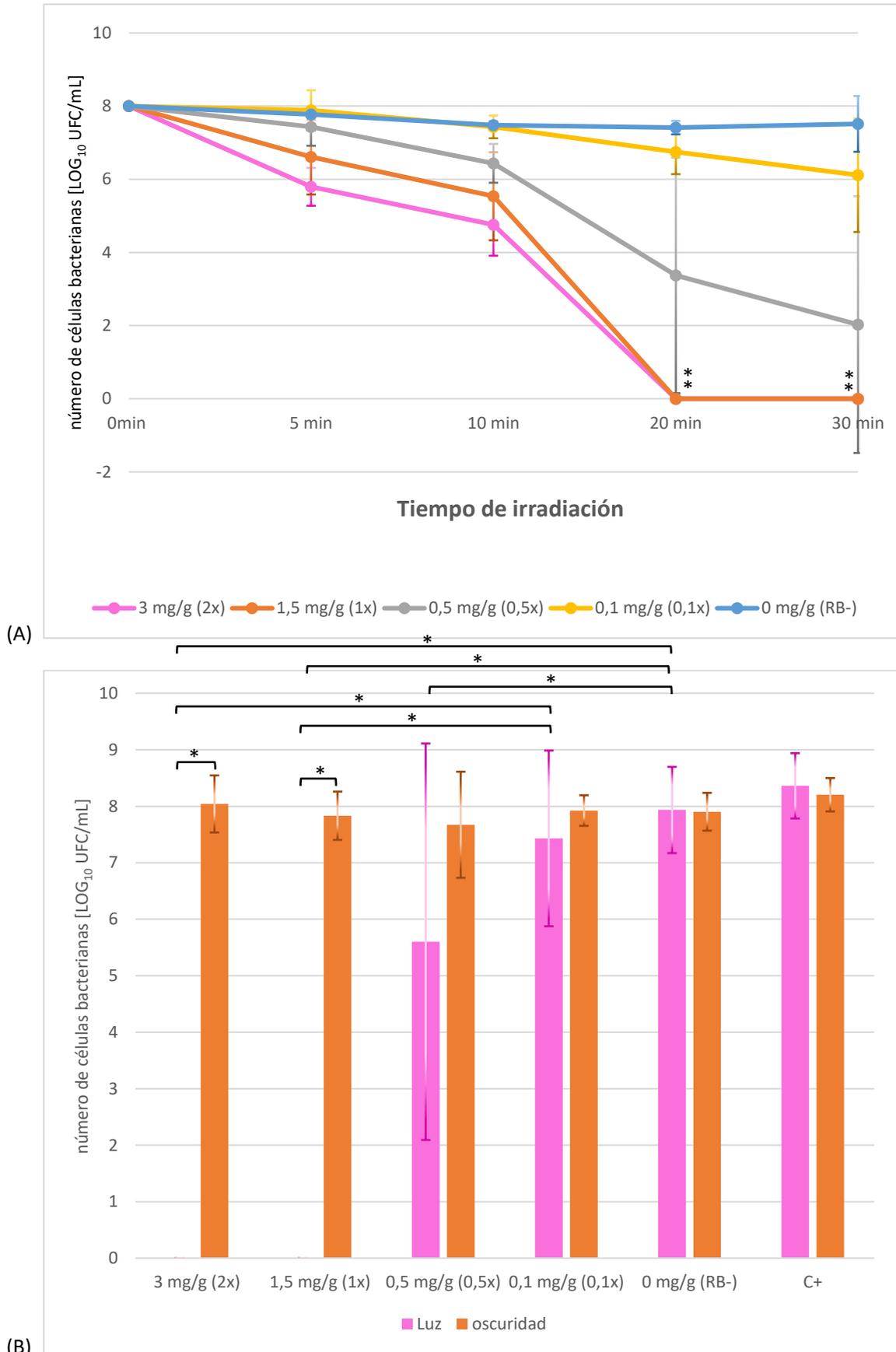


Figura 4. Ensayos de inactivación fotodinámica. (A) Curvas de supervivencia correspondientes a la inactivación fotodinámica de *Pseudomonas aeruginosa* en base al tiempo de irradiación y concentraciones de rosa de bengala.

Cada punto corresponde a la media de tres experimentos independientes. **(B)** Concentraciones logarítmicas de UFC de *Pseudomona aeruginosa* con rosa de bengala en sus distintas concentraciones en condiciones de luz y oscuridad después de 30 minutos (aPDI a una dosis total de luz emitida de 144 J/cm<sup>2</sup>). **2X:** 3mg/g; **1X:** 1,5 mg/g; **0,5X:** 0,5 mg/g; **0,1X:** 0,1 mg/g; **RB-:** 0 mg/g; **C+:** control positivo del inóculo.

Las barras de error representan la desviación estándar calculada para tres mediciones.

Análisis estadístico t de Student y ANOVA de un factor: \*p < 0,05.

#### 4. DISCUSIÓN

La aparición de resistencias microbianas se está convirtiendo en un desafío global en las áreas clínica y medioambiental [25]. En el marco actual de la pandemia por el nuevo coronavirus parece estar justificado el empleo concomitante de antibióticos en pacientes con COVID-19, pues las coinfecciones bacterianas en estos casos indican una mayor comorbilidad, un mayor uso de los recursos sanitarios y un riesgo de muerte más alto [33]. Actualmente es bien sabido que la coinfección bacteriana es relativamente poco frecuente en pacientes hospitalizados con COVID-19 [34], lo que provocará que en unos años se amplíe el número de resistencias a antibióticos debido a este uso excesivo. De hecho, desde la plataforma GLASS, donde se recogen datos de prácticamente todos los países del mundo, se puede ver que todos los informes revelan un reciente aumento de las infecciones provocadas por bacterias resistentes a los antibióticos [9]. Sin embargo, esta crisis silenciosa viene de antaño [35]. Existen numerosas pruebas que confirman que el uso inadecuado de antimicrobianos, o más bien abuso, no da los resultados terapéuticos esperados y que, además, se asocia con la generación de resistencias. La Estrategia Mundial de la OMS [36] define como uso apropiado de los antimicrobianos:

*“el uso eficaz en relación con el costo de los antimicrobianos con el cual se obtiene el máximo efecto clínico-terapéutico y simultáneamente se minimiza la toxicidad del medicamento y el desarrollo de resistencia microbiana”.*

La Organización Mundial de la Salud ha nombrado recientemente a *P. aeruginosa* como objetivo de la más alta prioridad para el desarrollo de nuevos antibióticos [10] para combatir el problema mundial cada vez mayor de la resistencia a los antimicrobianos, pues son especialmente peligrosas en el ámbito hospitalario y pueden provocar infecciones graves y, muchas veces, letales. Debido a lo comentado anteriormente, nos encontramos en el apuro de buscar alternativas a los fármacos antibióticos para evitar que progrese esta situación.

La terapia fotodinámica antimicrobiana es una alternativa emergente a los antibióticos motivada por problemas crecientes con patógenos resistentes a múltiples fármacos [37].

Como se ha mencionado en la introducción, la polaridad negativa del FS hace que este actúe sobre el exterior de la célula y no en el interior, con carga positiva. Queda reflejado en la bibliografía que el acúmulo de fotosensibilizador dentro de la célula no es requisito para que la fotoinactivación sea eficiente [21]. Esta propiedad de la aPDI nos aporta una gran ventaja ya que demuestra que el ataque a la célula microbiana se realiza desde el exterior de la célula y no desde el interior, donde el ADN podría quedar dañado y, probablemente, mutado [16]. Podría ser interesante estudiar si otros fotosensibilizadores son capaces de penetrar la membrana externa celular y llegar a estructuras claves de la bacteria, como el citoplasma o el núcleo.

Numerosos estudios han comparado la inactivación fotodinámica con rosa de bengala entre especie grampositivas y gramnegativas [40], incluyendo especies resistentes a antibióticos [41, 42]. Los resultados obtenidos fueron que las primeras eran más sensibles a esta terapia y que, por tanto, se inactivaron más rápido que las últimas [43]. Cervini Bohm [44] demostró que eran necesarias mayores dosis lumínicas en las muestras de *P. aeruginosa* para conseguir resultados similares observados en otras especies grampositivas y gramnegativas.

Además, considerando que el RB es uno de los foto-antimicrobianos más estudiados hasta el momento, sabemos que es seguro para el uso en la práctica clínica, y también que su coste es muy bajo, lo que podría ser una gran ventaja para su futura aplicación en contextos médicos reales [31].

En nuestro trabajo se demuestra que la inactivación de *P. aeruginosa* ha sido satisfactoria según qué condiciones. Teniendo en cuenta esto, quizás, podría ser este método una opción como potencial terapia antimicrobiana para el tratamiento de infecciones locales causadas por *P. aeruginosa* multirresistente. Combinando la luz junto con el RB obtuvimos una erradicación total (hasta 8 unidades logarítmicas) en la supervivencia bacteriana después de 30 minutos de irradiación, a una concentración de RB de 3 mg/g ( $p$  valor = 0,0396). Resultados similares (reducciones de 6 log<sub>10</sub> de *P. aeruginosa*) fueron demostrados en otros estudios por Nakonieczna et al. [57] con cuatro fotosensibilizadores diferentes, entre ellos RB y RB junto con yoduro de potasio. Del mismo modo, Beirão et al. [58] evaluaron la efectividad de la porfirina tetracatiónica (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) a una fluencia de 43,2 J/cm<sup>2</sup> mostrando una reducción de 8,1 log<sub>10</sub> en el recuento de células viables en el cultivo de *P. aeruginosa*. En el caso de Alves et al. [59], donde evalúan la viabilidad de otra gramnegativa (*E. coli*) con porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF y Tri-Py<sup>+</sup>-Me-CO<sub>2</sub>Me, también se ven reducciones significativas de ~7 log<sub>10</sub> a una fluencia de 21,6 J/cm<sup>2</sup>. La capacidad fotoinactivadora de estas porfirinas catiónicas también derivan del oxígeno singlete. Aun así, debemos resaltar que, en nuestro trabajo, la aplicación de la luz en períodos más cortos de tiempo (5, 10 y 20 minutos) también dio como resultado una disminución de la

supervivencia microbiana en las concentraciones 3 mg/g, 1,5 mg/g y 0,5 mg/g de RB, lo que puede llegar a tener gran relevancia clínica a la hora de aplicar esta terapia sobre ciertos tejidos en períodos de tiempo más largos.

Si bien empleamos concentraciones menores de RB no observamos resultados tan alentadores como los anteriores, aun empleando una dosis total de luz de  $144 \text{ J/cm}^2$  (30 minutos de irradiancia). Este efecto fue menor y, en realidad, insignificante, en el caso de concentraciones de RB de 0,5 mg/g y 0,1 mg/g –solo mostró una reducción de un logaritmo en el caso de 0,5 mg/g de RB- en la supervivencia de *P. aeruginosa* tras finalizar la aPDI. En las suspensiones celulares del control (C+), las cuales no contenían el polímero Amberlite® con RB, así como el polímero Amberlite® sin RB (RB-) tampoco se obtuvo, como era de esperar, una reducción de colonias bacterianas.

Con estos datos queremos recalcar que para *P. aeruginosa* el efecto máximo se obtiene a partir de 20 minutos de irradiación para concentraciones mínimas de  $\sim 1,5 \text{ mg/g}$  de RB, pero que, tal vez, con concentraciones menores se podría conseguir el mismo efecto aumentando el tiempo de exposición a la luz.

Sin embargo, el empleo simultáneo de RB, en las mismas concentraciones, en oscuridad revelan datos muy distintos. Las muestras de bacterias que no han sido expuestas a la luz no reflejan una reducción en su crecimiento en ninguna de las concentraciones del fotosensibilizador, por lo que ciertamente el RB solo es efectivo si se acopla a la fuente de luz. Ocurre lo mismo en el estudio de Gavara et al. [56], en el que la eficacia de los fotosensibilizadores empleados es nula o muy baja. Esto es debido a lo que se ha comentado anteriormente; sin la presencia de especies reactivas de oxígeno, en concreto de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), no se produce el efecto perjudicial sobre las células bacterianas; y esto solo se logra a través de irradiación lumínica.

Por el contrario, los ensayos realizados por Del Valle et al. [31] con polímeros cargados con RB muestran una reducción poblacional de  $4\text{-}5 \log_{10}$  en condición de oscuridad, lo cual convierte a esos polímeros en bactericidas contra *P. aeruginosa* incluso cuando el material no está iluminado.

Por todo lo explicado, deducimos que la aPDI tiene algunas ventajas sobre los antibióticos: en primer lugar, el FS puede erradicar no solo las bacterias grampositivas y gramnegativas, sino también algunos protozoos, virus y hongos [51], mientras que los antibióticos a menudo tienen un espectro de actividad antibacteriana bastante limitado; en segundo lugar, en contraposición a los antibióticos, el uso de FS no induce resistencia en las bacterias; en tercer lugar, el riesgo potencial de causar mutaciones tras la aplicación de PS

es muy baja –como se ha citado anteriormente- puesto que no afecta al ADN de la célula; en última instancia, se descubrió que los FS son activos no solo contra las bacterias sensibles a los antibióticos, sino también contra las cepas resistentes y aquellas especies bacterianas capaces de formar biofilms [37].

En cuanto a las propiedades morfológicas de las microesferas de poliestireno, se observó que, a partir de los 10 minutos tras la exposición a la luz, estas fueron aumentando de tamaño y disminuyendo la intensidad del color hasta quedarse blanquecinas casi por completo. Este cambio de volumen se les atribuye a los diversos estados de hidratación de los iones contenidos en la resina. De esta manera, una vez habiendo adquirido iones del medio líquido en el que se encuentran, estos iones se quedan hidratados [45]. En lo que respecta a sus propiedades fisicoquímicas, estas no se vieron modificadas a lo largo de este proceso, puesto que se vieron resultados satisfactorios tal y como se demuestra en la Figura 5 del Anexo.

En consecuencia, para comprender el papel exacto de la aPDI con rosa de bengala en el tratamiento de infecciones locales, es preciso realizar más investigaciones en cuanto a la concentración del FS, la energía de irradiación y la duración de esta terapia; y estudiarlas cuidadosamente para maximizar los beneficios terapéuticos que esta pudiera tener. La inquietud por seguir ampliando conocimientos en este tema hace que continuemos trabajando en este proyecto, y es por este motivo los resultados de este trabajo se presentarán en el XXVIII Congreso Nacional de Microbiología (<https://congresosem21.es/>). Creemos importante, por las actuales circunstancias sanitarias, que debemos incidir en la salud global y en la microbiología medioambiental.

## 5. CONCLUSIONES

La capacidad antimicrobiana del rosa de bengala sobre los polímeros Amberlite® frente a *Pseudomonas aeruginosa* sido investigada con anterioridad. Sin embargo, en nuestro trabajo hemos investigado que el efecto antimicrobiano depende de la concentración de fotosensibilizador empleado (rosa de bengala) y de la afluencia de luz con la que se irradia el sistema aPDI. De hecho, hemos observado que a una dosis total de luz ( $144\text{J}/\text{cm}^2$ -30 minutos de irradiación) y cuando se emplean concentraciones de rosa de bengala de 3 y 1,5 mg/g se consigue una total erradicación de una población de *P. aeruginosa* (hasta  $8 \log_{10}$  UFC/mL).

La comunidad científica ha adquirido una mayor comprensión del contexto en el que se puede aplicar la PDI y los microorganismos contra los que puede tener éxito. Ahora bien, es necesario un esfuerzo interdisciplinar para poner en marcha esta terapia en un futuro próximo.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutora la Dra. Rosa de Llanos por su ayuda y su dedicación, al Profesor Francisco Galindo y a Ana María López por su aportación de los polímeros con rosa de bengala, al Dr. Paco Herrero por su tiempo, a la UIJ por el aporte del material para la realización de este estudio, y a mi abuelo, por haber estado sonriéndome y apoyándome desde el cielo durante todo este trabajo.

## 7. ANEXOS

**Tabla 1.** Valores medios de ensayos de viabilidad celular de *P. aeruginosa* tras la aplicación de aPDI con RB, según concentración de RB y tiempo de exposición a la luz y oscuridad de los tres experimentos realizados.

	LUZ				OSCURIDAD
	5 min	10 min	20 min	30 min	30 min
RB 2x	$8,8 \cdot 10^5$ UFC/mL	$1,6 \cdot 10^5$ UFC/mL	0 UFC/mL	0 UFC/mL	$1,1 \cdot 10^8$ UFC/mL
RB 1x	$1,1 \cdot 10^7$ UFC/mL	$1,1 \cdot 10^6$ UFC/mL	0 UFC/mL	0 UFC/mL	$6,8 \cdot 10^7$ UFC/mL
RB 0,5x	$4,3 \cdot 10^7$ UFC/mL	$4,2 \cdot 10^6$ UFC/mL	$8,7 \cdot 10^5$ UFC/mL	$4 \cdot 10^5$ UFC/mL	$4,7 \cdot 10^7$ UFC/mL
RB 0,1x	$1,3 \cdot 10^8$ UFC/mL	$3,3 \cdot 10^7$ UFC/mL	$1 \cdot 10^7$ UFC/mL	$2,7 \cdot 10^7$ UFC/mL	$8,4 \cdot 10^7$ UFC/mL
RB-	$6 \cdot 10^7$ UFC/mL	$3,1 \cdot 10^7$ UFC/mL	$2,8 \cdot 10^7$ UFC/mL	$8,6 \cdot 10^7$ UFC/mL	$8 \cdot 10^7$ UFC/mL
C+	$9,5 \cdot 10^7$ UFC/mL	$1,3 \cdot 10^8$ UFC/mL	$5,9 \cdot 10^7$ UFC/mL	$2,3 \cdot 10^8$ UFC/mL	$1,6 \cdot 10^8$ UFC/mL

**2X:** 3mg/g; **1X:** 1,5 mg/g; **0,5X:** 0,5 mg/g; **0,1X:** 0,1 mg/g; **RB-:** 0 mg/g; **C+:** control positivo del inóculo.

**UFC:** Unidad formadora de colonias.

**Tabla 2.** Reducción de colonias de *P. aeruginosa* tras la aplicación de aPDI con RB expresado en reducción logarítmica en base 10.

	LUZ				OSCURIDAD
	5 min	10 min	20 min	30 min	30 min
RB 2x	$5,80 \pm 0,52$	$4,76 \pm 0,85$	0	0	$7,85 \pm 0,51$
RB 1x	$6,61 \pm 1,02$	$5,54 \pm 1,20$	0	0	$7,68 \pm 0,43$
RB 0,5x	$7,43 \pm 0,52$	$6,44 \pm 0,53$	$3,37 \pm 3,22$	$2,03 \pm 3,51$	$7,66 \pm 0,09$
RB 0,1x	$7,88 \pm 0,55$	$7,43 \pm 0,31$	$6,74 \pm 0,60$	$6,11 \pm 1,50$	$7,86 \pm 0,27$
RB-	$7,77 \pm 0,07$	$7,48 \pm 0,11$	$7,41 \pm 0,18$	$7,51 \pm 0,76$	$7,81 \pm 0,33$
C+	$7,95 \pm 0,18$	$8,05 \pm 0,23$	$7,76 \pm 0,06$	$8,13 \pm 0,58$	$8,12 \pm 0,29$

**2X:** 3mg/g; **1X:** 1,5 mg/g; **0,5X:** 0,5 mg/g; **0,1X:** 0,1 mg/g; **RB-:** 0 mg/g; **C+:** control positivo del inóculo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *J Invest Surg.* 2012;25(2):67-77. doi:10.3109/08941939.2012.664099
2. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis.* 2008;197(8):1079-1081. doi:10.1086/533452
3. Sobre la Resistencia. [Internet]. Plan Nacional Resistencia Antibióticos (PRAN). 2020 [citado 6 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://resistenciaantibioticos.es/es/sumate-al-pran>
4. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature.* 2016;529(7586):336-343. doi:10.1038/nature17042
5. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2020 [citado 1 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
6. Rodrigues ME, Silva S, Azeredo J, Henriques M. Novel strategies to fight Candida species infection. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(4):594-606. doi:10.3109/1040841X.2014.974500
7. Taraszkievicz A, Szweczyk G, Sarna T, Bielawski KP, Nakonieczna J. Photodynamic Inactivation of Candida albicans with Imidazoacridinones: Influence of Irradiance, Photosensitizer Uptake and Reactive Oxygen Species Generation. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129301. Published 2015 Jun 8. doi:10.1371/journal.pone.0129301
8. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* 2012;125(1 Suppl):S3-S13. doi:10.1016/j.amjmed.2011.11.001
9. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report [Internet]. World Health Organization (WHO). 2020 [Citado 3 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report-2020/en/>
10. La OMS publica la lista de bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017 [citado 1 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
11. Paz-Zarza VM, Mangwani-Mordani S, Martínez-Maldonado A, Álvarez-Hernández D, Solano-Gálvez SG, Vázquez-López R. Pseudomonas aeruginosa: Pathogenicity and antimicrobial resistance in urinary tract infection. *Rev. chil. infectol.* [Internet].

- 2019 Abr [citado 2021 May 23] ; 36( 2 ): 180-189. Disponible en:  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182019000200180&lng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000200180&lng=en). <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>
12. Strateva T, Yordanov D. Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 9):1133-1148. doi:10.1099/jmm.0.009142-0
  13. Pereira SG, Rosa AC, Cardoso O. Virulence factors as predictive tools for drug resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Virulence*. 2015;6(7):679-683. doi:10.1080/21505594.2015.1048958
  14. Lautenbach E, Synnestvedt M, Weiner MG, Bilker WB, Vo L, Schein J, et al. Imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa: emergence, epidemiology, and impact on clinical and economic outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010;31(1):47-53. doi:10.1086/649021
  15. Lebeque Y, Morris HJ, Calás N. Infecciones nosocomiales: incidencia de la Pseudomonas aeruginosa. *Rev cubana med [Internet]*. 2006 Mar [citado 21 de Mayo 2021] ; 45(1). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75232006000100005&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232006000100005&lng=es)
  16. Nakonieczna J, Wolnikowska K, Ogonowska P, Neubauer D, Bernat A, Kamysz W. Rose Bengal-Mediated Photoinactivation of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Is Enhanced in the Presence of Antimicrobial Peptides. *Front Microbiol*. 2018;9:1949. Published 2018 Aug 20. doi:10.3389/fmicb.2018.01949
  17. Gilaberte Y, Serra-Guillén C, de las Heras ME, Ruiz-Rodríguez R, Fernández-Lorente M, Benvenuto-Andrade C, et al. Terapia fotodinámica en dermatología [Photodynamic therapy in dermatology]. *Actas Dermosifiliogr*. 2006;97(2):83-102. doi:10.1016/s0001-7310(06)73359-2
  18. García Fresnadillo D. Generación fotosensibilizada de oxígeno singlete. *tecnia [Internet]*. 1jun.2010 [citado 23may2021];20(1). Disponible en: <http://www.revistas.uni.edu.pe/index.php/tecnia/article/view/104>
  19. Allinger NL. Química orgánica. 2ª ed. Barcelona: Reverté; 1978. 854 p.
  20. Halliwell B, Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine. 5.ª ed. New York: Oxford University Press; 2015. 66 p.
  21. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol*. 1998;201(Pt 8):1203-1209.
  22. Epe B. Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem Biol Interact*. 1991;80(3):239-260. doi:10.1016/0009-2797(91)90086-m

23. Corrales LC, Muñoz MM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova* [Internet]. 2012 July [cited 2021 May 21]; 10(18): 213-225. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702012000200009&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702012000200009&lng=en)
24. Kochevar IE, Lambert CR, Lynch MC, Tedesco AC. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1280(2):223-230. doi:10.1016/0005-2736(95)00297-9
25. Alves E, Faustino MA, Neves MG, Cunha A, Tome J, Almeida A. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Med Chem*. 2014;6(2):141-164. doi:10.4155/fmc.13.211
26. Awad MM, Tovmasyan A, Craik JD, Batinic-Haberle I, Benov LT. Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Sep;100(17):7679-88. doi: 10.1007/s00253-016-7632-3. Epub 2016 May 24. PMID: 27221289.
27. Pourova J, Kottova M, Voprsalova M, Pour M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;198(1):15-35. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.02039.x
28. File:Rosebengalskeletal.png. [Internet]. Wikimedia Commons. 17 de octubre de 2020. [citado 13 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Rosebengalskeletal.png&oldid=491996302>.
29. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res*. 1978;38(8):2628-2635.
30. 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*. 2008;159(6):1245-1266. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08882.x
31. Del Valle CA, Pérez-Laguna V, Resta IM, Gavara R, Felip-León C, Miravet JF, et al. A cost-effective combination of Rose Bengal and off-the-shelf cationic polystyrene for the photodynamic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;117:111302. doi:10.1016/j.msec.2020.111302

32. Burguete MI, Galindo F, Gavara R, Luis SV, Moreno M, Thomas P, et al. Singlet oxygen generation using a porous monolithic polymer supported photosensitizer: potential application to the photodynamic destruction of melanoma cells. *Photochem Photobiol Sci.* 2009;8(1):37-44. doi:10.1039/b810921d
33. Langford BJ, So M, Raybardhan S, Leung V, Westwood D, MacFadden DR, et al. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(12):1622-1629. doi:10.1016/j.cmi.2020.07.016
34. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2020;81(2):266-275. doi:10.1016/j.jinf.2020.05.046
35. World Health Assembly (fifty-first). Emerging and other communicable diseases: antimicrobial resistance [Internet]. World Health Organization. 1998 [citado 3 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/79863>
36. Quick JD. Managing drug supply: the selection, procurement, distribution, and use of pharmaceuticals: Second Edition. West Hartford, Conn.: Kumarian Press; 1997. 422–429 p.
37. Sharma SK, Dai T, Kharkwal GB, Huang YY, Huang L, De Arce VJ, et al. Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models. *Curr Pharm Des.* 2011;17(13):1303-1319. doi:10.2174/138161211795703735
38. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998;42(1):13-28. doi:10.1093/jac/42.1.13
39. Curtis H, Barnes NS, Schnek A, Massarini A. Curtis Biología [Internet]. Buenos Aires (Argentina): Ed. Médica Panamericana; 2008. [citado 2 de mayo de 2021]. Disponible en: [https://books.google.es/books?id=mGadUVpdTLsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?id=mGadUVpdTLsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
40. Silva AF, Borges A, Freitas CF, Hioka N, Mikcha JMG, Simões M. Antimicrobial Photodynamic Inactivation Mediated by Rose Bengal and Erythrosine Is Effective in the Control of Food-Related Bacteria in Planktonic and Biofilm States. *Molecules.* 2018;23(9):2288. Published 2018 Sep 7. doi:10.3390/molecules23092288

41. Nakonechny F, Nisnevitch M, Nitzan Y, Nisnevitch M. Sonodynamic excitation of Rose Bengal for eradication of gram-positive and gram-negative bacteria. *Biomed Res Int.* 2013;2013:684930. doi:10.1155/2013/684930
42. Halili F, Arboleda A, Durkee H, et al. Rose Bengal- and Riboflavin-Mediated Photodynamic Therapy to Inhibit Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Keratitis Isolates. *Am J Ophthalmol.* 2016;166:194-202. doi:10.1016/j.ajo.2016.03.014
43. Dahl TA, Midden WR, Neckers DC. Comparison of photodynamic action by Rose Bengal in gram-positive and gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol.* 1988;48(5):607-612. doi:10.1111/j.1751-1097.1988.tb02870.x
44. Cervini Bohm GM, Casas AG (dir), Buzzola FR (codir), Di Venosa GM (codir). La fotoinactivación bacteriana mediada por porfirinas en el tratamiento de las infecciones bacterianas [Tesis doctoral en Internet]. [Buenos aires]: Universidad de Buenos Aires; 2018 [citado 22 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/93695>
45. Propiedades de las resinas intercambiadoras de iones [Internet]. El intercambio iónico; 2017 [citado el 23 de mayo de 2021]. Disponible en: [http://dardel.info/IX/resin\\_properties\\_ES.html](http://dardel.info/IX/resin_properties_ES.html)
46. Tan J, Liu Z, Sun Y, Yang L, Gao L. Inhibitory Effects of Photodynamic Inactivation on Planktonic Cells and Biofilms of *Candida auris*. *Mycopathologia.* 2019;184(4):525-531. doi:10.1007/s11046-019-00352-9
47. Tavares A, Carvalho CM, Faustino MA, Neves MG, Tome JP, Tome AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs.* 2010;8(1):91-105. Published 2010 Jan 20. doi:10.3390/md8010091
48. Rippon JW. Micología médica. Hongos y actinomicetos patógenos. 3ª ed. México: Editorial Interamericana McGRAW-HILL; 1990.
49. Kadosh D. Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 2019;52:27-34. doi:10.1016/j.mib.2019.04.005
50. Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Pineda-Olvera J, Negrete-Abascal E, Vaca-Pacheco S. Caracterización genotípica de cepas de *Candida albicans* aisladas de la mucosa oral y vaginal de pacientes no inmunocomprometidos. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 2010;73(2):94-101.

- Polak A. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses*. 1992;35(1-2):9-16.  
doi:10.1111/j.1439-0507.1992.tb00813.x
51. Ilizirov Y, Formanovsky A, Mikhura I, Paitan Y, Nakonechny F, Nisnevitch M. Effect of Photodynamic Antibacterial Chemotherapy Combined with Antibiotics on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Molecules*. 2018;23(12):3152. Published 2018 Nov 30. doi:10.3390/molecules23123152
52. Preuss A, Zeugner L, Hackbarth S, Faustino MA, Neves MG, Cavaleiro JA, et al. Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURE2) without intracellular uptake of the photosensitizer. *J Appl Microbiol*. 2013;114(1):36-43. doi:10.1111/jam.12018
53. Amescua G, Arboleda A, Nikpoor N, Durkee H, Relhan N, Aguilar MC, et al. Rose Bengal Photodynamic Antimicrobial Therapy: A Novel Treatment for Resistant *Fusarium Keratitis*. *Cornea*. 2017;36(9):1141-1144. doi:10.1097/ICO.0000000000001265
54. Vanerio N, Stijnen M, de Mol BAJM, Kock LM. Biomedical Applications of Photo- and Sono-Activated Rose Bengal: A Review. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*. 2019;37(7):383-394. doi:10.1089/photob.2018.4604
55. Durkee H, Arboleda A, Aguilar MC, Martinez JD, Alawa KA, Relhan N, et al. Rose bengal photodynamic antimicrobial therapy to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* keratitis isolates. *Lasers Med Sci*. 2020;35(4):861-866. doi:10.1007/s10103-019-02871-9
56. Gavara R, de Llanos R, Pérez-Laguna V, Arnau del Valle C, Miravet JF, Rezusta A, et al. Broad-Spectrum Photo-Antimicrobial Polymers Based on Cationic Polystyrene and Rose Bengal. *Front. Med*. 2021; 8:641646. doi: 10.3389/fmed.2021.641646
57. Nakonieczna J, Wozniak A, Pieranski M, Rapacka-Zdonczyk A, Ogonowska P, Grinholc M. Photoinactivation of ESKAPE pathogens: overview of novel therapeutic strategy. *Future Med Chem*. 2019;11(5):443-461. doi:10.4155/fmc-2018-0329
58. Beirão S, Fernandes S, Coelho J, Faustino MA, Tomé JP, Neves MG, et al. Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin. *Photochem Photobiol*. 2014;90(6):1387-1396. doi:10.1111/php.12331
59. Alves E, Costa L, Carvalho CM, Tomé JP, Faustino MA, Neves MG, et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol*. 2009;9:70. Published 2009 Apr 15. doi:10.1186/1471-2180-9-70

60. Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B*. 1996;32(3):153-157. doi:10.1016/1011-1344(95)07147-4