

**Tratamientos fotodinámicos aplicados a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* enterica y a cepas de *Escherichia coli* multirresistentes a los antibióticos**

**Òscar Gulías Borau**

<http://hdl.handle.net/10803/404789>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

## TESIS DOCTORAL

Título	<b>Tratamientos fotodinámicos aplicados a <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Salmonella enterica</i> y a cepas de <i>Escherichia coli</i> multirresistentes a los antibióticos</b>
Realizada por	<b>Òscar Gulías Borau</b>
en el Centro	<b>IQS School of Engineering</b>
y en el Departamento de	<b>Bioingeniería.</b>
Dirigida por	<b>Dra. Montserrat Agut Bonsfills Dr. Santi Nonell Marrugat</b>



*There is a single light of science,  
and to brighten it anywhere  
is to brighten it everywhere.*

*Isaac Asimov*



# Agradecimientos

Siempre es difícil escribir un texto de agradecimiento como este; es inevitable el temor a olvidarse a alguien querido o que la pobre prosa no alcance a mostrar lo que, en el fondo, no deja de ser un intento de abrir el propio corazón a aquellos que te han ayudado y a los que aprecias.

Por esto, en un intento de ser justo, creo que lo apropiado es escribir siguiendo la norma, que dicta que cuando quieres agradecer has de hacerlo siguiendo un orden en el que primero se agradece lo imprescindible, después lo necesario y se cierra con lo fundamental.

Así, ningún agradecimiento que yo pueda expresar, actual o futuro, puede empezar por otras personas que no sean mis padres, que no sólo hicieron que yo existiera en este universo, sino que me hicieron ver que el universo existía alrededor mío. Con paciencia, cariño y libertad, no pude tener una guía mejor.

Con el amor que sólo corresponde a quien te complementa día a día y hace que puedas llegar a mañana, como el árbol agradece al sol su sustento para crecer y alcanzar alturas mayores, yo bendigo cada segundo que puedo estar a tu lado, *あなたのこと大好き*、Inma.

Familiar, personal y la tercera pata del banco ha de ser la profesional. Si hay alguien a quien tengo que agradecer haber llegado hasta aquí, sin duda es a Montse, que siempre creyó en mi capacidad de acabar la tesis, casi más que yo mismo. Y si hay algo que necesita un doctorando, es saber que tendrá a su directora de tesis apoyándolo. Gracias, de verdad, se agradece trabajar con una buena persona.

Pero sería injusto agradecer a un director de tesis y olvidarse del otro; si la oportunidad que Santi me dio hubiera venido de otra persona, seguramente no me habría atrevido a intentarlo; su visión de la ciencia es estimulante hasta casi la intoxicación, no es de extrañar que haya reunido un equipo tan maravilloso a su alrededor; siempre me apetece empezar un nuevo proyecto con vosotros, chic@s y me alegro cada vez que os veo por micro.

Y si estoy hablando de buena gente con la que trabajar, no quiero olvidarme de los que han pasado por el laboratorio y con los que hemos peleado, codo con codo, para tener resultados tantas veces: aunque algunos estéis lejos, os recuerdo, creedme. De igual modo, un reconocimiento muy sentido a los auxiliares, que me han echado un capote en las clases cada vez que estaba saturado, a menudo sacrificando su propio tiempo más allá de lo que el deber reclamaba.

Naturalmente, es de justicia agradecer a las instituciones y, sobretudo, a las personas que hay detrás de las siglas, que han apostado por mi formación y han ayudado en mis necesidades materiales, científicas y académicas:

Al IQS, gracias a su contrato como asistente de investigación, que no sólo me paga las facturas, sino que me da un sendero iluminado para progresar cada día hacia nuevos retos. Ya son más de seis años de relación laboral y que te dejen trabajar en algo que te gusta y te sientas reconocido por ello es algo que me hace felicitarme por no haber cogido la ruta del dinero fácil y sin recorrido en mi juventud.

Agradezco también al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO), por la financiación del proyecto “Desarrollo de dispositivos nanoestructurados como plataformas multimodales fototerapéuticas. 1. Química”, con referencia CTQ2013-48767-C3-1-R, en el que se circunscriben los estudios desarrollados en esta tesis.

Agradezco igualmente a la European Society for Photobiology por la concesión de una beca que me permitió asistir al “16th Congress of the ESP”, celebrado en Aveiro (Portugal) y presentar los resultados de esta tesis.

Por último, me gustaría acabar por un agradecimiento a aquellos que, sin tener relación con esta tesis, sí han sido fundamentales para mi viaje hasta este puerto: Dr. Asimov y まつもと 泉-sensei, por mostrarme los caminos de la ciencia y el camino correcto en mi infancia/adolescencia. Y a mi lado bueno, Enric, porque siempre ha sido el ejemplo a seguir, y lo sigue siendo.

Querría tener un recuerdo cariñoso también para todas mis jefas, en los laboratorios donde he trabajado, por enseñarme el placer del trabajo riguroso y bien hecho, así como darme, cada una su visión de la ciencia, que espero haber asimilado y poder transmitirse la así a mis preciosos alumnos (que me los quiero por el reto que suponen, aunque los ahogaría en ocasiones por no darse cuenta del potencial que tienen).

Si alguna capacidad admito que tengo es la de la reflexión; y es este autoconocimiento, lo que me hace consciente de mis limitaciones, casi tan grandes como la bondad y capacidad de la gente que he tenido la suerte de cruzarme en esta vida. Por eso, creo firmemente que esta tesis tiene la razón de su culminación en la generosidad y el esfuerzo de tanta gente hacia mí, que mi mayor sentimiento en el de alivio por poder brindarles el resultado de nuestro trabajo, como reivindicación de todos ellos.

Gracias, ojalá nunca tenga un “no” para ninguno de vosotros y pueda corresponderos a todos.

Òscar “Kyo” Gulías

BCN, ad 1.





# Sumario

En la presente tesis doctoral se ha estudiado la terapia fotodinámica antimicrobiana como método de eliminación alternativo de bacterias, orientado a un posible uso sobre superficies o materiales, así como para un uso terapéutico.

El uso de la terapia fotodinámica antimicrobiana presenta diversas ventajas, como son la no generación de resistencias por su daño masivo multifocalizado y la capacidad de dirigir su efecto a la zona deseada mediante la iluminación con una luz inocua de la longitud e intensidad adecuada.

En esta tesis se ha buscado utilizar terapia fotodinámica antimicrobiana para intentar eliminar especies bacterianas potencialmente patógenas: *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*; en este último caso, se ha estudiado también su efectividad en diferentes cepas con diferentes patrones de resistencia a antibióticos, creciendo en suspensión o formando biopelículas. Así mismo, se han buscado sinergias entre el tratamiento fotodinámico y el tratamiento con un antibiótico, el ácido nalidíxico.

Los resultados han sido los siguientes:

Se consiguieron calcular las dosis mínimas inhibitorias de fotosensibilizador (azul de metileno) que eliminaba por completo cultivos bacterianos de más de  $10^8$  UFC/mL tanto en un gram positivo (*Listeria monocytogenes*) como en un gram negativo (*Escherichia coli*), pero hizo falta cambiar el fotosensibilizador a un derivado (nuevo azul de metileno) más eficiente para alcanzar dosis bactericidas sobre *Salmonella enterica*.

En estudios con *Escherichia coli*, se comprobó la eficiencia de la terapia fotodinámica para la eliminación de las cepas multiresistentes a antibióticos, tanto en crecimiento planctónico como en biopelícula. Como era de esperar por su naturaleza de estructura de resiliencia, las cepas creciendo en biopelícula precisaron de una mayor concentración de fotosensibilizador para alcanzar la dosis bactericida y con más variabilidad que sobre cultivos planctónicos.

Finalmente, para algunas de las cepas de *E. coli*, se estudiaron combinaciones con diferentes concentraciones de azul de metileno y ácido nalidíxico para buscar un posible efecto sinérgico entre ellos, pero sólo se detectó tal efecto en una de las cepas multiresistentes de *Escherichia coli*, manteniéndose el efecto aditivo en las demás cepas estudiadas.

Como conclusión, podemos afirmar que en los estudios que se describen en esta tesis, queda demostrado que la terapia fotodinámica antimicrobiana es una metodología efectiva para la eliminación de un amplio espectro de microorganismos, de forma rápida y segura, incluso con cepas muy resistentes a tratamientos antibacterianos convencionales o formando estructuras de resistencia que causan grandes problemas al crecer en superficies, como las biopelículas.

Como información añadida, se ha comprobado la existencia de diferencias en la respuesta al tratamiento entre los diferentes tipos bacterianos, siendo las gram positivas más sensibles al tratamiento.

Se han evidenciado diferencias en la respuesta al tratamiento entre diferentes especies, e incluso entre diferentes cepas de la misma especie, posiblemente debido a diferencias en la estructura celular o presencia de mecanismos como bombas de eflujo, que limita la efectividad del tratamiento.

Por último, parece ser que la composición/estructuración de la biopelícula también ejerce un papel modulador en la respuesta al tratamiento fotodinámico.

# Sumari

En aquesta tesi doctoral s'ha estudiat la teràpia fotodinàmica antimicrobiana com a mètode alternatiu d'eliminació de bacteris, amb un possible ús final sobre superfícies i materials, així com per a un potencial ús terapèutic.

L'ús de la teràpia fotodinàmica antimicrobiana presenta nombrosos avantatges, com ara el de no generar resistències, gràcies al seu dany massiu i multifocalitzat i a la capacitat de dirigir el seu efecte a l'àrea desitjada, tot just il·luminant l'àrea amb una llum no perjudicial, d'intensitat i longitud d'ona adequada.

En aquesta tesi, s'ha investigat l'ús de la teràpia fotodinàmica antimicrobiana per tal d'eliminar espècies bacterianes potencialment patògenes: *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli*; en aquest últim cas, s'ha estudiat també la seva eficàcia envers diferents soques, amb diferents patrons de resistència als antibiòtics, creixent en suspensió o formant biopel·lícules. Així mateix, s'han buscat sinergies entre la teràpia fotodinàmica i el tractament amb un antibiòtic: l'àcid nalidíxic.

Els resultats van ser els següents:

S'ha aconseguit calcular les dosis mínimes inhibidores del fotosensibilitzador (blau de metilè) que eliminava més de  $10^8$  UFC/mL, en cultius tant de gram positiu (*Listeria monocytogenes*), com en gram negatiu (*Escherichia coli*), però va caldre un canvi de fotosensibilitzador cap a un derivatitzat del anterior (nou blau de metilè), més eficient per tal d'aconseguir dosis bactericides sobre *Salmonella enterica*.

En els estudis amb *Escherichia coli*, s'ha comprovat l'eficàcia de la teràpia fotodinàmica per tal d'eliminar soques multiresistents als antibiòtics, creixent tant en suspensió com en biopel·lícula. Com era d'esperar per la seva naturalesa, les soques creixent en biofilm necessiten una major concentració de fotosensibilitzador per assolir les dosis bactericides i es pot observar una variabilitat en la resposta al tractament més gran que en els cultius planctònics.

Finalment, per a algunes de les soques d'*E. coli*, combinacions amb diferents concentracions d'àcid nalidíxic i blau metilè van ser estudiats per trobar una possible sinergia entre ells, però només es va detectar aquest efecte en una de les soques multiresistents d'*Escherichia coli*, mentre que a la resta de soques estudiades, es va mantenir un efecte additiu.

Com a conclusió, podem dir que en els estudis es descriuen en aquesta tesi, resta demostrat que la teràpia fotodinàmica antimicrobiana és una metodologia eficaç per a l'eliminació d'un ampli espectre de microorganismes, d'una manera ràpida i segura, fins i tot amb soques molt resistents als tractaments antibacterians convencionals, o creixent en estructures de resistència que causen greus problemes en créixer en superfícies, com les biopel·lícules.

Com a dades afegides, s'ha demostrat l'existència de diferències en la resposta al tractament entre els diferents tipus de bacteris, sent el gram positiu més sensibles al tractament.

S'han detectat diferències en la resposta al tractament entre espècies diferents i fins i tot entre diferents soques de la mateixa espècie, possiblement a causa de les diferències a l'estructura cel·lular o degudes a la presència de mecanismes com bombes de eflux, que limitarien l'eficàcia de la teràpia.

Finalment, sembla que la composició i estructura del biofilm també exerceix un paper modulador a la resposta a la teràpia fotodinàmica.

# Summary

In this doctoral thesis, antimicrobial photodynamic therapy as a method of disposal alternative of bacteria has been studied, looking for its use on surfaces and materials, as well as for therapeutic use in patients.

The use of antimicrobial photodynamic therapy, presents several advantages, such as not generating resistance, thanks to its multifocalized massive damage and the ability to direct its effect to just the area illuminated with a light with a safe wavelength and intensity.

This thesis has used antimicrobial photodynamic therapy in order to eliminate pathogenic bacterial species: *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*; in the latter case, has been also studied the treatment effectiveness in different strains with different patterns of antibiotic resistance, with cells in suspension as well as forming biofilms. Likewise, synergies between photodynamic therapy and a treatment with nalidixic acid, an antibiotic, have been researched.

The results were as follows:

Managed to calculate the minimum inhibitory doses of photosensitizer (methylene blue) which completely eliminated more than  $10^8$  cfu/mL bacterial cultures both in a gram positive (*Listeria monocytogenes*) as in a negative gram (*Escherichia coli*); but it was needed a change of photosensitizer to a derivated one (new methylene blue), more efficient to achieve bactericidal doses of *Salmonella enterica*.

In studies with *Escherichia coli*, it was proved the efficiency of photodynamic therapy for the elimination of antibiotic multiresistant strains, both in biofilm and planktonic growth. As it was expected by its nature of structure of resilience, strains growing in biofilm needed a higher concentration of photosensitizer to achieve bactericidal doses and the efficiency rates had more variability than on planktonic cultures.

Finally, for some of the strains of *E. coli*, combinations with different concentrations of blue methylene and nalidixic acid were studied in order to find a possible synergy between them, but only in one of the tested multiresistant strains of *Escherichia coli* was synergy found, remaining an additive effect in the other strains studied.

As a conclusion, we can say that in the studies described in this thesis, it is shown that antimicrobial photodynamic therapy is an effective methodology for the elimination of a wide spectrum of microorganisms quickly and safely, even if they are very resistant to conventional antibacterial treatments or are forming resistance structures that usually cause big problems when growing on surfaces, as can be in biofilms.

As additional information, it has been proven the existence of differences in the response to treatment between different bacterial types, being the gram positive more sensitive to treatment.

Likewise, differences in response to treatment between different species, and even between different strains of the same species, have shown in the experiments; those can be due to differences in cell structure or presence of mechanisms like efflux pumps, so limiting the effectiveness of the therapy.

And as a final point, it would seem that the composition/structure of the biofilm also exerts a modulatory role in the response to photodynamic therapy.





# Índices

## 1. Índice general:

Agradecimientos.....III

Sumarios.....VIII

### Índices

1. Índice general.....XVI  
2. Índice de figuras, tablas y fórmulas.....XX  
3. Abreviaturas.....XXX

Capítulo 1: Introducción.....1

1. Resistencia a antibióticos.....1
  - 1.1. Ácido nalidíxico.....4
  - 1.2. Biopelículas.....4
2. Visión histórica de la terapia fotodinámica.....6
3. Fundamentos de la terapia fotodinámica.....7
4. Base molecular de la terapia fotodinámica.....8
5. Ventajas de la terapia fotodinámica antimicrobiana.....13
6. Fotosensibilizadores.....14
  - 6.1. Fotosensibilizador: Azul de metileno.....15
  - 6.2. Fotosensibilizador: Nuevo azul de metileno.....16
7. Efecto de la fotodinámica antimicrobiana en diferentes bacterias.....17
  - 7.1. Papel de la envoltura celular.....17
  - 7.2. Terapia combinada.....20
  - 7.3. Patógenos de interés: *Escherichia coli*.....21
  - 7.4. Patógenos de interés: *Salmonella* sp.....22
  - 7.5. Patógenos de interés: *Listeria monocytogenes*.....23
8. Aplicaciones de la terapia fotodinámica antimicrobiana.....23

Capítulo 2: Objetivos.....25

<u>Capítulo 3: Materiales, técnicas y métodos</u> .....	26
1. Caracterización de las cepas de trabajo.....	26
1.1. Cepas bacterianas.....	26
1.2. Antibiogramas.....	27
1.3. Tinción de Gram.....	29
1.4. Formación de biopelículas.....	29
2. Determinación de la densidad de células viables: recuento del número de Unidades Formadoras de Colonia.....	30
2.1. Obtención de las suspensiones bacterianas de trabajo iniciales...31	
3. Características de la irradiación.....	32
3.1. Tratamientos de irradiación.....	32
3.2. Evaluación de la reducción de viabilidad causada por la exposición a la luz.....	33
4. Agentes antimicrobianos.....	34
4.1. Fotosensibilizadores.....	34
4.2. Antibiótico.....	35
4.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los fotosensibilizadores y antibiótico.....	35
5. Terapia fotodinámica antimicrobiana.....	35
5.1. Sobre bacterias en crecimiento planctónico.....	35
5.2. Sobre <i>Escherichia coli</i> desarrollada en biopelícula.....	37
5.3. Tratamiento combinado: terapia fotodinámica antimicrobiana y antibiótica.....	38
6. Análisis de los datos obtenidos.....	39
6.1. Valoración de los resultados de la inactivación bacteriana y tratamiento estadístico de los datos.....	39
6.2. Valoración de la existencia de sinergia en los estudios de aTFD con antibiótico.....	40
<u>Capítulo 4: Resultados y discusión</u> .....	41
1. Caracterización y estudios previos.....	41
1.1. Comprobación de la pureza de los cultivos: Tinción de gram.....	41
1.2. Medida de la capacidad de formación de biopelícula por parte de las cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	43
1.3. Evaluación de la reducción de viabilidad causada por la exposición a la luz. ....	44
2. Efecto de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre especies patógenas.....	46

2.1. Efecto de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre <i>Listeria monocytogenes</i> .....	46
2.2. Efecto de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre <i>Salmonella enterica</i> .....	50
2.2.1. Azul de metileno (MB) como fotosensibilizador.....	50
2.2.2. Nuevo azul de metileno (NMB) como fotosensibilizador....	59
3. Efectos de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre cepas clínicas multiresistentes de <i>Escherichia coli</i> .....	63
3.1. Cultivos en planctónico.....	63
3.1.1. Estudio de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre cultivo planctónico.....	63
3.1.2. Estudio estadístico.....	68
3.2. Cultivos en biopelícula.....	70
3.2.1. Estudio de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre cultivo en biopelícula.....	70
3.2.2. Estudio estadístico.....	75
3.3. Comparativa de los efectos de la terapia fotodinámica antimicrobiana en cultivos en planctónico y en biopelícula.....	79
4. Terapia combinada: terapia fotodinámica antimicrobiana y tratamiento antibiótico con ácido nalidíxico (NAL) sobre <i>Escherichia coli</i> .....	84
4.1. Cálculo de la Concentración mínima inhibitoria (MIC).....	84
4.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de azul de metileno.....	84
4.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de ácido nalidíxico.....	84
4.2. Estudio del efecto combinado del antibiótico con la terapia fotodinámica antimicrobiana.....	87
4.2.1. Estudio de la terapia combinada con MIC 0.5MB y MIC 0.5 NAL.....	87
4.2.1.1. Sobre la cepa de referencia de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	87
4.2.1.2. Sobre cepas clínicas de <i>Escherichia coli</i> .....	89
4.2.2. Estudio de la terapia combinada con MIC 0.25 MB y MIC 0.5 NAL.....	96
4.2.2.1. Sobre la cepa de referencia de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	96
4.2.2.2. Sobre cepas clínicas de <i>Escherichia coli</i> .....	98
4.3. Estudio matemático del efecto combinado de los tratamientos..	104
4.3.1. Estudio estadístico.....	104
4.3.2. Búsqueda de efectos sinérgicos.....	107

<u>Capítulo 5: Conclusiones</u> .....	108
<u>Capítulo 6: Referencias</u> .....	109
<u>Capítulo 7: Anexos</u> .....	119
1. Anexo 1: Antibiogramas completos.....	119
2. Anexo 2: Contribuciones a congresos.....	120
3. Anexo 3: Colaboraciones en artículos relacionados con la tesis.....	121

## 2. Índice de figuras y tablas

### Índice de figuras:

		Página
Figura 1	Aparición de resistencias.	2
Figura 2	Mapa del porcentaje de cepas de <i>Escherichia coli</i> resistentes a fluoroquinolonas aisladas en los diferentes países de la Unión Europea en el año 2014.	3
Figura 3	Estructura 2D del ácido Nalidíxico.	4
Figura 4	Niels Ryberg Finsen Centenary Danish stamp.	5
Figura 5	Diagrama de Jablonski: Ejemplo de posibles transiciones de absorción.	6
Figura 6	Diagrama de Jablonski: Relajación vibracional.	7
Figura 7	Diagrama de Jablonski: Conversión interna.	8
Figura 8	Diagrama de Jablonski: Cruce entre sistemas.	9
Figura 9	Diagrama de Jablonski: Fluorescencia.	10
Figura 10	Diagrama de Jablonski: Fosforescencia.	11
Figura 11	Diagrama de Jablonski: Resumen de los procesos fotodinámicos.	13
Figura 12	Dianas predichas para el $^1\text{O}_2$ en una célula eucariota.	14
Figura 13	Estructura química del azul de metileno.	15,56
Figura 14	Estructura química del nuevo azul de metileno.	16,56
Figura 15	Estructura del peptidoglicano de <i>Escherichia coli</i> . La parte marcada en amarillo de la figura representa al monómero básico, con las abreviaciones convencionales de aminoácidos y hexosaminas a su izquierda. La parte media muestra un péptido enlazado, con su grupo amida conectando ambas cadenas peptídicas marcado en rojo.	18
Figura 16	Diagrama de la pared de una bacteria gram positiva modelo.	18
Figura 17	Diagrama de la pared de una bacteria gram negativa modelo.	19
Figura 18	Estructura general de un lipopolisacárido de una bacteria gram negativa.	20
Figura 19	Fotografía de antibiograma realizado a cepa multiresistente de <i>E. coli</i> . Los halos de inhibición alrededor de los discos indican la sensibilidad de la cepa al antibiótico presente en cada disco.	19

Figura 20	Colonias crecidas en placa a partir de las diluciones.	20
Figura 21	Espectro de emisión de luz roja de la lámpara LED, indicando la potencia generada según la longitud de onda	32
Figura 22	Lámpara LED irradiando muestras en la campana de flujo laminar horizontal (Selecta SL.), como parte de los estudios de aTFD.	33
Figura 23	Espectro de absorción del azul de metileno y el nuevo azul de metileno, con el rango de emisión de la fuente LED utilizada indicada en gris.	34
Figura 24	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218: Tinción de gram.	41
Figura 25	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313: Tinción de gram.	42
Figura 26	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311: Tinción de gram.	42
Figura 27	Relación de formación específica de biopelículas. Control negativo: <i>E. coli</i> ATCC 25922 incubada ON en PBS. Control Positivo: <i>E. coli</i> ATCC 25922 incubada ON en medio de cultivo M9 con glucosa. Ab 1 a 24 incubados en medio de cultivo M9 con glucosa..	43,82
Figura 28	Evaluación de la toxicidad de la irradiación de 57.6 J/cm <sup>2</sup> de luz roja de longitud de onda (625 ± 25 nm) aplicada a suspensiones bacterianas de <i>E. coli</i> ATCC 35218, <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 y <i>S. enterica</i> ATCC 13311 en ausencia de fotosensibilizador. Control células: suspensión celular inicial sin incubación posterior. Control oscuridad: suspensiones celulares incubadas 120 min en oscuridad. Control luz: suspensiones celulares incubadas durante 120 min con luz roja. Todas las incubaciones se realizaron sin agitación a temperatura ambiente.	45
Figura 29	Gráfica del número de UFC/mL de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 tratadas con concentración de MB (0 y 1,86µM) con 18 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (37.5 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	46
Figura 30	Gráfica del número de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 tratada con diferentes concentraciones de MB (0, 1.55, 3.1, 6.2 y 15.5 µM) con 18 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (37.5 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	48
Figura 31	Gráfica del número de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313 con diferentes concentraciones de MB (0, 0.31, 0.62, 0.93, 1,24 y 1.55 µM) con 18 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (37.5 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	49
Figura 32	Fotografía mostrando la coloración de diferentes concentraciones de azul de metileno: 10 µg/mL (31 µM), 2.5 µg/mL (7.75 µM), 0.5 µg/mL (1.55 µM), 0.3 µg/mL (0.93 µM) y 0.1 µg/mL (0.31 µM).	50

Figura 33	Gráfica del número de UFC/mL de <i>S. enterica</i> ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de MB (0, 15.5, 31, 46.5, 62 y 77.5 $\mu$ M) con 18 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (37.5 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	50
Figura 34	Gráfica del número de UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 tratada con concentración de MB (0 y 77.5 $\mu$ M) con 18 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (37.5 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	52
Figura 35	Gráfica del número de UFC/mL de <i>S. enterica</i> ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de MB (0, 15.5, 31, 46.5, 62 y 77.5 $\mu$ M) con 28.8 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	52
Figura 36	Gráfica del número de UFC/mL de <i>S. enterica</i> ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de MB (0, 77.5, 124 y 155 $\mu$ M) con 28.8 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	53
Figura 37	Gráfica del número de UFC/mL de <i>S. enterica</i> ATCC 13311 tras ser tratada con diferentes concentraciones de MB (0 y 310 $\mu$ M) con 28.8 J/cm <sup>2</sup> y 57,6 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 y 120 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	54
Figura 38	Gráfica del número de UFC/mL de <i>S. enterica</i> ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de MB (0, 279 y 310 $\mu$ M) con 28.8 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	55
Figura 39	Gráfica del número de UFC/mL de <i>S. enterica</i> ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de NMB (0, 185.94 y 206.6 $\mu$ M) con 28.8 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	59
Figura 40	Gráfica del número de UFC/mL de <i>S. enterica</i> ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de NMB (0, 20.66 y 103.3 $\mu$ M) con 28.8 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	60
Figura 41	Gráfica del número de UFC/mL de <i>S. enterica</i> ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de NMB (0, 12.4, 16.53, 20.66 y 51.65 $\mu$ M) con 28.8 J/cm <sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".	61
Figura 42	Cambios del espectro de absorción debido a la agregación de NMB, mostrando la bajada de la longitud de onda en el máximo de absorción al incrementarse las unidades agregadas.	62

Figura 43	Toxicidad causada a las diferentes cepas de <i>E. coli</i> por la exposición a 31 $\mu\text{M}$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de azul de metileno durante 37.5 minutos en oscuridad absoluta. Se indican el valor promedio de UFC/mL y los límites $\pm 1 \log_{10}$ a partir del mismo. Se ha incluido una <i>E. coli</i> de referencia sin exposición al MB ( <i>cell control</i> ).	64
Figura 44	Fotoinactivaciones de los aislados clínicos (Ab 1 a Ab 24) y de la <i>Escherichia coli</i> de referencia ATCC 35218. El tratamiento se efectuó con una concentración de azul de metileno de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (31 $\mu\text{M}$ ) de irradiación con 18 $\text{J}/\text{cm}^2$ de luz roja. Como referencia, se incluye los recuentos de los controles: "cell" (sin fotosensibilizador) y "dark" (con MB, pero sin irradiar).	65
Figura 45	Reducción de la viabilidad debida a la aTFD de las muestras irradiadas con 18 $\text{J}/\text{cm}^2$ , respecto a las mismas muestras no irradiadas, ambas con 31 $\mu\text{M}$ de azul de metileno. Se indica el valor promedio de reducción, los límites $\pm 1 \log_{10}$ a partir del mismo y el límite del efecto bactericida. Las cepas de referencia ATCC 25922 y ATCC 35218 fueron incluidas, así como las muestras clínicas multiresistentes (Ab 1 a Ab 24).	67
Figura 46	Recuento de UFC/mL después de un cultivo ON de 130 $\mu\text{l}$ de medio (M9+Glucosa, TSB o PBS) con un inóculo de 2 $\mu\text{l}$ de la cepa de referencia <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Se ha incluido un control con 132 $\mu\text{l}$ de medio M9+glucosa sin inocular.	72
Figura 47	Recuento de UFC/mL de <i>E. Coli</i> ATCC25922, después de los lavados para eliminar las células planctónicas (ON) y después de la metodología completa con las incubaciones, irradiación y resuspensión de la biopelícula (Completo).	73
Figura 48	Reducción de la viabilidad de la cepa de referencia <i>E. coli</i> ATCC 25922 creciendo en biopelícula, debida a la aTFD de las muestras irradiadas con 18 $\text{J}/\text{cm}^2$ , con concentraciones de azul de metileno de 93, 77.5, 62, 46.5 y 31 $\mu\text{M}$ . Expresado respecto a las mismas muestras no irradiadas.	74
Figura 49	Reducción de la viabilidad debida a la aTFD de las muestras irradiadas con 18 $\text{J}/\text{cm}^2$ , respecto a las mismas muestras no irradiadas, ambas con 77.5 $\mu\text{M}$ de azul de metileno. Se indican el valor promedio de reducción, los límites $\pm 1 \log_{10}$ a partir del mismo y el límite del efecto bactericida. Cepa de referencia <i>E. coli</i> ATCC25922 incluida, así como las cepas clínicas multiresistentes (Ab 1 - Ab 24).	75

Figura 50	Reducción de la viabilidad debida a la aTFD de las muestras irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> , respecto a las mismas muestras no irradiadas. Se indican el valor promedio de reducción, los límites $\pm 1 \log_{10}$ a partir del mismo y el límite del efecto bactericida. Cepa de referencia <i>E. coli</i> ATCC 25922 incluida y muestras clínicas multiresistentes (Ab 1-Ab 24). La gráfica de la izquierda pertenece al estudio hecho con cultivos planctónicos y el derecho pertenece al estudio de cultivos en biopelícula.	80
Figura 51	Tratamiento fotodinámico con azul de metileno (MB) en la cepa de referencia de <i>E. coli</i> ATCC 25922. Suspensiones "Light", irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 $\pm$ 25 nm) y controles "Dark" con suspensiones incubadas en oscuridad el mismo tiempo (37.5 minutos).	85
Figura 52	Tratamiento de <i>E. coli</i> ATCC 25922 con diferentes concentraciones de ácido nalidíxico (0, 32.5, 40.6, 48.75 y 56.8 $\mu$ M).	86
Figura 53	Tratamiento combinado de MB con NAL sobre <i>E. coli</i> ATCC 25922. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 $\pm$ 25 nm).	88
Figura 54	Ratio de supervivencia de <i>E. coli</i> ATCC25922, tras el tratamiento combinado. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 $\pm$ 25 nm).	89
Figura 55	Tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos en la cepa clínica Ab 4. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 $\pm$ 25 nm).	90
Figura 56	Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 4 tras el tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 $\pm$ 25 nm).	91

Figura 57	Tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos en la cepa clínica Ab 10. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm).	92
Figura 58	Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 10 tras el tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm).	93
Figura 59	Tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos en la cepa clínica Ab 14. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm).	94
Figura 60	Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 14 tras el tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm).	95
Figura 61	Tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB en la cepa de referencia <i>E. coli</i> ATCC 25922. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm).	96
Figura 62	Ratio de supervivencia de la cepa de referencia <i>E. coli</i> ATCC 25922 tras el tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm).	97

Figura 63	Tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB en la cepa clínica Ab 4. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm)	98
Figura 64	Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 4 tras el tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm)	99
Figura 65	Tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB en la cepa clínica Ab 10. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm).	100
Figura 66	Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 10 tras el tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm).	101
Figura 67	Tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB en la cepa clínica Ab 14. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm).	102
Figura 68	Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 14 tras el tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm <sup>2</sup> de luz roja (625 ± 25 nm).	103
Figura 69	Valores empleados para realizar el análisis ANOVA de las diferentes cepas tras el tratamiento con 0.5 MIC de ácido nalidíxico (NAL).	105

Figura 70	Valores empleados para realizar el análisis ANOVA de las diferentes cepas tras el tratamiento con 0.25 MIC de azul de metileno (MB).	105
Figura 71	Valores empleados para realizar el análisis ANOVA de las diferentes cepas tras el tratamiento con 0.5 MIC de ácido nalidíxico (NAL) y con 0.25 MIC de azul de metileno (MB).	106
Figura 72	Poster presentado en el "16th Congress of the European Society for Photobiology", celebrado del 31 de agosto al 4 de septiembre del 2015 en Aveiro (Portugal). Presenta el efecto aTFD con una fenalenona 9-substituida como fotosensibilizador.	120

### Índice de tablas:

		Página
Tabla 1	Rendimientos cuanticos y de fluorescència, medidos en etanol y metanol, de azul de metileno y nuevo azul de metileno.	17
Tabla 2	Descripción de los antibióticos que se utilizaron en el estudio.	28
Tabla 3	Concentraciones de fotosensibilizadores utilizadas. MB: Azul de metileno; NMB: nuevo azul de metileno.	36
Tabla 4	Concentraciones de fotosensibilizador y antibiótico utilizadas.	38
Tabla 5	Resumen del test de análisis de la varianza de las reducciones de viabilidad medidas entre las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 20 µg/mL (15.5, 31, 46.5, 62 y 77.5 µM).	51
Tabla 6	Test F de Fisher realizado. En la tabla se presenta la comparación de varianzas del control celular y las muestras sin irradiar (Dark)	54
Tabla 7	Test t de Student. En la tabla se presenta la comparación de varianzas del control celular y la muestras sin irradiar (Dark)	55
Tabla 8	Resumen del test de análisis de la varianza de las UFC/mL medidas entre todas las cepas (clínicas y de referencia) de <i>Escherichia coli</i> sin exposición a la luz (Dark).	68
Tabla 9	Ejemplo de test F de Fisher realizado para cada muestra. En la tabla se presenta la comparación de varianzas de Ab 24 irradiada o sin irradiar.	68
Tabla 10	Ejemplo de test t de Student realizado para cada muestra. En la tabla comparación de Ab 24 irradiada o sin irradiar (dark).	69
Tabla 11	Resumen del test de análisis de la varianza de las reducciones de viabilidad medidas entre todas las cepas (clínicas y de referencia) de <i>Escherichia coli</i> .	70
Tabla 12	Test F de Fisher realizado para los cultivos recuperados de la biopelícula, antes (ON) y después de la aplicación del protocolo (Completo).	76
Tabla 13	Test t de Student para los cultivos recuperados de la biopelícula, antes (ON) y después de la aplicación del protocolo (Completo).	76
Tabla 14	Ejemplo de test F de Fisher realizado para cada muestra. En la tabla comparación de varianzas de Ab 24 irradiada o sin irradiar (dark)	76
Tabla 15	Ejemplo de test t de Student realizado para cada muestra. En la tabla comparación de Ab 24 irradiada o sin irradiar (dark).	77

Tabla 16	Resumen del test de análisis de la varianza de las reducciones de viabilidad medidas entre todas las cepas (clínicas y de referencia ATCC 25922) de <i>Escherichia coli</i> .	78
Tabla 17	Resumen del test de análisis de la varianza de las reducciones de viabilidad medidas entre todas las cepas (clínicas y de referencia) de <i>Escherichia coli</i> , comparando el tipo de cultivo (planctónico o biopelícula).	83
Tabla 18	MIC de MB y NAL para la cepa de referencia <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	86
Tabla 19	Concentración de MB (MIC 0.5) y NAL (MIC 0.5) para los estudios combinados.	87
Tabla 20	Concentración de MB (MIC 0.25) y NAL (MIC 0.5) para los estudios combinados.	96
Tabla 21	Estudio del efecto combinado de 0.5 MIC del ácido nalidíxico (NAL) y 0.25 MIC del azul de metileno (MB) en las cepas de estudio. Tratamiento combinado (MIX).	107
Tabla 22	Cuadro de resistencias de las diferentes cepas de <i>Escherichia coli</i> , tanto clínicas (Ab 1 a Ab 24), como de referencia (ATCC 25922 y ATCC 35218).	119

#### Índice de fórmulas:

		Página
Fórmula 1	Fenómenos de fotosensibilización. FS: fotosensibilizador; hv: fotón.	11
Fórmula 2	Fotosensibilización tipo I.	12
Fórmula 3	Fotosensibilización tipo II.	12
Fórmula 4	Formación específica de biopelículas (FEB)	30, 43
Fórmula 5	Cálculo células viables	31
Fórmula 6	Cálculo de la dosis de luz recibida	32
Fórmula 7	Resumen efectos sinérgicos.	40
Fórmula 8	Simplificación efectos sinérgicos.	40, 107
Fórmula 9	Tasa de supervivencia.	66

### 3. Abreviaturas

®	Marca registrada
$\sigma$	Desviaciones estándar
$\Phi_{\Delta}$	Rendimiento cuántico
$\Phi_F$	Rendimiento cuántico de fluorescencia
ad	Año del doctorado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	ANalysis Of VAriance - Análisis de la varianza
ARN	Ácido Ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
aTFD	Terapia fotodinámica antimicrobiana
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
D.O.	Atenuación óptica
dPBS	Tampón fosfato deuterado.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAggEC	Enteroagregativas
EIEC	Enteroinvasiva
EPEC	Enteropatógenas
ESP	European Society for Photobiology
EtOH	Etanol
ETEC	Enteropatógenas
FEB	Formación específica de biopelículas
FS	Fotosensibilizador

H <sub>0</sub>	Hipótesis nula
H <sub>1</sub>	Hipótesis alternativa
I+D+i	Investigación, desarrollo e innovación
IFD	Inactivación fotodinámica celular
IQS	Institut Químic de Sarria
Kdo	Ácido 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosónico
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LB	Luria-Bertani
LED	Light Emitting Diode
LPS	Lipopolisacárido
MB	Azul de metileno
MIC	Dosis Mínima Inhibitoria
MeOH	Metanol
MINECO	Ministerio de Economía, Industria y Competitividad
MIX	Tratamiento combinado
NAL	Ácido nalidíxico
NMB	Nuevo azul de metileno
NMEC	Meningitis neonatal
ON	Overnight
P	Probabilidad
p/v	peso/volumen
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PBS	Tampón fosfato salino
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SOSG	Singlet oxygen sensor green
sp.	Especie
spp	<i>Species pluralis</i>
STEC/VTEC	Productoras de Shiga/Vero toxina
TFD	Terapia fotodinámica
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
UDP	Uridina difosfato
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UPEC	Uropatógenas
UTI	Infecciones en el tracto urinario



# Capítulo 1: Introducción

Transcurrido casi un siglo desde el inicio de la era de los antibióticos por parte de Alexander Fleming, (Sengupta, et al., 2013) que ha permitido una relación de éxitos sin precedentes en la historia médica, estamos asistiendo a su progresivo ocaso debido a la generalización de cepas patógenas resistentes a uno o varios antibióticos.

La inefectividad terapéutica de los antibióticos no sólo causa pérdidas económicas, obligando a estancias hospitalarias más prolongadas y al desarrollo continuo de fármacos más complejos y onerosos; el coste más grave es un incremento en la mortalidad de los pacientes, dificultando también tratamientos quirúrgicos y antitumorales. (Kollef & Fraser, 2001)

Es por eso que la lucha antimicrobiana necesita nuevas armas para combatir los agentes infecciosos que no generen en los microorganismos nuevas resistencias y que sean lo más específicas posible para evitar efectos secundarios. En ambos aspectos, la terapia fotodinámica antimicrobiana (aTFD) se destaca como una solución muy prometedora. (Lauro, et al., 2002) (Singh & Greenstein, 2000)

## **1. Resistencia a antibióticos:**

*“Antibiotic resistance is no longer a prediction for the future; it is happening right now, across the world, and is putting at risk the ability to treat common infections in the community and hospitals. Without urgent and coordinated action, the world is heading towards a post-antibiotic era, in which common infections and minor injuries, which have been treatable for decades, can once again kill” –WHO, Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.*

La definición histórica de antibiótico (del griego αντί - anti, "en contra" + βιοτικός - biotikos, "dado a la vida" (Liddell & Scott, 1940)), dada por el Dr. Selman A. Waksman en su discurso de aceptación del premio nobel de medicina en 1952, es la de un compuesto producido por microorganismos que posee la propiedad de inhibir el crecimiento e incluso destruir otros microorganismos (Waksman, 1952).

Desde entonces, la definición se ha ampliado para incluir a compuestos sintéticos, variaciones de los antibióticos naturales o compuestos naturales con propiedades antibióticas que no han sido generados por microorganismos (Strohl, 1997).

Sea por un efecto accidental o porque hayan sido desarrollados evolutivamente como un mecanismo de competencia entre organismos, los antibióticos se han convertido en el principal medio de defensa contra los patógenos a los que los seres humanos se ven expuestos (Sandoval-Motta & Aldana, 2016).

La terapia con antibióticos reduce la mortalidad principalmente en tres condiciones clínicas:

1) En el tratamiento de enfermedades contagiosas (por ejemplo, las enfermedades de transmisión sexual, algunas infecciones del tracto respiratorio, infecciones hospitalarias, etc.).

2) En la supresión de infecciones endógenas (muchas de las infecciones urinarias, cutáneas o de tejidos blandos) provocadas por oportunistas presentes en la microbiota corporal.

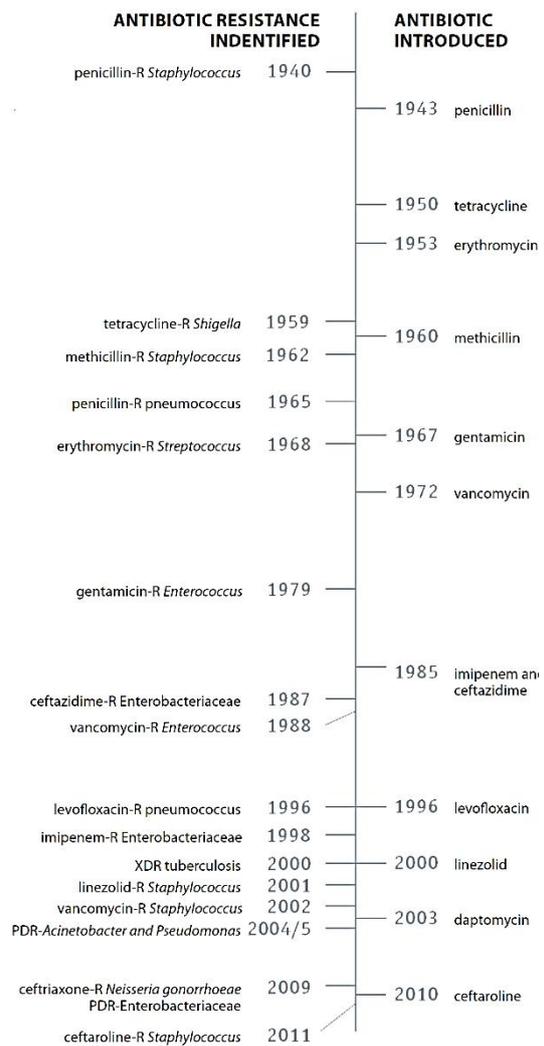
3) Como medida de profilaxis para prevenir infecciones en pacientes de alto riesgo (quemados, pacientes sometidos a cirugía, inmunodeprimidos o con tratamientos anticancerígenos, entre otros) (US Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Cada año, más de 70 miles de millones de dosis de antibióticos son servidas en farmacias de todo el mundo, principalmente penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, fluoroquinolonas, trimetoprim y tetraciclinas (Van Boeckel, et al., 2014).

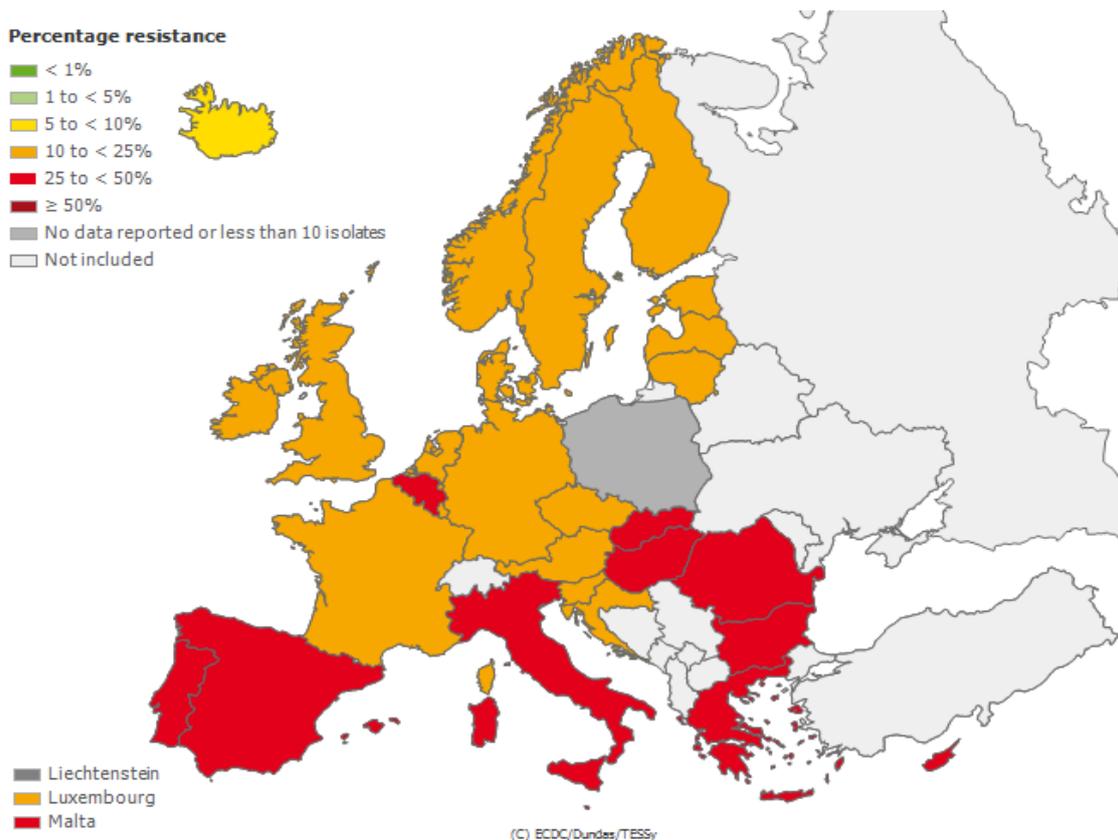
Las cantidades vendidas aumentan cada año debido a la entrada de tratamientos más avanzados en poblaciones de poca salubridad que no tenían acceso anteriormente a éstos y a la necesidad de tratamientos cada vez más complejos para tratar cepas resistentes en todos los países. (Laxminarayan, et al., 2016) (figura 1 y 2)

La emergencia de resistencias es una respuesta evolutiva natural de los microorganismos a la exposición a los antimicrobianos, pero su aparición se ve exacerbada por la presión selectiva provocada por el empleo de la gran cantidad de antibióticos en uso (Kollef & Fraser, 2001), incluyendo la utilización indiscriminada de antibióticos en la ganadería, en la agricultura y en tratamientos médicos inadecuados (Holmes, et al., 2016).

Este incremento de la aparición de microorganismos resistentes a los tratamientos, es una de las mayores preocupaciones en el ámbito de la salud pública en el temprano siglo XXI (Laxminarayan, et al., 2016). Particularmente peligrosa es el aumento de las cepas bacterianas multiresistentes, dentro de las cuales, el aumento de las bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos (imipenem, panipenem/betamipron, etc.) es el peor de los riesgos, ya que, en muchos casos, estos son considerados la última línea de tratamiento efectivo contra estas infecciones (Narayanan, et al., 2016).



**Figura 1: Aparición de resistencias.** (US Centers for Disease Control and Prevention, 2013).



**Figura 2: Mapa del porcentaje de cepas de *Escherichia coli* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en los diferentes países de la Unión Europea en el año 2014.** (European Center for Disease Prevention and Control, 2014)

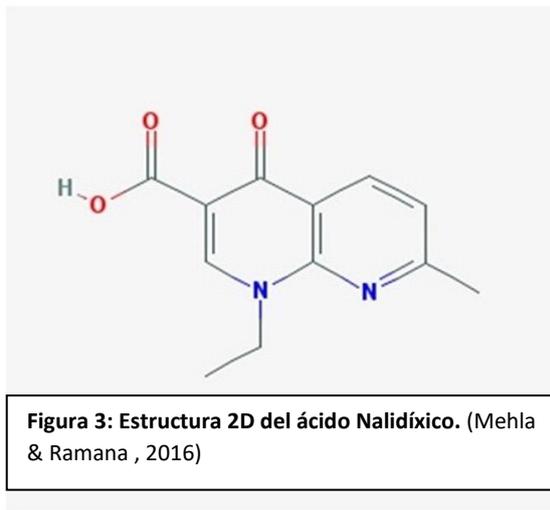
Los mecanismos que confieren resistencias a las cepas bacterianas se pueden clasificar en tres categorías básicas (Fernández & Hancock, 2012):

- † Resistencia intrínseca: es referida a todos los mecanismos inherentes a un microorganismo concreto que limitan los efectos de los antimicrobianos, como por ejemplo la membrana celular, las bombas de eflujo, los estados de latencia o la ausencia de la diana propia del antibiótico en la bacteria.
- † Resistencia adquirida: es consecuencia de la incorporación de material genético (vía plásmidos, transposones, etc.) o la aparición de nuevas capacidades para soportar mayores concentraciones de antibiótico como resultado de mutaciones (Partridge, 2015).
- † Resistencia adaptativa: Es el incremento temporal en la habilidad de una bacteria para sobrevivir al efecto de un antibiótico gracias a la alteración en la expresión de genes o proteínas como resultado de la exposición a un estímulo ambiental, siendo este estímulo la presencia del mismo antibiótico frente al que incrementa su resistencia (Fernández, et al., 2011).

### 1.1. Antibiótico de interés: ácido nalidíxico:

En pro de combatir, o al menos ralentizar, la proliferación de bacterias con resistencias a antibióticos, es interesante buscar la forma de potenciar tratamientos antibióticos existentes; en esta tesis se ha estudiado la combinación de la terapia fotodinámica con la farmacoterapia con ácido nalidíxico, utilizado habitualmente como tratamiento de las infecciones urinarias por parte de bacterias gram negativas como *Escherichia coli*. (National Center for Biotechnology Information., s.f.)

El ácido nalidíxico es una quinolona de primera generación (figura 3). Las quinolonas son antibióticos de amplio espectro que inhibe la actividad ADN Girasa. En *Escherichia coli*, el ADN Girasa introduce giros para superenrollar el ADN, provocando la relajación de las hebras en la horquilla de replicación del material genético y también permite el acceso a diversas proteínas. Su correcta función es vital para la replicación del ADN y para ciertos pasos de la transcripción, reparación, recombinación y transposición del mismo (Wolfson & Hooper, 1985).



El ácido nalidíxico tiene como acción principal inhibir rápidamente la síntesis de ADN y la formación de la horquilla de replicación y secundariamente causa muescas en el ADN de cadena simple, degradando parcialmente el cromosoma bacteriano e induciendo los sistemas de reparación del ADN y la síntesis de proteínas de respuesta a choque térmico (Krueger & Walker, 1984).

El ácido nalidíxico es un antibacteriano de gran interés por su amplio espectro y efectividad contra bacilos y cocos gram negativos y por la capacidad de controlar infecciones sistémicas con dosis orales en concentraciones de fácil tolerancia para los pacientes (Fass, 1985).

El principal problema del ácido nalidíxico es la relativa facilidad con la que aparecen resistencias al tratamiento, agravándose el impacto en entornos hospitalarios. En el caso del ácido nalidíxico, al ser una quinolona, la resistencia no aparece por la transferencia de un plásmido, como es habitual en otras resistencias, sino por una mutación cromosómica, usualmente por sustituciones en la región QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*) de la unidad gyrA del ADN Girasa (Vila, et al., 1994).

### 1.2. Biopelículas:

La existencia de estructuras gelatinosas, asociadas a un crecimiento bacteriano más efectivo y a una superior resiliencia al tratamiento antibiótico, es conocida desde hace tiempo (Zobell & Allen, 1935). A estas estructuras se las conoce como biopelículas.

El término biopelícula fue creado para describir a las comunidades sésiles de microorganismos, caracterizada por la secreción de una compleja matriz extracelular protectora. En el caso de *Escherichia coli*, la matriz está compuesta mayoritariamente por lipopolisacáridos (LPS) y su formación y maduración ocupa el 38% del genoma bacteriano (Prigent-Combaret, et al., 1999).

Los microbios creadores de biopelículas suelen ser microorganismos que se adhieren a superficies, formando estructuras tridimensionales y que son responsables de hasta el 80% de las infecciones bacterianas en países con buena asistencia sanitaria (Lebeaux, et al., 2013).

La existencia de biopelículas como reservorios permite a las bacterias patógenas una mejor diseminación, ya que éstas migran para colonizar al huésped más cómodamente (Ben Nasr, et al., 1996). Paralelamente, facilita contaminar el medio ambiente externo al hospedador, pudiéndose alcanzar nuevos hospedadores o evitar su completa eliminación por parte del sistema inmune, consiguiendo ganar tiempo para su adaptación y posterior colonización del hospedador (Jefferson, 2004).

Además, permite a las células que lo integran interactuar más fácilmente entre ellas mediante pequeñas moléculas sintetizadas por ellas mismas, lo que permite la autoinducción de la expresión génica en función de la densidad de la población, es decir, comunicarse mediante percepción de quórum o *quorum sensing*. Éste sistema de regulación está mediado usualmente en bacterias gram negativas por compuestos de acil-homoserina lactonas y, en gram positivos, por oligopéptidos procesados (Miller & Bassler, 2001). La percepción de quórum permite un mejor uso de los nutrientes a la comunidad que integra la biopelícula, (Camilli & Bassler, 2006) al tiempo que dificulta la difusión de moléculas tóxicas, diluyendo el efecto de antimicrobianos (Redfield, 2002).

Asimismo, la formación de la biopelícula protege a los microorganismos de las agresiones del entorno, evitando la desecación y aportando protección mecánica al tiempo que una estructura donde moverse. Por ejemplo, en la matriz de *Escherichia coli*, la celulosa mantiene la humedad (Gualdi, et al., 2008) (Hobley, et al., 2013), mientras que las fibras *curly*, proteínas ameloides, le sirven como andamio para el depósito de los exopolisacáridos (Serra, et al., 2013).

Esta protección extra, añadida a las diferencias de metabolismo de las células creciendo en estado planctónico o en biopelícula, hace que la resistencia delante de los agentes antimicrobianos sea muy superior en células agrupadas formando una biopelícula que en las que viven en suspensión (Ghannoum, et al., 2016). Esto se debe en gran medida a variaciones de la expresión génica que:

- reguladas de forma coordinada y en fases, alteran el fenotipo de poblaciones clonales para poder protegerse del sistema inmune (van der Woude, 2006).
- dirigen la evolución de la matriz de la biopelícula hacia una biopelícula “madura”, centrándose en la seguridad y la comunicación por delante de la adhesión y construcción estructural, permitiendo una “división del trabajo” entre las diferentes células que la integran e incluso la coexistencia de interacciones multiespecie colaborativas/simbióticas dentro de la misma biopelícula (Holden & Gally, 2004) (Aparna & Yadav, 2008).

- dan lugar a subpoblaciones de células quiescentes (Shah, et al., 2006) que pueden sobrevivir a la exposición a antibióticos, reconstruyendo la colonia y la biopelícula cuando las agresiones han pasado (Teles, et al., 2013).

Como consecuencia de estas características, la concentración antimicrobiana necesaria para eliminar a un agente patógeno en biopelícula puede llegar a ser miles de veces superior a la necesaria para las células creciendo en suspensión (Costerton, et al., 1987).

## **2. Visión histórica de la terapia fotodinámica (TFD):**

*“At this time of the year the light fluctuated greatly and it is to this fact that I am largely beholden for the remarkable results I found...”--Oscar Raab*

La luz siempre ha sido considerada como la fuente de vida primordial, no en vano somos una especie que ha sobrevivido a glaciaciones y tenemos la sensibilidad atávica de atesorar cada rayo de luz que nos llega. Así, no es de extrañar que se haya intentado usar la luz solar para curar enfermedades desde los tiempos primigenios; en efecto, hay registros del uso de la luz en combinación con extractos de plantas en civilizaciones de hasta tres milenios atrás para el tratamiento del vitiligo y la psoriasis (Spikes, 1997); así se habla de fotomedicina para referirse a la rama de terapias en las que se usa radiación electromagnética no ionizante (infrarrojo, visible y ultravioleta) para el tratamiento de enfermedades (Lim & Soter, 1993).

Probablemente, uno de los primeros artículos científicos que menciona un suceso de fotoactivación, sea el artículo de Marcacci del 1888 (Robinson, 1983), en el que describe como, al trabajar con semillas, fermentos y huevos de anfibios, ciertos alcaloides tenían un efecto más pronunciado en el protoplasma celular expuestos a la luz diaria que en oscuridad.

En el invierno de 1897 a 1898, Oscar Raab, un estudiante de medicina bajo el tutelaje del Dr. Hermann von Tappeiner de la universidad de Munich, detectó que la toxicidad de bajas concentraciones de acridina sobre cultivos de paramecios variaba de día en día, dependiendo de la intensidad de la luz solar que iluminara el laboratorio. Este comportamiento lo observó también con otros tintes como la eosina, que no tenían efecto en oscuridad, pero al ser expuestos a la luz mataban rápidamente a los microorganismos. Raab llegó a demostrar con ayuda de prismas monocromos que sólo las longitudes de ondas que eran absorbidas por los tintes activaban la mortalidad celular (Raab, 1904).

Casi simultáneamente, von Tappeiner publicó un estudio donde relacionaba la inflamación cutánea en ovejas que consumían trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) con el hecho de estar expuestas a la luz y ser de coloración clara, postulando la existencia de unos “materiales fluorescentes” responsables del daño cutáneo. La necesidad de la presencia de oxígeno para la efectividad del tratamiento se demostró rápidamente (Jodlbauer & von Tappeiner, 1904). Así mismo, propuso el uso de estos “materiales fluorescentes” fotosensibilizadores, en tratamientos dermatológicos, como el herpes, la pitiriasis versicolor y la psoriasis común (Von Tappeiner & Raab, 1900) (Von Tappeiner & Jesionek, 1903).

Paralelamente, la fototerapia antitumoral fue sugerida un siglo atrás (Jesionek & von Tappeiner, 1905), pero no fue hasta 1970 que fue aplicada a pacientes de forma organizada por Dougherty y sus colaboradores (Dougherty, 1987) (Gomer, et al., 1989), que aprovecharon la afinidad de las porfirinas (tetrapirroles con actividad fotosensibilizadora) por células concretas, pudiendo así dirigir los tratamiento contra tumores en las células donde se acumulan (Lipson , et al., 1961).

Para no crear confusión con reacciones químicas fotoactivadas como las estimulaciones fotográficas, fue Harold Blum quien acuñó el término fotodinámico aplicado a las reacciones en sistemas biológicos en las que son necesarias el oxígeno (Blum, 1941) para la creación de oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), entre otras especies de oxígeno, y poder hablar así de inactivación fotodinámica celular (IFD).

Finalmente, el término “terapia fotodinámica” (TFD) se empezó a usar en la década de 1970 para describir los tratamientos con fotosensibilizadores de tumores malignos en ratas (Diamond, et al., 1972). Aunque inicialmente se adoptó la nomenclatura “terapia por fotoirradiación” (Dougherty, et al., 1978), esta fue substituida hasta ser TFD la expresión universalmente aceptada en el ámbito científico y aplicada tanto en tratamientos antitumorales utilizando Photofrin®, Photobarr® u otros productos como fármacos fotosensibilizantes (Agostinis, et al., 2011) como en tratamientos antimicrobianos (Spikes, 1991).

### 3. Fundamentos de la terapia fotodinámica:

*“What this (receiving light in the organism) useful effect really was, I could not find; I have been working for this goal ever since but have not been able to find exactly what I have been seeking, though we have gone somewhat forward.” -- Niels Ryberg Finsen*

En fototerapia, la radiación absorbida tiene efecto sobre algún tipo de biomolécula endógena en el organismo, mediando en el efecto terapéutico. Quizás el ejemplo más clásico es el tratamiento de la tuberculosis cutánea mediante radiación ultravioleta por el que Niels Finsen recibió el premio nobel de medicina en 1903 (figura 4).

En fotoquimioterapia, al paciente le es suministrado un medicamento fotosensibilizador (FS) exógeno. Al excitarlo con iluminación, el medicamento actúa terapéuticamente dañando o destruyendo las células y/o tejido adyacente. Típicamente el tratamiento con el fotosensibilizador o con la luz por separado no tiene efectos relevantes (Spikes, 1985).



**Figura 4: Niels Ryberg Finsen  
Centenary Danish stamp.**

Para poder hablar de terapia fotodinámica, se añade un ingrediente más a la luz y al sensibilizador: la necesidad de oxígeno para generar oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) u otras especies reactivas de oxígeno (ROS), que causarán el daño celular.

En el caso de la eliminación de microorganismos mediante protocolos fotodinámicos es correcto hablar de inactivación fotodinámica (IFD), pero dado que los objetivos generales de los estudios realizados en nuestro grupo de investigación acostumbran a apuntar a su futura aplicación clínica, en este estudio se usará indistintamente IFD, TFD y aTFD, para referirnos a la eliminación de microorganismos mediante técnicas fotodinámicas, aunque en el estudio no se esté aplicando a pacientes.

#### 4. Base molecular de la terapia fotodinámica:

Las reacciones fotoquímicas se inician a través de la irradiación con luz, que es absorbida selectivamente por grupos cromóforos.

El fotón puede ser absorbido por la molécula, transfiriendo su energía a la molécula. Esta energía causa un cambio en su estructura electrónica, que modifica la ocupación de los orbitales moleculares, pasando del estado fundamental de la molécula a un estado excitado (figura 5).

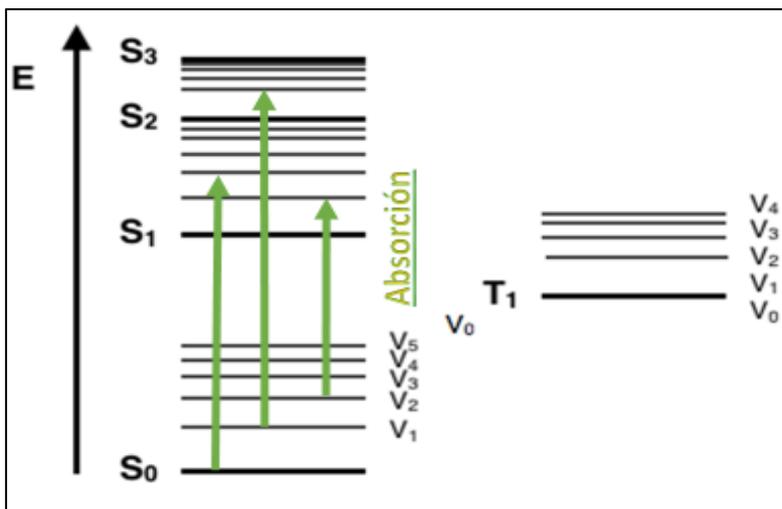


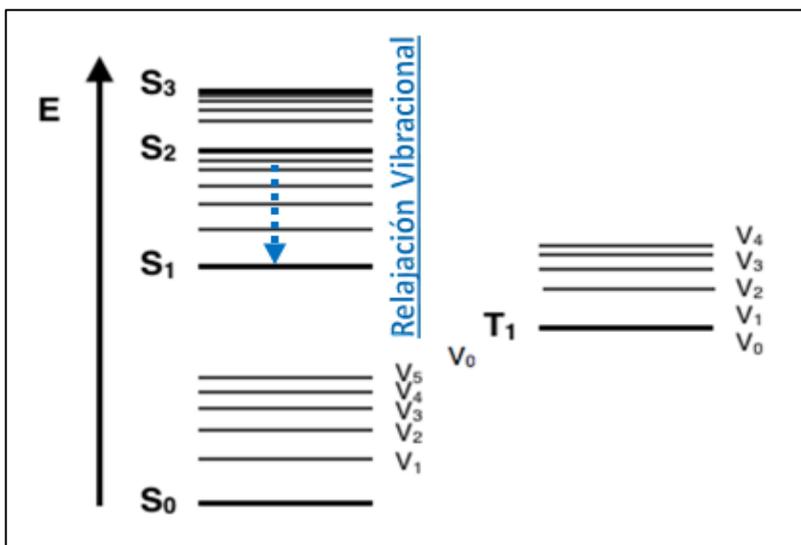
Figura 5:  
Diagrama de Jablonski:  
Ejemplo de posibles  
transiciones de absorción.  
(McEwen, 2016)

Esta molécula en un estado cuántico superior es inestable y, o bien sufrirá un proceso de modificación de su estructura química (fotoquímica), o perderá esta energía ganada, mediante un cambio en el estado cuántico de la molécula (fotofísica) para volver a su estado fundamental. (Jaffe & Miller, 1966).

Este retorno al estado fundamental puede darse por diferentes vías, que pueden ser agrupadas en tres categorías (Gilbert & Baggott, 1991):

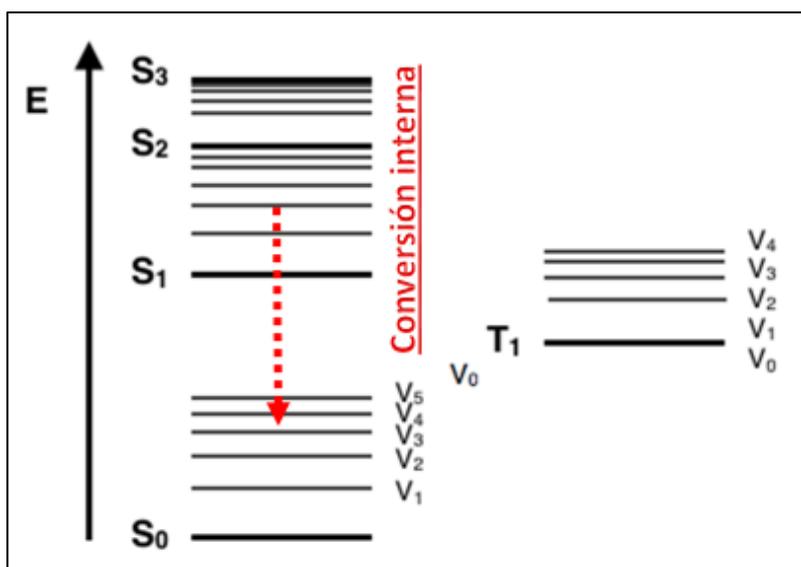
1. Procesos no radiantes, en los que el estado inicialmente excitado se transfiere a otro estado sin que le acompañe ninguna emisión de fotones. Los mecanismos pueden ser:

1.1. *Relajación vibracional*: En la que la molécula excitada baja su energía vibracional, transformándola en energía cinética dentro de la misma molécula o en moléculas cercanas. No causa cambios en el estado electrónico. (figura 6)



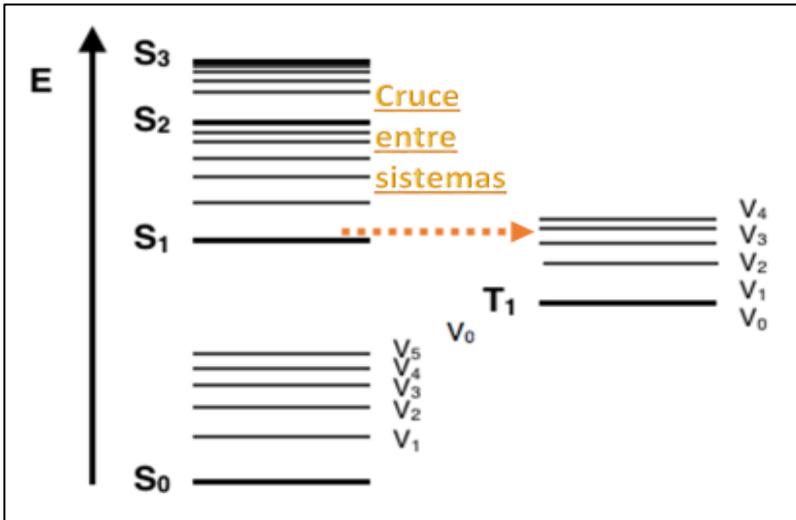
**Figura 6:**  
**Diagrama de Jablonski:**  
**Relajación vibracional**  
 (McEwen, 2016)

1.2. *Conversión interna*: Transición entre dos estados electrónicos cuando los estados vibracionales y electrónicos se solapan por el aumento de energía. La multiplicidad de spin no se ve alterada y la energía se conserva, pasando la electrónica a vibracional en el nuevo estado. (figura 7)



**Figura 7:**  
**Diagrama de Jablonski:**  
**Conversión interna**  
 (McEwen, 2016)

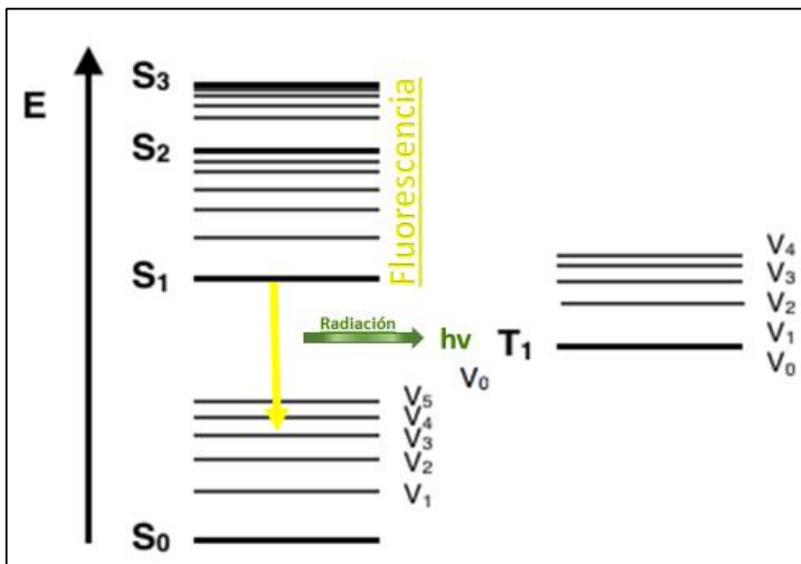
1.3. *Cruce entre sistemas*: Similar al proceso de conversión interna arriba descrito, pero con un cambio de multiplicidad de spin, pasando del estado singlete al de triplete (o viceversa). (figura 8)



**Figura 8:**  
**Diagrama de Jablonski:**  
**Cruce entre sistemas**  
 (McEwen, 2016)

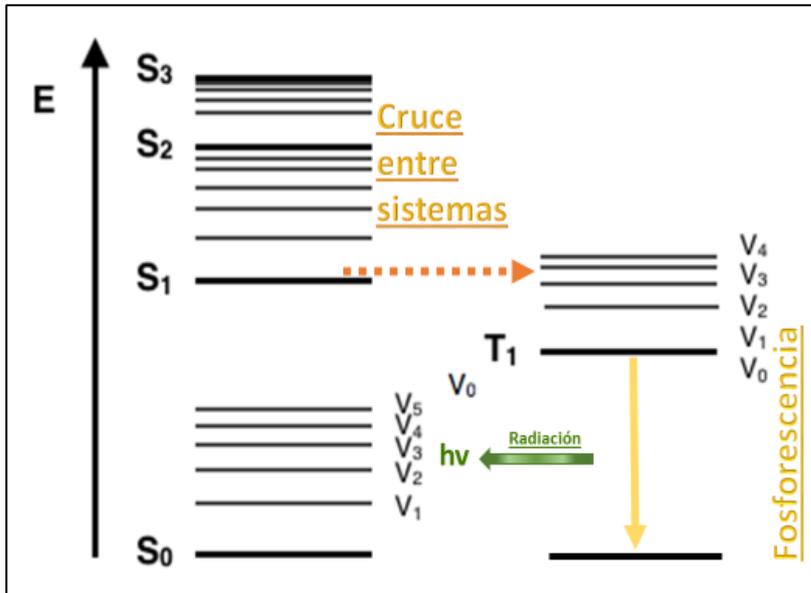
2. Procesos radiantes, en los que el exceso de energía es devuelto como radiación electromagnética, distinguiéndose:

2.1. *Fluorescencia*: Emisión espontánea de radiación entre dos estados electrónicos con la misma multiplicidad de spin. (figura 9)



**Figura 9:**  
**Diagrama de Jablonski:**  
**Fluorescencia**  
 (McEwen, 2016)

2.2. *Fosforescencia*: Emisión espontánea de radiación entre dos estados electrónicos con diferente multiplicidad de spin. (figura 10)

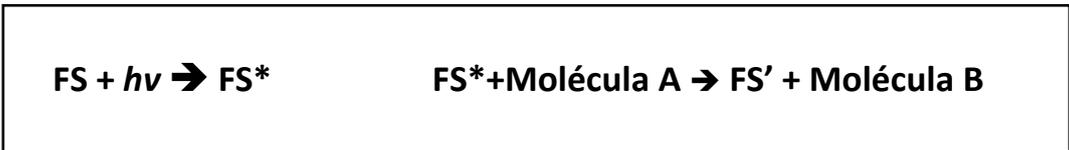


**Figura 10:**  
**Diagrama de Jablonski:**  
**Fosforescencia**  
 (McEwen, 2016)

3. Otros procesos:

3.1. *Quenching*: procesos de desexcitación que implican la transferencia de energía de la molécula inicialmente excitada a otras partículas mediante choques inelásticos.

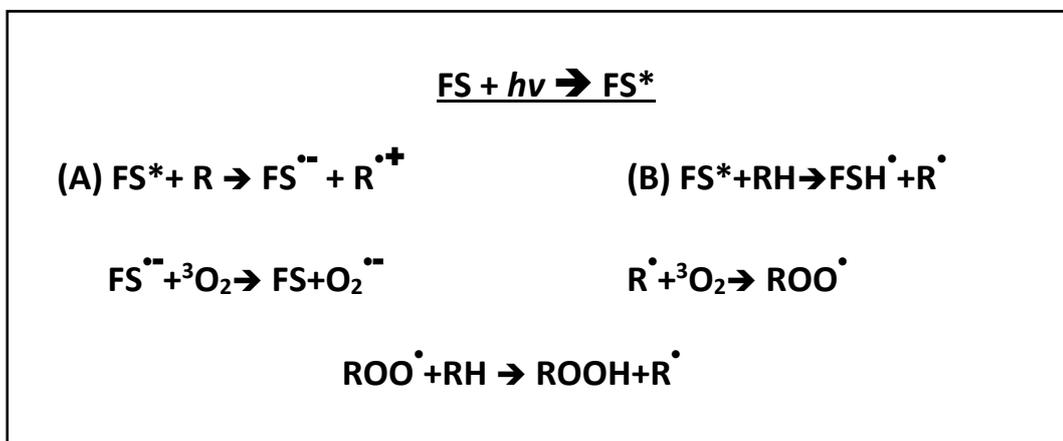
3.2. Fotosensibilización (fórmula 1): es el proceso fotoquímico/físico que ocurre en una entidad molecular como resultado de que previamente haya existido una absorción de radiación electromagnética por parte de otra molécula, esta será la llamada fotosensibilizador. (Braslavsky, 2007)



**Fórmula 1: Fenómenos de fotosensibilización. FS: fotosensibilizador; hv: fotón.**

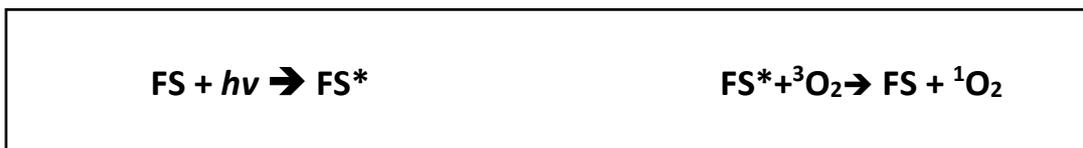
Como se ha mencionado anteriormente, si en el proceso está implicado el oxígeno molecular, es cuando se puede hablar de fotodinámico y se distinguen dos tipos de mecanismos, que se suelen dar simultáneamente. La prevalencia de una vía u otra depende, entre otros factores, del sustrato, la concentración de oxígeno presente y la distancia entre el sustrato y el fotosensibilizador. Estos mecanismos, son los siguientes:

3.2.1. **Tipo I** (fórmula 2): En este mecanismo el fotosensibilizador excitado en estado singlete o triplete reacciona con un sustrato vía transferencia de electrones (A) o abstracción de hidrógeno (B) para obtener radicales libres, que reaccionan rápidamente con el oxígeno, empezando así una cadena de reacciones de radicales.



Fórmula 2: Fotosensibilización tipo I.

3.2.2. **Tipo II** (fórmula 3): en este proceso, el sensibilizador en su estado excitado (habitualmente en estado de triplete) transfiere su energía al oxígeno molecular en estado fundamental, lo que devuelve al FS a su estado basal y genera oxígeno singlete ( ${}^1\text{O}_2$ ), una especie de oxígeno muy reactiva con sustratos ricos en electrones como alquenos, anillos aromáticos, fenoles, aminas y tioéteres. Se considera el mecanismo predominante en entornos biológicos. (Valentine, et al., 1995)



Fórmula 3: Fotosensibilización tipo II.

Independientemente del tipo de mecanismo que esté actuando, el efecto fotodinámico en un entorno biológico produce la fotooxidación de biomoléculas relevantes, como proteínas, ADN, lípidos de las membranas, etcétera, dando lugar a daño o incluso muerte celular (figura 11).

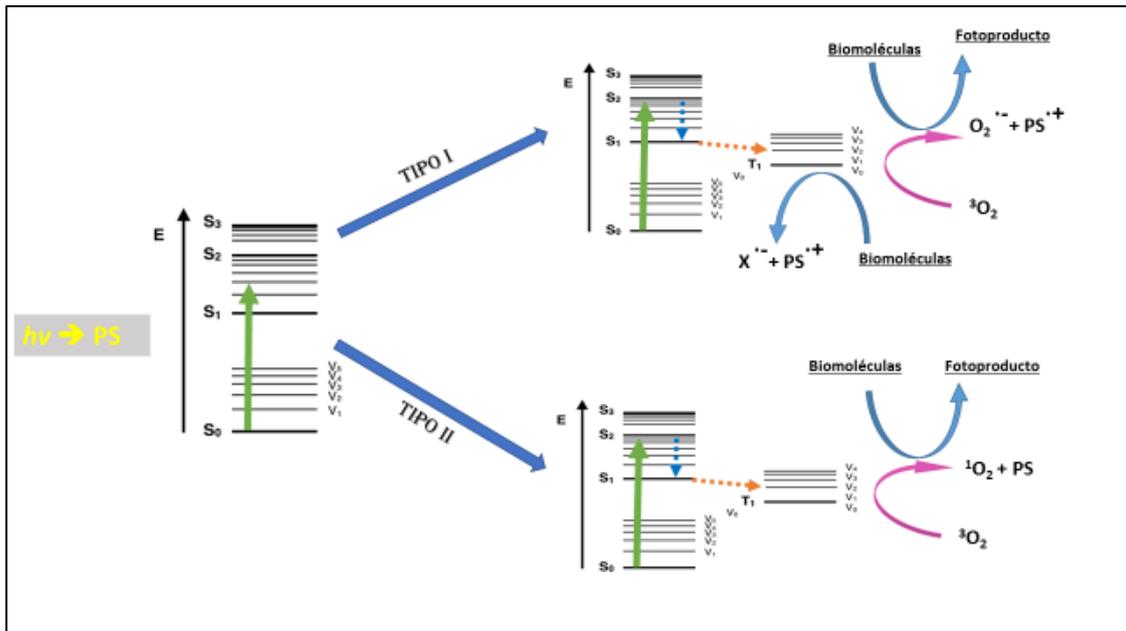


Figura 11: Diagrama de Jablonski: Resumen de los procesos fotodinámicos (McEwen, 2016)

## 5. Ventajas de la terapia fotodinámica antimicrobiana:

*“Water is good; air is better and light is best of all” -- Arnold Rikli*

Las ventajas de la terapia fotodinámica antimicrobiana son diversas:

- La necesidad de la aplicación de luz puede ser controlada fácilmente, añadiendo así otro nivel de selectividad al tratamiento, que se puede sumar a la mayor afinidad de algunos FS por los microorganismos que por las células del hospedador y a la posibilidad en algunos casos de su aplicación localizada en un área concreta; se obtiene así una doble selectividad que disminuye los efectos secundarios causados por la afectación de tejido sano (Singh & Greenstein, 2000).
- La inmediatez en el tratamiento, que permite ver el resultado del tratamiento una vez aplicado, a diferencia de tratamientos antibióticos tradicionales, que requieren un tiempo de incubación. (Jori, et al., 2006)
- La alta reactividad de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas permite afectar a una mayor diversidad de microorganismos en diferentes condiciones, incluso con estructuras de resistencia y biopelículas (Dai, et al., 2009); además su daño multifocalizado hace que no se haya detectado casos de desarrollo de resistencias a la TFD (Lauro, et al., 2002).

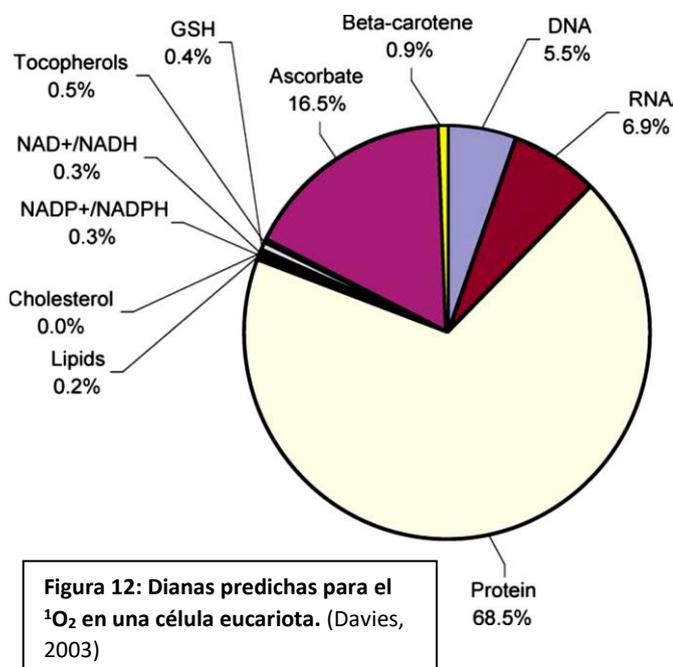
## 6. Fotosensibilizadores:

“Compuesto que incrementa los efectos de la radiación luminosa” -- (Real Academia Española, 2014)

Mucho antes de conocer el mecanismo por el que ejercía su efecto la luz, ya se utilizaban tintes por su efecto antibacteriano (Robinson, 1983). Éstos, al ser expuestos a la luz se activan, generando especies reactivas de oxígeno que eliminan las bacterias.

En el contexto de la terapia fotodinámica antibacteriana (aTFD) que se desarrolla en este estudio, se define un fotosensibilizador como la molécula que tiene la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno, como el oxígeno singlete, al ser activada por la luz en presencia de oxígeno (efecto fotodinámico). (Ragàs, et al., 2013)

El oxígeno singlete molecular  $^1\text{O}_2$  es el nombre dado al estado excitado de la molécula de dióxigeno. Con una vida media de microsegundos, es mucho menos estable que el oxígeno en su estado basal y tiene una fuerte actividad citotóxica. (Ergaieg, et al., 2008). El  $^1\text{O}_2$  causa daño en lípidos, proteínas, ARN, ADN y esteroides (Davies, 2003), generando así un daño multilocalizado, asociado a una rápida mortalidad celular e impidiendo la formación de resistencias al tratamiento de la aTFD. (Jori, et al., 2006) (figura 12)



Como uno de los pilares básicos para una TFD óptima, el fotosensibilizador ideal debería tener las siguientes características (Sharma, et al., 2011) (Sharma, et al., 2012):

- ∴ Un estado triplete de tiempo de vida (relativamente) largo.
- ∴ Un alto rendimiento cuántico para la producción de ROS al excitarse con luz del espectro visible.
- ∴ Altos coeficientes de absorción en el espectro rojo o infrarrojo cercano. Este rango es el más efectivo para la penetración de la luz en tejidos, mientras que, para tratamientos sobre superficies o infecciones superficiales, la luz azul entre 400 y 420 nm es también funcional.

- ∴ Alta fotoestabilidad para evitar el fenómeno del fotoblanqueo o photobleaching, que consiste en la degradación del fotosensibilizador.
- ∴ Una capacidad para afectar al mayor número de microorganismos posibles, sin afectar a las células del potencial huésped, incluso en presencia de estructuras de resistencia o biopelículas.
- ∴ Afinidad y si es posible, capacidad para unirse a los microorganismos diana para causar la mayor mortalidad, evitando efectos sobre el material genético, para no tener efectos mutagénicos.

### 6.1. Fotosensibilizador: Azul de metileno:

Para la mayoría de estudios expuestos en esta Tesis Doctoral, el fotosensibilizador de elección ha sido el **azul de metileno** (MB), cuya estructura se puede ver en la figura 13.

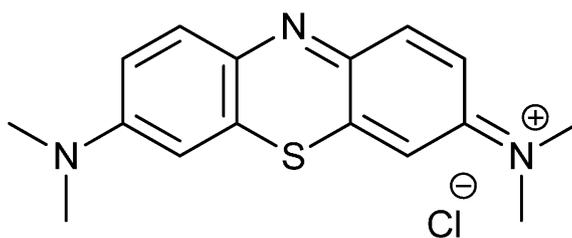


Figura 13: Estructura química del azul de metileno

El azul de metileno (cloruro de metiltionina) es un colorante orgánico de la familia de las fenotiacinas, cuya síntesis fue descubierta y patentada por Heinrich Caro en 1876 (Reinhardt & Travis, 2000), para la empresa BASF, como tinte de color azul puro, de fácil obtención, para la tinción del algodón.

Médicamente, el azul de metileno tuvo su primer uso como tratamiento contra la malaria en 1886 por parte del doctor Paul Ehrlich (Prüll, 2003), que observó su unión con el agente etiológico de la malaria (un protozoo del género *Plasmodium*) y demostró su utilidad en pacientes infectados. Actualmente se usa rutinariamente como tratamiento para la metahemoglobinemia (Yusim, et al., 2007).

Fotoquímicamente, MB tiene una gran banda de absorción en el rango de las 550-700 nm, con un máximo coeficiente de atenuación molar de  $85000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  en los 664 nm, que le confiere su característico color azul intenso (Junqueira, et al., 2002).

El mencionado espectro de absorción tiene una dinámica dependiente de concentración, ya que presenta un equilibrio con su forma dimerizada (constante de equilibrio:  $3,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  en agua), variando de un máximo en 664 nm, presente en forma monomérica, a los 590 nm de la conformación dimérica (Junqueira, et al., 2002). En disoluciones de concentración  $20 \mu\text{M}$ , la forma monomérica es la única presente (Paulo Tardivo, et al., 2005), pudiendo variar los ratios al interactuar con moléculas con cargas (como las de la pared bacteriana) (Severino, et al., 2003).

De forma similar, dependiendo del medio en que se encuentra, el estado fundamental del MB se ve alterado, por lo que el rendimiento cuántico también varía (Paulo Tardivo, et al., 2005). Además, diferencias locales de pH también pueden dirigir la afinidad del MB hacia distintas moléculas de la célula (Wagner, et al., 1998). Estas características, pueden explicar cierta variabilidad en el efecto de la fotoinducción durante los tratamientos *in vivo* (Adamson & Gast, 1997) (Ito & Kobayashi, 1977).

A pesar de la citada variabilidad, su alto rendimiento cuántico para la generación de  $^1\text{O}_2$  ( $\phi_{\Delta} \approx 0.5$ ) (Redmond & Gamlin, 1999) y su carga neta positiva (Hamblin, et al., 2002), lo hacen un FS ideal para la fotooxidación de material biológico o de precursores orgánicos. (Tuite & Kelly, 1993) (Schneider Jr., et al., 1998) (Silva, et al., 2000) (Harmatz & Blauer, 1983)

Este alto rendimiento, permite incluso el uso de fuentes de luz no laser policromáticas, lo que, unido al relativo bajo coste de producción del MB, lo hace indicado para el tratamiento de diversas enfermedades en entornos con bajos recursos económicos, ampliando así sus potenciales aplicaciones (Tardivo, et al., 2004).

## 6.2. Fotosensibilizador: Nuevo azul de metileno:

En los estudios descritos en esta tesis, en búsqueda de un superior efecto bactericida, se ha recurrido también a una evolución del azul de metileno con eficiencia probada como agente antimicrobiano; se trata de una derivación cromofóricamente metilada que recibe el nombre de “New Methylene Blue” (cloruro de 3,7-bis (etilamino)-2,8-dimetilfenotiacina-5-io). (López-Chicón, et al., 2016) (figura 14)

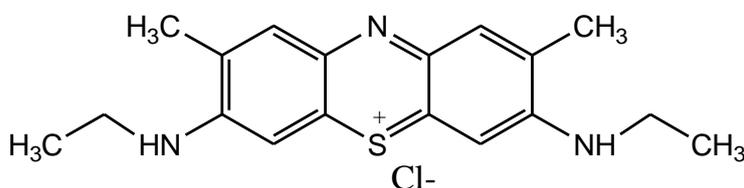


Figura 14: Estructura química del nuevo azul de metileno

El nuevo azul de metileno (NMB) es una fenotiazina plana tricíclica. Este compuesto presenta un espectro de absorción entre 600-850 nm, con un pico de absorción en los 630 nm y de emisión alrededor de los 650 nm en soluciones acuosas tamponadas, con un leve viraje hacia el rojo al unirse a entornos bacterianos. Al igual que con el MB, se encuentran efectos de dimerización que se incrementan al interactuar con la pared bacteriana (Ragàs, et al., 2013)

En la tabla 1 está anotadas los rendimientos cuánticos ( $\phi_{\Delta}$ , medido en Etanol) y rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\phi_F$ , medido en metanol). (Ronzani, *et al.*, 2013)

	Medio	MB	NMB
$\phi_{\Delta}$	EtOH	0.5	0.67
$\phi_F$	MeOH	0.03	0.04

Tabla 1: Rendimientos cuanticos y de fluorescència, medidos en etanol y metanol, de azul de metileno y nuevo azul de metileno.

## **7. Efecto de la terapia fotodinámica antimicrobiana en diferentes bacterias:**

### **7.1. Papel de la envoltura celular**

Es conocida la particular sensibilidad de las bacterias gram positivas a las aTFD, mientras que las gram negativas son significativamente más difíciles de matar (Malik, et al., 1992). Esta mayor resistencia al tratamiento es debida a la estructura de su pared celular.

La envoltura celular bacteriana presenta una estructura compleja, dispuesta en diversas capas:

Las bacterias presentan, externamente a la membrana citoplasmática, una capa rígida compuesta de peptidoglicano (mureína), formado por láminas de N-acetil-glucosamina, ácido N-acetilmurámico y algunos aminoácidos (L-alanina, D-alanina, D-glutámico o lisina o ácido diaminopimélico), que se unen formando el tetrapéptido de glicano. Este tetrapéptido se repite, unido por puentes peptídicos entre los aminoácidos presentes y mediante enlaces glucosídicos entre los azúcares (figura 15). Esta pared celular determina en gran parte la forma de la bacteria y presenta variaciones en su composición, dependiendo de que especie se trate

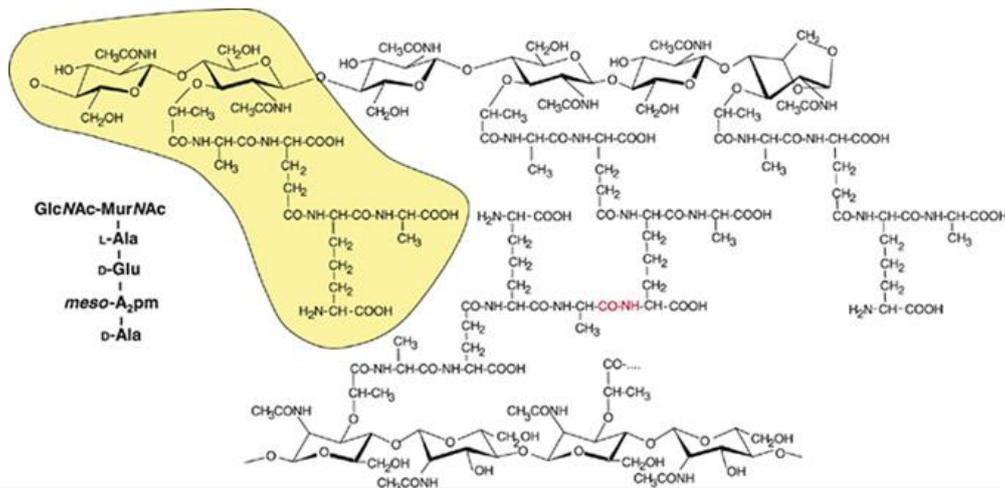


Figura 15: Estructura del peptidoglicano de *Escherichia coli*. La parte marcada en amarillo de la figura representa al monómero básico, con las abreviaciones convencionales de aminoácidos y hexosaminas a su izquierda. La parte media muestra un péptido enlazado, con su grupo amida conectando ambas cadenas peptídicas marcado en rojo. (Vollmer, et al., 2088)

En gram positivas esta capa rígida es más gruesa que en gram negativas, usualmente con varias capas de mureína, que constituye el 90% de esta pared, con ácidos teicóicos, lipoteicóicos y proteínas asociadas formando el resto de la estructura. (figura 16). (Madigan, et al., 2004)

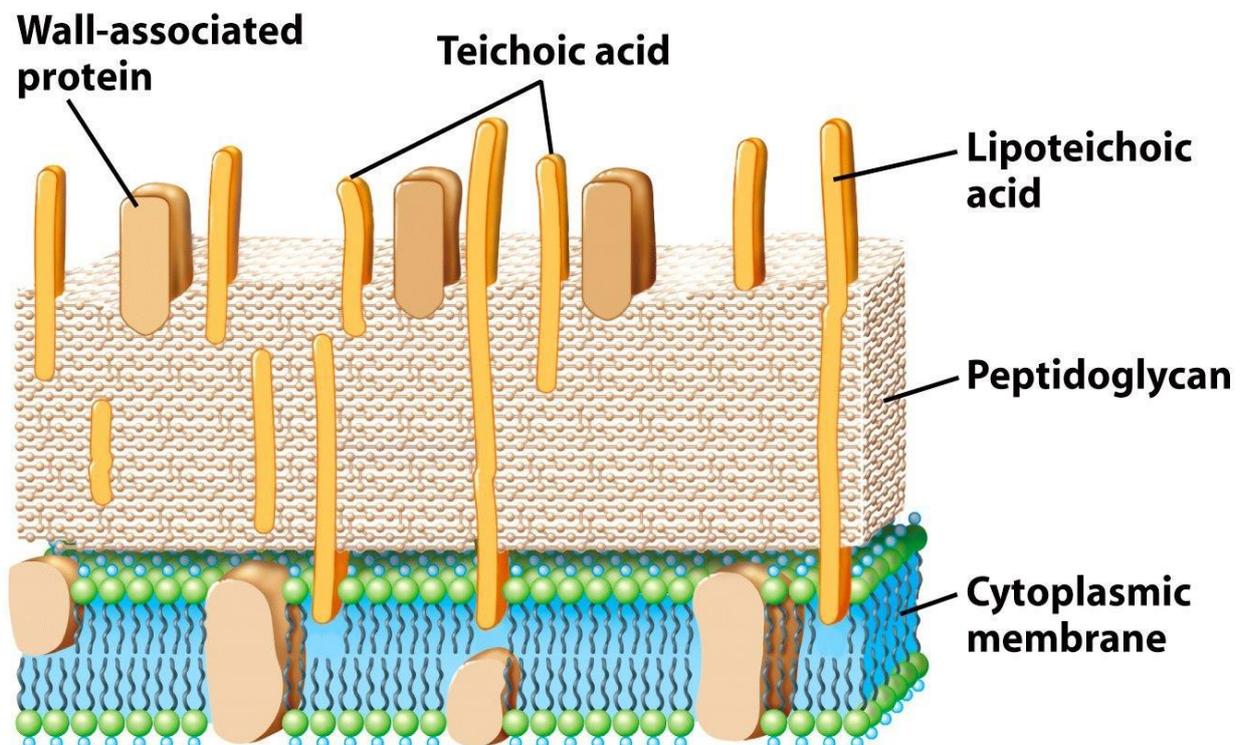


Figura 16: Diagrama de la pared de una bacteria gram positiva modelo. (Madigan, et al., 2004)

En bacterias gram negativas, la envoltura es más compleja, presenta diversas capas y el peptidoglicano sólo representa aproximadamente el 10% de la pared. (Schleifer & Kandler, 1972) Las bacterias gram negativas presentan una membrana externa que en la mayoría de las ocasiones será el lugar de unión de los fotosensibilizadores. (Figura 17) (Hamblin, et al., 2002).

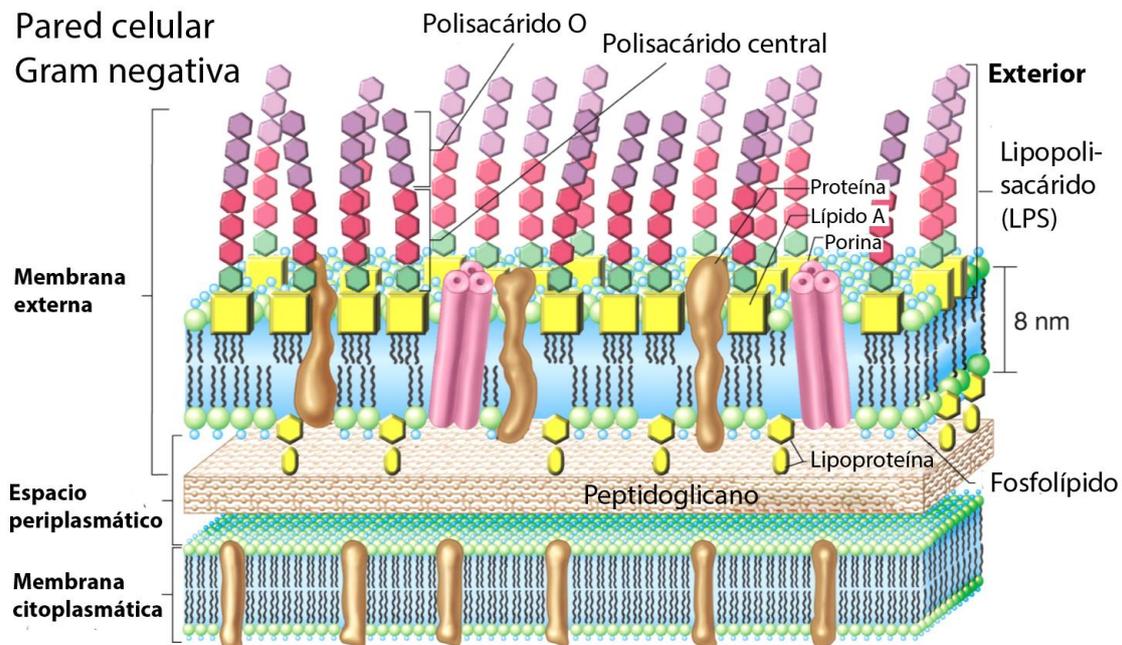
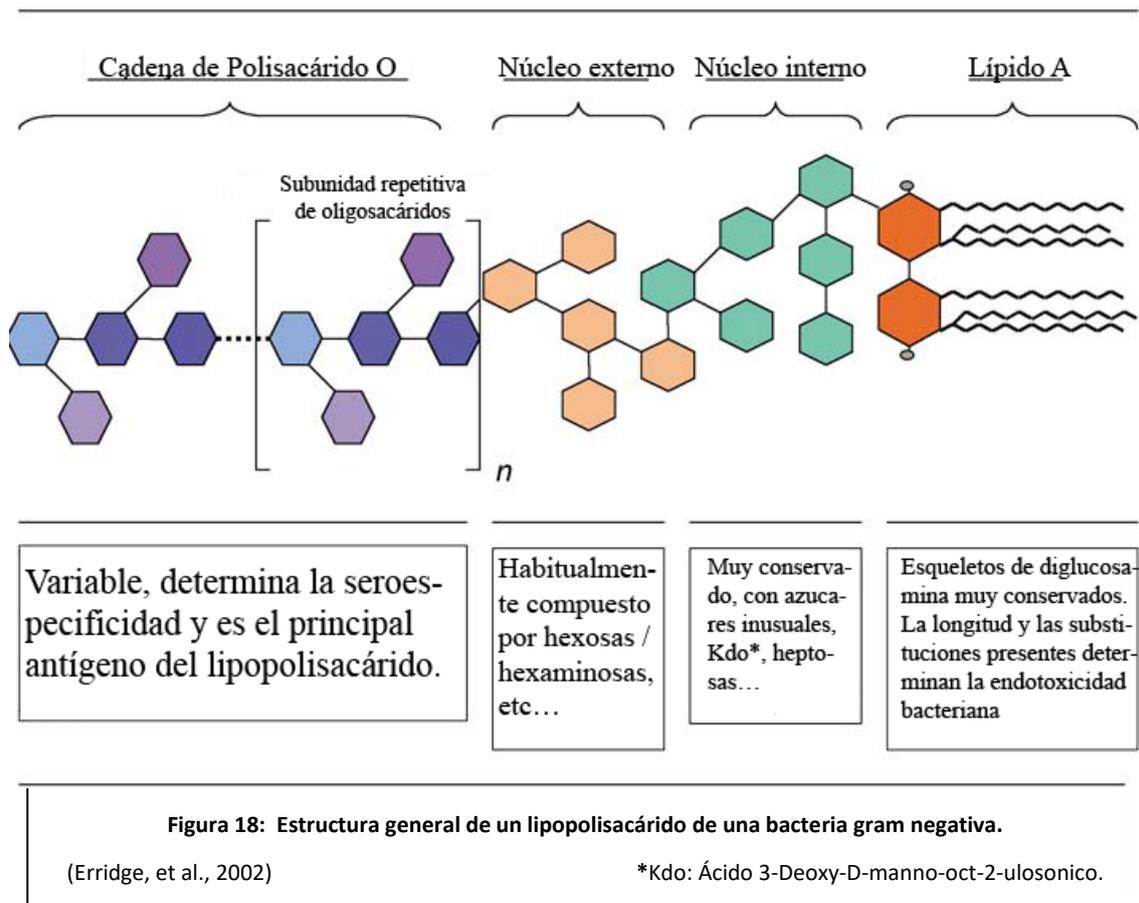


Figura 17: Diagrama de la pared de una bacteria gram negativa modelo. (Madigan, et al., 2004)

Esta membrana externa incluye una capa de lipopolisacáridos, que forma parte de una segunda bicapa lipídica de gran complejidad, conteniendo no sólo fosfolípidos, sino también un importante número de proteínas; muchas de ellas asociadas a los lipopolisacáridos que adornan el exterior de la membrana y que están anclados a la misma mediante el Lípido A que a su vez se une fuertemente al núcleo del polisacárido que está unido al polisacárido O. (Figura 18) (Erridge, et al., 2002)

La variabilidad de estos LPS determina factores tan importantes como la toxicidad bacteriana y el reconocimiento por parte del sistema inmune de las bacterias; además les confiere una mayor resistencia a las bacterias gram negativas a la aTFD (Wainwright, et al., 1997), haciendo necesario el uso de fotosensibilizadores catiónicos para su unión a la membrana de carga neta negativa y conseguir una actividad lítica efectiva. (Malanovic & Lohner, 2016) Esta unión de los fotosensibilizadores catiónicos también se dan en las bacterias gram positivas, pero su mayor sensibilidad natural hace menos crítico su uso.

En el caso de células eucariotas, su unión a las membranas es menos rápida, lo que puede ser útil para minimizar efectos secundarios de la aTFD si se activa la irradiación lumínica rápidamente después de la administración del FS (Deminova & Hamblin, 2004).



## 7.2. Terapia antimicrobiana combinada

El concepto de aplicar tratamientos diferentes de forma coherente para buscar efectos sinérgicos que permita una mejor eliminación de los patógenos con menores dosis de antimicrobianos es conocido con el nombre de terapia antimicrobiana combinada.

En el campo de los tratamientos fotodinámicos, el uso de aTFD combinada con tratamientos convencionales se ha investigado para evitar infecciones en cirugías dentales. (Meire, et al., 2012)

Es realmente interesante la posibilidad de combinar la aTFD con tratamientos antibióticos para bajar las dosis, esto tiene dos ventajas principales desde el punto de vista sanitario:

- Minimizar posibles efectos secundarios producidos por la toxicidad de los antibióticos.
- Potenciar el efecto, evitando la aparición de bacterias resistentes y/o eliminando las que estuvieran presentes.

Se ha demostrado la existencia de los efectos sinérgicos de combinar tratamientos con antibióticos y aTFD en modelos experimentales con animales. (Chibebe, et al., 2013)

### **7.3. Patógenos de interés: *Escherichia coli***

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una enterobacteria gram negativa de morfología bacilo de 1x5 µm. Presenta motilidad peritrica y capacidad aeróbica y anaerobia facultativa por fermentación. No tiene actividad oxidasa, citrato ni genera H<sub>2</sub>S ni acetoina, pero la mayoría de las cepas fermentan la lactosa y la D-glucosa.

*Escherichia coli* es una bacteria básicamente neutrófila (pH entre 5-9) y mesófila (15-45°C), habitante natural de la parte final del intestino de animales de sangre caliente, generalmente sin causarles perjuicios. No obstante, ciertos serotipos han demostrado ser actores clave en diferentes patologías intestinales y extra intestinales, entre los que se encuentran: (Scheutz & Strockbine, 2005)

- Cepas enteropatógenas (EPEC): serotipos causantes de diarreas cuyo mecanismo de patogenicidad no se han relacionado con enterotoxinas o con invasividad del tejido al estilo de los géneros *Shigella* o *Salmonella*. Se trata de unos pocos serotipos clasificados en base a su antígeno somático y flagelar, que interfieren con las rutas de señalización celular de las células epiteliales, provocando la internalización de las bacterias en las mismas, lo que desencadena los síntomas.
- Cepas enteropatógenas (ETEC): clones enterotoxigénicos que no son invasivos, pero producen enterotoxinas. Suelen estar asociados a los serotipos que causan secreción intestinal activando la ruta del guanilato o adenilato ciclasa.
- Cepas enteroinvasivas (EIEC): serotipos con capacidad de invadir y multiplicarse en el epitelio intestinal, con un mecanismo análogo a *Shigella*, habitualmente dependiente de un gen plasmídico que le confiere esta virulencia.
- Cepas enteroagregativas (EAaggEC): presentan patrones de adherencia por auto-agregación característicos; esta capacidad mediada por un plásmido causa diarrea, rampas intestinales y otros síntomas de trastorno entérico y es la causa habitual de la diarrea del viajero, así como de diarreas infantiles.
- Cepas productoras de Shiga/Vero toxina (STEC/VTEC): cepas capaces de producir una o varias de estas citotoxinas, usualmente transmitidas por bacteriófagos, se conocen por su capacidad enterohemorrágica y se suele asociar a la cepa O157:H7, con cuadros graves de edemas, que pueden acabar con la muerte del paciente.
- Cepas que producen cuadros clínicos extraintestinales, entre los que destacan:
  - Infecciones en el tracto urinario (UTI): cepas con factores de patogenicidad en su genoma o plásmidos que les permiten sobrevivir fuera de su hábitat natural, evitar las defensas del organismo y/o codifican para toxinas; el principal grupo son las uropatógenas (UPEC), que pueden provocar pielonefritis graves.
  - Meningitis neonatal (NMEC): causadas por cepas K1 en recién nacidos de menos de 3 meses. Es el responsable del 20% de los casos de meningitis neonatales.

Como todas las bacterias gram negativas, *Escherichia coli* es resistente a los antibióticos hidrófobos como los macrólidos. Esto es debido a la estructura de la membrana externa y su poca permeabilidad a estos productos, pero no es extraña la presencia de bombas que ayuden sinérgicamente a esta resistencia. (Nikaido, 1996)

Adicionalmente, se han descrito resistencias adquiridas a aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, macrólidos, sulfamidas, tetraciclina y trimetoprim. Los mecanismos de resistencia son diversos: alteración de diana, detoxificación enzimática, evitación de la acumulación del antibiótico, etc., adquiridos por mutaciones en el ADN cromosómico o mediante plásmidos que son portadores de los genes necesarios para la resistencia. (Quintiliani & Courvalin, 1995)

Como modelo de bacteria gram negativa, *Escherichia coli* ha sido sometida a aTFD con éxito en diversas ocasiones. (Deminova & Hamblin, 2004)

#### **7.4. Patógenos de interés: *Salmonella* sp.**

Al igual que *E. coli*, *Salmonella* es una enterobacteria. Bacteria gram negativa, posee morfología de bacilo de una longitud de 1x4  $\mu\text{m}$ . Presenta motilidad peritrica y capacidad aeróbica y anaerobia facultativa por fermentación. Fermenta la D-glucosa con producción de gas, es capaz de reducir los nitratos a nitritos y usar el citrato como fuente única de carbón. Se revela negativa en la prueba del indol y la ureasa, además de no ser habitual encontrar la capacidad de fermentar sucrosa, inositol ni salicina. (Popoff & Le Minor, 2005)

Los serotipos de *Salmonella* pueden ser específicos del huésped, como los Thyphi, Paratyphi A y Sendai, exclusivos del ser humano y que causan enfermedades graves con cuadros de síndrome septicémico-tifoidal. También hay serotipos ubicuos que son los presentes en contaminaciones alimentarias (por ejemplo, el serotipo Typhimurium), que incluso con dosis infectivas por debajo de las 1000 UFC/mL, provocan síntomas clínicos de prognosis que puede variar de leve a muy grave. Una vez recuperados los pacientes, éstos se mantienen como portadores durante meses, con peligro de causar contaminación cruzada al manipular alimentos.

La patología de *Salmonella* es debida a su capacidad de invadir la mucosa del intestino delgado, penetrando en las células epiteliales y llegando a los ganglios linfáticos mesentéricos, pudiendo infectar el hígado y el bazo en las fases de sepsis de la enfermedad. (Gulig, 2007)

De forma similar a *Escherichia coli*, las cepas de *Salmonella* sp. pueden adquirir resistencias mediante plásmidos, incluso provenientes de serotipos con huéspedes exclusivos animales. Son especialmente preocupantes las cepas multiresistentes, cuya aparición se ha disparado por el uso de antibióticos en ganadería. (Anderson, et al., 1975)

*Salmonella* Typhimurium se ha reportado como sensible a la aTFD utilizada para la esterilización de superficies. (Brovko, et al., 2005)

## **7.5. Patógenos de interés: *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* es un bacilo gram positivo de unos 0.4x1.5 µm que puede formar filamentos de más de 6 µm, presenta motilidad peritrica cuando se desarrolla a menos de 30°C y capacidad aeróbica y anaerobia facultativa. Fermenta la D-glucosa con producción de ácido láctico, siendo positiva en la prueba del Voges-Proskauer y del rojo de metilo, pero negativa en la prueba del indol, catalasa y ureasa. (McLauchlin & Rees, 2009)

*L. monocytogenes* ha sido aislada de muchos ambientes desde hace muchos años: vegetales, forrajes, ensilados, agua y en el suelo. Se ha aislado de muchos ambientes naturales acuáticos: de la superficie de canales y lagos, forrajes, etc. La presencia de listeria en las canales de los animales se atribuye a su contaminación con material de origen fecal durante el eviscerado. Un elevado porcentaje de animales (del 11 al 52 %) son portadores sanos. En humanos se considera que un 1% es portador asintomático. Ampliamente distribuida, *Listeria monocytogenes* es patógena para el ser humano y otros mamíferos, causando infecciones sistémicas que suelen derivar en sepsis y/o meningitis en individuos inmunocomprometidos, pudiendo infectar al feto en caso de pacientes embarazadas. (Murray, et al., 1929)

*L. monocytogenes* es de especial impacto debido a su capacidad para crecer en entornos de la industria alimentaria durante largos periodos aprovechando diferentes alimentos como substrato, incluso si estos presentan conservantes como la sal o el nitrato de sodio. Su capacidad para crecer a bajas temperaturas hace a esta bacteria de particular relevancia en la industria de la comida precocinada. (Farber & Peterkin, 1991)

*Listeria monocytogenes* se ha reportado como sensible a la aTFD durante la esterilización de superficies. (Brovko, et al., 2005)

## **8. Aplicaciones de la terapia fotodinámica antimicrobiana:**

*“Photodermatology—The Future is Bright” -- Kendric C. Smith*

Como se ha explicado anteriormente, la principal ventaja de la aTFD es la capacidad de afectar a un amplio abanico de microorganismos, minimizando los efectos adversos secundarios al limitar su efecto y poder dirigir el daño oxidativo a las células diana y, sobre todo por permitir tratar infecciones sin generar resistencias ulteriores (Lauro, et al., 2002). Estas cualidades hacen posibles diversas aplicaciones tales como el:

- ✓ Tratamiento de células y tejidos *in vitro*: Se ha aplicado con éxito para la eliminación de patógenos en cultivos de piel artificial (Street, et al., 2009) o en esterilización de sangre donada potencialmente infectada con virus (Mohr, et al., 1997).
- ✓ Tratamiento de infecciones en quemaduras: Su uso tópico sobre quemaduras infectadas (comúnmente debido a especies de *Candida* y *Pseudomonas aeruginosa*), permite minimizar los efectos secundarios en un tejido sin perfusión o de pacientes inmunodeprimidos (Soukos, et al., 1998) al ser eficaz frente cualquier microorganismo oportunista implicado (Dai, et al., 2009).

- ✓ Tratamiento de infecciones cutáneas: Acostumbran a ser infecciones fastidiosas que afectan cavidades y superficies corporales y que generalmente responden mal a los tratamientos sistémicos. Estas infecciones son causadas por diversas bacterias, hongos filamentosos, parásitos eucariotas e incluso en unos pocos casos por virus. Se han tratado con éxito mediante aTFD cuadros de queratitis, queratomycosis, abscesos o leishmaniasis cutánea, etc. (Hamblin & Hasan, 2004) (Akilov, et al., 2007). Otro ejemplo es su uso para el tratamiento efectivo del acné provocado por *Propionibacterium acne* en casos que requiere no sólo de un tratamiento tópico, sino de inyecciones intra-lesión (Ryou, et al., 2009) (Ashkenazi, et al., 2003)
- ✓ Tratamiento de infecciones en tejido blando, a menudo asociadas a traumatismos: En el caso de infecciones como la fascitis necrótica (causadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. o por infecciones polimicrobianas), gangrena gaseosa (provocada por *Clostridium* spp.), gangrena de Fournier (originada por mezclas sinérgicas de aerobios y anaerobios). En todos estos casos suele ser necesaria la escisión del tejido infectado, que podría ser reducida con una correcta aplicación de la TFD en la zona infectada (Berthiaume, et al., 1994).
- ✓ Tratamientos de estomatología: La TFD se ha demostrado efectivo para la eliminación de biopelículas de *Enterococcus faecalis*, principal patógeno asociado a las infecciones endodónticas (Dai, et al., 2009). Existen soluciones comerciales para la fotodesinfección, como Periowave™, que usa el azul de metileno como fotosensibilizador (Gursoy, et al., 2013). Actualmente es el campo en que más extendido está la implementación de TFD en pacientes.
- ✓ Tratamientos de infecciones en órganos internos: El uso de TFD con azul de metileno en mucosa gástrica permite eliminar la colonización de *Helicobacter pylori* (Millson, et al., 1996), asociado al riesgo de padecer gastritis, úlceras e incluso cáncer de estómago (Parsonnet, et al., 1991).
- ✓ Tratamiento de infecciones sistémicas complejas: La tuberculosis, causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* es una enfermedad que ataca primariamente a los pulmones, pero que puede extenderse a otras zonas como la piel y precisa de un tratamiento complejo, siendo necesarios largos periodos de exposición con varios antibióticos, lo que aumenta la probabilidad de la generación de resistencias a los mismos (Verbeeck, et al., 2016). La aplicación de TFD ya ha probado su efectividad en cultivos *in vitro* (Hasebe, et al., 2013) y modelos animales (O'Riordan, et al., 2006) con administración intravenosa del FS con irradiación externa.  
Las infecciones del tracto urinario son el segundo tipo de infecciones más comunes causadas por bacterias gram negativas como *Escherichia coli* (Al-Jiffri, et al., 2011) . Para combatirlas se han probado con éxito tratamientos *in vitro* (Turcheniuk, et al., 2015) y, en modelos de roedor, han resultado ser eficaces tras la administración directa del FS mediante un catéter en la vejiga urinaria (Liu, et al., 2015).
- ✓ Tratamientos antivíricos: La TFD ha sido usada contra diferentes virus. A pesar de la existencia de una vacuna, el virus del papiloma humano sigue siendo la infección de transmisión sexual más frecuente en muchos países civilizados y es causante de diferentes tipos de cáncer (Hausen & De Villiers, 1994); aTFD tópicos y sistémicos han sido aplicados en diferentes zonas corporales, previniendo la recurrencia, problema habitual con los tratamientos convencionales (Shikowitz, et al., 1998).

## Capítulo 2: Objetivos

Los objetivos planteados en la presente tesis se pueden resumir en cuatro:

Objetivo 1: Estudiar el efecto de la terapia fotodinámica sobre diferentes especies de microorganismos potencialmente patógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*.

Objetivo 2: Estudiar el efecto de la terapia fotodinámica sobre diferentes cepas de *Escherichia coli* con diferentes patrones de resistencia a antibióticos.

Objetivo 3: Estudiar el efecto de la terapia fotodinámica sobre diferentes cepas de *Escherichia coli* crecidas en biopelícula para compararlo con el efecto que ejerce cuando las células se desarrollan en estado planctónico.

Objetivo 4: Evaluar si se producen sinergias entre el tratamiento fotodinámico y un antibiótico ya aprobados para su uso clínico sobre cepas de *Escherichia coli*.



# Capítulo 3: Material y métodos

## **1. Caracterización de las cepas de trabajo:**

### **1.1. Cepas bacterianas:**

Las cepas utilizadas en este trabajo son las siguientes:

1. *Escherichia coli* ATCC 35218 y ATCC 25922, esta última caracterizada como productora de biopelículas (Naves, et al., 2008). Ambas fueron obtenidas a partir de la *American Type Culture Collection* (ATCC). (ATCC®, 2016) (ATCC®, 2016).
2. *Salmonella enterica* CECT 443, adquirida en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Universitat de Valencia (CECT), 2016). Esta cepa corresponde a la ATCC 13311, referenciada en bibliografía previa como cepa de referencia para el estudio de *Salmonella* enteropatógena (Park, et al., 2010).
3. *Listeria monocytogenes* serovar 1/2 CECT 4031<sup>T</sup> de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Corresponde a la cepa ATCC 15313, citada en bibliografía en estudios previos sobre tratamientos fotodinámicos (Brovko, et al., 2005)
4. Cepas clínicas: se escogieron veinticuatro cepas uropatógenas de *Escherichia coli*, aisladas de muestras de orina humana.

Todas las cepas utilizadas están depositadas y mantenidas criogénicamente en el Institut Químic de Sarria (IQS), en tampón fosfato (PBS, Fisher Scientific BP399-1, Geel, Bélgica, pH ajustado a 7.4) con un 20% de glicerol como agente crioprotector (Sigma-Aldrich G7757, Saint Louis, Estados Unidos) a -80°C (congelador Thermo VX490E, Geel, Bélgica).

Antes de su utilización, un microtubo de la cepa deseada se descongela a 37±1°C en una incubadora (JP Selecta, Abrera, España) y se siembra mediante estría en placas de Petri estériles de poliestireno (Ø90 mm-Labbox labware, Vilassar de Dalt, España), sobre el medio caldo de triptona de soja (TSB, Panreac, Castellar del Vallès, España) adicionado con un 1,5% de agar-agar para obtener el medio sólido agar de triptona de soja o TSA (Fisher BP9744, Geel, Bélgica). Las placas se incuban en aerobiosis toda la noche (ON, mínimo de 16 horas) a 37±1°C.

Comprobada la pureza del cultivo mediante una tinción de Gram y observación microscópica, se preparan los preinóculos de cultivo en 10 mL de medio líquido TSB en tubos de ensayo de vidrio de borosilicato estériles (13 mL-Labbox labware, Vilassar de Dalt, España).

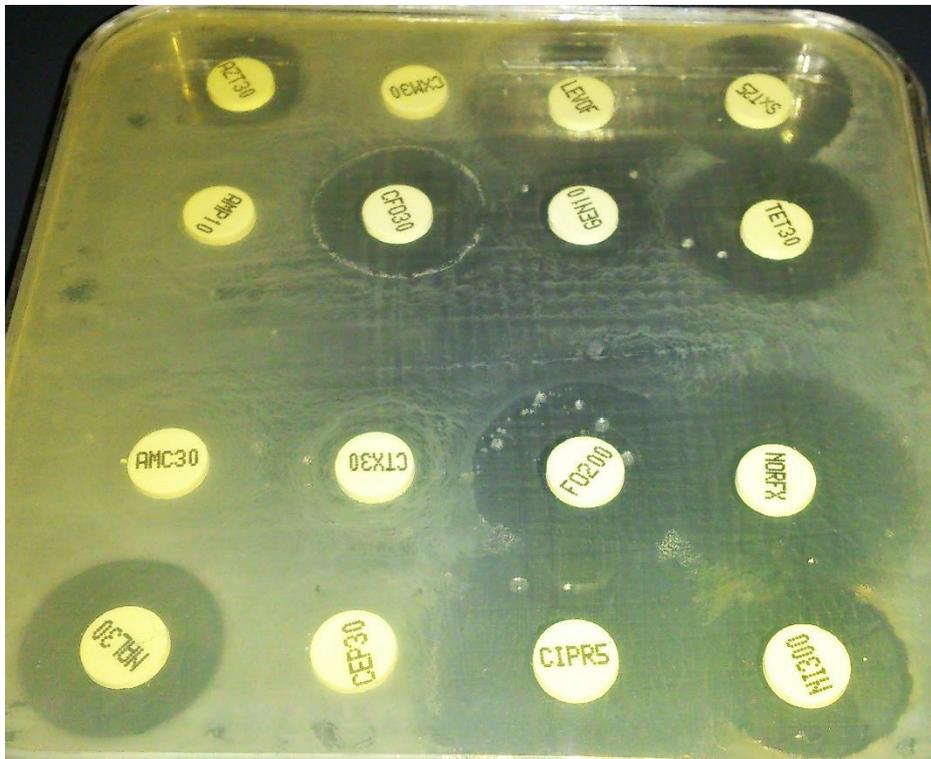
## 1.2. Antibiogramas:

En el caso de las cepas de *E. coli*, se procedió a realizar un estudio de su sensibilidad a los antimicrobianos mediante el método de Kirby-Bauer modificado que emplea discos de difusión de los antibióticos y que se describe a continuación.

Para realizar el estudio, primero, se transfirieron colonias del cultivo puro del microorganismo en estudio a un tubo con solución salina estéril con el fin de obtener una turbidez equivalente al 0,5 McFarland (aproximadamente  $10^8$  microorganismos viables por mililitro).

A continuación, se depositó 1 mL de la suspensión sobre una placa de Petri con agar Mueller-Hinton (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos) y se hizo rotar por encima del agar. Seguidamente, se removió el exceso de inóculo mediante una micropipeta y se dejaron secar las placas tapadas entre 5 y 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, mediante un dispensador se colocaron los discos de antibióticos sobre el agar (discos Rosco Neo-Sensitabs-ROSCO Diagnostica, Taastrup, Denmark). Los discos se deben depositar a más de 15 mm del borde de la placa y distribuidos de manera de que no haya superposición de los halos de inhibición. Finalmente, las placas se incubaron en aerobiosis a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  durante 16-24 horas.

Transcurrida la incubación, se valoran los antibiogramas según el diámetro de los halos de inhibición desarrollados alrededor de los discos, como se muestra en la figura 19 y teniendo en cuenta los datos aportados por el fabricante para poder determinar si la cepa es resistente o sensible a cada uno de ellos. (Taroco, et al., 2000)



**Figura 19:**  
Fotografía de antibiograma realizado a cepa multiresistente de *E. coli*. Los halos de inhibición alrededor de los discos indican la sensibilidad de la cepa al antibiótico presente en cada disco.

En la tabla 2 se aporta la lista de los 16 antibióticos frente a los cuales se ha obtenido el perfil de sensibilidad a los antibióticos de todas las cepas de *E. coli* utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Asimismo, se aporta información sobre la familia a la que pertenece el antibiótico y la diana celular del mismo. Los antibióticos ensayados se han seleccionado teniendo en cuenta que todas las cepas habían sido aisladas de muestras de orina y que fueron identificadas como *Escherichia coli*.

**Tabla 2: Descripción de los antibióticos que se utilizaron en el estudio.**

<b>Categoría Antimicrobiana</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Diana Bacteriana</b>
Penicilinas	Ampicilina	Síntesis de la pared bacteriana
Penicilinas + Inhibidores de la $\beta$ -lactamasa	Amoxicilina + Ácido Clavulánico	
Cefalosporinas de primera generación	Cefalotina	
Cefalosporinas de segunda generación	Cefuroxima	
Cefalosporinas de tercera generación	Cefotaxima	
Cefamicinas	Aztreonam Cefoxitina	
Quinolonas	Ciprofloxacina	ADN girasa.
	Ácido Nalidíxico	
	Norfloxacino	
Macrólidos	Azitromicina	Subunidad 50S del Ribosoma
Tetraciclinas	Tetraciclina	Subunidad 30S del Ribosoma
Aminoglicosidos	Gentamicina	
Fosfoenolpiruvatos	Fosfomicina	UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil transferasa
Furantoínas	Nitrofurantoína	ADN y varios enzimas bacterianos
Diaminopirimidinas + Sulfamida	Trimethoprim + Sulfametoxazol	Síntesis del ácido fólico

### **1.3. Tinción de Gram:**

La tinción de Gram es una tinción diferencial rutinaria que se emplea en bacteriología. Los pasos a seguir son los siguientes:

- A partir de un cultivo bacteriano, se prepara un frotis fino y homogéneo sobre un portaobjetos limpio y desengrasado que se fija suavemente mediante el calor de la llama de un mechero Bunsen.
- Cubrir el frotis con violeta de genciana (cristal violeta -Panreac, Castellar del Vallès, España) durante 3 minutos. Lavar con agua.
- Cubrir con lugol (Lugol -Panreac, Castellar del Vallès, España), dejándolo actuar durante 2 minutos antes de lavarlo con agua.
- Decolorar con alcohol-acetona (1:5 acetona:alcohol 96°). Lavar con agua y añadir safranina como colorante de contraste (Safranina O -Panreac, Castellar del Vallès, España), durante 1 minuto. Lavar con agua.
- Secar y observar al microscopio a una magnificación de x1000 aumentos (Optic Iymen System-Selecta, Abrera, España) con aceite de inmersión (Aceite de inmersión -Panreac, Castellar del Vallès, España).

### **1.4. Formación de biopelículas:**

Para asegurar que las cepas de *Escherichia coli* uropatógenicas son productoras de biopelículas, se compararon con la cepa de referencia productora de biopelículas ATCC 25922 (Naves, et al., 2008).

El protocolo seguido es una adaptación del previamente descrito por Danese y colaboradores (Danese, et al., 2000) y se describe a continuación:

Para cada cepa de *E. coli* utilizada en el estudio, a partir de una colonia aislada de *E. coli* sobre TSA, se prepara un preinóculo sembrándola en 5 mL de caldo LB (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos) y se incubó en agitación a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  ON. Cada uno de los preinóculos se utilizará en una columna experimental y por duplicado en una placa estéril de 96 pocillos. Las columnas se organizan tal y como se detalla seguidamente. Las placas se incubaron ON en una incubadora sin agitación a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ .

- Columnas control:

Control negativo: 130  $\mu\text{L}$  Tampón fosfato estéril (PBS) inoculado con 2  $\mu\text{L}$  del preinóculo de *E. coli* ATCC 25922.

Control Positivo: 130  $\mu\text{L}$  Medio salino mínimo M9 (Gibco, life technologies, New York, Estados Unidos), suplementado con un 0.8% p/v de glucosa estéril (Panreac Química, Castellar del Valles, España) inoculado con 2  $\mu\text{L}$  del preinóculo de *E. coli* ATCC 25922.

- Columnas muestra:

130  $\mu\text{L}$  Medio salino mínimo M9 (Gibco, life technologies, New York, Estados Unidos), suplementado con un 0.8%p/v de glucosa estéril (Panreac Química, Castellar del Valles, España) al que se le añaden 2  $\mu\text{L}$  del preinóculo de una de las cepas uropatógenica a estudiar.

Transcurrida la incubación de las células en las placas, se comprueba el crecimiento de las bacterias mediante una medición de la densidad óptica a 630 nm de cada pocillo realizada con el lector de absorbancia de microplacas (Biotek ELx808, Winooski, Estados Unidos).

Para eliminar las células no incluidas en la biopelícula, se retira suavemente el sobrenadante con una micropipeta y se lava el pocillo con 150 µL de solución salina estéril (0.89% NaCl, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). Tras ello, se dejan secar los pocillos al aire durante 20 minutos. Finalizado el tiempo de secado, a cada pocillo se añaden 130 µL de Cristal Violeta 1%p/v (Panreac, Química, Castellar del Valles, España) y se deja reposar a oscuras durante 5 minutos.

Para eliminar el exceso de tinte, se lavan cuatro veces los pocillos con 180 µL de agua destilada estéril. El líquido de los pocillos se descarta y se deja secar las placas durante una hora.

Por último, el tinte incorporado en las células se solubiliza con 130 µL de etanol absoluto (alcohol deshidratado 99.9%, Alcohols Montplet, Barcelona, España) y se mide la densidad óptica de cada pocillo a 490 nm.

Obtenidos los valores de densidad óptica (atenuancia), para estandarizar los resultados se aplicó la fórmula 4 (Niu & Gilbert, 2004)

$$FEB = \frac{(OD490nm \text{ de las células teñidas}) - (OD490nm \text{ de controles negativos teñidos})}{(OD630nm \text{ células crecidas en cultivo planctónico})}$$

**Fórmula 4: Formación específica de biopelículas (FEB)**

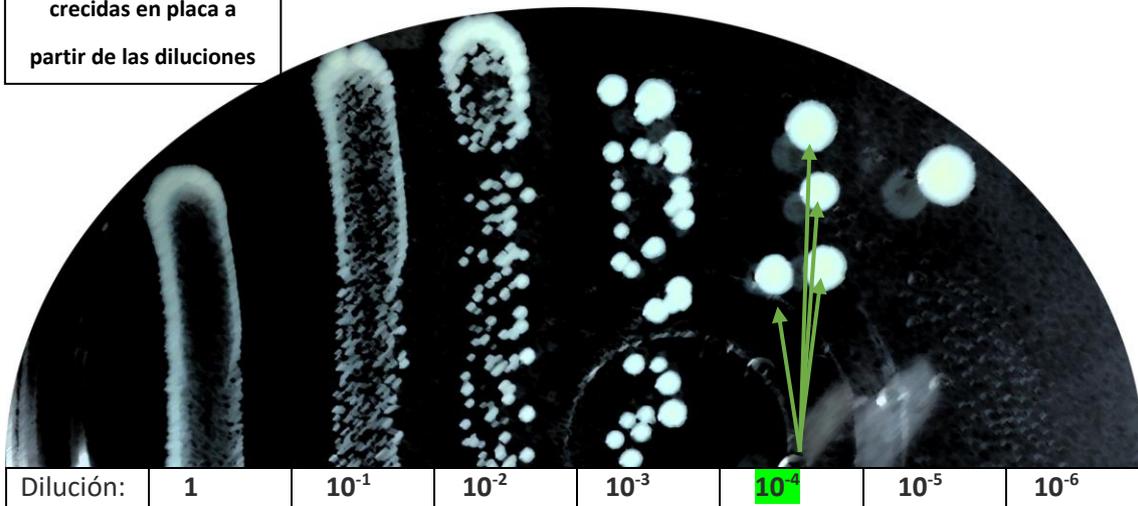
La producción de biopelícula quedó revelada al comparar la FEB de los diferentes cultivos crecidos en medio de cultivo, con las lecturas de los controles hechos con las bacterias incubadas en PBS (sin crecimiento).

## **2. Determinación de la densidad de células viables: recuento del número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)**

Para el cálculo de la densidad de células viables de una suspensión, antes y después de los tratamientos, se preparó un banco de diluciones de la muestra de factor 1/10 en PBS, hasta una dilución máxima de 10<sup>-6</sup> (en los estudios de las biopelículas, es necesario resuspenderlas previamente con el volumen deseado de PBS).

A continuación, 10 µL de cada dilución se sembraron por triplicado en una placa de TSA por extensión y se incubaron a 37±1°C durante 24 horas. Se hizo el recuento de las colonias aisladas en el canal con la menor dilución que tuviera las colonias claramente diferenciadas, como se ve en la figura 20.

Figura 20: Colonias  
crecidas en placa a  
partir de las diluciones



El cálculo de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) se obtuvo según la fórmula 5 y se promediaron los recuentos de las siembras por triplicado, siendo este promedio el valor de células viables de la dilución de la muestra.

Fórmula 5: Cálculo células viables

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{Recuento\ de\ colonias}{Dilución \times 0.01}$$

### 2.1. Obtención de las suspensiones bacterianas de trabajo iniciales:

Para nuestros experimentos, se ha mantenido una densidad celular inicial del cultivo estandarizada a aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. Esta concentración se corresponde a un valor de turbidez de 0.5 en la escala McFarland, concentración usada habitualmente para valorar efectos en la viabilidad bacteriana. (Onlen, et al., 2007)

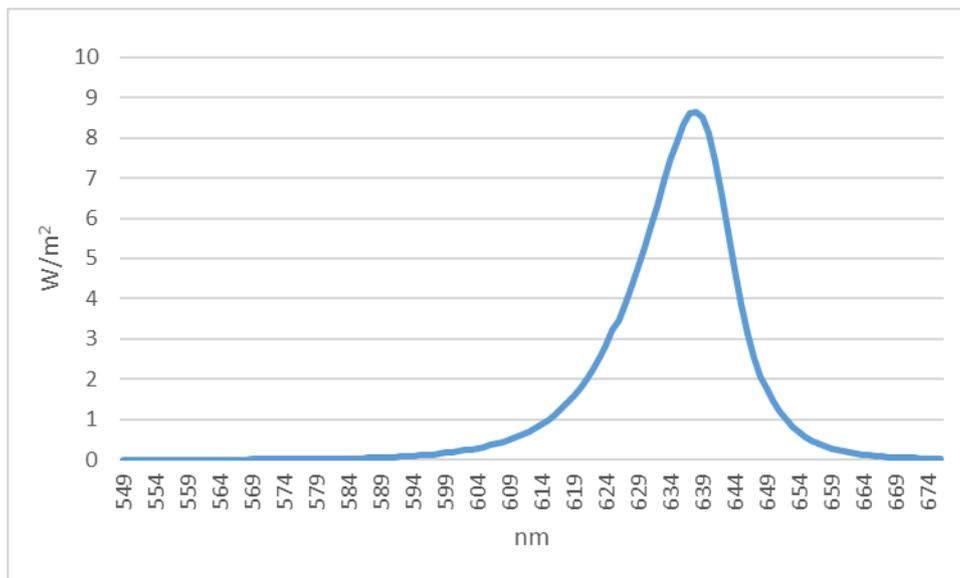
Para ajustar el valor de la densidad celular de la suspensión de trabajo inicial, se preparó un banco de suspensiones de diferente concentración de células a las que se determinó su densidad celular calculada mediante el método antes descrito para obtener el número de UFC/mL de cada una de ellas y se correlacionó este valor con el resultado de medir la densidad óptica (D.O.) de cada suspensión en caldo TSB con un espectrofotómetro (Jenway, Staffordshire, Regne Unit) a una longitud de onda de 620 nm. Así, se determinó que para alcanzar el valor de concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL deseado, se trabajaría con una D.O.<sub>620</sub> de  $0.05 \pm 0.01$  en suspensiones de *Escherichia coli* y de  $0.08 \pm 0.01$  en el caso de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*.

Así, para obtener la suspensión celular de trabajo inicial, se preparó un preinóculo sembrando una colonia de la bacteria en un tubo con 10 mL de TSB. Tras su incubación ON, mínima de 16 horas) a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , entre 50 y 100  $\mu\text{L}$  del preinóculo fueron transferidos a 10 mL de medio TSB fresco y se incubaron en agitación suave a 60 rpm (Rotabit-JP Selecta, Abrera, España), en aerobiosis y a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , hasta que el valor de  $\text{D.O.}_{620}$  del cultivo alcanzó el correspondiente a la densidad deseada (0.05 o 0.08), momento en el que se procedió al estudio de fotoinactivación.

### 3. Características de la irradiación:

#### 3.1. Tratamientos de irradiación:

Para las irradiaciones se utilizó una lámpara de 18 LED (light emitting diode, Showtec, LED Par64Short, Sussex, UK) de luz roja a  $640 \pm 25 \text{ nm}$ , cuyo espectro de emisión se muestra en la figura 21.



**Figura 21: Espectro de emisión de luz roja de la lámpara LED, indicando la potencia generada según la longitud de onda.**

La dosis de luz que recibieron las muestras se calculó según la fórmula 6.

**Fórmula 6: Cálculo de la dosis de luz recibida**

$$\text{Dosis de luz } \left( \frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right) = \text{Irradiancia } \left( \frac{\text{W}}{\text{cm}^2} \right) \times \text{Tiempo}$$

Aplicado a los experimentos realizados, la irradiancia a una distancia de las muestras de 25 cm fue de 8 mW/cm<sup>2</sup>.

En los estudios con *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, se irradió las muestras durante 37.5 minutos (18 J/cm<sup>2</sup>). Para los estudios frente *Salmonella*, se emplearon también dosis de 28.8 J/cm<sup>2</sup> (60 minutos) y 57.6 J/cm<sup>2</sup> (120 minutos) para la determinación de la dosis de fotoinactivador bactericida.

Figura 22: Lámpara LED irradiando muestras en la campana de flujo laminar horizontal (Selecta SL.), como parte de los estudios de aTFD.



### **3.2. Evaluación de la reducción de viabilidad causada por la exposición a la luz.**

Previo a la aplicación de la terapia fotodinámica, se hicieron unos primeros estudios para comprobar que el tratamiento y la exposición a la luz roja no reducían la viabilidad de las bacterias.

Partiendo de cultivos de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL, se separaron alícuotas del cultivo, cada una de ellas de un volumen de 1 mL, que se depositaron en microtubos (Labbox, Vilassar de Dalt, Barcelona). A continuación, los microtubos fueron centrifugados a 3000 g durante 10 minutos (centrifugadora Sigma 2-16P-Fisher Bioblock Scientific, Geel, Belgica).

Para eliminar el medio de cultivo, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con el mismo volumen (1 mL) de PBS. El centrifugado y lavado se repitieron tres veces y se hicieron tres grupos de estudio, en ningún caso se utilizó fotosensibilizador:

- El “control células”, en el que se hizo el recuento de viables después de una incubación en agitación a oscuras de 15 minutos.
- El “control oscuridad”, después de una incubación en agitación a oscuras de 15 minutos en PBS se pasó 300 µL a la placa de 96 pocillos y se dejó dos horas a temperatura ambiente a oscuras para proceder seguidamente a realizar el recuento celular.

- El “control luz”, difiere del “control oscuridad” en el hecho de que una vez se ha pasado a la placa de 96 pocillos, la placa se dejó dos horas a temperatura ambiente mientras recibía una irradiación de  $57.6 \text{ J/cm}^2$  con luz roja ( $640 \pm 25 \text{ nm}$ ) antes de llevar a cabo el recuento celular.

#### 4. Agentes antimicrobianos:

##### 4.1. Fotosensibilizadores:

En los estudios de inactivación de las cepas bacterianas mencionadas, se utilizó azul de metileno (MB) comercial (Panreac, Montcada i Reixac, España) como agente fotosensibilizador. Se prepararon soluciones madre de MB a concentraciones de  $77.5 \mu\text{M}$  en agua desionizada estéril que se conservaron a  $4^\circ\text{C}$  en la oscuridad, nunca por más de una semana.

Para el estudio de la inactivación de *Salmonella*, aparte del MB, también se utilizó el nuevo azul de metileno (NMB) comercial (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). Las soluciones madre de NMB se ajustaron a concentraciones de  $103 \mu\text{M}$  en agua desionizada estéril y se conservaron a  $4^\circ\text{C}$  en la oscuridad, nunca por más de una semana.

Previamente a su uso en el experimento, a partir de las soluciones madre se obtuvieron diluciones de ambos fotosensibilizadores a la concentración de trabajo deseada en tampón fosfato PBS.

En la figura 23 se muestran los espectros de absorción de ambos fotosensibilizadores, confirmando la oportunidad del uso de luz roja para su excitación.

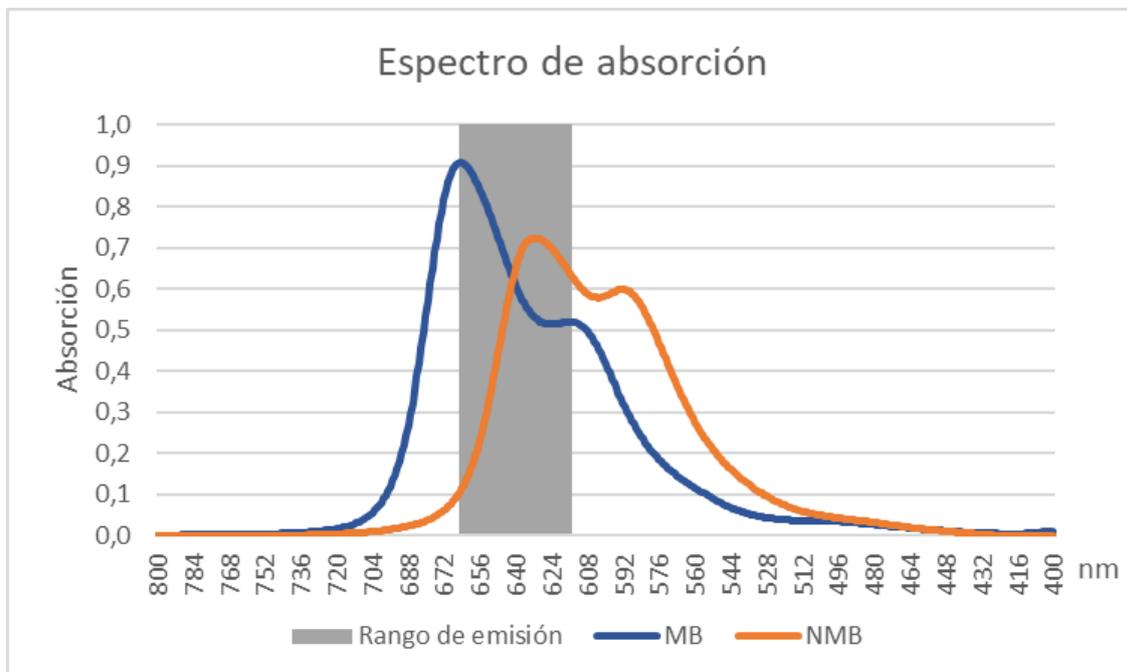


Figura 23: Espectro de absorción del azul de metileno y el nuevo azul de metileno, con el rango de emisión de la fuente LED utilizada indicada en gris.

## **4.2. Antibiótico:**

El antibiótico empleado en los tratamientos combinados, en los que éste se utilizó junto a un fotosensibilizador, fue el ácido nalidíxico (NAL, AppliChem-Panreac, Darmstadt, Alemania), agente terapéutico ampliamente utilizado en el tratamiento de las infecciones urinarias. (Hooper, 1998)

Se preparó una solución madre de NAL a una concentración de 32 µg/mL (0.13 mM). Para ello, el NAL se disolvió en 90 mL de agua estéril adicionada de 10 mL de NaOH (Panreac Química, Castellar del Vallés, España) a una concentración 1 M en agua estéril, que permite una mejor disolución del NAL y se conservó a 4 °C en oscuridad.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, la disolución se empleó como máximo durante los siguientes 15 días. Las diluciones deseadas se diluyeron en PBS estéril, según necesidad.

## **4.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los fotosensibilizadores y antibiótico:**

En los casos que se consideraron oportunos, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los productos frente a las cepas bacterianas. Para ello, se hicieron tratamientos con dosis crecientes de fotoactivador o de antibiótico a concentraciones fijas celulares hasta conseguir la completa inhibición del crecimiento bacteriano.

## **5. Terapia fotodinámica antimicrobiana:**

### **5.1. Sobre bacterias en crecimiento planctónico:**

Para las fotoinactivaciones, se siguió el mismo protocolo en todos los estudios, adaptándolo a las diferentes especies bacterianas. El procedimiento es el que se describe a continuación.

Partiendo de un preinóculo incubado ON en TSB, se transfirieron 100 µL del mismo a 10 mL de medio fresco TSB estéril y se incubó en agitación a 37±1°C hasta alcanzar la D.O.<sub>620</sub> de trabajo deseada.

Transcurrido el período de incubación, se separaron alícuotas del cultivo, cada una de ellas de un volumen de 1 mL, que se depositaron en microtubos (Labbox, Vilassar de Dalt, Barcelona). A continuación, los microtubos fueron centrifugados a 3000 g durante 10 minutos (centrifugadora Sigma 2-16P-Fisher Bioblock Scientific, Geel, Bélgica). Para eliminar el medio de cultivo, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con el mismo volumen (1 mL) de PBS. El centrifugado y lavado se repitieron dos veces y, en la última iteración, se resuspendieron las células con una solución de la concentración de fotosensibilizador (MB o NMB) deseada en PBS. Todos los pasos a seguir a continuación fueron realizados en oscuridad.

Las concentraciones elegidas para realizar los estudios de inactivación se desprenden de estudios previos del grupo (resultados no mostrados) o de las estimaciones del MIC descritas posteriormente en el apartado de resultados. Estos valores se recogen en la tabla 3.

**Tabla 3: Concentraciones de fotosensibilizadores utilizadas.**

**MB: Azul de metileno; NMB: nuevo azul de metileno.**

	Estudio	Concentración de fotosensibilizador ( $\mu\text{M}$ )	Concentración de fotosensibilizador ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Listeria monocytogenes</i>	aTFD (planctónico)	De 0.31 hasta 1.55	De 0.1 hasta 0.5
<i>Salmonella enterica</i>	aTFD (planctónico)	De 15.5 hasta 310	De 5 hasta 100
		De 12.4 hasta 103.3 (NMB)	De 6 hasta 50 (NMB)
<i>Escherichia coli</i>	Tratamiento combinado con ácido nalidíxico (planctónico)	15.5 y 7.75	5 y 2.5
	aTFD (planctónico)	31	10
	aTFD (biopelícula)	77.5	25

Para cada concentración a ensayar, las células se incubaron en presencia del fotosensibilizador en agitación suave a 60 rpm durante 30 minutos en oscuridad. A continuación, se transfirieron 300  $\mu\text{L}$  de cada muestra a un pocillo de una placa de 96 pocillos estériles (Thermo Scientific®, Roskilde, Dinamarca), que fueron irradiadas en condiciones asépticas el tiempo descrito: 37.5 minutos para *E. coli* y *L. monocytogenes* para alcanzar una fluencia de 18  $\text{J/cm}^2$  o 60 ó 120 minutos en los estudios con *Salmonella*, en los que se empleó una dosis de luz de 28.8  $\text{J/cm}^2$  o 57.6  $\text{J/cm}^2$ .

Una vez irradiadas el tiempo requerido, las muestras se mantuvieron a oscuras mientras se realizaron las diluciones y siembras para el cálculo de viables.

El resultado de cada experiencia fue la media de tres tratamientos de fotoinactivación. Tras cada uno de ellos se sembraron tres placas para el cálculo del número de UFC/mL.

Además de realizar todos los experimentos por triplicado como se ha descrito, para cada muestra se incluyeron unos experimentos de control que fueron los siguientes:

- “Control células”: Consiste en realizar el recuento de la concentración de densidad celular bacteriana, sin exposición al fotosensibilizador. Esto permitió tener el número de las UFC/mL iniciales de referencia que se utilizó para el cálculo de las inactivaciones.
- “Control Dark”: En este caso, las muestras reciben exactamente el mismo tratamiento, pero se mantiene a oscuras durante el mismo tiempo que se irradian las muestras de estudio. Permite descartar toxicidad inherente al agente fotoinactivador.

## **5.2. Sobre *Escherichia coli* desarrollada en biopelícula:**

Para las fotoinactivaciones de células en biopelícula, se siguió una variación del protocolo anteriormente descrito para las bacterias en estado planctónico (Danese, et al., 2000).

Partiendo de una colonia aislada de *Escherichia coli* sobre TSA, se preparó un preinóculo sembrándola en 5 mL de caldo LB (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos) y se incubó en agitación a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  ON.

Por triplicado y tras el período de incubación, en una placa de 96 pocillos estéril, se añadió 2  $\mu\text{L}$  del preinóculo de cada muestra a 130  $\mu\text{L}$  de medio TSB y se dejó crecer ON a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  en la incubadora sin agitación.

Para eliminar las células no incluidas en la biopelícula, se retiró suavemente el sobrenadante con una micropipeta y se lavó el pocillo con solución salina estéril (0.89% NaCl- Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos) un mínimo de tres veces o hasta que no se detectó turbidez en el sobrenadante tras ser medida la D.O. mediante un espectrofotómetro a 620 nm.

Seguidamente, se añadieron 130  $\mu\text{L}$  de una solución de MB en PBS a la concentración deseada (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el tratamiento aTFD) y se dejó en reposo incubándose 15 minutos en total oscuridad, tras lo que se sometió a la irradiación (37.5 minutos, 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

A continuación, se retiró el sobrenadante y se lavaron los pocillos con 180  $\mu\text{L}$  de PBS dos veces, para acabar resuspendiendo las células del pocillo con 180  $\mu\text{L}$  de PBS estéril pipeteando con energía para arrancar la biopelícula y disgregarla con eficiencia. La suspensión resultante fue finalmente diluida para el cálculo de UFC/mL, según se ha descrito.

En todas las experiencias, además de hacerse, como mínimo, por triplicado, se han incluido una serie de controles:

- “Control de creación de biopelícula”: En cada experimento se añadieron dos pocillos que fueron sembrados con la cepa productora de biopelículas de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 e incubados. Uno de los pozos contenía el medio de cultivo TSB igual que los de realizados con las cepas clínicas de *E. coli*, pero no se le añadió el fotosensibilizador MB y se utilizó como el “control células” descrito para las células desarrolladas en estado planctónico, mientras que el segundo pocillo sólo contenía el tampón PBS (ni medio de cultivo ni MB) por lo que sirvió como “control negativo de células” para poder descartar contaminaciones exógenas.  
Al inicio de cada experimento se compararon los controles celulares con y sin irradiación sin MB para detectar posibles efectos tóxicos de la luz sobre las células. En ningún experimento se pusieron de manifiesto.
- “Control Dark”: Las muestras recibieron exactamente el mismo tratamiento, pero se mantuvieron a oscuras durante el mismo tiempo que se irradiaron las muestras de estudio (37.5 minutos). Este control permite descartar toxicidad debida al propio fotoinactivador.

- “Control del efecto de la metodología”: Las muestras reciben exactamente el mismo tratamiento, pero no se añade MB, sólo PBS a la biopelícula antes de la irradiación. Esto permite descartar efectos derivados de lisis mecánica por el tratamiento. En ningún experimento se detectaron diferencias a considerar.

### 5.3. Tratamiento combinado aTFD + antibiótico:

En los tratamientos combinados en los que se utilizó, con las concentraciones indicadas en la tabla 4, un fotosensibilizador (MB) y un antibiótico convencional (NAL) se siguió el procedimiento siguiente:

**Tabla 4: Concentraciones de fotosensibilizador y antibiótico utilizadas.**

Concentración del compuesto		
Ácido nalidíxico (0.5 MIC)	Azul de metileno (0.5 MIC)	Azul de metileno (0.25 MIC)
7 µg/mL, (28.4 µM)	5 µg/mL (15.5 µM)	2.5 µg/mL(7.75 µM)

Primero, se inició el tratamiento con el ácido nalidíxico a una concentración equivalente a la mitad de la MIC previamente obtenida con la cepa de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922 (tabla 3). Para ello, se incubó 1 mL de una suspensión celular de *E. coli* a una concentración de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL en PBS, en presencia de 7 µg/mL de NAL durante tres horas en agitación a 60 rpm, a oscuras y a 37°C. (Tabla 3)

A continuación, se centrifugó 10 minutos a 3000 g para eliminar el NAL del sobrenadante. Seguidamente, se resuspendió en un volumen final de 1 mL el botón celular, con PBS con la concentración deseada de MB y la mitad o un cuarto de la MIC (de nuevo, obtenida con la cepa de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922). (Tabla 3) Entonces se sometió a la irradiación durante 37.5 minutos ( $18 \text{ J/cm}^2$ ) con luz roja ( $640 \pm 25 \text{ nm}$ ).

Por último, se sembraron por triplicado para el recuento de UFC/mL, según lo descrito. Estas muestras que recibieron ambos tratamientos, con antibiótico y fotodinámico, se les dio la etiqueta de “MIX”, por combinar los dos.

Todas las experiencias destinadas a evaluar el efecto del tratamiento combinado se realizaron por triplicado sin olvidar incluir una serie de controles para valorar, en caso de que existiera un efecto sinérgico entre el MB y el NAL, que éste no estaba influido por otros factores. Los controles realizados fueron los siguientes:

- “Control células”: Consistió en el recuento de la concentración de la densidad celular, sin exposición a fotosensibilizador/antibiótico. Esto permitió determinar el número de las UFC/mL iniciales de referencia.  
Al inicio de cada experimento se comparó los controles celulares (sin FS) con y sin irradiación para detectar posibles efectos de la luz sobre las células. En ningún experimento se detectó toxicidad debida a la luz.

- “Efecto antibiótico”: En el caso de los tratamientos que empleaban antibiótico, se resuspendió el botón celular con antibiótico diluido en PBS, sin fotosensibilizador.
- “Efecto fotoinactivación”: Se utilizó un grupo control al que se le sometió a las mismas condiciones de incubación, que en este caso se realizó en PBS sin ácido nalidíxico antes de ser resuspendido en la concentración de MB deseada e irradiado, como en los tratamientos “MIX” anteriormente mencionados.

## **6. Análisis de los datos obtenidos:**

### **6.1. Valoración de los resultados de la inactivación bacteriana y tratamiento estadístico de los datos:**

Todos los valores están representados como la media de al menos tres experimentos (n=3) con sus desviaciones estándar ( $\pm\sigma$ ).

Para que el efecto de un fármaco sobre un microorganismo se considere que tiene un efecto bactericida es necesario que produzca al menos una reducción de mil veces ( $\geq 3$ logs) en el número de UFC/mL calculado.

Como criterio adicional, se llevó a cabo varios estudios estadísticos simples, realizados en el programa de procesamiento de datos Excel 2016:

Para ver las diferencias entre las muestras irradiadas y las muestras con fotosensibilizador, pero sin irradiación se utilizó un test t de Student, con un nivel de significación  $\alpha=0.05$ , que permitió saber si existió diferencias significativas entre las respuestas al tratamiento. Para poder aplicarlo con corrección se hizo previamente un estudio de igualdad de varianzas mediante un test F.

Adicionalmente, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si había diferencias en las respuestas de las diferentes cepas empleadas durante el estudio a los diferentes tratamientos.

Además de permitir determinar si existen diferencias estadísticas entre las respuestas a los diferentes tratamientos, al permitirnos analizar varias muestras a la vez (ANOVA multivariante), también se utilizó para determinar si existían diferencias estadísticas entre la sensibilidad al tratamiento de las distintas cepas estudiadas.

El análisis ANOVA fue realizado con un valor de  $\alpha = 0.05$  y de  $\alpha = 0.01$ , que permitió saber si existió diferencias significativas entre las respuestas.

En todos los casos, se parte de una hipótesis nula ( $H_0$ ), según la cual el efecto del tratamiento es el mismo y la hipótesis alternativa ( $H_1$ ), que el efecto del tratamiento es diferente.

## **6.2. Valoración de la existencia de sinergia en los estudios de terapia fotodinámica antimicrobiana con antibiótico:**

En los experimentos de aTFD con azul de metileno y ácido nalidíxico, se buscaba ver si el tratamiento combinado con ambos (MIX) tenía un efecto sinérgico. Para ser considerado sinérgico, sería necesario que la suma del efecto del tratamiento combinado fuera menor que la multiplicación del efecto de los tratamientos con MB y NAL (fórmula 7). Si los efectos son iguales, el efecto se consideraría aditivo. Y, en el caso de que el efecto del tratamiento combinado (MIX) fuese mayor que la multiplicación del efecto de los tratamientos con MB y NAL, el efecto sería antagónico.

<b>Fórmula 7:</b> Resumen efectos sinérgicos.	$MIX < NAL \times MB \rightarrow \text{Sinérgico}$ $MIX = NAL \times MB \rightarrow \text{Aditivo}$ $MIX > NAL \times MB \rightarrow \text{Antagónico}$
--	---

Para simplificar el cálculo, se aplicaron logaritmos, por lo que es aplicando la regla aritmética correspondiente a logaritmos; así, las fórmulas que se emplearon fueron las indicadas en la fórmula 8:

<b>Fórmula 8:</b> Simplificación efectos sinérgicos.	$\log_{10} (MIX) < \log_{10} (NAL) + \log_{10} (MB) \rightarrow \text{Sinérgico}$ $\log_{10} (MIX) = \log_{10} (NAL) + \log_{10} (MB) \rightarrow \text{Aditivo}$ $\log_{10} (MIX) > \log_{10} (NAL) + \log_{10} (MB) \rightarrow \text{Antagónico}$
---	--



# Capítulo 4: Resultados y discusión

## 1. Caracterización y estudios previos

### 1.1. Comprobación de la pureza de los cultivos: Tinción de gram.

En todos los casos en que se emplearon cepas bacterianas, se comprobó la pureza de los cultivos mediante tinciones de gram antes de realizar los experimentos. Las figuras 24 a 26 muestran la respuesta a la tinción de gram de una de las cepas de *Escherichia coli* utilizada en este trabajo (*E. coli* ATCC 35218), de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 y de *Salmonella enterica* ATCC 13311.

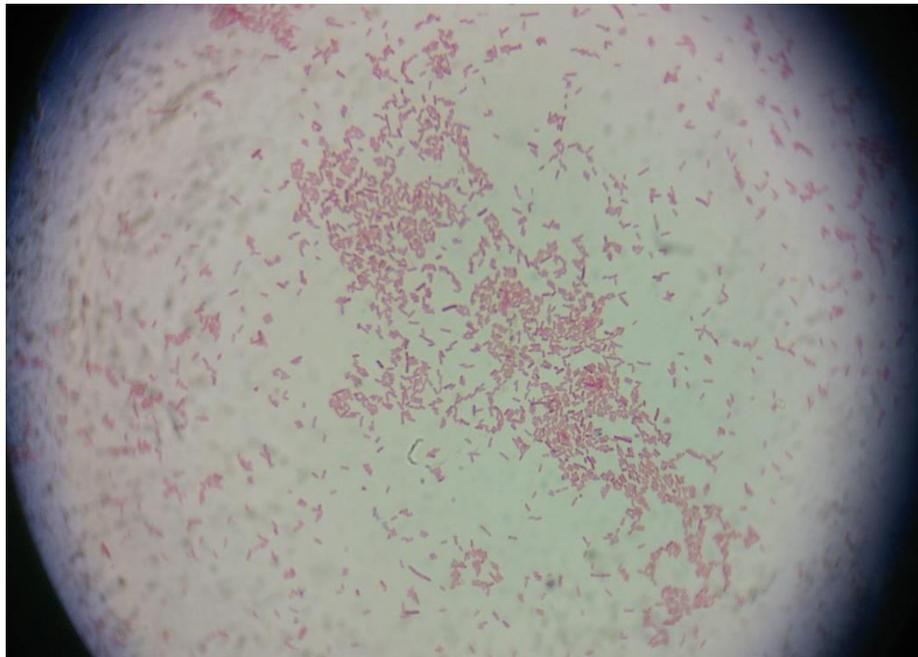


Figura 24: *Escherichia coli* ATCC 35218: Tinción de gram.

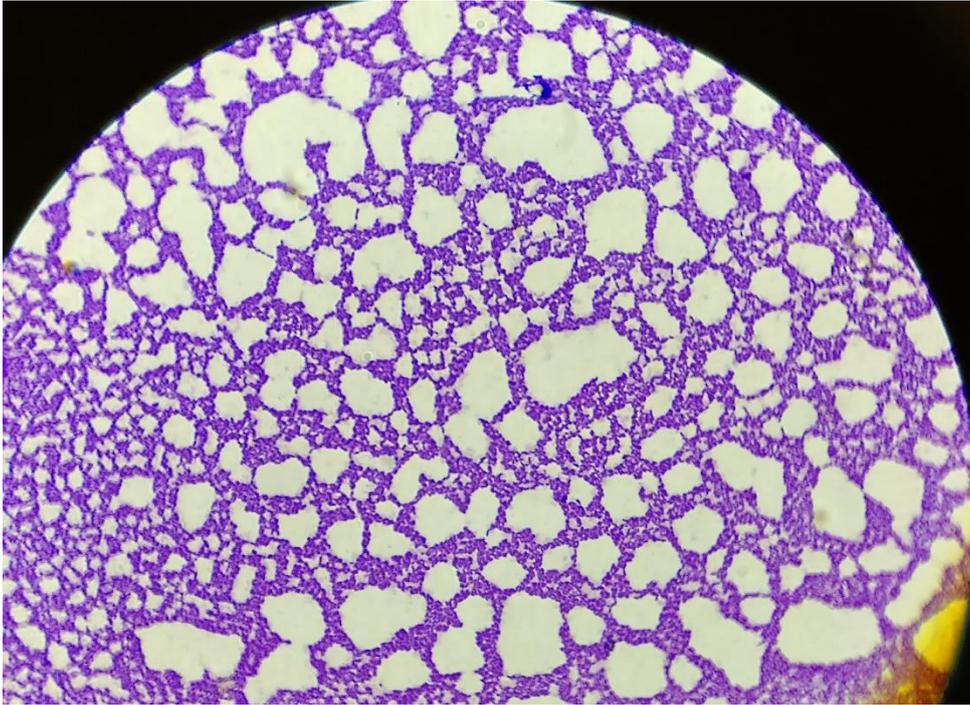


Figura 25: *Listeria monocytogenes* ATCC 15313: Tinción de gram.

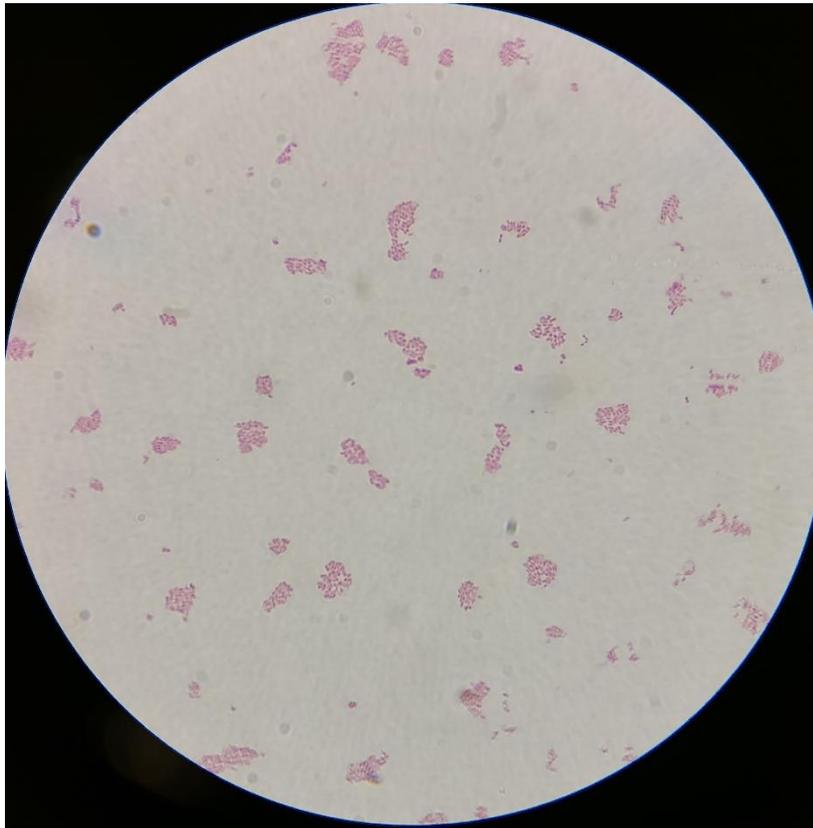


Figura 26: *Salmonella enterica* ATCC 13311: Tinción de gram.

## 1.2. Medida de la capacidad de formación de biopelícula por parte de las cepas de *Escherichia coli*.

Como se ha expuesto en el capítulo de material y métodos, para asegurar que las cepas de *Escherichia coli* uropatógenas son productoras de biopelículas, se compararon con la cepa de referencia productora de biopelículas ATCC 25922 (Naves, *et al.*, 2008) y se calculó la relación de formación específica de biopelículas (FEB), según el protocolo descrito por Danese (Danese, *et al.*, 2000) (fórmula 1)

Fórmula 1: Formación específica de biopelículas (FEB)

$$FEB = \frac{(\text{OD}_{490\text{nm}} \text{ de las células teñidas}) - (\text{OD}_{490\text{nm}} \text{ de controles negativos teñidos})}{(\text{OD}_{630\text{nm}} \text{ células crecidas en cultivo planctónico})}$$

Los resultados obtenidos a partir del promedio de los cálculos de las FEB se representan en la figura 27:

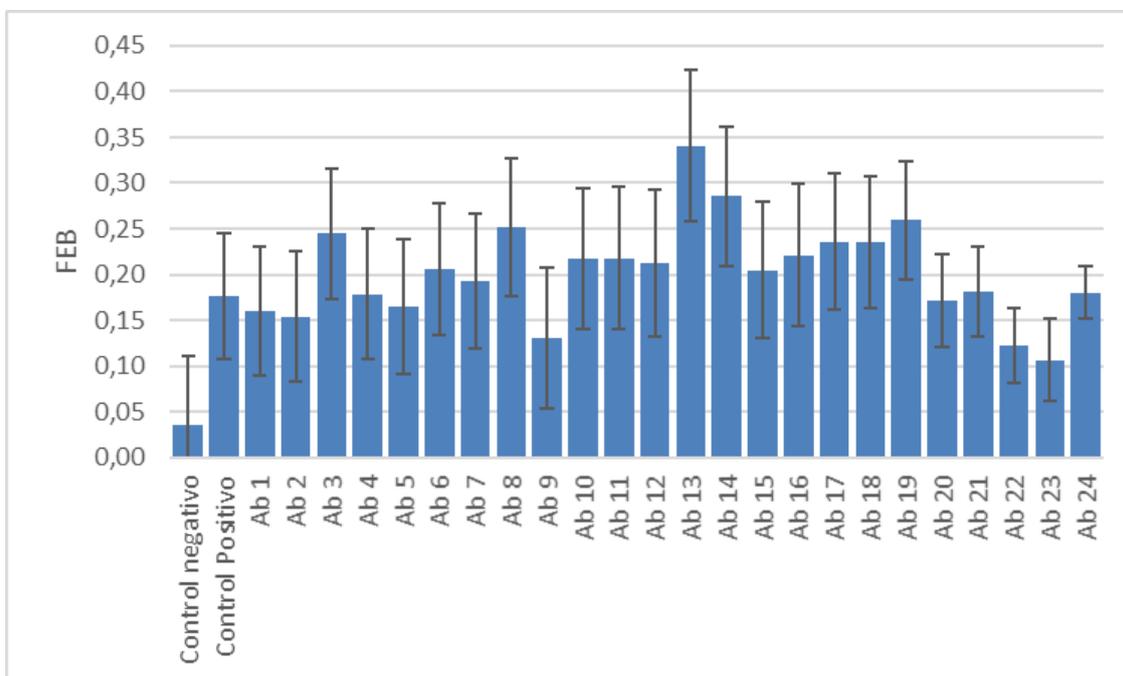


Figura 27: Relación de formación específica de biopelículas. Control negativo: *E. coli* ATCC 25922 incubada *overnight* en PBS. Control Positivo: *E. coli* ATCC 25922 incubada *overnight* en medio de cultivo M9 con glucosa. Ab 1 a 24: cepas clínicas incubadas en medio de cultivo M9 con glucosa.

Como se puede observar a partir de la gráfica de la figura 27, los resultados obtenidos en el estudio de formación específica de biopelículas presentan unos márgenes de variabilidad muy grandes. Esto es debido a la poca uniformidad que se consigue en la tinción de la biopelículas. Sin embargo, para todas las cepas se aprecian valores de formación específica de biopelículas superiores al control negativo, cercanos al FEB de la cepa modelo de productor de biopelículas (ATCC 25922).

De estos datos, además de la observación directa de biopelículas visibles a simple vista en los pocillos con bacterias crecidas incluso después de cinco lavados suaves con solución salina de los pocillos para eliminar las células planctónicas, se concluyó que todos los aislados cénicos de *Escherichia coli* uropatogénicas eran productoras de biopelículas.

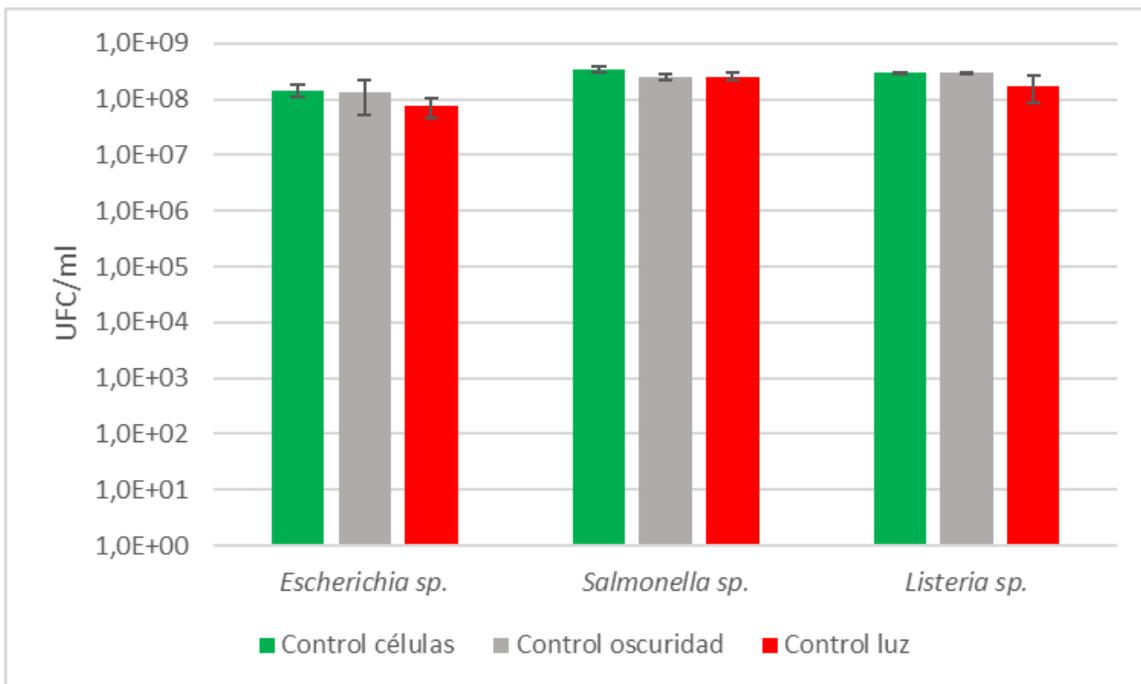
Esto es coherente con lo encontrado en la bibliografía, que indica que, en muchos casos, la creación de biopelícula es necesaria para la invasión/supervivencia del patógeno en el cuerpo del paciente, siendo esta capacidad un factor clave a la hora de determinar la virulencia y persistencia de las infecciones y de las enfermedades asociadas a ellas (Lebeaux, et al., 2013).

### **1.3. Evaluación de la reducción de viabilidad causada por la exposición a la luz.**

Previo a la aplicación de la terapia fotodinámica frente a las diferentes especies bacterianas en estudio, se comprobó que la simple exposición a la luz roja ( $640 \pm 25$  nm) no reducía la viabilidad de las bacterias y por tanto no influía en el tratamiento cuando se aplicaba el protocolo establecido.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 28, donde se representa el número de UFC/mL del “control células” (suspensión celular recién obtenida), del “control oscuridad” (suspensión celular incubada en oscuridad durante 120 minutos a temperatura ambiente) y del “control luz” (suspensión irradiada mediante luz roja a temperatura ambiente y con la dosis de luz ajustada para cada una de las condiciones empleadas posteriormente).

Como se quiere evaluar los efectos de la metodología a aplicar, todos los ensayos se realizaron por triplicado, en ausencia del agente fotosensibilizador.



**Figura 28: Evaluación de la toxicidad de la irradiación de 57.6 J/cm<sup>2</sup> de luz roja de longitud de onda (640 ± 25 nm) aplicada a suspensiones bacterianas de *E. coli* ATCC 35218, *L. monocytogenes* ATCC 15313 y *S. enterica* ATCC 13311 en ausencia de fotosensibilizador. Control células: suspensión celular inicial sin incubación posterior. Control oscuridad: suspensiones celulares incubadas 120 minutos en oscuridad. Control luz: suspensiones celulares incubadas durante 120 con luz roja. Todas las incubaciones se realizaron sin agitación a temperatura ambiente.**

Como se puede observar en la figura 28, todos los recuentos dieron resultados alrededor de las 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Las variaciones en los recuentos de la viabilidad celular por debajo de un factor logarítmico decimal se consideraron despreciables al entrar dentro del error experimental habitual, por lo que no pueden imputarse a un efecto de alguno de los factores empleados en los tratamientos. Este hecho empírico, conocido por nuestra experiencia, fue comprobado mediante la aplicación del análisis de varianza de un factor (ANOVA) a los resultados obtenidos, que confirmó la hipótesis nula (no hay diferencias significativas en los diferentes tratamientos) con un nivel de significación  $\alpha=0.05$ .

Así, analizados los resultados, se concluyó que la exposición a la luz durante dos horas no tiene un efecto perjudicial a tener en cuenta sobre las bacterias y por tanto, era posible efectuar nuestros protocolos de fotoinactivación con la seguridad de que las pérdidas de viabilidad que se observasen serían causadas por el efecto del agente fotosensibilizador, ya sea cuando esté sea irradiado o por su toxicidad intrínseca, y no por el efecto de la metodología aplicada o de un posible efecto de la luz sobre las células.

## **2. Efecto de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre especies patógenas.**

Es sabido que el efecto de la terapia fotodinámica depende de las características del microorganismo a tratar y de las características del fotosensibilizador utilizado (Malanovic & Lohner, 2016), por lo que es importante comprobar la utilidad de los fotosensibilizadores con diferentes especies. Por ello, además de estudiarse el efecto del azul de metileno en *Escherichia coli*, se hicieron dos estudios paralelos sobre dos bacterias patógenas de particular interés en la industria alimentaria con la intención de valorar su posible aplicación como desinfectante de materiales o superficies de trabajo en las industrias de este sector.

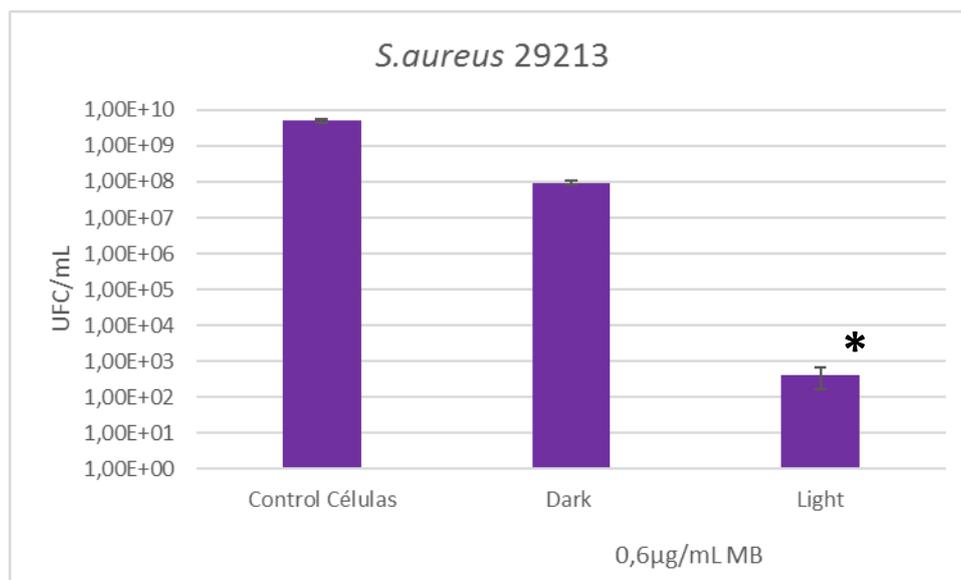
Las bacterias elegidas fueron *Salmonella enterica* ATCC 13311, como ejemplo de gram negativo, y *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 como ejemplo de gram positiva. Como se ha comentado en la introducción, ambas especies pueden causar trastornos de la salud cuando son ingeridas junto a los alimentos.

Para este estudio se han seleccionado dos bacterias con diferente respuesta a la tinción de gram ya que, a pesar de que una de las grandes ventajas de la terapia fotodinámica antimicrobiana es su capacidad de ser efectiva contra los diferentes microorganismos, se ha demostrado que el efecto no es igual sobre todos ellos. En la práctica resulta evidente la mayor resistencia de las bacterias gram negativas (Wainwright, et al., 1997).

### **2.1. Efecto de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre *Listeria monocytogenes*:**

Para el primer estudio se eligió a una bacteria gram positiva, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, para ser tratada mediante terapia fotodinámica con azul de metileno como fotosensibilizador. A partir de estudios previos realizados en nuestro departamento y de datos hallados en la bibliografía, es conocida la mayor sensibilidad que presentan las bacterias gram positivas a este tipo de terapia (Malik, et al., 1992).

Coherentemente, los datos obtenidos en el departamento sobre otra bacteria gram positiva: *Staphylococcus aureus*, donde se conseguían reducciones de la viabilidad de  $10^6$  veces, como se muestra en la figura 29, pasando de crecimientos de  $10^8$  UFC/mL a apenas superar las 100 UFC/mL; estos antecedentes permitieron planificar los experimentos en los que el rango de concentraciones de azul de metileno se mantuvo por debajo de los 5  $\mu\text{g/mL}$  (15.5  $\mu\text{M}$ ).

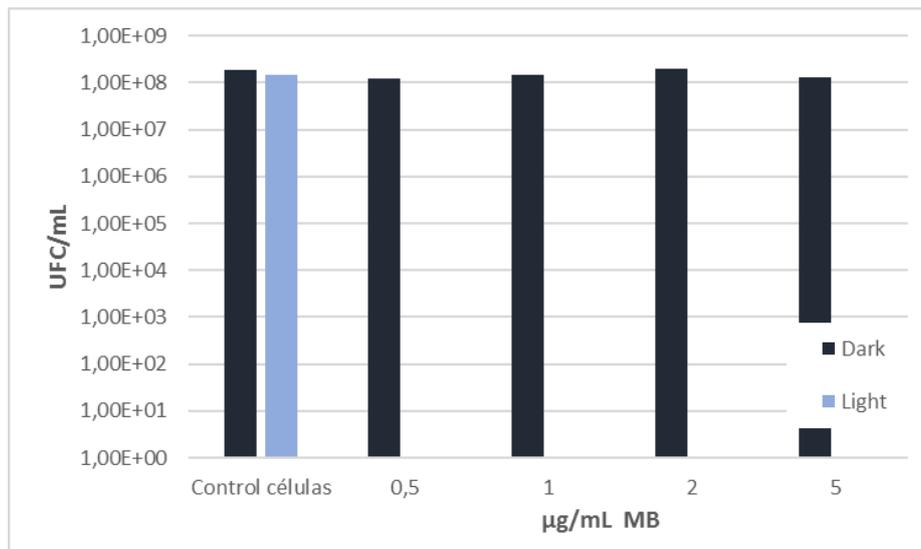


**Figura 29:** Gráfica del número de UFC/mL de *S. aureus* ATCC 29213 tratadas con concentración de MB (0 y 1.86 µM) con 18 J/cm<sup>2</sup> de irradiación “Light” y con el mismo tiempo (37.5 minutos) de incubación en oscuridad “Dark”.

Es de gran interés utilizar la mínima dosis de FS posible por economía. Además, en el caso de FSs que son tintes como el azul de metileno, usar una dosis baja permite mejorar el aspecto de la solución de los mismos. Asimismo, en el caso de tratamientos clínicos, permite minimizar los posibles efectos secundarios. Por ello se consideró interesante buscar la dosis mínima inhibitoria (MIC), entendida esta como la concentración mínima de fotosensibilizador que elimina todas las bacterias, en nuestro caso partiendo de una concentración inicial de entre  $10^8$  a  $1.5 \cdot 10^8$  UFC/mL.

En todos los experimentos, la dosis de irradiación se mantuvo fija en los 18 J/cm<sup>2</sup>, con 37.5 minutos de irradiación de luz roja ( $640 \pm 25$  nm), que en experiencias previas con enterobacterias (*Escherichia coli*, no mostradas), se mostró como una dosis efectiva para la eliminación bacteriana con azul de metileno como fotosensibilizador

En la figura 30, se detalla el efecto de los tratamientos iniciales sobre *Listeria monocytogenes* utilizando concentraciones crecientes (0, 1.55, 3.1, 6.2 y 15.5 µM) de azul de metileno. Se incluyen los recuentos de muestras con las mismas concentraciones de fotosensibilizador, pero sin ser irradiadas con los 18 J/cm<sup>2</sup> mencionados (muestras incubadas en oscuridad).



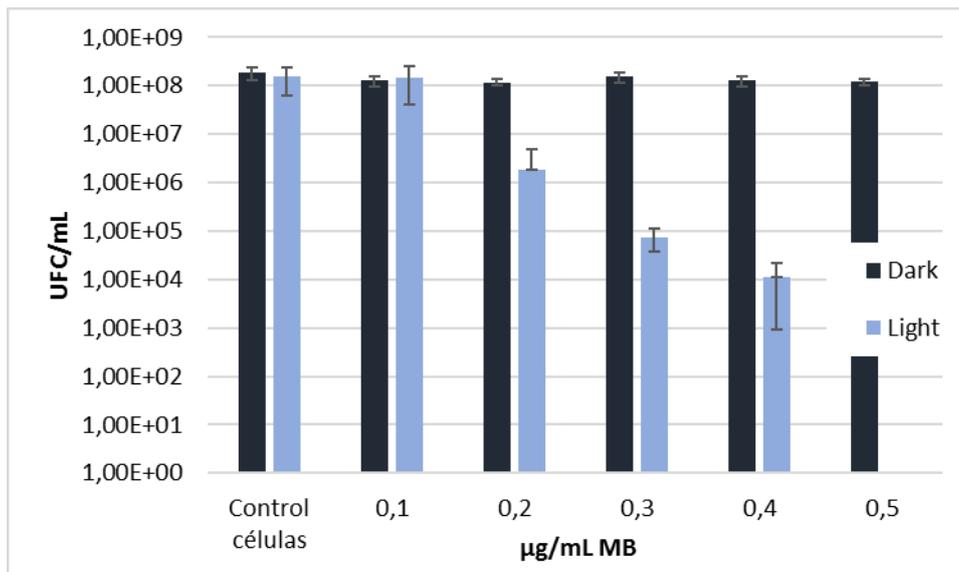
**Figura 30:** Gráfica del número de UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 15313 tratadas con diferentes concentraciones de MB (0, 1.55, 3.1, 6.2 y 15.5 µM) con 18 J/cm<sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (37.5 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".

Tras emplear estas dosis, se llegó a dos conclusiones:

- Incluso con la dosis más elevada de fotosensibilizador, no se observó un aumento de mortalidad en las pruebas sin irradiar "Dark", por lo que se pudo descartar efectos de toxicidad intrínsecos al azul de metileno sobre las células.

- El tratamiento fotodinámico fue muy efectivo, eliminando a todas las bacterias tratadas. Fue tan efectivo que, incluso en la dosis menor no se encontraba supervivencia alguna, por lo que para obtener la MIC es necesario probar dosis incluso más bajas de azul de metileno para poder afinar su valor.

En la gráfica de la figura 31, se puede apreciar el efecto de los tratamientos con dosis inferiores de fotosensibilizador sobre *Listeria monocytogenes*, con concentraciones crecientes (0, 0.31, 0.62, 0.93, 1.24 y 1.55 µM) de azul de metileno. Se incluyen los resultados de los recuentos de muestras con las mismas concentraciones de fotosensibilizador, pero sin ser irradiadas con los 18 J/cm<sup>2</sup>.



**Figura 31:** Gráfica del número de UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 15313 con diferentes concentraciones de MB (0, 0,31, 0,62, 0,93, 1,24 y 1,55 µM) con 18 J/cm<sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (37.5 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".

Como era de esperar, al igual que en el caso del experimento anterior en el que se habían utilizado concentraciones superiores de azul de metileno, el tratamiento no causó toxicidad detectable en los cultivos mantenidos en oscuridad o "Dark".

Para las muestras tratadas con luz, se puede ver el descenso de la viabilidad que causaron las crecientes concentraciones de azul de metileno, llegando a la inhibición completa del crecimiento a una concentración de 1.55 µM (0,5 µg/mL). Con estos datos, se concluyó que la concentración mínima inhibitoria en las condiciones experimentales empleadas es de 0.5 µg/mL (1.55 µM), partiendo de una concentración inicial aproximada de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Este estudio también nos permite afirmar que la dosis bactericida, la que consigue una reducción de la viabilidad celular de más del 99.9% (3 logs), es de 0.3 µg/mL (0.93 µM), concentración de PS en la que se pudo observar una caída de viabilidad de más de 10<sup>8</sup> UFC/mL a menos de 10<sup>5</sup> UFC/mL.

Estas bajas concentraciones pueden conseguirse preparando una dilución incolora a simple vista (ver diferencias en la figura 32), lo que hace del azul de metileno como una alternativa realmente interesante para la desinfección de superficies o utensilios de trabajo, además de como tratamiento sanitario.



Figura 32: Fotografía mostrando la coloración de diferentes concentraciones de azul de metileno: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (31  $\mu\text{M}$ ), 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (7.75  $\mu\text{M}$ ), 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1.55  $\mu\text{M}$ ), 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0.93  $\mu\text{M}$ ) y 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0.31  $\mu\text{M}$ ).

## 2.2. Efecto de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre *Salmonella enterica*.

### 2.2.1. Con azul de metileno como fotosensibilizador:

En el caso del estudio con *Salmonella enterica* ATCC13311, se ha partido de estudios previos realizados frente a otras bacterias gram negativas (ver cálculo de MIC de *Escherichia coli* en esta misma tesis).

Fijada la dosis de irradiación a 18  $\text{J}/\text{cm}^2$  (37.5 minutos), se preparó un gradiente de concentraciones de azul de metileno en agua hasta los 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0, 15.5, 31, 46.5, 62 y 77.5  $\mu\text{M}$ ), para determinar la MIC. En la figura 33, se puede apreciar el efecto de los tratamientos iniciales sobre *Salmonella enterica*; se incluyen también los recuentos de muestras con las mismas concentraciones de fotosensibilizador, pero sin ser irradiadas con los 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ , muestras incubadas en oscuridad o "dark".

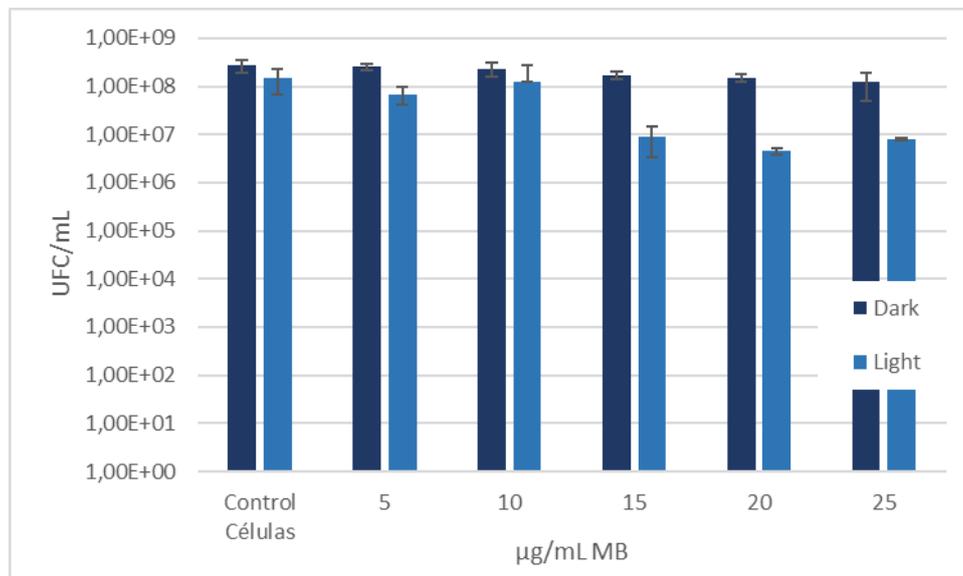


Figura 33: Gráfica del número de UFC/mL de *S. enterica* ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de MB (0, 15.5, 31, 46.5, 62 y 77.5  $\mu\text{M}$ ) con 18  $\text{J}/\text{cm}^2$  de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (37.5 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".

Con estas dosis, se llegaron a dos conclusiones:

- Incluso con la dosis más elevada de fotosensibilizador, no se observó un aumento de mortalidad en las pruebas sin irradiar “Dark”, por lo que se pudo descartar efectos de toxicidad intrínsecos al azul de metileno sobre las células.

- En las muestras irradiadas “Light”, no se observó una disminución relevante de UFC/mL; incluso con las concentraciones más altas, causaron poco más de una reducción del 10% en la viabilidad, variabilidad que está dentro de la variabilidad experimental habitual. Esto queda confirmado al aplicar un análisis de la varianza, cuyos resultados se ven en la tabla 5.

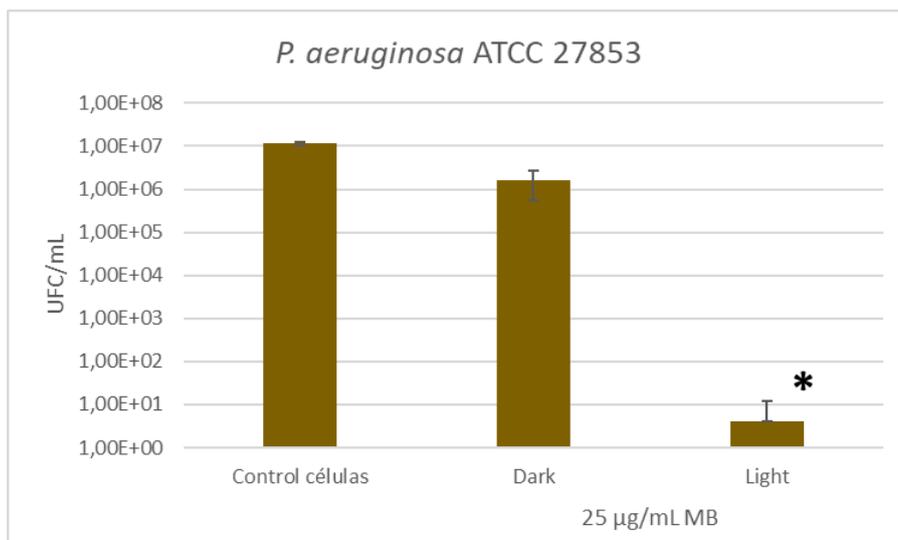
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las	Suma de cuad	Grados de libe	Promedio de l	F	Probabilidad	crítico para F
Entre grupos	0,72	4	0,18	1,37	0,29	3,06
Dentro de los	1,97	15	0,13			
Total	2,69	19				

Tabla 5: Resumen del test de análisis de la varianza de las reducciones de viabilidad medidas entre las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 20 µg/mL (15.5, 31, 46.5, 62 y 77.5 µM).

Este resultado no era el esperado, ya que *Salmonella*, al igual que *Escherichia coli*, pertenecen a la familia de las *Enterobacteriaceae*. Por tanto, *E. coli* es un organismo filogenéticamente cercano que presenta MICs inferiores (de nuevo, se presentará una medida de la misma en esta misma tesis).

Así, se pudo concluir que, claramente, *Salmonella* es una especie que presenta una resistencia al tratamiento. Esta puede ser debida a la acción de bombas de eflujo que expulsa el fotosensibilizador al exterior de las células, efecto ya ha sido descrito para las fenotiacinas catiónicas. (Tegos, et al., 2008) (Fernández & Hancock, 2012)

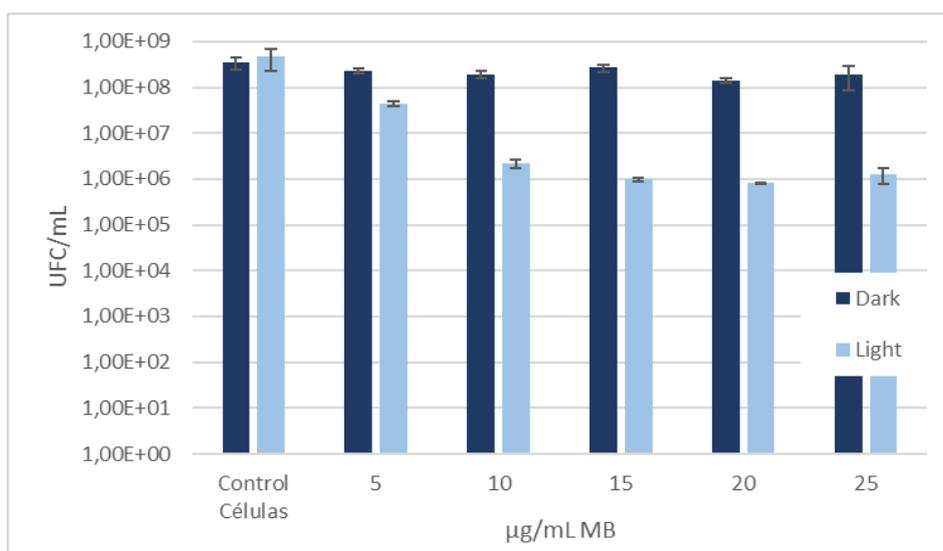
Este resultado, aunque inesperado *a priori*, no es inusual entre los gram negativos, ya que en este mismo laboratorio se ha comprobado el valor de la MIC del azul de metileno frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y este se encuentra por encima de los 25 µg/mL, como se muestra en la figura 34:



**Figura 34:** Gráfica del número de UFC/mL de *P. aeruginosa* ATCC 27853 tratadas con concentración de MB (0 y 77.5 µM) con 18 J/cm<sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (37.5 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".

Para solucionarlo, se optó inicialmente por aumentar el tiempo de irradiación hasta una hora (28.8 J/cm<sup>2</sup>), para intentar no subir la concentración de azul de metileno, evitando efectos tóxicos del mismo sin irradiación.

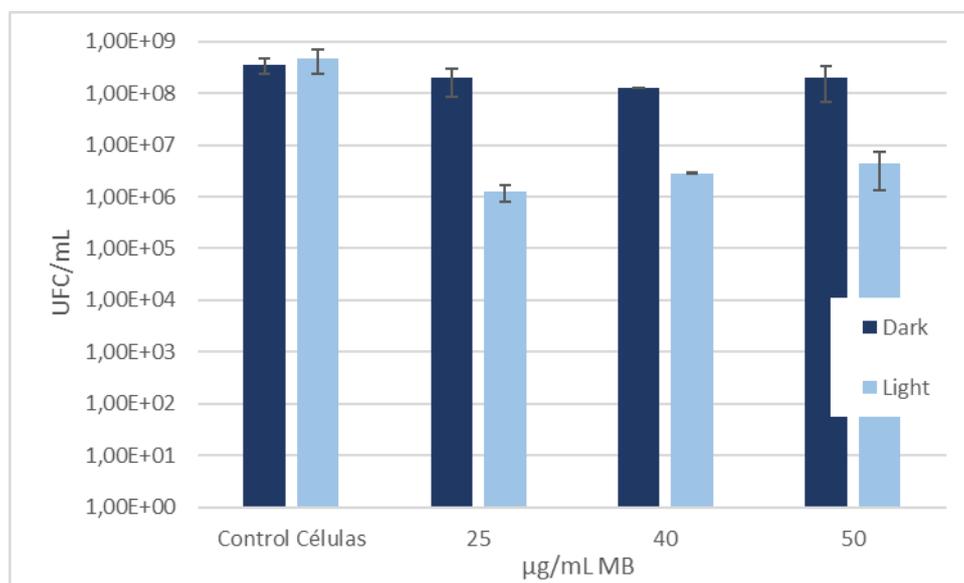
Con este principio, se mantuvieron las mismas concentraciones de azul de metileno (0, 15.5, 31, 46.5, 62 y 77.5 µM). En la figura 35, se puede apreciar el efecto del tratamiento con 60 minutos de irradiación; se incluyen los resultados de las suspensiones celulares incubadas el mismo tiempo sin exposición a la luz en presencia de las diferentes dosis del fotosensibilizador.



**Figura 35:** Gráfica del número de UFC/mL de *S. enterica* ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de MB (0, 15.5, 31, 46.5, 62 y 77.5 µM) con 28.8 J/cm<sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".

Al aumentar la exposición a la luz, aunque, en efecto, se vio más efecto fotodinámico que en el caso anterior (figura 33), no se llegó a alcanzar una reducción de 99.9% que marca el efecto bactericida, quedándose en poco más de un 99% de mortalidad.

Debido a este poco efecto, finalmente se decidió aumentar la concentración de fotosensibilizador, subiéndola hasta los 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (77.5, 124 y 155  $\mu\text{M}$ ). Los resultados se pueden ver en la figura 36, donde se ve el efecto del tratamiento con 60 minutos de incubación, tanto en oscuridad, como irradiado.



**Figura 36: Gráfica del número de UFC/mL de *S. enterica* ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de MB (0, 77.5, 124 y 155  $\mu\text{M}$ ) con 28.8  $\text{J}/\text{cm}^2$  de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".**

El incremento de dosis de fotosensibilizador no comportó una aparición de efectos bactericidas, quedándose en poco más de un 99% de mortalidad.

A pesar de que se empezaba a observar toxicidad intrínseca del azul de metileno en las muestras no irradiadas con la mayor concentración (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -155  $\mu\text{M}$ ), se hizo una última prueba con una concentración todavía más elevada: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (310  $\mu\text{M}$ ) manteniendo y duplicando el tiempo de irradiación, con una y dos horas (28.8 y 57.6  $\text{J}/\text{cm}^2$ , respectivamente).

En la figura 37, se puede apreciar el efecto del tratamiento con 60 y 120 minutos de incubación, con y sin irradiación.

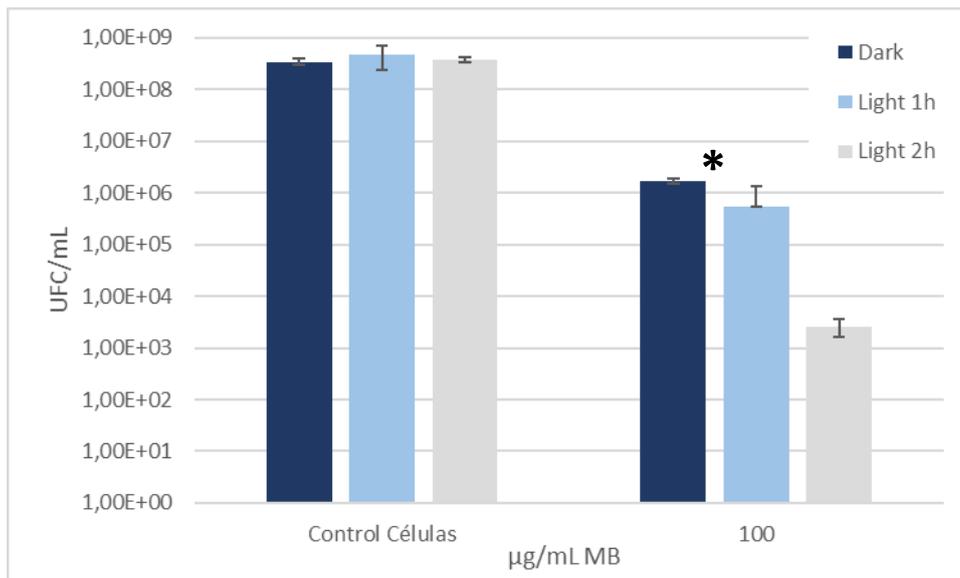


Figura 37: Gráfica del número de UFC/mL de *S. enterica* ATCC 13311 tras ser tratada con diferentes concentraciones de MB (0 y 310 µM) con 28.8 J/cm<sup>2</sup> y 57,6 J/cm<sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 y 120 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".

En este experimento finalmente se observó un claro efecto bactericida del tratamiento, alcanzado tanto tras una como en dos horas de irradiación, obteniéndose más de 3 y 4 reducciones logarítmicas, respectivamente, pero sin llegar a alcanzar una inhibición completa del crecimiento bacteriano.

Paralelamente, se ve un efecto de toxicidad del azul de metileno sin irradiar, con una reducción del 99% de la viabilidad. Esto se ve confirmado al hacer un análisis de la variancia, en la que se encuentran diferencias significativas entre el control celular y el control *Dark* sin irradiar.

Los resultados del análisis estadístico se pueden ver en la tabla 6 (F de Fisher para decidir que análisis aplicar).

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	<i>Control Células</i>	<i>100 Dark</i>
Media	3,49E+08	2,51E+06
Varianza	1,31E+16	1,02E+12
Observaciones	1,20E+01	9
Grados de libertad	1,10E+01	8
F	1,28E+04	
P(F<=f) una cola	9,76E-16	<α=0,05 ↓
Valor crítico p	3,31E+00	Varianzas diferentes

Tabla 6: Test F de Fisher realizado. En la tabla se presenta la comparación de varianzas del control celular y las muestras sin irradiar (Dark)

Dado que las varianzas eran diferentes, se aplicó un t de Student para varianzas diferentes, como se puede ver en la tabla 7:

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Control Células	100 Dark
Media	349166667	2511111,111
Varianza	1,3081E+16	1,01861E+12
Observaciones	12	9
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	10,4989233	
P(T<=t) una cola	2,2677E-07	
Valor crítico de t (una cola)	1,79588482	
P(T<=t) dos colas	4,5354E-07	< $\alpha=0,05$ ↓
Valor crítico de t (dos colas)	2,20098516	Diferencias significativas

Tabla 7: Test t de Student. En la tabla se presenta la comparación de varianzas del control celular y la muestras sin irradiar (Dark)

Efectivamente, se confirmó la existencia de una toxicidad significativa en las muestras con azul de metileno sin irradiar. Para intentar bajar esta toxicidad, se buscó una concentración menor de azul de metileno (90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), dejando el tiempo de irradiación en una hora (28.8  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). El resultado queda reflejado en la figura 38, donde se ve el efecto del tratamiento con 90 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (279 y 310  $\mu\text{M}$ ).

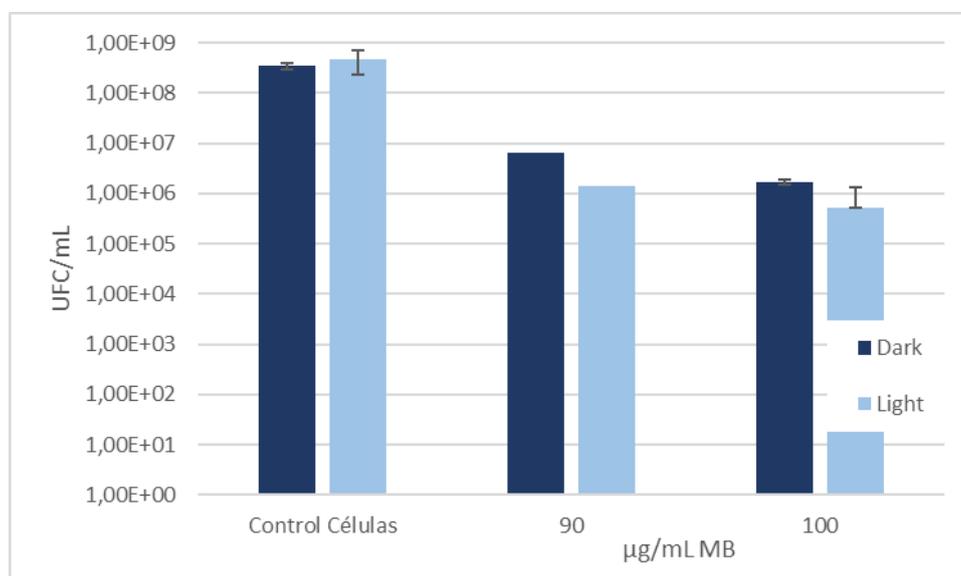


Figura 38: Gráfica del número de UFC/mL de *S. enterica* ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de MB (0, 279 y 310  $\mu\text{M}$ ) con 28.8  $\text{J}/\text{cm}^2$  de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".

En este experimento, se llegó a conseguir un efecto bactericida claro en la dosis de 100 µg/mL; estos resultados fueron coherentes con los resultados previos reflejados en la figura 37, alcanzando en ambos el efecto bactericida.

En el caso de las concentraciones de azul de metileno de 90 µg/mL, se midieron reducciones de justo el 99.9%, alcanzando también el efecto bactericida.

En ambos casos, se apreció una toxicidad clara en los controles *Dark* sin irradiar. Esto es un efecto indeseado para nuestro estudio, ya que no nos permite ver con claridad la reducción de viabilidad debida solamente al efecto fotodinámico; pero se ha de aclarar que, de cara a un posible uso como desinfectante de superficies, el interés es en su letalidad global, independientemente de su origen.

Esta toxicidad no relacionada con la fotoexposición está relacionada con su interacción con la membrana interna bacteriana, anulando su fluidez natural. (Jette Elisabeth, 1990) (János, et al., 1992)

En ningún caso se llegó a ver una mortalidad total, por lo que la MIC quedaría en una concentración superior, en la cual es de suponer que la toxicidad en oscuridad del azul de metileno también sería mayor.

Como conclusión, se puede afirmar que el tratamiento fotodinámico antimicrobiano es efectivo como desinfectante (alcanza dosis bactericida), pero hay que tener en cuenta que una parte del efecto es por toxicidad directa del fotosensibilizador, por lo que su uso estaría restringido al tratamiento de materiales.

Para su uso como desinfectante, las concentraciones tan altas de azul de metileno son problemáticas, debido a que su intenso color azul puede teñir el material a desinfectar, bajando su valor comercial o siendo directamente inútil para su uso.

Esta baja sensibilidad no era esperada ni por resultados obtenidos en estudios previos, ni por estar descrita en la bibliografía. Las causas de esta no las conocemos con absoluta certeza, pero cabe pensar que tengan alguna relación con una baja afinidad del colorante por la envoltura celular o algún mecanismo no descrito de expulsión del mismo una vez haya alcanzado el citoplasma, lo que haría que la mortalidad fuera solamente causada por la producción de especies reactivas de oxígeno por parte del fotosensibilizador presente en el medio, no unidas a las bacterias. Esta toxicidad secundaria no es deseable por su inferior rendimiento y baja especificidad.

Partiendo de esta hipótesis, se postuló que, si se usaba un fotosensibilizador con más afinidad por la membrana bacteriana, se debería ver una mejora en su rendimiento.

El fotosensibilizador elegido fue el Nuevo Azul de Metileno (NMB), ya que es un derivado cromofóricamente metilado del azul de metileno (Ragàs, et al., 2010)

Las estructuras del azul de metileno y nuevo azul de metileno se presentan en las figuras 13 y 14.

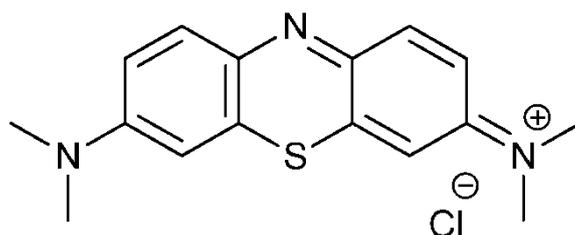


Figura 13: Estructura química del azul de metileno

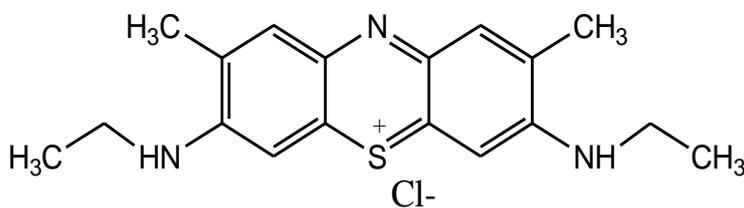


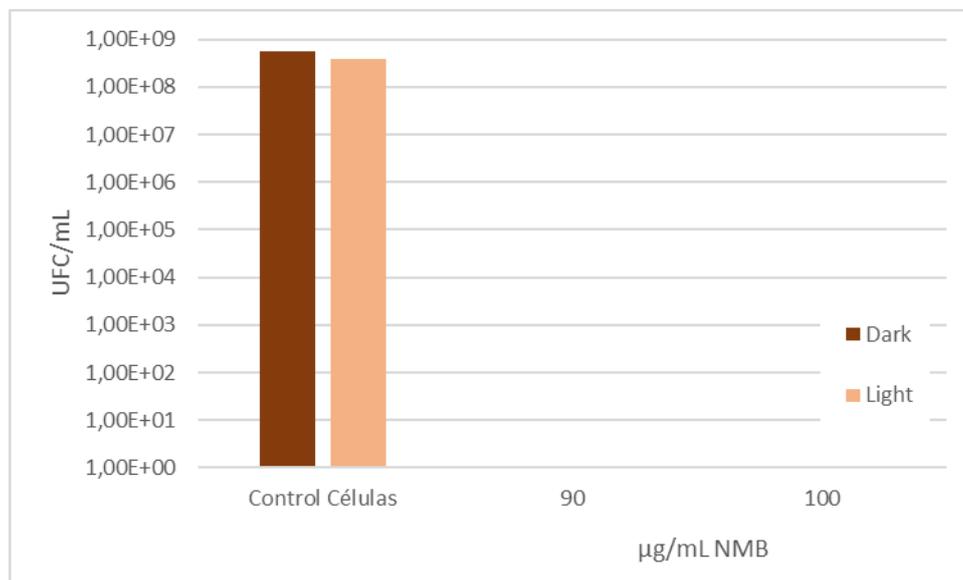
Figura 14: Estructura química del nuevo azul de metileno

El nuevo azul de metileno tiene un rendimiento cuántico mejorado (1.32 veces la del MB), manteniendo su estructura catiónica. (Wainwright & Giddens, 2003)

Está demostrado que, en comparación al MB clásico, el nuevo azul de metileno presenta una superior capacidad bactericida sobre microorganismos (López-Chicón, *et al.*, 2016); siendo ésta debida, no sólo a su superior rendimiento cuántico, sino también a una mayor lipofilicidad (valores de logP de -0.1 en MB y 1.2 NMB), que varía su afinidad por la pared bacteriana y lo convierte en una alternativa atractiva cuando se desea observar efecto fotodinámico con un cambio mínimo del fotosensibilizador. (Ragàs, *et al.*, 2010)

### **2.2.2. Estudio del efecto de la terapia fotodinámica antimicrobiana en *Salmonella enterica*, con New Methylene Blue como fotosensibilizador**

Para ver si, como se postuló, el cambio de fotosensibilizador acababa llevando a mejores resultados, se repitió el último experimento sobre *Salmonella enterica* ATCC 13311, con concentraciones de 90 i 100 µg/mL (185.9 y 206.6 µM) de Nuevo Azul de Metileno; los resultados se pueden ver en la Figura 39, tras mantener las muestras por 60 minutos de incubación, en oscuridad o irradiados (28.8 J/cm<sup>2</sup>).



**Figura 39: Gráfica del número de UFC/mL de *S. enterica* ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de NMB (0, 185.94 y 206.6 µM), con 28.8 J/cm<sup>2</sup> de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".**

Con estas condiciones, todas las bacterias expuestas al fotosensibilizador fueron erradicadas, independientemente de si habían estado expuestas a la luz o se habían mantenido los 60 minutos a oscuras.

Al comparar estos datos con lo obtenido previamente con el azul de metileno vistos en la figura 38, es evidente que el NMB tiene un efecto tóxico en oscuridad sobre las células, incluso más potente que el azul de metileno normal; posiblemente por su mayor lipofilia, que mantendría el compuesto unido a las bacterias. (Ragàs, et al., 2010)

Para poder ver mejor si se producía el efecto fotodinámico, se decidió bajar las concentraciones de fotosensibilizador.

En la figura 40, se puede ver el efecto del tratamiento con 10 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (20.66 y 103.3  $\mu\text{M}$ ) de NMB con 60 minutos de incubación, en oscuridad o irradiados (28.8  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

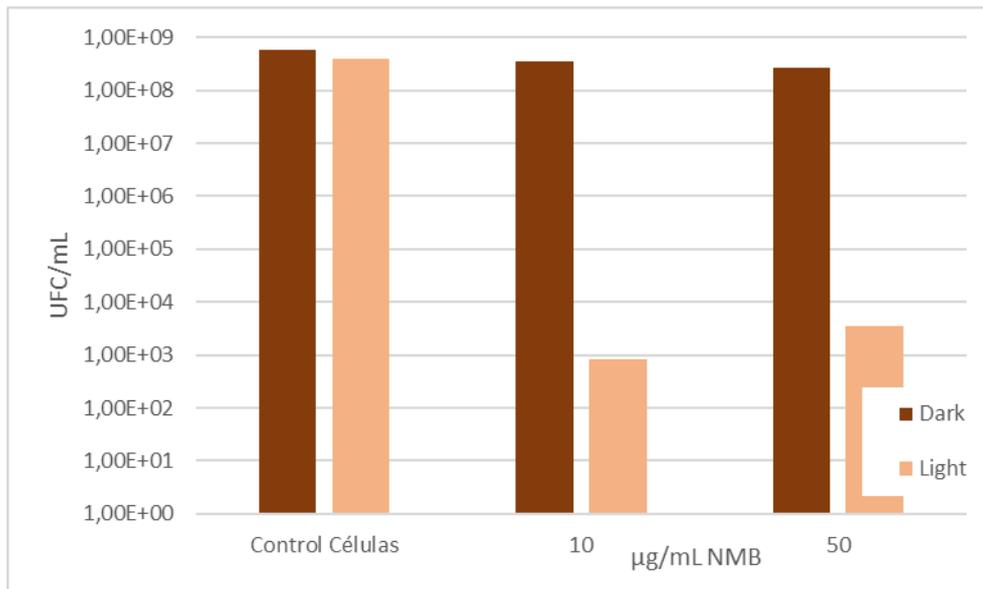


Figura 40: Gráfica del número de UFC/mL de *S. enterica* ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de NMB (0, 20.66 y 103.3  $\mu\text{M}$ ) con 28.8  $\text{J}/\text{cm}^2$  de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".

Con estas concentraciones sólo se detectó toxicidad debida al fotosensibilizador en la concentración más alta con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (103.3  $\mu\text{M}$ ), mientras que a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (20.66  $\mu\text{M}$ ) no estaba presente tal efecto.

Asimismo, se observó disminuciones en la viabilidad de *Salmonella* en las muestras irradiadas tratadas con ambas concentraciones de NMB, alcanzándose el efecto bactericida en ambos casos, con más de cuatro logaritmos de reducción en los recuentos de UFC/mL.

Con una concentración de 20.66  $\mu\text{M}$  de fotosensibilizador, se alcanzaron reducciones de hasta cinco unidades logarítmicas decimales mientras que se midió una ligera disminución del efecto en la concentración más alta (103.3  $\mu\text{M}$ ), que fue recurrente al repetir el experimento.

Como experimento final, se decidió probar concentraciones intermedias de NMB; esto nos permitiría confirmar la tendencia observada.

Así, en la figura 41, se puede ver el efecto del tratamiento con concentraciones de 6 a 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0, 12.40, 16.53, 20.66 y 51.65  $\mu\text{M}$ ) de NMB, con una incubación de 60 minutos en oscuridad o irradiados ( $28.8 \text{ J}/\text{cm}^2$ ).

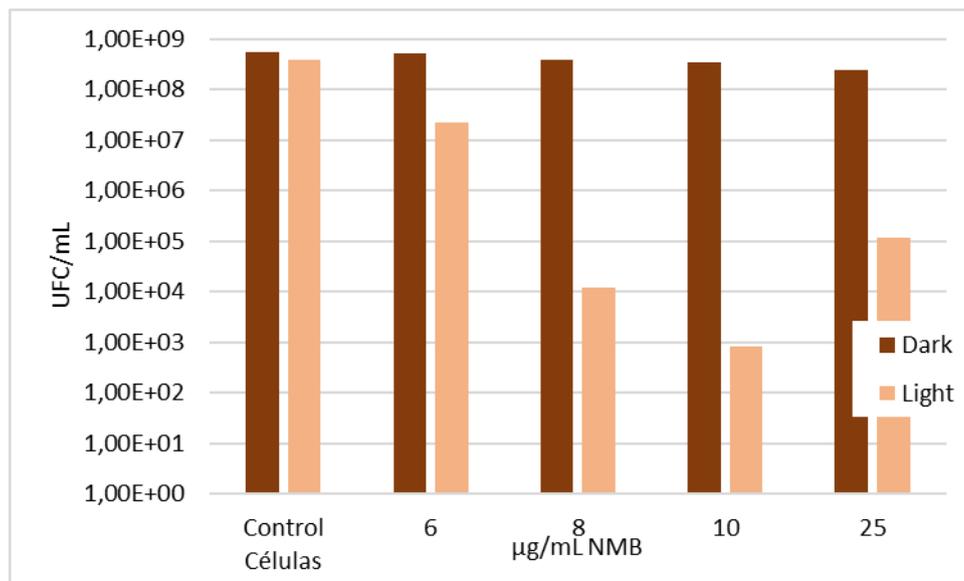


Figura 41: Gráfica del número de UFC/mL de *S. enterica* ATCC 13311 tratada con diferentes concentraciones de NMB (0, 12.4, 16.53, 20.66 y 51.65  $\mu\text{M}$ ) con  $28.8 \text{ J}/\text{cm}^2$  de irradiación "Light" y con el mismo tiempo (60 minutos) de incubación en oscuridad "Dark".

Para todas las concentraciones del fotosensibilizador ensayadas en esta etapa, la toxicidad sin irradiación fue escasa, aunque parece indicar una tendencia al alza al aumentar concentraciones que no superó la reducción del 10% que se consideró como una reducción posible dentro de la variabilidad experimental.

Con estos recuentos, los resultados previos fueron reforzados, ya que se detectó una disminución de la viabilidad asociada al incremento de concentración del fotosensibilizador tras el tratamiento con luz, con un logaritmo de reducción en concentraciones de 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (12.4  $\mu\text{M}$ ), que llegaron a los seis logaritmos de reducción con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (20.66  $\mu\text{M}$ ) de fotosensibilizador.

Por último, se confirmó un descenso de la actividad antimicrobiana al subir las concentraciones de fotosensibilizador por encima de los 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  que se visualizó en los recuentos de las bacterias expuestas a 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fotosensibilizador, con una reducción de viabilidad únicamente de 3 unidades logarítmicas.

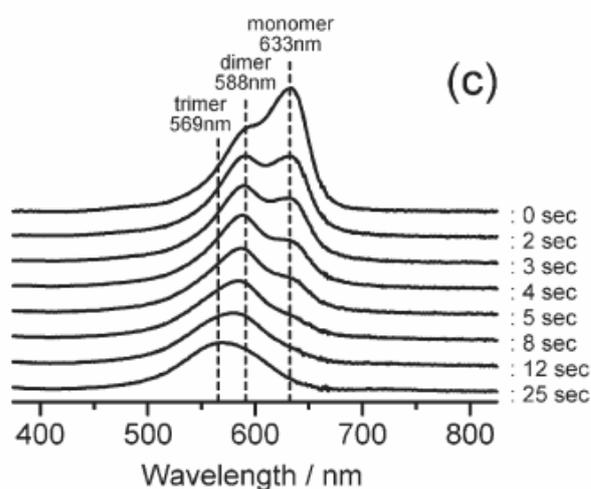
Como conclusiones, aunque no se ha llegado a definir la MIC del NMB con exactitud, se ha conseguido una mortalidad muy alta, del 99.999%, sin toxicidad intrínseca asociada con esta concentración de fotosensibilizador. Si se quisiera obtener el valor de la MIC, haría falta probar más concentraciones entre los 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NMB.

Los datos obtenidos, nos permiten afirmar que la aTFD con NMB es efectiva para la desinfección de *Salmonella enterica*, reafirmando la importancia de una correcta elección del fotosensibilizador (Sharma, et al., 2012) y la necesidad del continuo desarrollo y testeo de nuevas moléculas fotosensibilizadores.

Como nuestro objetivo era conseguir un efecto bactericida suficientemente elevado como para poder utilizar el fotosensibilizador como agente desinfectante, hecho conseguido, se decidió no continuar los experimentos necesarios para obtener el valor de la MIC.

En la experiencia con NMB además se observó un efecto que también es importante a la hora de planificar el uso de fotosensibilizadores como antimicrobianos: a la hora de determinar la concentración óptima del fotosensibilizador a utilizar, no siempre más concentración es mejor.

Como se ha visto, en nuestros experimentos se detectó un descenso del efecto antimicrobiano al superar cierta concentración del mismo. Esto puede ser debido a la formación de agregados de moléculas de NMB, cuya formación sería más probable al aumentar la concentración de FS; estos agregados actuarían como un filtro interno, dificultando el acceso de la luz y/o el oxígeno al FS; además, es conocido que la formación de estos agregados cambia su espectro de absorción, sufriendo un desplazamiento hipsocrómico, que desplaza el máximo de absorción del rojo hacia el amarillo (Adachi, et al., 2010), lo que bajaría la producción de oxígeno singlete al ser irradiado con luz de 640 nm, bajando la letalidad y explicando nuestros resultados con concentraciones altas de Nuevo Azul de Metileno.



**Figura 42: Cambios del espectro de absorción debido a la agregación de NMB, mostrando la bajada de la longitud de onda en el máximo de absorción al incrementarse las unidades agregadas. (Adachi, et al., 2010)**

### **3. Efectos de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre cepas clínicas multiresistentes de *Escherichia coli*.**

La preocupación por la aparición de resistencias a los antibióticos (Laxminarayan, et al., 2016) es una de las principales razones del renacimiento de la fotodinámica como técnica de eliminación de microorganismos, por lo que se consideró de interés hacer un estudio para comprobar que los diferentes perfiles de resistencia a antibióticos (Susan, et al., 2011), no limitan la efectividad de la terapia fotodinámica antimicrobiana.

En la tabla 2 de la sección material y métodos se puede ver un resumen de las resistencias a antibióticos detectadas en las cepas clínicas en estudio, mientras que en el apéndice 1 se muestra una tabla más extensa de las resistencias para cada cepa. Dos cepas de referencia de *Escherichia coli* (ATCC 35218 y ATCC 25922) sin resistencias detectadas, se utilizaron para comparar los efectos con las cepas clínicas.

#### **3.1. Estudio de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre cultivo planctónico:**

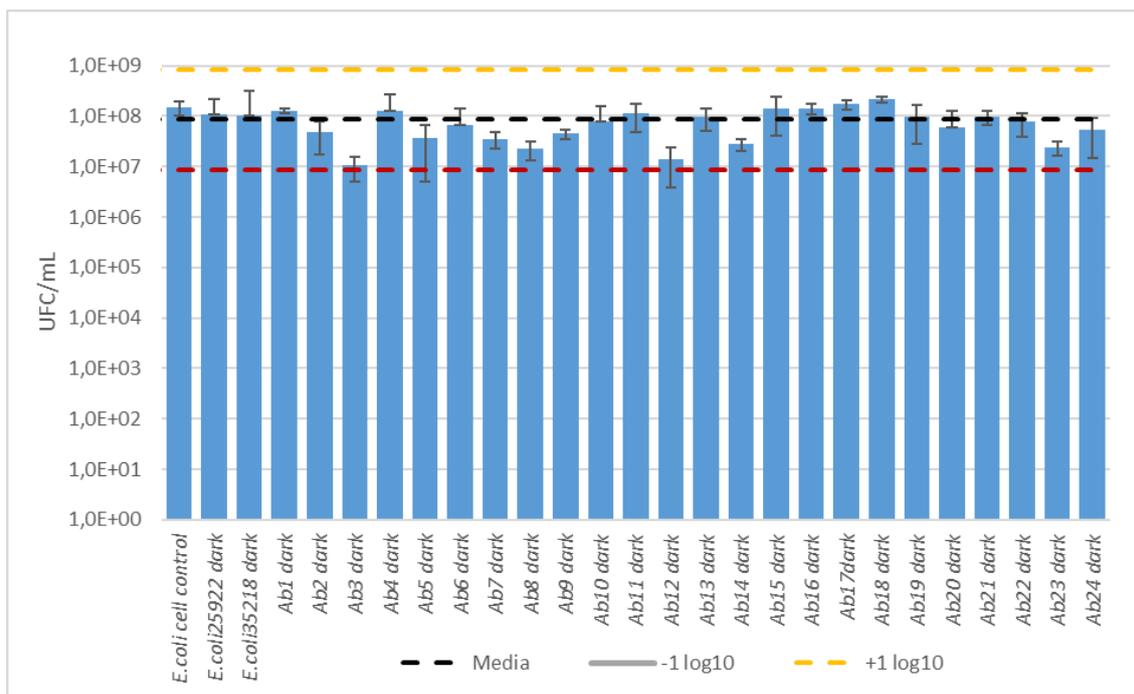
##### **3.1.1. Terapia fotodinámica antimicrobiana:**

Los primeros experimentos fueron para ver si el fotosensibilizador azul de metileno, a una concentración de 10 µg/mL (31 µM) generaba toxicidad celular al estar expuesto al compuesto en oscuridad completa durante 37.5 minutos (el mismo tiempo que se utilizó posteriormente para irradiar las muestras para la aTFD).

Un compendio de los recuentos de UFC/mL obtenidos después de la exposición al fotosensibilizador en oscuridad, se puede ver en la figura 43.

En la gráfica, para mayor facilidad de interpretación, se ha indicado el valor medio de UFC/mL que se observó y un logaritmo por encima y por debajo de esta media; estos nos permiten ver los márgenes de variabilidad experimental esperable en la técnica.

Se estudiaron todas las cepas clínicas (Ab 1 a Ab 24) y las dos cepas de referencia (*E. coli* ATCC 35218 y *E. coli* ATCC 25922).



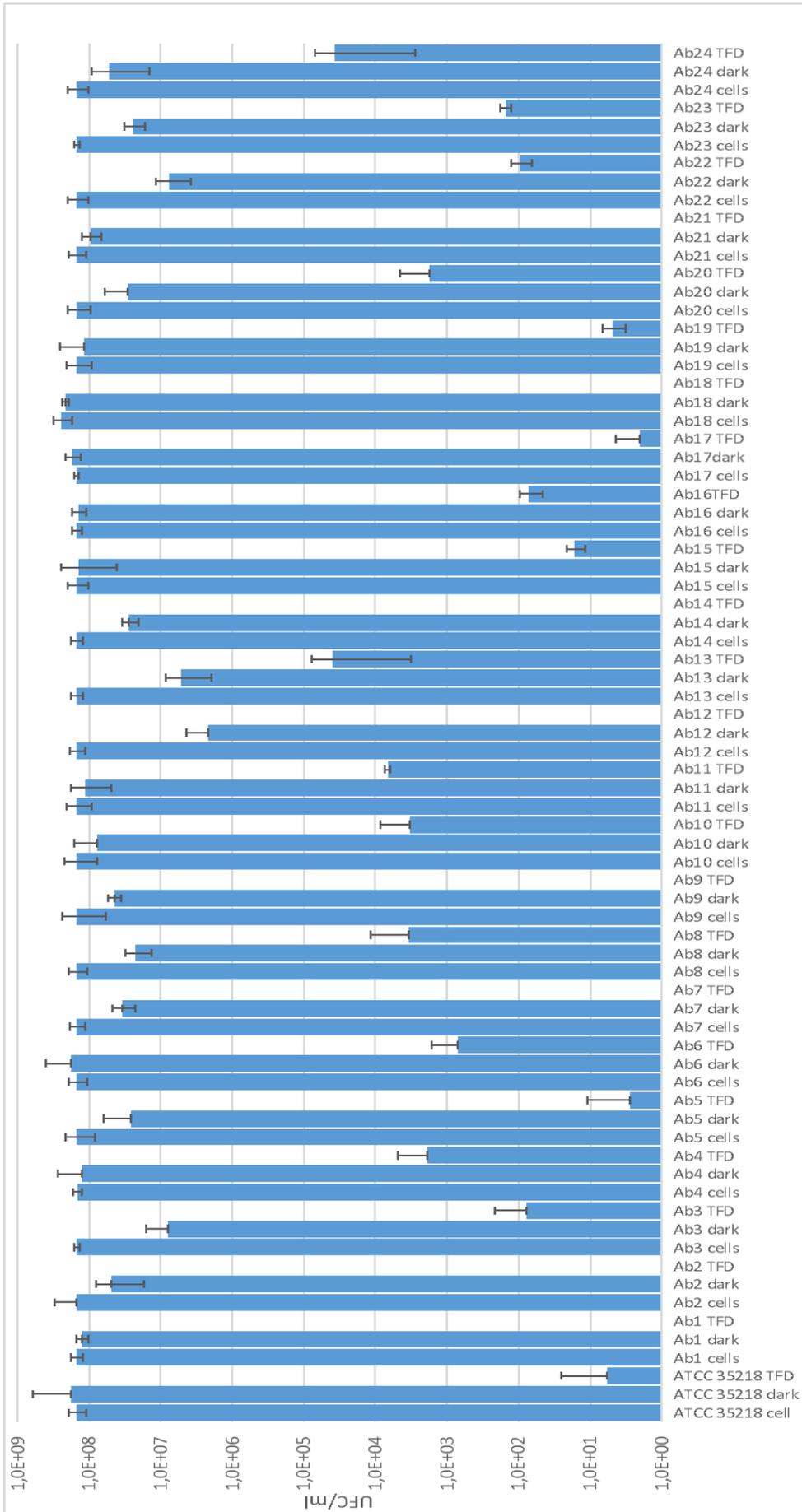
**Figura 43: Toxicidad causada a las diferentes cepas de *E. coli* por la exposición a 31  $\mu$ M (10  $\mu$ g/mL) de azul de metileno durante 37.5 minutos en oscuridad. Se indican el valor promedio de UFC/mL y los límites  $\pm 1 \log_{10}$  a partir del mismo. Se ha incluyó una *E. coli* de referencia sin exposición al MB (*cell control*).**

A pesar de que sí se pudo ver algún ligero efecto tóxico del MB (sobre las cepas Ab 3 o Ab 12, por ejemplo), en ningún caso superó el valor de una unidad logarítmica decimal, que es, según la experiencia previa, la variabilidad que se considera aceptable en los estudios de aTFD ya que es consecuencia inevitable de la aplicación del método y no se puede considerar una reducción significativa.

La confirmación estadística se puede ver en la tabla 8 (ver estudio estadístico en la sección de análisis estadístico planctónico más adelante).

Una vez se comprobó que la dosis de fotosensibilizador a utilizar en el estudio (31  $\mu$ M) no genera toxicidad a oscuras que pueda enmascarar el posible efecto fotoinactivador de la aTFD, se procedió a la aplicación de la metodología planificada sobre las cepas.

Las inactivaciones se hicieron siguiendo el protocolo previsto, con una irradiación de 18 J/cm<sup>2</sup> con luz roja. En la figura 44, están reflejados los recuentos de las placas sembradas después del tratamiento fotoinactivador, expresadas en UFC/mL. Junto con las lecturas de las muestras irradiadas, se incluyen la de los controles celulares (células que no se expusieron al contacto con el fotosensibilizador) y de oscuridad (con azul de metileno, pero incubados 37.5 minutos en oscuridad).



**Figura 44: Fotoinactivaciones de los aislados clínicos (Ab1 a Ab24) y de la *Escherichia coli* de referencia ATCC35218. El tratamiento se efectuó con una concentración de azul de metileno de 10 µg/ml (31µM) de irradiación con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja. Como referencia, se incluye los recuentos de los controles: "cell" (sin fotosensibilizador) y "dark" (con MB, pero sin irradiar).**

En esta gráfica se puede apreciar las grandes diferencias que se revelaron en el recuento de UFC/mL, de los experimentos dejados en oscuridad y los irradiados; las disminuciones de viabilidad llegaron incluso a la total inhibición del crecimiento de algunas cepas (Ab 1, Ab 2, Ab 7, Ab 9, Ab 12, Ab 14, Ab 18 y Ab 21).

La cantidad de datos representados en la gráfica figura 44 hace difícil su interpretación. Para simplificarlo, se creyó conveniente ofrecer también los datos expresados como la relación del número de células crecidas respecto el número de células de partida, consideradas estas como las UFC/mL del control Dark de toxicidad de azul de metileno sin irradiación.

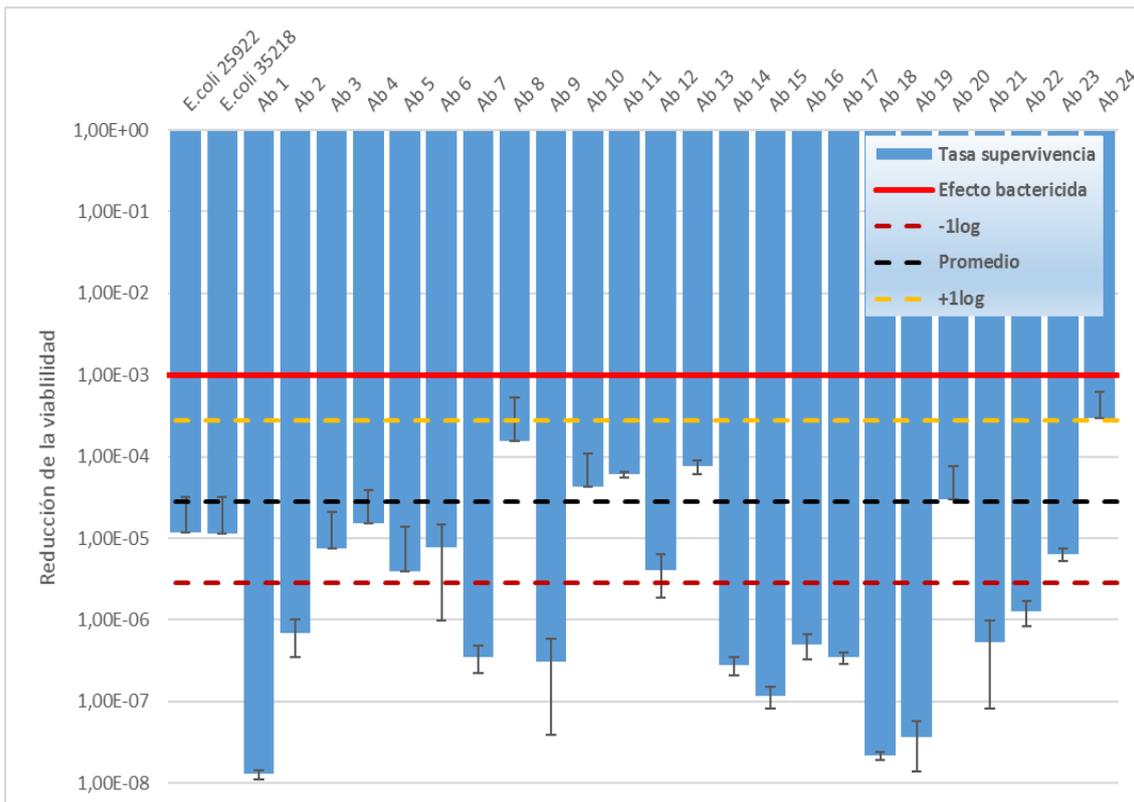
Esta representación permite ver la reducción de viabilidad atribuible únicamente al efecto fotodinámico. (Fórmula 9)

**Fórmula 9: Tasa de supervivencia.**

$$Tasa\ de\ supervivencia = \frac{Muestra\ irradiada \frac{UFC}{ml}}{Muestra\ "Dark" \frac{UFC}{ml}}$$

El resultado de esta transformación se puede ver en la figura 45; se ha añadido marcas del promedio de reducción encontrada, con  $\pm 1$  unidad logarítmica decimal y se ha marcado el límite del efecto bactericida (una reducción del 99.9% en la viabilidad).

El efecto bactericida aumenta conforme las columnas son más largas (el límite de la columna llega más abajo). Además de las cepas clínicas (Ab 1 a Ab 24), se han incluido las dos cepas de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y ATCC 35218.



**Figura 45: Reducción de la viabilidad debida a la aTFD de las muestras irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup>, respecto a las mismas muestras no irradiadas, ambas con 31µM de azul de metileno. Se indican el valor promedio de reducción, los límites  $\pm 1 \log_{10}$  a partir del mismo y el límite del efecto bactericida. Cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922 y ATCC 35218 fueron incluidas, así como las muestras clínicas multiresistentes (Ab 1 a Ab 24).**

De estos datos se han constatado que, independientemente de la cepa y sus patrones de resistencias a antibióticos diferentes, la aTFD se mostró como muy efectiva, eliminando altas concentraciones de densidad celular de las cepas clínicas.

En nuestros experimentos, se obtuvieron reducciones de la viabilidad celular que oscilaron de  $10^3$  a  $10^8$  veces, comparadas con las concentraciones bacterianas obtenidas en los ensayos “dark” con fotosensibilizador, pero sin irradiar.

Como promedio, la terapia fotodinámica antimicrobiana con 10 µg/mL de azul de metileno como fotosensibilizador fue capaz de eliminar  $5 \cdot 10^5$  UFC/mL de células, con poco más de media hora de exposición a la luz roja, inocua por si sola.

Incluso en las cepas menos sensibles (Ab 24, Ab 8) se eliminaron más de  $10^3$  UFC/mL, siendo este el límite que marca la definición de efecto bactericida (99.9% de reducción de viabilidad).

Estos resultados obtenidos responden al objetivo del estudio, ya que demostraron que se podían eliminar contaminaciones bacterianas de alta densidad con concentraciones mínimas del fotosensibilizador (a la concentración de trabajo, la dilución de azul de metileno no tiene color apreciable) y una irradiación corta con una luz inocua, por lo que sería un tratamiento desinfectante aplicable tanto a superficies, materiales, herramientas, como para posibles tratamientos médicos.

### 3.1.2. Estudio estadístico: (cultivos planctónicos).

Para comprobar la significancia estadística de los resultados se hicieron análisis de los resultados, asumiendo normalidad en la distribución de los datos (Schastak, et al., 2010):

Se compararon las UFC/mL de las muestras sin irradiar “dark”, para comprobar si existía efectos tóxicos sin irradiación (previamente, figura 43). Para ello, se hizo un análisis de la varianza (ANOVA). El resultado está representado en la tabla 8.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	crítico para F
Entre grupos	6,90E+17	24	2,88E+16	0,52	0,97	1,60
Dentro de los grupos	6,96E+18	127	5,48E+16		↑↑↑	
Es $>\alpha=0,05$ , por lo que no hay diferencias significativas.						
Total	7,65E+18	151				

Tabla 8: Resumen del test de análisis de la varianza de las UFC/mL medidas entre todas las cepas (clínicas y de referencia) de *Escherichia coli* sin exposición a la luz (Dark).

Se compararon las UFC/mL de las muestras irradiadas con las mismas sin irradiar “dark”.

Para ello, se comprobaron con una F de Fisher que existían diferencias entre sus desviaciones (tabla 9) y se buscaron diferencias con el test t de Student y una  $\alpha=0.05$  (tabla 10).

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	Ab 24 dark	Ab 24
Media	1	2,95E-04
Varianza	0,52	1,09E-07
Observaciones	9	9
Grados de libertad	8	8
F	4789336,64	
P(F<=f) una cola	6,65E-26	
Valor crítico p	3,44	
$\alpha=$	Ho	No hay diferencia en las varianzas
0,05	H1	Hay diferencia en la varianza
	<b>NO</b>	Son iguales

Tabla 9: Ejemplo de test F de Fisher realizado para cada muestra. En la tabla se presenta la comparación de varianzas de Ab 24 irradiada o sin irradiar

En todos los casos se hallaron diferencias estadísticas en las varianzas de las muestras, razón por la cual se eligió la variante del test t-Student con varianzas diferentes.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales			
	Ab 24 dark	Ab 24	
Media	1	2,95E-04	
Varianza	0,52	1,0938E-07	
Observaciones	9	9	
Diferencia hip	0		
Grados de libe	8		
Estadístico t	4,14		
P(T<=t) una co	1,62E-03		
Valor crítico d	1,86		
P(T<=t) dos co	3,24E-03		
Valor crítico d	2,31		
$\alpha=$	Ho	No hay diferencia en la respuesta	
0,05	H1	Hay diferencia en la respuesta	
	<b>NO</b>	Son iguales	

Tabla 10: Ejemplo de test t de Student realizado para cada muestra. En la tabla comparación de Ab 24 irradiada o sin irradiar (dark).

En todas las muestras, el valor de  $P < \alpha$ , hizo rechazar la hipótesis nula y nos permitió concluir que los recuentos obtenidos en las muestras sin irradiación eran significativamente diferentes de las mismas muestras con exposición a la luz roja.

Esto reforzó la conclusión a la que se había llegado en las gráficas anteriores (figuras 43 y 44) donde se apreciaba el efecto bactericida, con una diferencia de más de  $10^3$  veces en número de UFC/mL calculadas entre las muestras irradiadas y las sin irradiar.

Para ver si existía diferencias significativas a la respuesta al tratamiento en las diferentes cepas, se hicieron test ANOVA de los resultados de las diferentes cepas, empleando para ello los resultados obtenidos a partir de las muestras irradiadas.

Para esto se tomaron los valores de viabilidad (figura 44) y se hizo el test con estos datos (tabla 11).

ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	2,70E+13	25	1,08E+12	47,11	1,42E-51	1,59	
Dentro de los	2,84E+12	124	2,29E+10				
Total	2,98E+13	149					
$\alpha=$	Ho	No hay diferencia en la respuesta					
0,05	H1	Hay diferencia en la respuesta					
	<b>NO</b>	<b>Son iguales</b>					

Tabla 11: Resumen del test de análisis de la varianza de las reducciones de viabilidad medidas entre todas las cepas (clínicas y de referencia) de *Escherichia coli*.

El test indicó que sí existían diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad de las diferentes cepas sometidas a los experimentos.

Este resultado, es coherente con lo ya descrito en otras especies, que también han mostrado diferencias en la sensibilidad al tratamiento fotodinámico (Grinhol, et al., 2008).

Esta conclusión no desmerece, en absoluto, la capacidad antimicrobiana de la aTFD con azul de metileno sobre cultivos de *Escherichia coli* creciendo en planctónico, ya que en todos los casos se pudo confirmar un efecto bactericida.

Las causas de esta diferente sensibilidad pueden ser diversas: se ha postulado que pueden ser debidas a diferencias de la estructura de la pared bacteriana o posible presencia de otros mecanismos que eviten la acumulación del fotosensibilizador, como la presencia de bombas de eflujo que expulsen el azul de metileno fuera de las células, minimizando así su efectividad. (Vera, et al., 2012) (Tegos, et al., 2008),

### **3.2. Estudio de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre cultivo en biopelícula:**

#### **3.2.1. Terapia fotodinámica antimicrobiana**

Es conocida la asociación del crecimiento en biopelículas con la colonización del huésped por parte de las bacterias patógenas, así como del incremento a la resistencia a los tratamientos de los microorganismos creciendo en biopelículas. (Zobell & Allen, 1935).

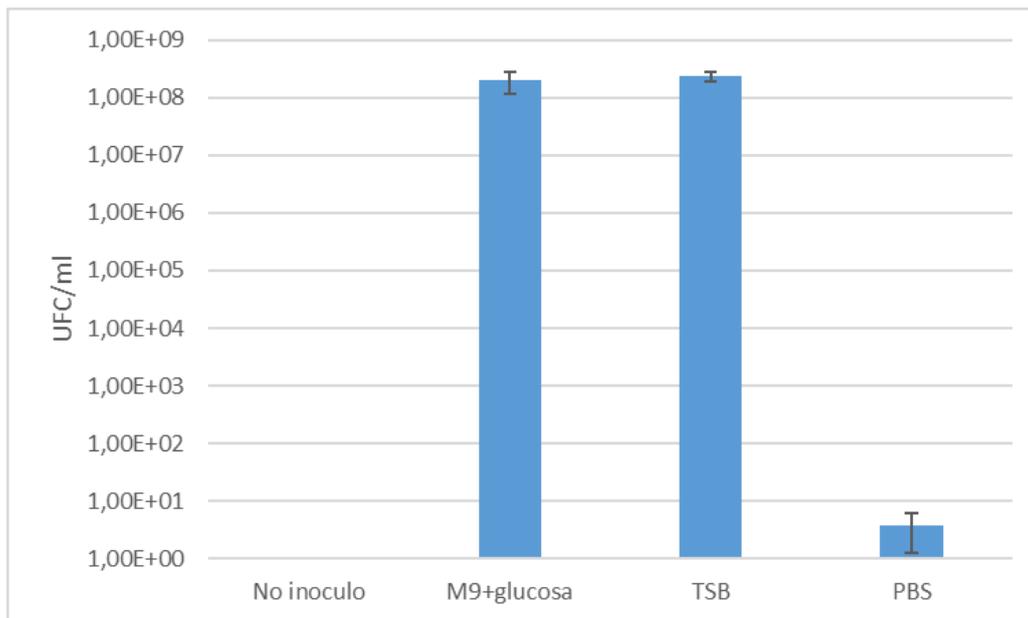
Por eso, se consideró importante revisar el efecto que la terapia fotodinámica antimicrobiana tiene sobre células crecidas en biopelícula, en aras de un posible uso como bactericida.

Previamente, se comprobó que las cepas clínicas eran capaces de generar biopelículas, como se ha descrito previamente en la sección de “Formación de biopelícula por parte de las *Escherichia coli* uropatógenicas” (figura 27); donde se pudo medir la producción de biopelícula por parte de todas las cepas.

Para mantener cierta homogeneidad y poder comparar mejor con los estudios previos, se utilizó una modificación del protocolo de obtención de biopelículas, utilizando TSB en lugar de medio salino mínimo M9 (el protocolo modificado se puede leer en detalle en la sección de material y métodos).

Para eliminar las células planctónicas del cultivo, se hicieron lavados con solución salina hasta que no se detectó turbidez y fue el remanente sin resuspender el que fue tratado, con la mínima perturbación mecánica posible a la biopelícula.

Para comprobar que el protocolo modificado no alteraba los resultados del estudio, se midieron las viabilidades de *E. coli* ATCC 25922 obtenidas a partir de aplicar las dos metodologías: crecimiento ON con Medio salino mínimo M9 como en el protocolo original y con TSB; además se añadió un control con PBS como medio y uno sin células con Medio salino mínimo M9 como referencias. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 46.

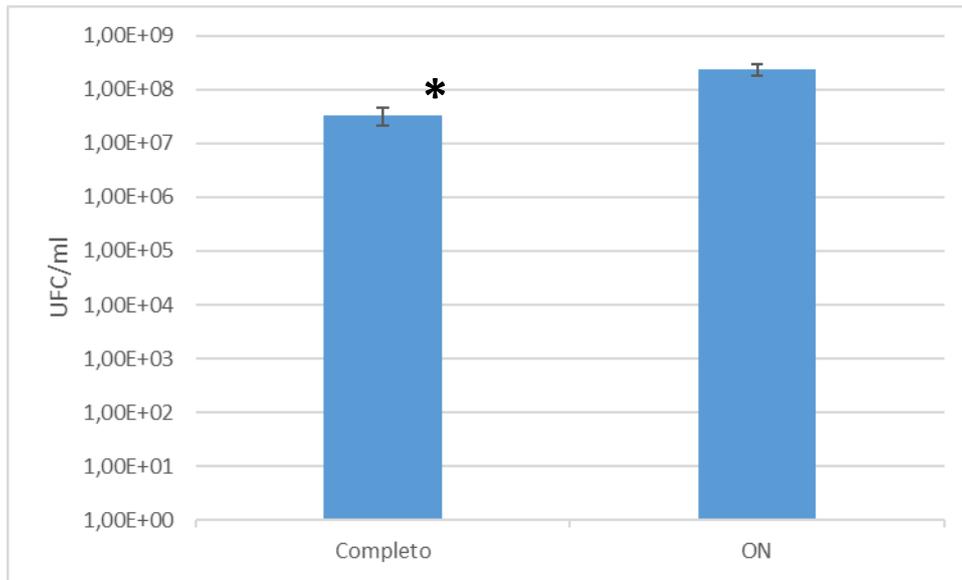


**Figura 46:** Recuento de UFC/mL después de un cultivo ON de 130  $\mu$ l de medio (M9+Glucosa, TSB o PBS) con un inóculo de 2  $\mu$ l de la cepa de referencia *Escherichia coli* 25922. Se ha incluido un control con 132  $\mu$ l de medio M9+glucosa sin inocular.

El recuento celular que se obtuvo del biopelícula crecido con medio salino mínimo M9 o con TSB no presentó diferencias significativas en viabilidad. Una vez comprobada la bondad del método modificado, se adoptó el medio TSB para la formación de biopelículas, por la mayor experiencia en el laboratorio con su uso y para aproximarnos, en lo posible, al estudio de las fotoinactivaciones en estado planctónico.

La metodología en sí, implicaba varios lavados, por lo que era posible que hubiera una pérdida de células en los recuentos. Para descartarlo, se compararon cultivos de la cepa de referencia *E. coli* ATCC25922 justo después de descartar las bacterias planctónicas y después del tratamiento completo, añadiendo PBS en lugar del fotosensibilizador.

Los resultados del estudio de células viables se pueden comparar a partir de los datos mostrados en la figura 47.



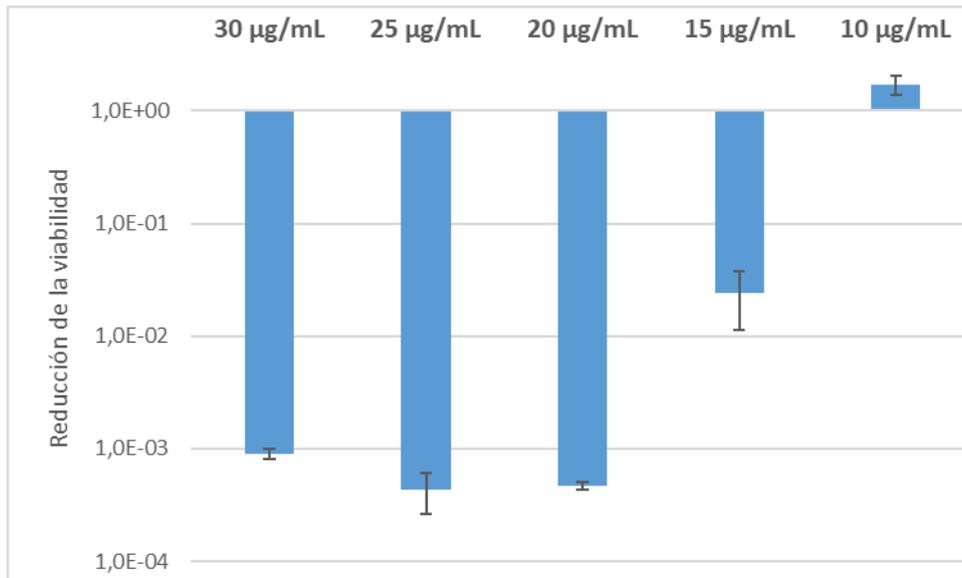
**Figura 47: Recuento de UFC/mL de *E. coli* ATCC25922, después de los lavados para eliminar las células planctónicas (ON) y después de la metodología completa con las incubaciones, irradiación y resuspensión de la biopelícula (Completo).**

Como se puede observar, sí se presentó una reducción de las células viables en el recuento después de la técnica de algo más del 90% ( $1 \log_{10}$ ). El análisis estadístico confirmó la significancia de estas diferencias (ver tabla 13 en la sección de análisis estadístico en biopelícula más adelante).

Para compensar esta reducción, las lecturas de los experimentos con biopelículas se expresarán en la tesis como una relación entre las células irradiadas con las no irradiadas 'Dark', que han sufrido el mismo proceso en oscuridad.

Para determinar que concentración de azul de metileno utilizar para las fotoinactivaciones, se realizaron experimentos con la cepa de referencia y diferentes concentraciones crecientes de fotosensibilizador, partiendo de los  $10 \mu\text{g/mL}$  ( $31 \mu\text{M}$ ) que se utilizaron en los estudios con cepas multiresistentes en cultivo planctónico.

La reducción de viabilidad celular se puede ver en la figura 48, expresada como la relación entre las UFC/mL calculadas del experimento irradiado respecto a la concentración del experimento incubado el mismo tiempo, pero sin irradiar.



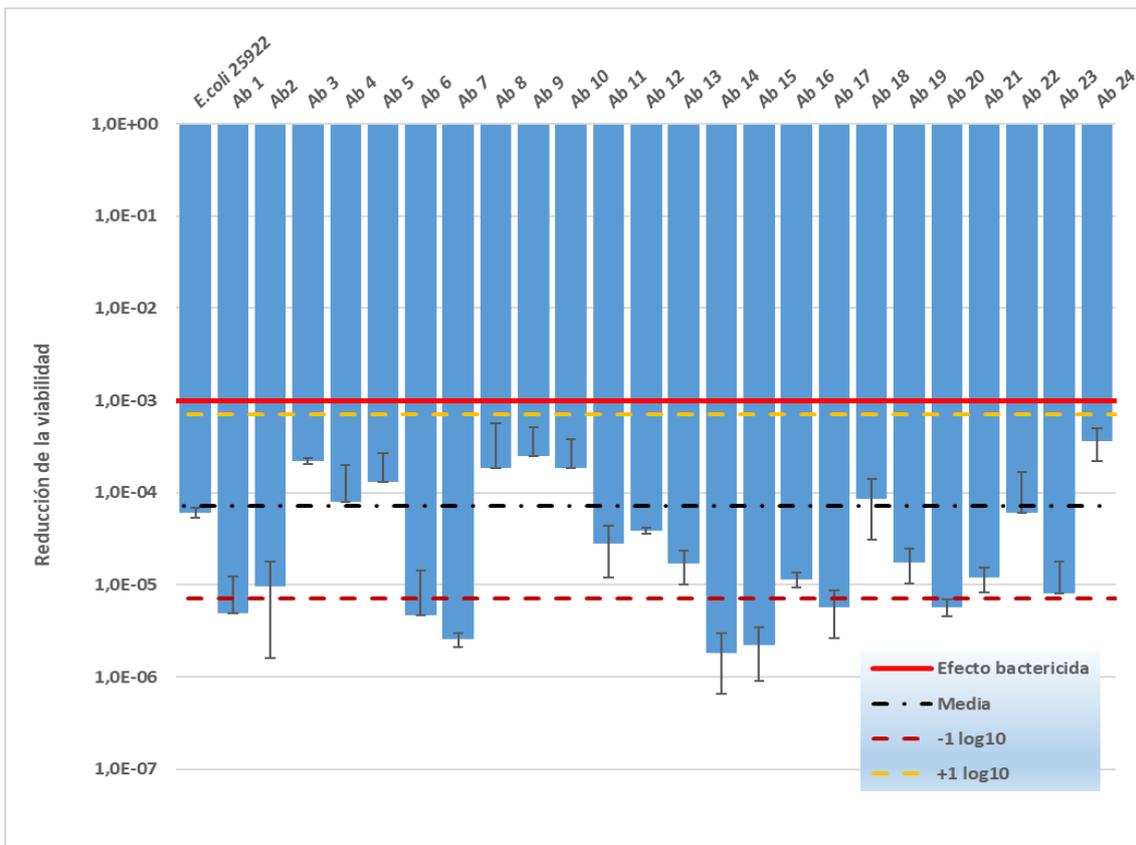
**Figura 48: Reducción de la viabilidad de la cepa de referencia *E. coli* ATCC25922 creciendo en biopelícula, debida a la aTFD de las muestras irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup>, con concentraciones de azul de metileno de 93, 77.5, 62, 46.5 y 31 µM. Expresado respecto a las mismas muestras no irradiadas.**

Este experimento indicó que la concentración que se usaba para la fotoinactivación de bacterias en crecimiento planctónico era ineficaz para la inhibición del crecimiento de las células en biopelícula, lo que confirmaba la mayor resiliencia de cultivos creciendo en biopelículas con respecto a los cultivos en suspensión.

También se observó un efecto menor en concentraciones altas (por encima de los 25 µg/mL de azul de metileno) de fotosensibilizador; esto sería debido a una aparición de la toxicidad sin irradiación del mismo y, probablemente, de un efecto de la misma biopelícula, que limitaría la acumulación de forma efectiva de altas concentraciones del producto hacia las células, efecto que ya ha sido citado sobre otros antimicrobianos (Redfield, 2002).

Teniendo en cuenta estos resultados, se optó por la concentración alta, con el mayor efecto detectado correspondiente a 25 µg/mL (77.5 µM). La figura 49, muestra la reducción de viabilidad obtenida, aplicando la terapia fotodinámica durante 37 minutos y medio de irradiación (18 J/cm<sup>2</sup>) con luz roja sobre cepas de origen clínico (Ab1 a Ab24) y de referencia (ATCC25922) en biopelícula.

Se ha añadido a la gráfica las marcas del promedio de reducción encontrada, con  $\pm 1$  unidad logarítmica decimal y se ha marcado el límite del efecto bactericida (una reducción del 99.9% en la viabilidad). Cuando el límite inferior de las llega barras más abajo, implica una mayor mortalidad.



**Figura 49: Reducción de la viabilidad debida a la aTFD de las muestras irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup>, respecto a las mismas muestras no irradiadas, ambas con 77.5 μM de azul de metileno. Se indican el valor promedio de reducción, los límites ±1 log<sub>10</sub> a partir del mismo y el límite del efecto bactericida. Cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922 incluida, así como cepas clínicas multiresistentes (Ab 1 - Ab 24).**

El promedio de inactivación está en una reducción de la viabilidad de 10<sup>4</sup> veces respecto a los experimentos no irradiados, con reducciones que van de las 1.5·10<sup>3</sup> veces (Ab 3, Ab 8, Ab 9, Ab 24), hasta reducciones de 1.5·10<sup>5</sup> veces (Ab 14, Ab 15).

Por ello, al analizar los resultados, se puede afirmar que la aTFD fue efectiva, eliminando en todos los casos más del 99.9% de las bacterias presentes en el cultivo, siendo éste el requerimiento para considerarse un tratamiento bactericida.

En todos los experimentos, la presencia de la biopelícula, causa una menor homogeneidad de los experimentos, por lo que hay desviaciones relativamente grandes, pero que no ponen en duda la efectividad del tratamiento. Para confirmarlo, se recurrió al análisis estadístico de los resultados.

### 3.2.2. Estudio estadístico: (cultivos en biopelícula).

Para comprobar los resultados se hicieron análisis estadísticos; en ellos se asumió una distribución de normalidad (Schastak, et al., 2010):

Se comprobó si existían diferencias en la concentración celular justo después de descartar las bacterias planctónicas y después del tratamiento completo, añadiendo PBS en lugar del fotosensibilizador. Para ello se comprobaron con una F de Fisher que existían diferencias entre sus desviaciones (tabla 12) y se buscaron diferencias con el test t de Student y una  $\alpha=0.05$  (tabla 13).

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	Completo	ON
Media	4,40E+07	2,50E+08
Varianza	1,13E+15	1,10E+16
Observaciones	5	6
Grados de libertad	4	5
F	0,1	
P(F<=f) una cola	0,02	$<\alpha=0,05 \downarrow$
Valor crítico p	0,16	Varianzas diferentes

Tabla 12: Test F de Fisher realizado para los cultivos recuperados de la biopelícula, antes (ON) y después de la aplicación del protocolo (Completo).

Se hallaron diferencias estadísticas en las varianzas de las muestras, razón por la cual se eligió la variante del test t-Student con varianzas diferentes.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Completo	ON
Media	4,40+07	2,50+08
Varianza	1,13E+15	1,10E+16
Observaciones	5	9
Diferencia hip	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	-4,54	
P(T<=t) una cola	2,00E-03	
Valor crítico d	1,94	
P(T<=t) dos colas	4,00E-03	$<\alpha=0,05 \downarrow$
Valor crítico d	2,45	Diferencias significativas

Tabla 13: Test t de Student para los cultivos recuperados de la biopelícula, antes (ON) y después de la aplicación del protocolo (Completo).

El valor de  $P < \alpha$  hizo rechazar la hipótesis nula y permitió concluir que los recuentos obtenidos en las muestras sin haber sido sometido al tratamiento eran significativamente diferentes de las mismas muestras después de haber soportado el tratamiento, con PBS en lugar de azul de metileno. Para compensar esta pérdida, se decidió expresar los resultados como una relación entre las células irradiadas con las no irradiadas 'Dark', que han sufrido el mismo proceso en oscuridad.

Se compararon las UFC/mL de las muestras irradiadas con las mismas sin irradiar. Para ello se comprobaron con una F de Fisher que existían diferencias entre sus desviaciones (tabla 14) y se buscaron diferencias con el test t de Student y una  $\alpha = 0.05$  (tabla 15).

$\alpha =$	Ho	Són iguals
0,05	H1	No són iguals
↓	<b>NO</b>	Són iguals
Prueba F para varianzas de dos muestras		
	<i>Ab24 Irradiado</i>	<i>Ab24 Dark</i>
Media	1,25E+08	4,48E+04
Varianza	3,04E+16	5,24E+09
Observaciones	9	9
Grados de libertad	8	8
F	5,80E+06	
P(F<=f) una cola	3,09E-26	
Valor crítico para F (una cola)	3,44	

Tabla 14: Ejemplo de test F de Fisher realizado para cada muestra. En la tabla comparación de varianzas de Ab 24 irradiada o sin irradiar (dark)

En todos los casos se hallaron diferencias estadísticas en las varianzas de las muestras, razón por la cual se eligió la variante del test t-Student con varianzas diferentes.

$\alpha =$	Ho	Són iguals
0,05	H1	No són iguals
↓	<b>NO</b>	Són iguals
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desigual		
	<i>Ab24 Irradiado</i>	<i>Ab24 Dark</i>
Media	1,25E+08	4,48E+04
Varianza	3,04E+16	5,24E+09
Observaciones	9	9
Diferencia hipotética de las m	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	2,14	
P(T<=t) una cola	0,03	
Valor crítico de t (una cola)	1,86	
P(T<=t) dos colas	0,04	
Valor crítico de t (dos colas)	2,31	

Tabla 15: Ejemplo de test t de Student realizado para cada muestra. En la tabla comparación de Ab 24 irradiada o sin irradiar (dark).

En todas las muestras, el valor de  $P < \alpha$  hizo rechazar la hipótesis nula y permitió concluir que los recuentos obtenidos en las muestras sin irradiación eran significativamente diferentes de las mismas muestras con exposición a la luz roja.

Esto refuerza la conclusión a la que se había llegado en las gráficas anteriores (figura 49) donde se apreciaba el efecto bactericida, con una diferencia de más de  $10^3$  veces en número de UFC/mL calculadas en muestras irradiadas y sin irradiar.

Para ver si existía diferencias significativas a la respuesta al tratamiento en las diferentes cepas, se hicieron test ANOVA de los resultados de las diferentes cepas, empleando para ello los resultados obtenidos a partir de las muestras irradiadas.

Para esto se tomaron los valores de viabilidad representados en la figura 49 y se hizo el test con estos datos, cuyos resultados se ven en la tabla 16.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,12	24	4,85E-03	5,11	9,79E-11	1,59
Dentro de los	0,15	161	9,51E-04			
Total	0,27	185				
$\alpha =$	Ho	No hay diferencia en la respuesta				
0,05	H1	Hay diferencia en la respuesta				
	<b>NO</b>	<b>Són iguales</b>				

Tabla 16: Resumen del test de análisis de la varianza de las reducciones de viabilidad medidas entre todas las cepas (clínicas y de referencia ATCC 25922) de *Escherichia coli*.

El test indicó que sí existían diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad de las diferentes cepas crecidas en biopelículas, sometidas a los experimentos.

Este resultado, es coherente con lo ya descrito en otras especies, que también han mostrado diferencias en la sensibilidad al tratamiento fotodinámico (Grinhole, et al., 2008).

Esta conclusión, al igual que para los estudios realizados sobre las células en estado planctónico, no desmerece, en absoluto, la capacidad antimicrobiana de la aTFD con azul de metileno sobre cultivos de *Escherichia coli* creciendo en biopelículas, ya que en todos los casos se alcanzaron efectos bactericidas.

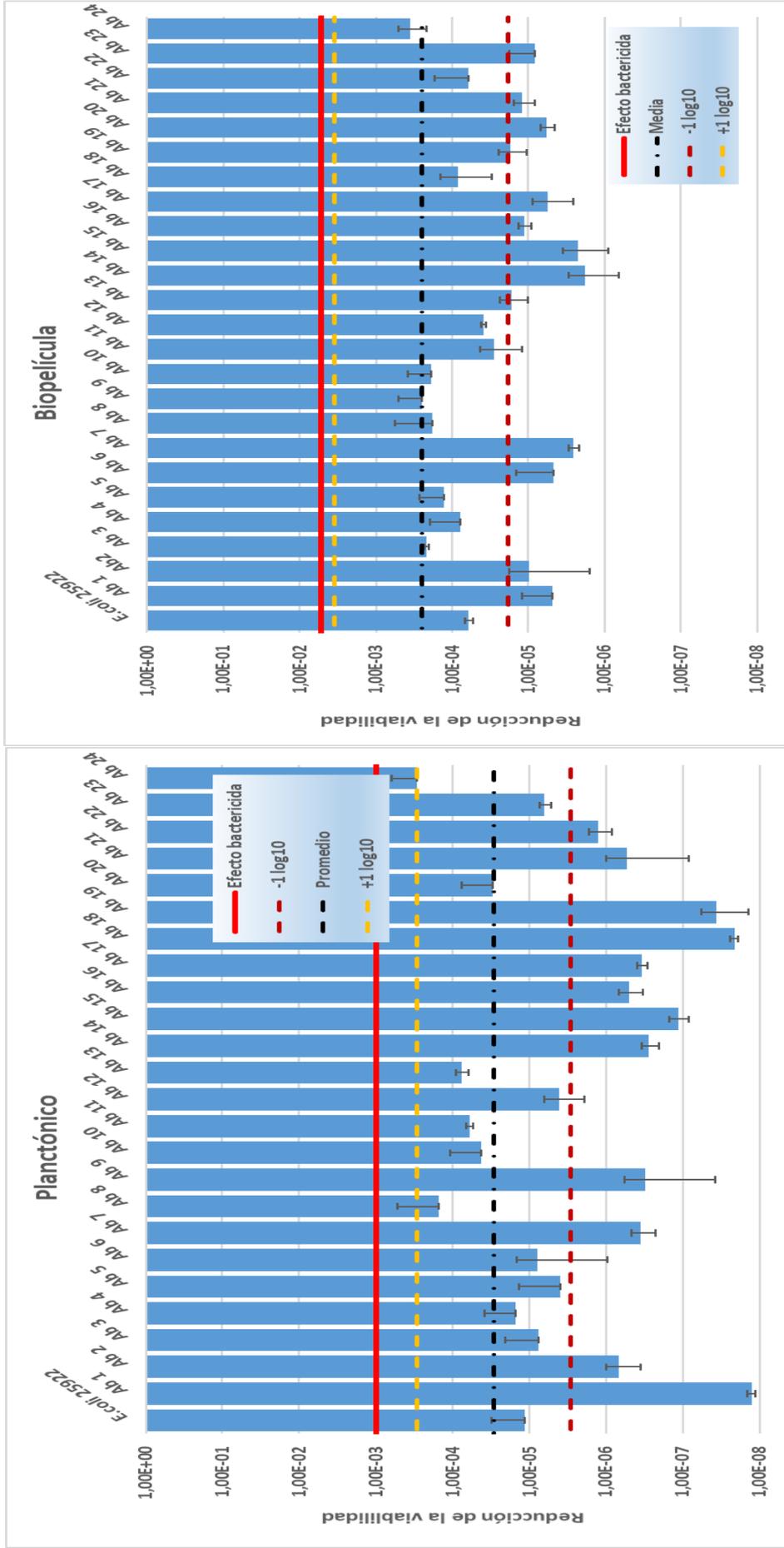
Las causas de esta diferente sensibilidad pueden ser diversas: además de las ya comentadas en cultivos planctónicos como diferencias de pared y/o posible presencia de mecanismos que evitan la acumulación del fotosensibilizador (Redfield, 2002).

En este estudio, hay que tener en cuenta la variabilidad en la composición y organización de la matriz de biopelícula, que puede cambiar la distribución del fotosensibilizador, de los diferentes fenotipos de las células, etc., variando así la respuesta al tratamiento. Efectos similares en otros antimicrobianos han sido descritos previamente (Ghannoum, et al., 2016).

### **3.3. Comparativa de los efectos de la terapia fotodinámica antimicrobiana en cultivos en planctónico y en biopelícula:**

Para estudiar si la variabilidad en la sensibilidad se debe primariamente a la sensibilidad específica de la célula o influye más las diferencias en la formación de biopelículas, se compararon los efectos de los dos tratamientos (figura 50) sobre las células *Escherichia coli* multiresistentes (Ab1 a Ab24) y de referencia ATCC 25922.

Los protocolos y la dosis de fotosensibilizador son diferentes en cada caso, según lo explicado anteriormente, mientras que la dosis de luz es la misma en ambos casos: 18 J/cm<sup>2</sup> (37.5 minutos).



**Figura 50:** Reducción de la viabilidad debida a la aTFD de las muestras irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup>, respecto a las mismas muestras no irradiadas. Se indican el valor promedio de reducción, los límites  $\pm 1 \log_{10}$  a partir del mismo y el límite del efecto bactericida. Cepa de referencia ATCC 25922 incluida y muestras clínicas multiresistentes (Ab 1-Ab 24). La gráfica de la izquierda pertenece al estudio hecho con cultivos planctónicos y el derecho pertenece al estudio de cultivos en biopelícula.

Al comparar las dos gráficas, es posible resaltar algunas similitudes:

- Hay cepas que parecen ser especialmente sensibles, perdiendo un factor decimal de viabilidad más que la media de las cepas tanto creciendo en planctónico, como en biopelícula: Ab 1, Ab 7, Ab 14, Ab 15 y Ab 17.
- Igualmente, hay cepas que muestran menos sensibilidad al tratamiento tanto en planctónico, como en biopelícula: Ab 8 y Ab 24.
- En contraste, hay cepas que presentan comportamientos diferentes e incluso contradictorios, como en el caso de Ab 9, que es muy sensible el planctónico, pero de las cepas menos sensibles en biopelícula.

De esta comparación, se pueden apuntar ciertas deducciones:

Existen cepas con diferentes sensibilidades dentro de una misma especie, esto se da tanto en planctónico como en biopelícula, por lo que la razón de esta variabilidad ha de estar en las diferencias fenotípicas de las diferentes cepas.

Por la bibliografía previa consultada (Adamson & Gast, 1997) (Wagner, et al., 1998), es conocido que pequeñas variaciones en la pared celular pueden generar grandes diferencias de afinidad al fotosensibilizador, factor que es clave para un pleno efecto de la fotoinactivación (Hamblin, et al., 2002).

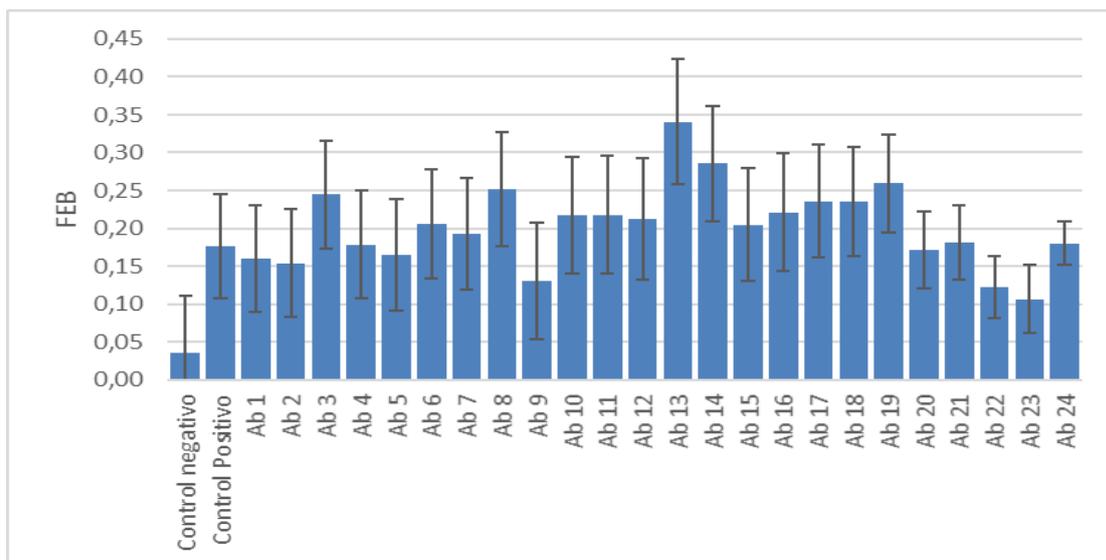
Asimismo, es conocido que dentro de una misma especie parte de los mecanismos de resistencia a antibióticos implican cambios en la pared (Embleton, et al., 2002) y variaciones en las bombas de eflujo (Tegos, et al., 2008), pudiendo ser estos cambios los responsables de estas diversas sensibilidades a la aTFD. (Fernández & Hancock, 2012)

Paralelamente, las diferencias de supervivencia de algunas cepas según si el crecimiento en biopelícula o planctónico, hace pensar en que hay cepas en las que la matriz extracelular es de una gran relevancia, superior incluso a la influencia que la estructura de la bacteria ejerce sobre la respuesta a la aTFD.

Ha sido descrito la existencia de canales acuosos en el biopelícula que permite un flujo rápido de las moléculas con el medio (Costerton, et al., 1994), además las bacterias maduras en biopelícula modifican su patrón de expresión (Prigent-Combaret & Lejeune, 1999), cambiando su fenotipo (Wilson & Devine, 2003) y especializándose para la vida en comunidad (Davies, et al., 1993), ralentizando su tasa de crecimiento (Costerton, et al., 1999) y activando mecanismos activos de resistencia, como bombas de eflujo (Brooun, et al., 2000) o síntesis de partículas protectoras (Giwerzman, et al., 1991).

Estos resultados se correlacionarían con el comportamiento de otros antimicrobianos y sus efectos sobre bacterias creciendo en biopelícula (Costerton, et al., 1987) (Lewis, 2001) (Ghannoum, et al., 2016).

En relación, la cantidad de células que proliferan en la biopelícula (ver figura 27), no parece tener una correspondencia clara con una disminución de la sensibilidad (ver Ab 9 como ejemplo claro de este comportamiento).



**Figura 27: Relación de formación específica de biopelículas. Control negativo: *E. coli* ATCC 25922 incubada ON en PBS. Control Positivo: *E. coli* ATCC 25922 incubada ON en medio de cultivo M9 con glucosa. Ab 1 a 24 incubados en medio de cultivo M9 con glucosa.**

Esto parece ser un indicio de que no es tan importante la cantidad de biopelícula, como la composición y estructuración de la misma; también es posible que haya interacciones de entre la biopelícula y las células, que se diferenciarán fenotípicamente dentro de la biopelícula, afectando a la sensibilidad bacteriana.

Como en estudios previos, para buscar la significancia de estos resultados, se hizo un análisis de varianza ANOVA comparando el tipo de crecimiento (planctónico o en biopelícula) y las diferentes cepas analizadas. El resultado de este análisis se puede ver en la tabla 17.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tipo de crecimiento	1,10E+12	1	1,10E+12	48,45	2,96E-11	3,88
Cepas	2,64E+13	24	1,10E+12	48,45	5,54E-80	1,56
Interacción	2,64E+13	24	1,10E+12	48,45	5,54E-80	1,56
Dentro del grupo	5,68E+12	250	2,27E+10			
Total	5,96E+13	299				

Tabla 17: Resumen del test de análisis de la varianza de las reducciones de viabilidad medidas entre todas las cepas (clínicas y de referencia) de *Escherichia coli*, comparando el tipo de cultivo (planctónico o biopelícula).

Los resultados del test, nos indican que existe una variabilidad significativa entre la sensibilidad al tratamiento aTFD de las diferentes cepas, una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos en los estudios de crecimiento planctónico y en biopelícula.

Por añadidura, nos avisa de una posible interacción entre ambas; es decir, que parte de la diferencia que se observan entre las cepas, es dependiente de si crece en biopelícula, por lo que es natural deducir que las diferencias de la supervivencia en las cepas en biopelícula se deben, al menos en parte a diferencias en la composición/organización de las biopelículas, pero no en exclusividad, ya que hay otra parte de esta diferente sensibilidad que es exclusiva del tipo celular.

Esto confirmaría lo inferido de la comparación de las dos gráficas de viabilidad representadas en la figura 50; pero se ha de insistir que hay otros factores que también afectarían a estas lecturas, como son: el diferente protocolo, con un mayor estrés mecánico en la aTFD en biopelícula, la diferente concentración de azul de metileno y su diferente comportamiento (difusión, disponibilidad...) en medio líquido, comparado con su comportamiento en la matriz extracelular de la biopelícula, etc.

#### **4. Terapia combinada: terapia fotodinámica antimicrobiana y tratamiento antibiótico con ácido nalidíxico sobre *Escherichia coli*.**

Una de las acciones de gran importancia a nivel clínico para ralentizar la aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes es reducir la concentración necesaria de antibiótico para la erradicación bacteriana; otra opción pasa por asegurarse una eliminación más efectiva, evitando la supervivencia de bacterias resistentes.

Una solución para ambos casos es plantear tratamientos combinados con un antimicrobiano de amplio espectro que no genere resistencias en su uso, como los fotosensibilizadores que se utilizan en la terapia fotodinámica antimicrobiana. (Jori, et al., 2006)

Bibliografía previa postula el posible efecto sinérgico de las fentotiacinas (como el azul de metileno) con el tratamiento antibiótico (Kristiansen & Amaral, 1997).

Por eso, se planteó la oportunidad de cerrar los estudios de esta tesis con un estudio sobre el tratamiento combinado de un antibiótico de uso rutinario para el tratamiento de infecciones urinarias por *E. coli*, el ácido nalidíxico (NAL) (National Center for Biotechnology Information., s.f.) y la aTFD con azul de metileno (MB), en busca de posibles efectos sinérgicos entre ambos.

##### **4.1. Cálculo de la concentración mínima inhibitoria en *Escherichia coli*.**

Para medir el efecto de la aTFD con azul de metileno, del ácido nalidíxico y detectar el posible efecto sinérgico entre ambos, es necesario utilizar dosis no letales de ambos productos, para evitar enmascaramientos, ya que, si nos eliminaran todas las bacterias con un solo tratamiento, no sería posible cuantificar el efecto ocasionado al utilizar los dos tratamientos combinados.

Para conocer las dosis más bajas de MB y NAL que causan una letalidad completa, se calcularon sus concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) en una cepa de *Escherichia coli* de referencia (ATCC 25922).

##### **4.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de azul de metileno:**

Se calculó la MIC del MB tras el tratamiento fotodinámico sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, empleando concentraciones que oscilaron entre 0 a 10 µg/mL de MB (0, 12.4, 18.6, 24.8 y 31µM) y 18 J/cm<sup>2</sup> (37.5 minutos) de luz roja (640 ± 25 nm).

Una disminución de la viabilidad asociada al incremento de concentración de MB puede verse reflejada en la figura 51, llegando a no observarse crecimiento bacteriano en las aTFDs realizadas con concentraciones de 10 µg/mL (31µM).

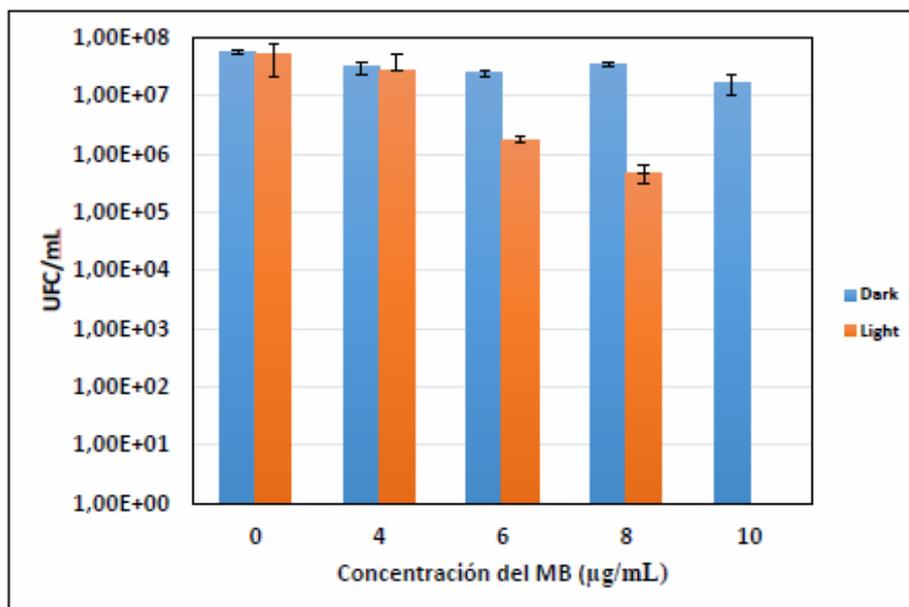


Figura 51: Tratamiento fotodinámico con azul de metileno (MB) en la cepa de referencia de *E. coli* ATCC 25922. Suspensiones "Light", irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm) y controles "Dark" con suspensiones incubadas en oscuridad el mismo tiempo (37.5 minutos).

Queda establecido, por tanto, que la MIC de MB de nuestro estudio era de 10 µg/mL MB (31 µM). Este valor fue el empleado posteriormente para decidir la concentración MIC0.5, en los ensayos que combinaron el tratamiento fotodinámico con el de un antibiótico convencional.

#### 4.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del ácido nalidíxico.

En los tratamientos para determinar la sensibilidad de *Escherichia coli* ATCC25922 al antibiótico, se incubaron tres horas en oscuridad en presencia de concentraciones de hasta 14 µg/mL (32.5, 40.6, 48.75 y 56.8 µM). El objetivo de este estudio fue para determinar la MIC y utilizar una dosis subletal de antibiótico en la terapia combinada NAL + aTFD, para poder apreciar mejor su efecto.

En la figura 52, puede observarse los valores del recuento de UFC/mL para las diferentes concentraciones empleadas del NAL empleadas.

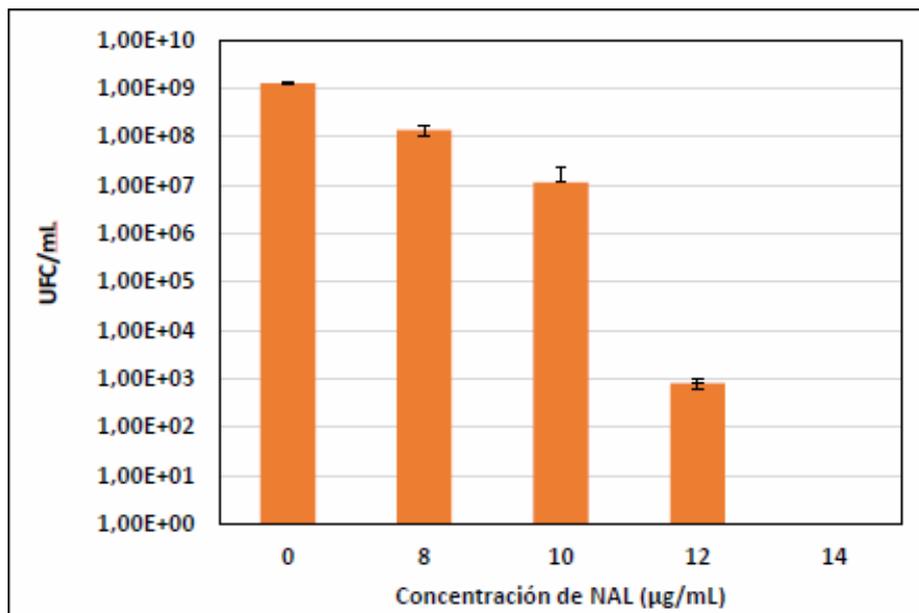


Figura 52: Tratamiento de *Escherichia coli* 25922 con diferentes concentraciones de ácido nalidíxico (0, 32.5, 40.6, 48.75 y 56.8 µM).

Al incrementar la concentración del antibiótico se observó una reducción en el número de UFC/mL crecidas. A una concentración de 12 µg/mL se observó ya una reducción de la viabilidad de más de un 99.9%, con un claro efecto bactericida.

Se observó que no había colonias en las placas tratadas con concentraciones de ácido nalidíxico a partir de 14 µg/mL (56.8 µM), lo cual llevo a determinar esta concentración como la MIC para el tratamiento con el NAL y utilizar este valor para el cálculo de la concentración de ácido nalidíxico a utilizar en los experimentos de terapia combinada (MIC0.5).

El resumen de las concentraciones mínimas inhibitorias encontradas para azul de metileno y ácido nalidíxico, se pueden ver en la tabla 18:

Tabla 18: MIC de MB y NAL para la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922.

	Concentración (µg/mL)	Concentración (µM)
Azul de metileno	10	31
Ácido nalidíxico	14	56.8

## **4.2. Estudio del efecto combinado del antibiótico con la terapia fotodinámica antimicrobiana.**

Según lo expuesto, para el experimento combinando el tratamiento fotodinámico con el antibiótico, se realizó con concentraciones inferiores al valor de la MIC de ambos productos para poder establecer posibles sinergias.

### **4.2.1. Estudio del efecto combinado de 0.5 MIC de NAL y MB**

Teniendo en cuenta estudios bibliográficos previos (Fu, et al., 2013), se emplearon unas concentraciones correspondientes a la mitad de la MIC de ambos compuestos (MIC0.5), datos mostrados en la tabla 19.

Tabla 19: Concentración de MB (MIC 0.5) y NAL (MIC 0.5) para los estudios combinados.		Concentración (µg/mL)	Concentración (µM)
	Azul de metileno	5	15.5
Ácido nalidíxico	7	28.4	

#### **4.2.1.1. Sobre la cepa de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922**

En la figura 53, está representado el efecto de los tratamientos sobre *Escherichia coli* ATCC 25922: con PBS (control), 5 µg/mL de azul de metileno (MB), 7 µg/mL de ácido nalidíxico (NAL) o 5 µg/mL de MB y 7 µg/mL de NAL (MIX).

Las muestras se incubaron en oscuridad en agitación durante tres horas, se centrifugaron para eliminar el NAL no unido a las células y se irradiaron con 18 J/cm<sup>2</sup> (37.5 minutos) con luz roja (640 ± 25 nm) o se dejaron a oscuras en el caso de las réplicas "Dark".

Tras el ensayo combinado, se realizó el contaje de UFC/mL.

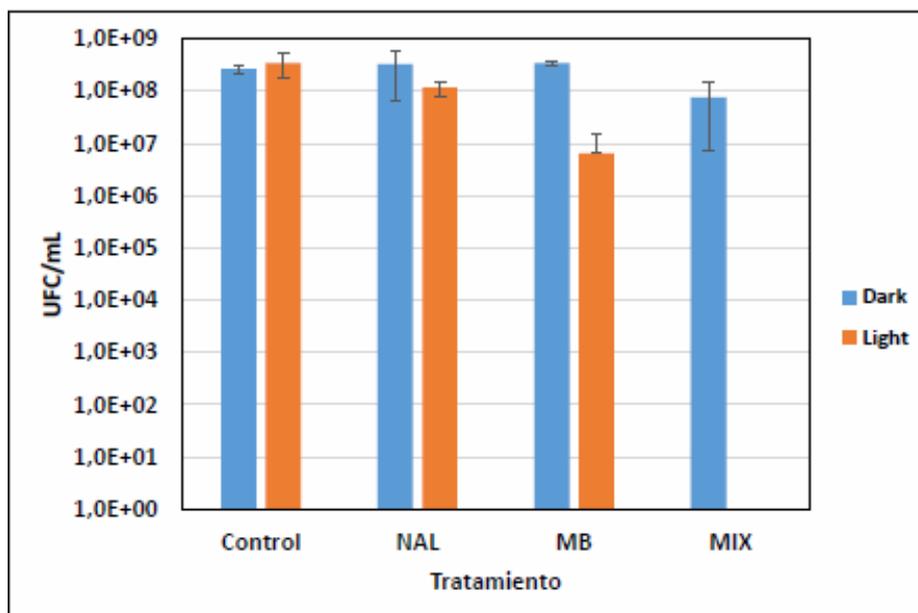


Figura 53: Tratamiento combinado de MB con NAL sobre *E. coli* ATCC 25922. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

El efecto del NAL sobre la cepa de referencia fue mínimo: apenas se produjo una reducción en el número de UFC/mL. En el caso del MB se pudo observar una reducción ligeramente superior a un logaritmo decimal. No obstante, el efecto combinado de ambos compuestos sí que produjo la fotoinactivación completa de las bacterias.

Como se ha explicado en los estudios previos de fotoinactivación de cepas multiresistentes, se pueden expresar los resultados como la relación de UFC/mL calculadas respecto a las UFC/mL del control celular. Esto permite apreciar mejor el ratio de supervivencia, ya que se ve la disminución de la viabilidad debida al efecto fotodinámico, reduciendo variabilidades en el crecimiento celular de cada experimento.

Al procesar los datos mostrados en la figura 54, se observa claramente una reducción de 7 unidades logarítmicas ( $\log_{10}$ ) en la muestra MIX, en la que el tratamiento combinado consigue eliminar todas las bacterias, mientras que el uso de MB y de NAL por separado resultó ineficaz, sin llegar a reducciones de las tres unidades logarítmicas decimales que marcan una acción bactericida.

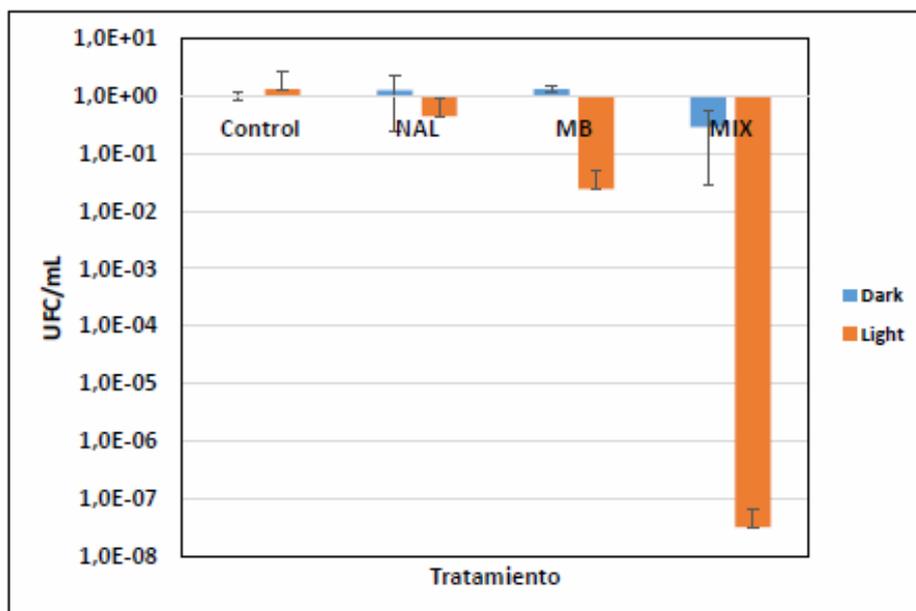


Figura 54: Ratio de supervivencia de *E. coli* ATCC 25922, tras el tratamiento combinado. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

#### 4.2.1.2. Estudio sobre cepas clínicas de *Escherichia coli*.

Tras el ensayo combinado en la cepa de referencia ATCC 25922, se realizó el conteo de UFC/mL tras ambos tratamientos sobre cepas de *Escherichia coli* multiresistentes, con el objetivo de atestiguar la efectividad del tratamiento sobre cepas clínicas.

Las cepas tratadas fueron la Ab 4, Ab 10 y Ab 14. De las tres, Ab 4 era una cepa resistente al efecto del ácido nalidíxico (ver Tabla 4 en material y métodos).

Precisamente en la figura 55, se puede ver el efecto que los tratamientos MIC0.5 de MB y NAL tuvieron con las mismas condiciones de tratamiento que el usado con la cepa de referencia. Se incluyeron controles sin antimicrobianos y sin irradiar con la luz roja (Control y Dark, respectivamente).

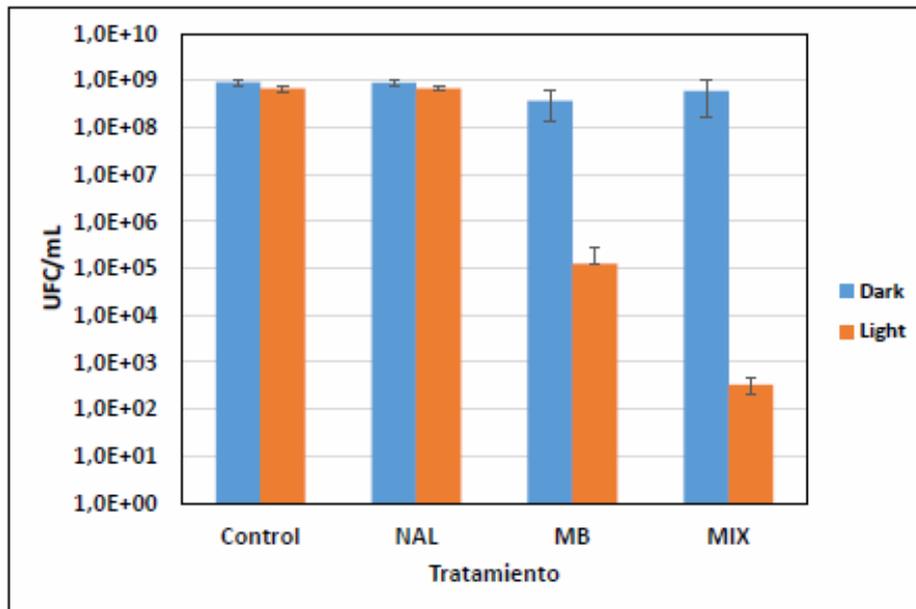


Figura 55: Tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos en la cepa clínica Ab 4. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

Como sería de esperar en una cepa resistente, el tratamiento con NAL, no produjo ningún efecto apreciable en la cepa Ab 4.

El tratamiento únicamente con MB produjo un efecto bactericida, reduciendo hasta 4 logaritmos decimales las UFC/mL.

Las muestras tratadas con el combinado (MIX) también tuvieron una disminución de la viabilidad bactericida, sin llegar a la erradicación celular completa, pero logrando una reducción superior a los tratamientos individuales de más de 6 unidades logarítmicas.

Estos datos se pueden apreciar con más claridad al expresarlos como la ratio de supervivencia, que se muestra en la figura 56.

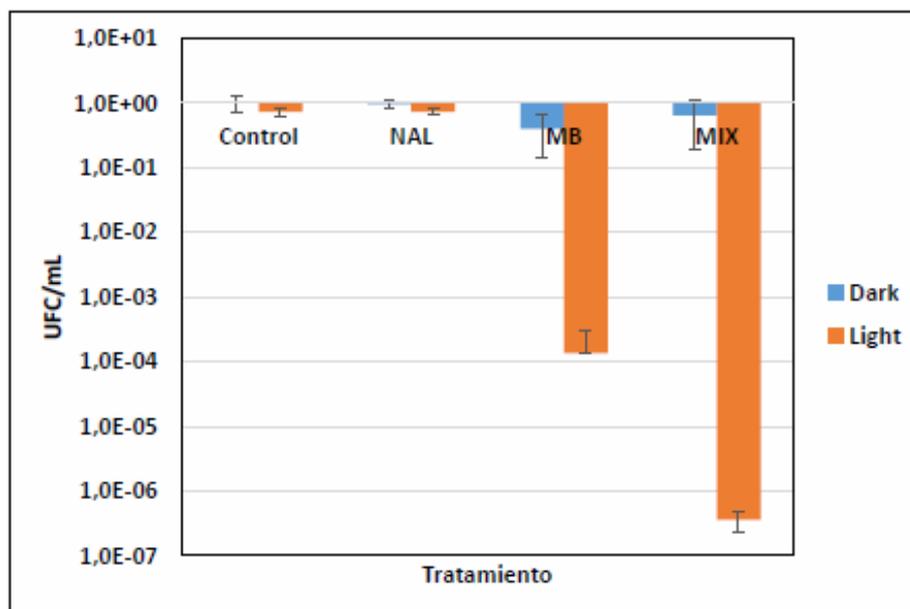


Figura 56: Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 4 tras el tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

En la figura 57, se puede apreciar el efecto de los tratamientos sobre la cepa Ab 10: los tratamientos MIC0.5 de MB y NAL tuvieron con las mismas condiciones de tratamiento que el usado con la cepa de referencia.

Se incluyeron controles sin antimicrobianos y si irradiar con la luz roja (Control y Dark, respectivamente).

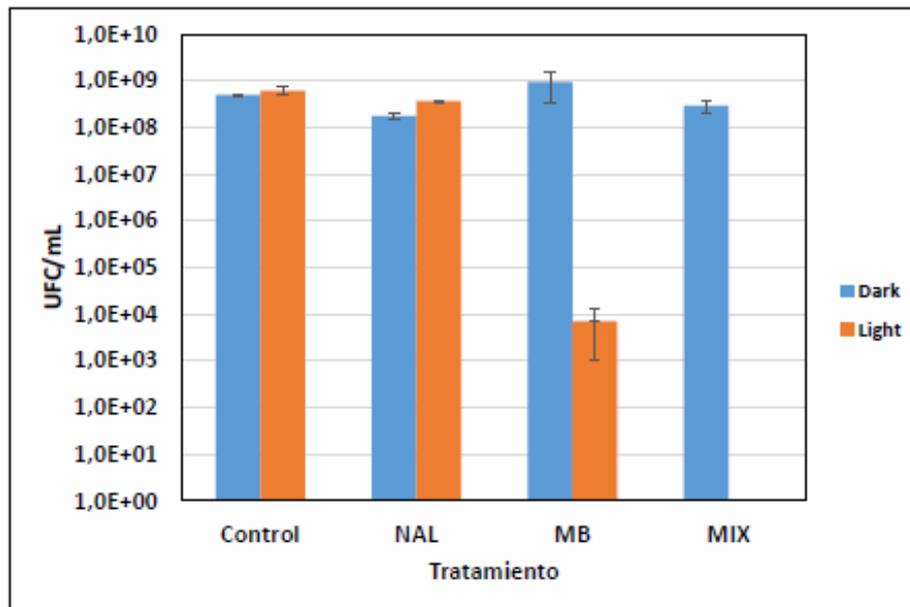


Figura 57: Tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos en la cepa clínica Ab 10. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

En el estudio se pudo observar que el efecto de la aTFD por si sola en la cepa Ab 10 fue mayor que en la cepa de referencia (ver figura 53) y el efecto del tratamiento combinado fue totalmente eficaz, eliminando todas las células.

No se apreció un descenso en el tratamiento con NAL ya que, a pesar de ser sensible a este antibiótico, al utilizarse una concentración mitad a al MIC, su efecto no fue efectivo.

El tratamiento con MB produjo una reducción de 5 logs en la viabilidad, mientras que el tratamiento combinado redujo los más de 10<sup>7</sup> UFC/mL iniciales.

Estos datos se pueden apreciar con más claridad al expresarlos como la ratio de supervivencia, que se muestra en la figura 58:

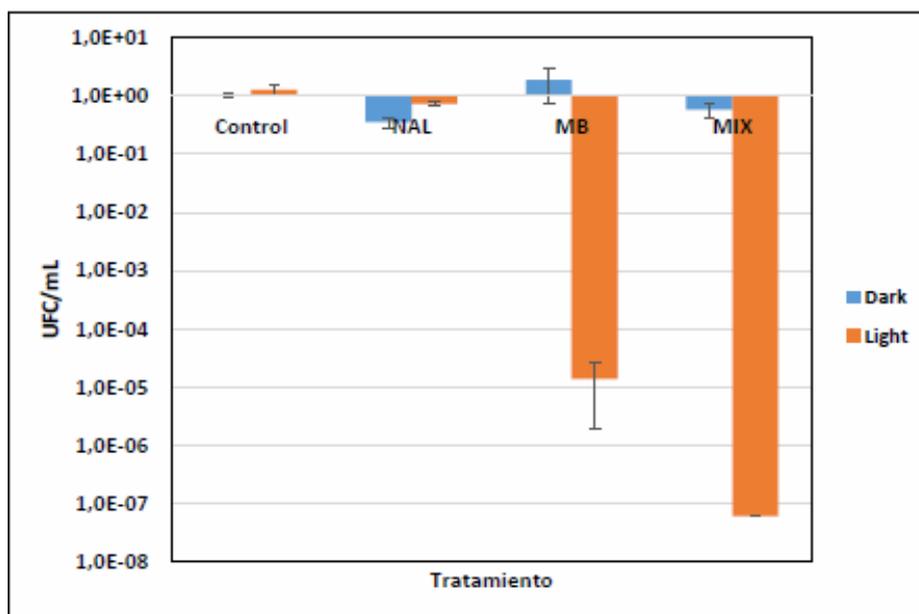
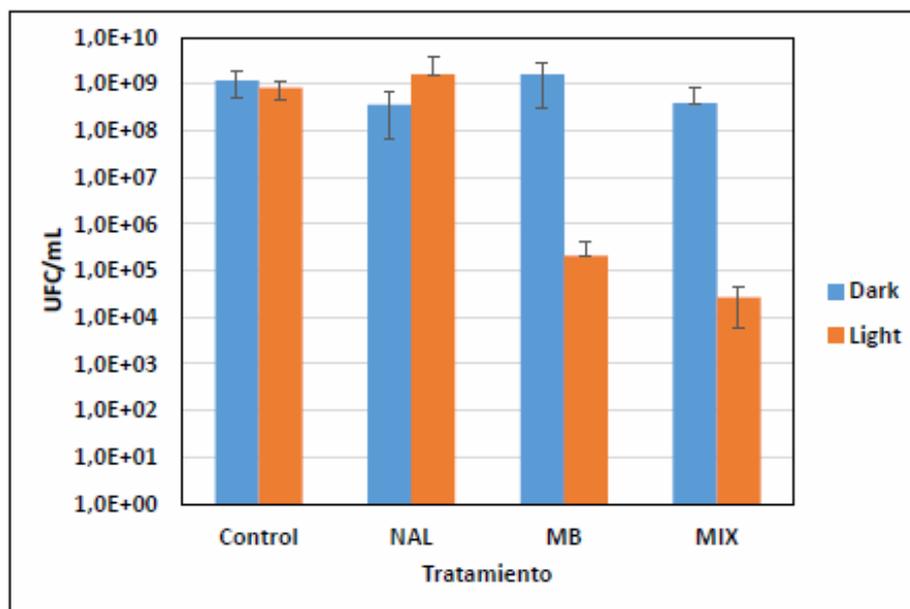


Figura 58: Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 10 tras el tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

En la figura 59, se puede apreciar el efecto de los tratamientos sobre la cepa Ab 14: los tratamientos MIC0.5 de MB y NAL tuvieron con las mismas condiciones de tratamiento que el usado con la cepa de referencia.

Se incluyeron controles sin antimicrobianos y sin irradiar con la luz roja (Control y Dark, respectivamente).



**Figura 59: Tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos en la cepa clínica Ab 14.**  
**Control:** Suspensiones celulares no tratadas; **NAL:** suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; **MB:** suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; **MIX:** suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. **Dark:** suspensiones no irradiadas; **Light:** suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

En el estudio se pudo observar que el efecto de la aTFD por si sola en la cepa Ab 14 fue mayor que en la cepa de referencia (figura 53).

El efecto del tratamiento combinado fue algo más eficaz, pero tan sólo se observó un descenso de una unidad logarítmica decimal más que el tratamiento con MB en solitario.

No se apreció un descenso en el tratamiento con NAL ya que, a pesar de ser sensible a este antibiótico, al utilizarse una concentración mitad a al MIC, su efecto no fue efectivo.

El tratamiento con MB produjo una reducción de más de 3 logaritmos decimales en la viabilidad, mientras que el tratamiento combinado redujo los más de 10<sup>4</sup> UFC/mL iniciales.

Estos datos se pueden apreciar con más claridad al expresarlos como la ratio de supervivencia, que se muestra en la figura 60.

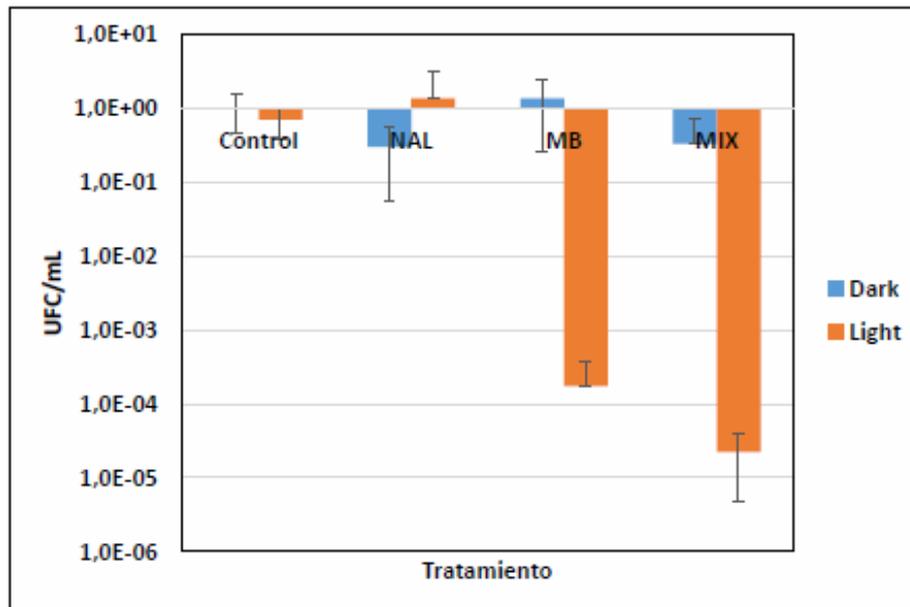


Figura 60: Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 14 tras el tratamiento combinado de 0.5 de las MICs de ambos compuestos. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.5 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

La conclusión inicial de estos estudios se resume en que la aTFD es efectiva para el tratamiento de estas cepas y el efecto combinado con tratamientos podría tener un efecto sinérgico, ya que, en varias de las cepas, el tratamiento combinado provocó una disminución de la viabilidad mayor que con el tratamiento sólo con aTFD, teniendo en cuenta que el tratamiento con antibiótico sólo apenas causaba mortalidad.

A pesar de lo expuesto, el efecto dista de ser concluyente (ver análisis estadístico más adelante para conclusiones más fundamentadas), siendo un factor que enmascara la alta mortalidad causada por la aTFD en solitario.

#### 4.2.2. Estudio del efecto combinado de 0.25 MIC de NAL y MB

Para discernir mejor la posible interacción entre el tratamiento antibiótico y la terapia fotodinámica, se decidió bajar la dosis de azul de metileno en la aTFD. Las concentraciones están indicadas en la tabla 20:

Tabla 20: Concentración de MB (MIC 0.25) y NAL (MIC 0.5) para los estudios combinados.	Concentración	Concentración
	( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	( $\mu\text{M}$ )
Azul de metileno	2.5	7.75
Ácido nalidíxico	7	28.4

Las condiciones del estudio se mantuvieron iguales a los anteriores, con tres horas de incubación con 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (28.4  $\mu\text{M}$ ) NAL, centrifugación e irradiación con 18  $\text{J}/\text{cm}^2$  de luz roja ( $640 \pm 25$  nm) con 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MB (7.75  $\mu\text{M}$ , MIC 0.25).

##### 4.2.2.1. Sobre la cepa de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922

En la figura 61, se muestra el efecto que los tratamientos tuvieron sobre la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922. Se incluyen además de los dos antimicrobianos en solitario y combinados, un control sin ninguno de ellos (Control), así como muestras no irradiadas "Dark".

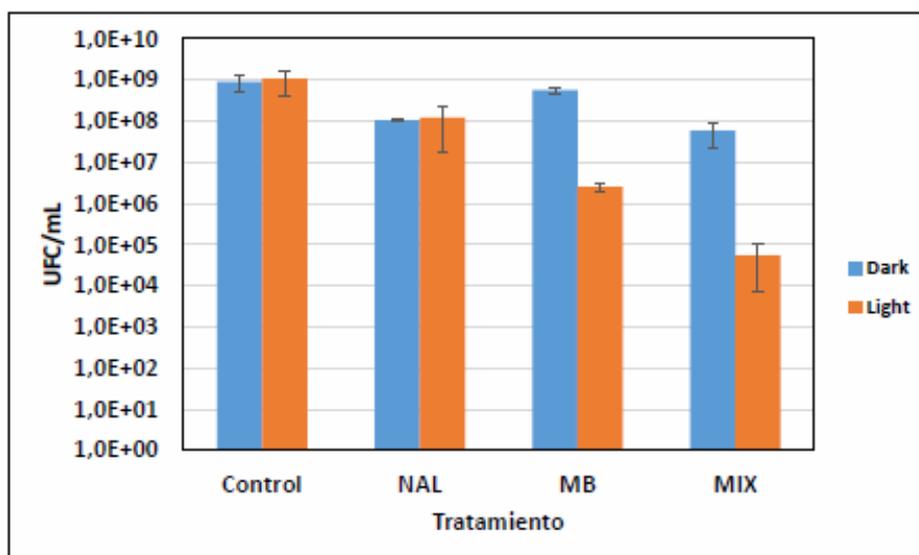
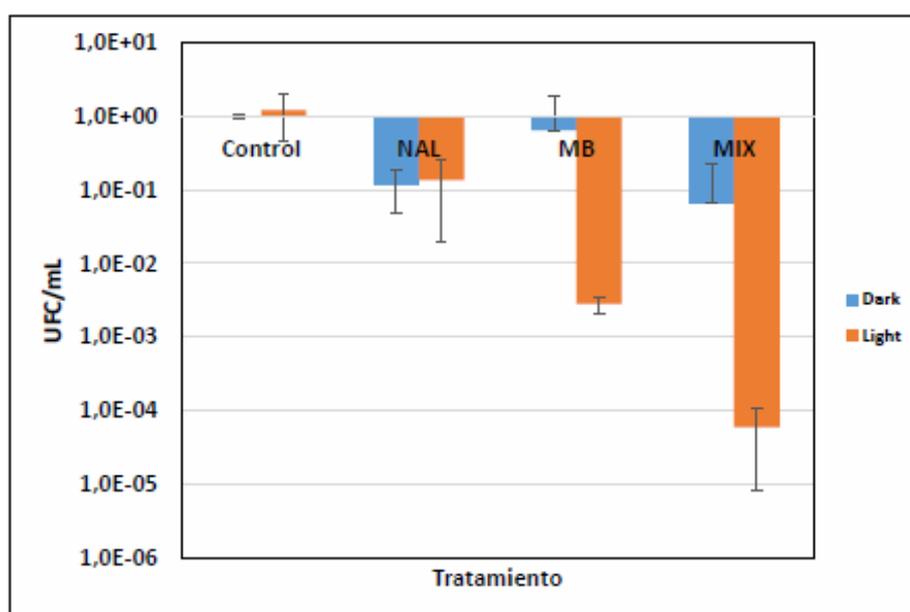


Figura 61: Tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB en la cepa de referencia ATCC 25922. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18  $\text{J}/\text{cm}^2$  de luz roja ( $640 \pm 25$  nm).

Con la nueva concentración de fotoinactivador, no se produjo la fotoinactivación completa de todas las células con el tratamiento combinado, lo que permitió valorar en mejor medida el efecto combinado de ambos tratamientos.

El descenso de viabilidad en el tratamiento con NAL está en un 10% de descenso, que se considera dentro de la variabilidad de la metodología. A pesar de ser sensible a este antibiótico, el utilizarse una concentración mitad a la MIC explica que su efecto no fuera más efectivo.

Estos datos se pueden apreciar con más claridad al expresarlos como la ratio de supervivencia, que se muestra en la figura 62.



**Figura 62:** Ratio de supervivencia de la cepa de referencia ATCC 25922 tras el tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

En esta figura 62, se observa que la aTFD sólo con MB a una concentración de 0.25 de la MIC sólo llegó a una reducción de dos logaritmos decimales; sin embargo, el tratamiento combinado sí produjo la reducción de 4 logaritmos decimales en el número de UFC/mL, por encima del efecto bactericida y con una reducción cien veces superior en la viabilidad, comparada con el efecto sólo con MB.

#### 4.2.2.2. Estudio sobre cepas clínicas de *Escherichia coli*.

Siguiendo lo realizado previamente con la MIC0.5 de MB, también se aplicaron a las cepas clínicas Ab4 (resistente a NAL), Ab 10 y Ab 14.

En la Figura 63, se puede apreciar el efecto de los tratamientos con MIC0.25 de MB y MIC0.5 de NAL en solitario y combinadas sobre la cepa Ab 4; se incluyeron controles sin ningún agente antimicrobiano y los recíprocos de cada experimento con una incubación en oscuridad de 37.5 minutos en lugar de la irradiación de 18 J/cm<sup>2</sup>.

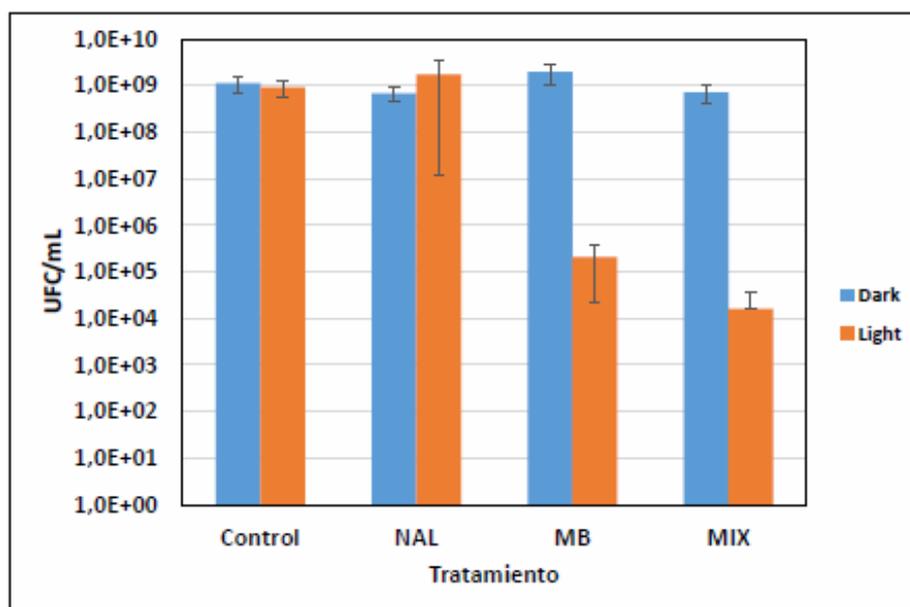


Figura 63: Tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB en la cepa clínica Ab 4. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

Como en los casos anteriores, se puede observar que el tratamiento con el NAL no causó un efecto notable sobre la cepa resistente Ab 4.

Como en los casos anteriores, estos datos se pueden apreciar con más claridad al expresarlos como la ratio de supervivencia, que se muestra en la figura 64:

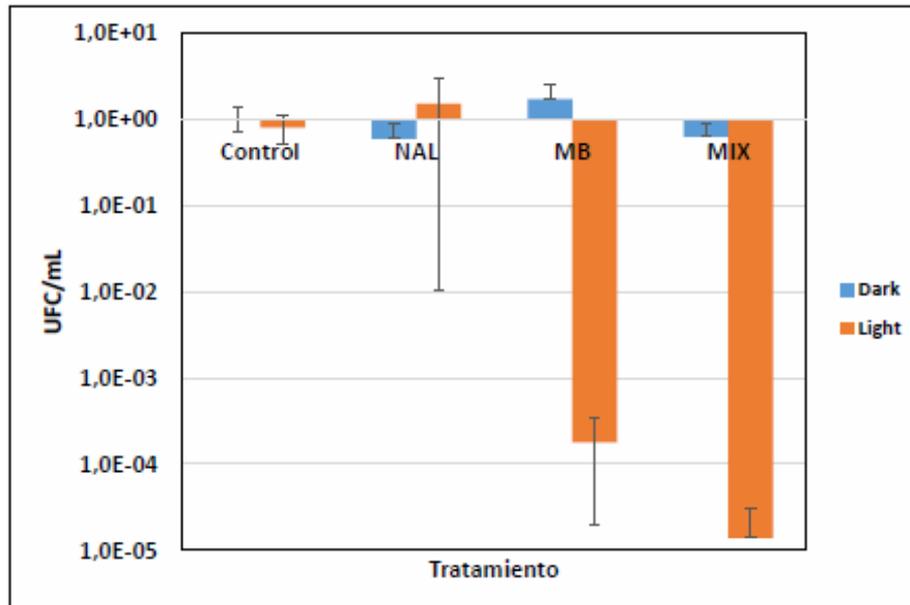


Figura 64: Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 4 tras el tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

A pesar de haber bajado la dosis a 2.5 µg/mL (7.75 µM), el tratamiento fotodinámico con MB en solitario causó un efecto bactericida, eliminando más del 99.9% de las bacterias.

El tratamiento combinado redujo la viabilidad todavía más, hasta casi 5 unidades logarítmicas, una unidad logarítmica más que sin el antibiótico.

En la figura 65, se puede apreciar el efecto de los tratamientos con MIC0.25 de MB y MIC0.5 de NAL en solitario y combinadas sobre la cepa Ab 10; se incluyeron controles sin ningún agente antimicrobiano y los recíprocos de cada experimento con una incubación en oscuridad de 37.5 minutos en lugar de la irradiación de 18 J/cm<sup>2</sup>.

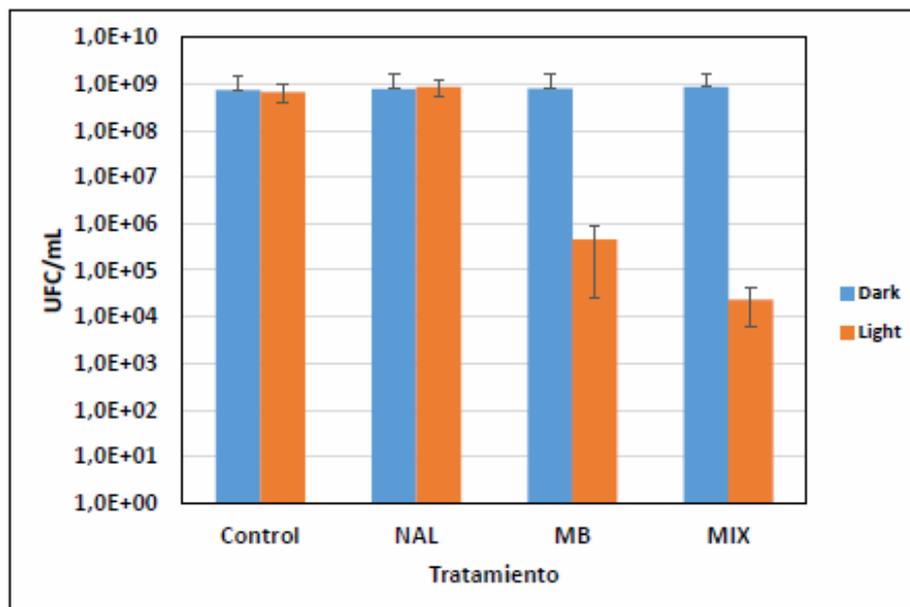


Figura 65: Tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB en la cepa clínica Ab 10. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

Como en los casos anteriores, se puede observar que el tratamiento con el NAL no causó un efecto sobre la cepa Ab 10 a pesar de ser sensible a éste, debido a su baja dosis 7 µg/mL (28.4 µM).

Una vez más, los datos se pueden apreciar con más claridad al expresarlos como la ratio de supervivencia, que se muestra en la figura 66.

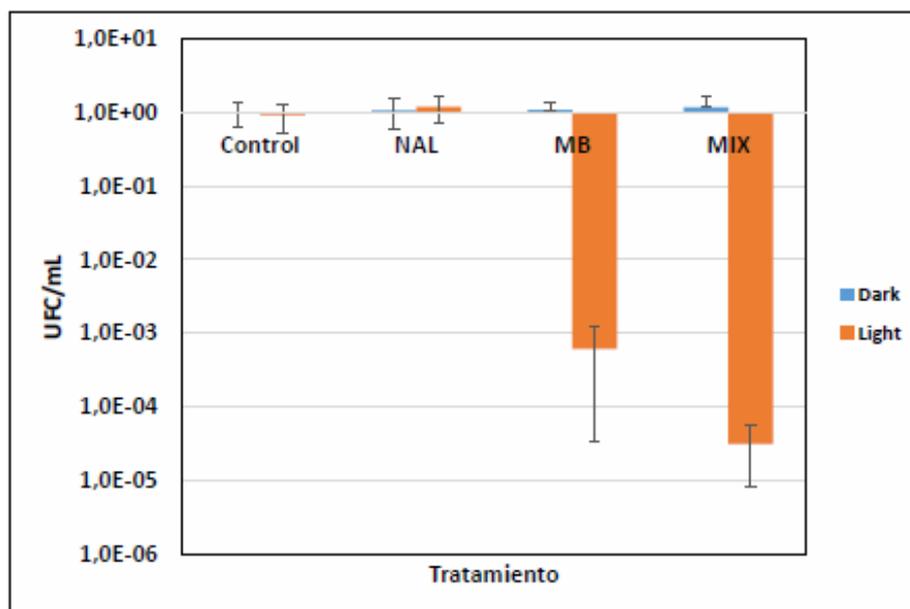


Figura 66: Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 10 tras el tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

El tratamiento fotodinámico solamente con MB tuvo un efecto bactericida por sí mismo, eliminando un 99.9% de las células.

El tratamiento combinado también causó un efecto bactericida, reduciendo más de 4 logs CFU/mL, una reducción diez veces superior que en ausencia de ácido nalidíxico.

En la figura 67, se puede apreciar el efecto de los tratamientos con MIC 0.25 de MB y MIC 0.5 de NAL en solitario y combinadas sobre la cepa Ab 14; se incluyeron controles sin ningún agente antimicrobiano y los recíprocos de cada experimento con una incubación en oscuridad de 37.5 minutos en lugar de la irradiación de 18 J/cm<sup>2</sup>.

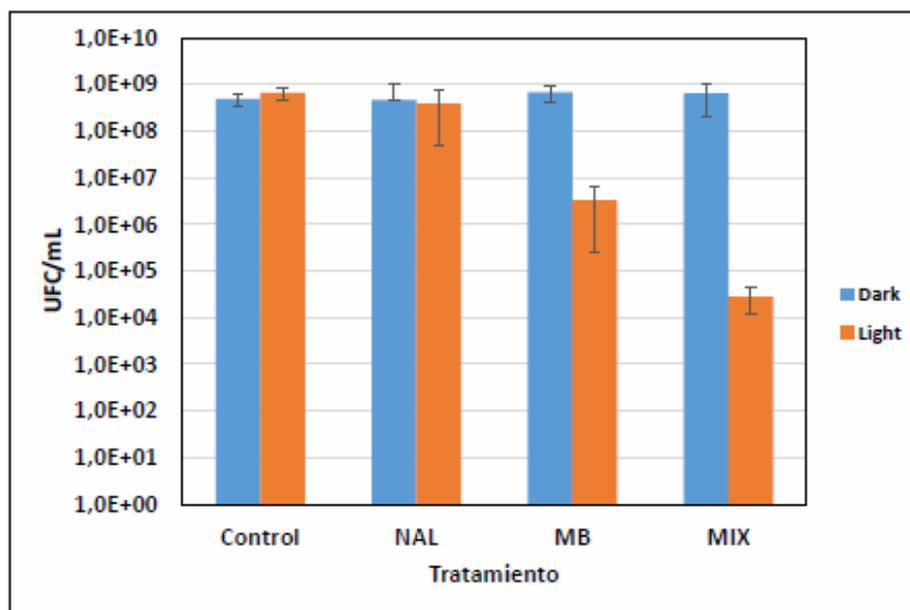


Figura 67: Tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB en la cepa clínica Ab 14. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

Como en los casos anteriores, se puede observar que el tratamiento con el NAL no causó un efecto sobre la cepa Ab 14 a pesar de ser sensible a éste, debido a su baja dosis 7 µg/mL (28.4 µM).

Es en el efecto entre el tratamiento con MB y el tratamiento combinado es donde apareció una diferencia más clara, que se puede apreciar con más claridad al expresarlos como la ratio de supervivencia, como se muestra en la figura 68.

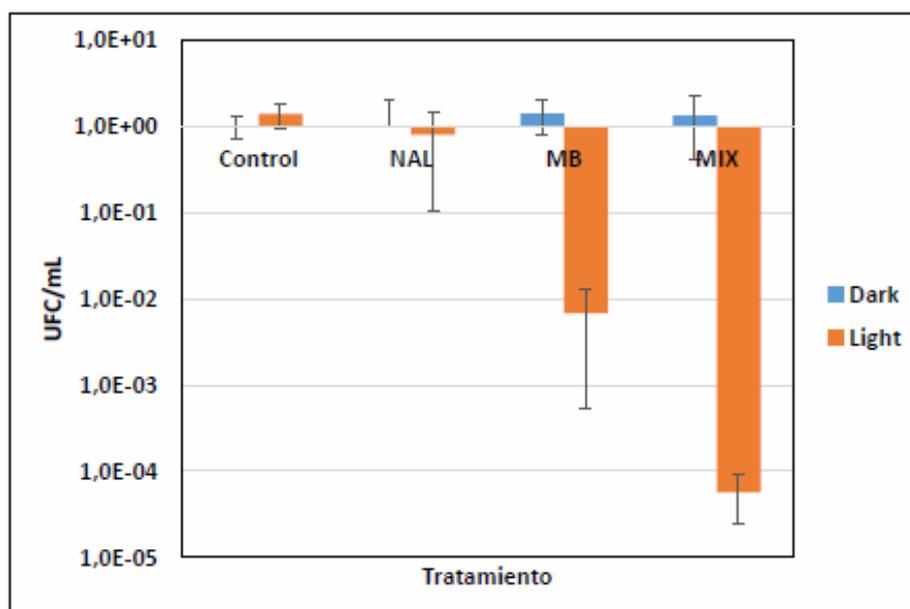


Figura 68: Ratio de supervivencia de la cepa clínica Ab 14 tras el tratamiento combinado de 0.5 MIC del NAL y 0.25 MIC del MB. Control: Suspensiones celulares no tratadas; NAL: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL; MB: suspensión celular tratada con 0.25 MIC de MB; MIX: suspensión celular tratada con 0.5 MIC de NAL y 0.25 MIC de MB. Dark: suspensiones no irradiadas; Light: suspensiones irradiadas con 18 J/cm<sup>2</sup> de luz roja (640 ± 25 nm).

El tratamiento fotodinámico solamente con MB no alcanzó un efecto bactericida por sí mismo, eliminando aproximadamente dos unidades logarítmicas del total de las células.

El tratamiento combinado sí causó un efecto bactericida, reduciendo más de 4 log<sub>10</sub>, una reducción cien veces superior al presente en ausencia de ácido nalidíxico.

Los datos obtenidos con esta reducción de la concentración de azul de metileno hasta una dosis MIC 0.25 mantienen unos resultados de supresión más importantes en para la terapia combinada que con el azul de metileno sólo, a pesar de que el ácido nalidíxico no presentó ningún efecto apreciable por sí solo.

Para asegurar la significancia de estos resultados, se analizaron estadísticamente.

### **4.3. Estudio matemático del efecto combinado de los tratamientos.**

#### **4.3.1. Estudio estadístico:**

Todos los resultados de los tratamientos con el 0.25 MIC de MB y de 0.5 MIC de NAL, fueron realizados por triplicados para posteriormente poder realizar análisis de la varianza (ANOVA).

Se realizó un análisis ANOVA evaluando si existían diferencias estadísticas entre los tratamientos fotodinámicos entre las muestras “Dark” (sin irradiación) y “Light” (con dosis de luz roja ( $640 \pm 25$  nm) de  $18 \text{ J/cm}^2$ ). Los datos empleados se pueden ver en las figuras 61 a 67 (figuras impares).

Tras realizar los análisis ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ), se pudo determinar que **existen diferencias** estadísticas **entre** los resultados obtenidos de las muestras “**Dark**” y “**Light**” de los diferentes tratamientos fotodinámicos, y para todas las cepas, es decir, que cuando las muestras eran irradiadas se producía una reducción significativa en el recuento del número de UFC/mL.

De forma paralela, se realizó otro análisis ANOVA con los resultados de cada una de las cepas empleadas para los distintos tratamientos con NAL, aTFD sólo y combinado. El objetivo era discernir si había diferentes respuestas a los tratamientos por parte de las diferentes cepas.

Para este estudio se emplearon los resultados obtenidos a partir de las muestras irradiadas, es decir, las muestras “light”. Para esto se tomaron los valores del recuento de UFC/mL vistos en las gráficas previas (de nuevo: figuras impares del 61 a 67).

En la figura 69, se representan recopiladas los valores empleados para la realización del análisis ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ) de todas las cepas que han sido tratadas con 0.5 MIC de ácido nalidíxico, sin azul de metileno.

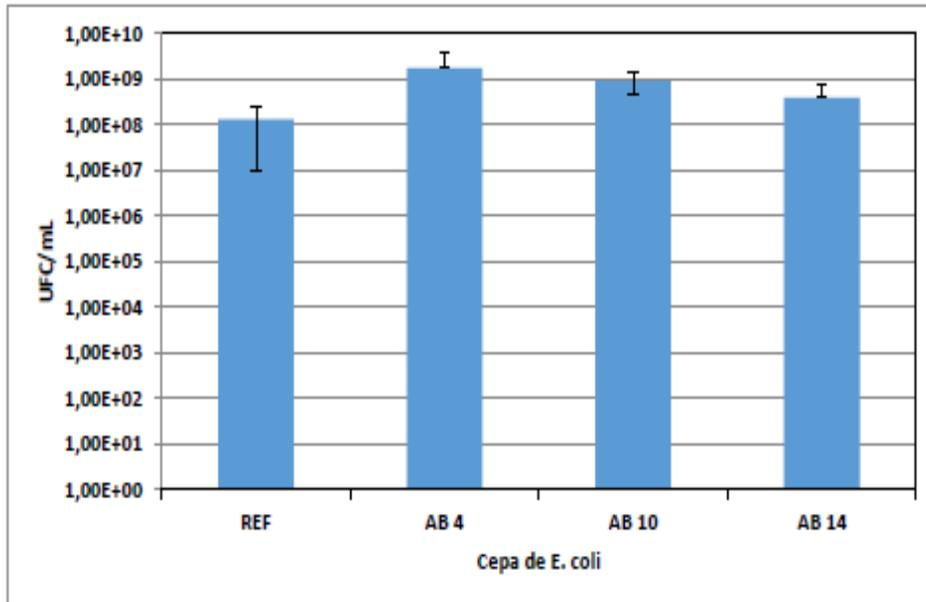


Figura 69: Valores empleados para realizar el análisis ANOVA de las diferentes cepas tras el tratamiento con 0.5 MIC de ácido nalidíxico (NAL).

Para un valor de significación de  $\alpha = 0.05$  se acepta la  $H_0$  de que, con un 95% de probabilidad no hay diferencia significativa entre ellos; estadísticamente, el ácido nalidíxico a una concentración equivalente al 50% de la MIC causa el mismo efecto sobre todas las cepas. Esto se debe a que la dosis de NAL es tan baja que incluso en las células de las cepas sensibles no se vieron afectadas de forma significativa.

En la figura 70, se representan recopilados los valores empleados para la realización del análisis ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ) de todas las cepas que han sido tratadas con 0.25 MIC de MB.

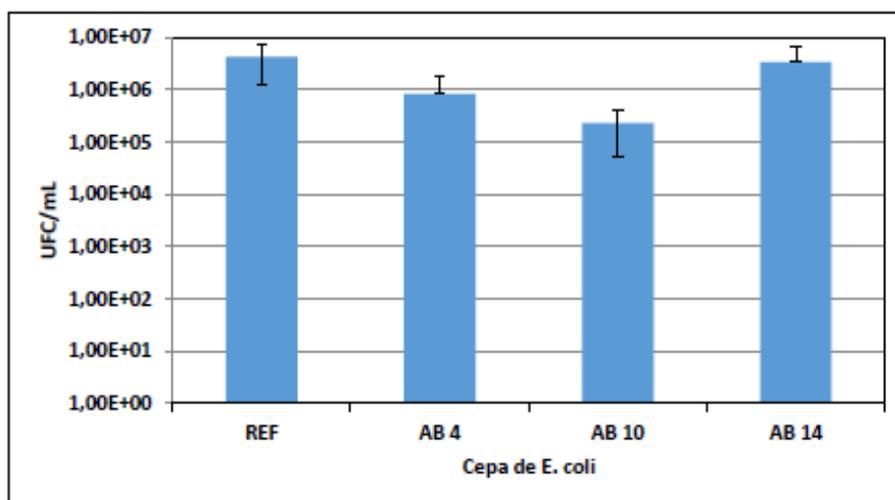


Figura 70: Valores empleados para realizar el análisis ANOVA de las diferentes cepas tras el tratamiento con 0.25 MIC de azul de metileno (MB).

Para un valor de significación de  $\alpha = 0.05$  se aceptó la  $H_0$ , es decir, se está en condición de asegurar que, con un 95% de probabilidad, no hay diferencia significativa entre ellos.

En los casos más extremos, el recuento de UFC/mL solo varió una unidad logarítmica decimal entre la cepa de referencia ATCC 25922 y la Ab 10, por lo que no hay ninguna cepa que estadísticamente se pueda afirmar que tenga una respuesta diferente al tratamiento.

En la figura 71, se recopilan los valores empleados para la realización del análisis ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ) de todas las cepas que han sido tratadas con 0.5 MIC de NAL y con 0.25 MIC de MB.

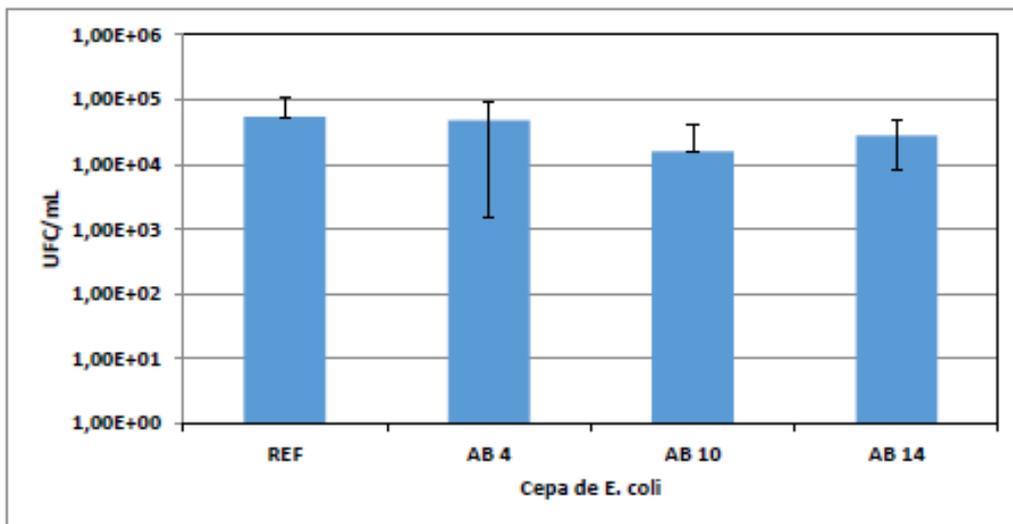


Figura 71: Valores empleados para realizar el análisis ANOVA de las diferentes cepas tras el tratamiento con 0.5 MIC de ácido nalidíxico (NAL) y con 0.25 MIC de azul de metileno (MB).

Para un valor de significación de  $\alpha = 0.05$  se aceptó la  $H_0$ , es decir, se puede asegurar que con un 95% de probabilidad no hay diferencia significativa entre ellos.

Como conclusión, en el recuento de UFC/mL no se encontraron diferencias a la respuesta a los diferentes tratamientos entre las distintas cepas, todas responden de forma muy similar a los diferentes tratamientos.

### 4.3.2. Búsqueda de efectos sinérgicos de los tratamientos.

En la tabla 21, se muestran los resultados de la comparación del efecto del tratamiento combinado, aplicado a las diferentes cepas en comparación con los tratamientos individuales (con solo el antibiótico o el FS), de acuerdo con el método detallado por Valeriote y Lin en 1975 (Valeriote & Lin, 1975), detallada en la ecuación 5, adaptándolo para nuestros estudios microbiológicos.

Ecuación 5:  
Simplificación  
efectos sinérgicos.

$\text{Log}_{10}(\text{MIX}) < \text{log}_{10}(\text{NAL}) + \text{log}_{10}(\text{MB}) \rightarrow \text{Sinérgico}$

$\text{Log}_{10}(\text{MIX}) = \text{log}_{10}(\text{NAL}) + \text{log}_{10}(\text{MB}) \rightarrow \text{Aditivo}$

$\text{Log}_{10}(\text{MIX}) > \text{log}_{10}(\text{NAL}) + \text{log}_{10}(\text{MB}) \rightarrow \text{Antagónico}$

Cepa <i>Escherichia coli</i>	[MIX]	[NAL] [MB]	Efecto del tratamiento
<b>ATCC 25922</b>	-4.58±0.87	-3.60±0.62	<b>ADITIVO</b>
<b>Ab 4</b>	-5.24±0.84	-3.89±1.24	<b>ADITIVO</b>
<b>Ab 10</b>	-4.75±0.79	-3.45±1.06	<b>ADITIVO</b>
<b>Ab 14</b>	-4.46±0.34	-2.90±0.95	<b>SINÉRGICO</b>

Tabla 21: Estudio del efecto combinado de 0.5 MIC del ácido nalidíxico (NAL) y 0.25 MIC del azul de metileno (MB) en las cepas de estudio. Tratamiento combinado (MIX).

Este estudio se llevó a cabo para valorar si el tratamiento combinado ofrece ventajas frente a los individuales y para poder determinar si el efecto del tratamiento varía en las diferentes cepas estudiadas.

Para poder realizar este estudio se emplearon los resultados en los que se empleó el 0.5 MIC de ácido nalidíxico, el 0.25 MIC del tratamiento con MB y el tratamiento conjunto con los dos productos.

Para la cepa de referencia (ATCC 25922), la Ab 4 y Ab 10, se puede afirmar que el efecto combinado de ambos compuestos visto en nuestros estudios es aditivo, mientras que para la cepa Ab 14, el efecto demuestra ser sinérgico.



## Capítulo 5: Conclusiones

- ❖ Se ha establecido la efectividad de la terapia fotodinámica para la eliminación de especies potencialmente patógenas como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*, aunque en este último caso, para alcanzar un efecto bactericida, ha sido necesario cambiar el fotosensibilizador azul de metileno por un derivado del mismo, el nuevo azul de metileno, con mayor afinidad por la pared celular y mejor rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete.
- ❖ Se ha demostrado la efectividad de la terapia fotodinámica para la eliminación de cepas clínicas de *Escherichia coli* multiresistentes, tanto en crecimiento planctónico como en biopelícula.
- ❖ Se ha demostrado la existencia de un efecto sinérgico entre el tratamiento fotodinámico y el tratamiento con ácido nalidíxico en al menos una de las cepas estudiadas



## Capítulo 6: Referencias:

- Adachi, K. et al, 2010. Controllable adsorption and ideal H-aggregation behaviors of phenothiazine dyes on the tungsten oxide nanocolloid surface. *Langmuir*, 26(1), pp. 117-125.
- Adamson, A. W. & Gast, A. P., 1997. *Physical chemistry of surfaces*. 6 ed. s.l.: Stanford: Wiley.
- Agostinis, P. et al, 2011. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*, 61(4), pp. 250-281.
- Akilov, O. E., Kosaka, S., O'Riordan, K. & Hasan, T., 2007. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci*, 6(10), pp. 1067-1075.
- Al-Jiffri, O., El-Sayed, Z. M. & Al-Sharif, F. M., 2011. Urinary tract infection with *Escherichia coli* and antibacterial activity of some plants extracts. *International Journal of Microbiological Research*, 2(1), pp. 2079-2093.
- Anderson, E. S., Humphreys, G. O. & Willshaw, G. A., 1975. The molecular relatedness of R factors in enterobacteria of human and animal origin. *J. Gen. Microbiol.*, 91(1), pp. 376-382.
- Aparna, M. S. & Yadav, S., 2008. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis*, 12(6), pp. 526-530.
- Ashkenazi, H., Malik, Z., Harth, Y. & Nitzan, Y., 2003. Eradication of propionibacterium acnes by its endogenous porphyrins after illumination with high intensity blue light. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 35(1), pp. 17-24.
- ATCC®, 2016. *Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922™)*. [En línea] Available at: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/25922-MINI-PACK.aspx> [Último acceso: 12 12 2016].
- ATCC®, 2016. *Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 35218™)*. [En línea] Available at: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/35218.aspx?geo\\_country=es#generalinformation](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/35218.aspx?geo_country=es#generalinformation) [Último acceso: 12 12 2016].
- Ben Nasr, A. et al, 1996. Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, 20(5), pp. 927-935.
- Berthiaume, F. et al, 1994. Antibody-targeted photolysis of bacteria in vivo. *Biotechnology (N Y)*, 703(6), pp. 703-706.
- Blum, H. F., 1941. *Photodynamic action and diseases caused by light*. New York: Reinhold Publishing Corp.
- Braslavsky, S. E., 2007. Glossary of terms used in photochemistry 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure Appl. Chem.*, 79(3), pp. 293-465.
- Brooun, A., Tomashek, J. & Lewis, K., 2000. Purification and ligand binding of EmrR, a regulator of a multidrug transporter. *J. Bacteriol.*, Volumen 44, pp. 640-646.

- Brovko, L. et al, 2005. Photodynamic treatment for surface sanitation. *Proc. SPIE*, Volumen 5969, pp. 1-6.
- Camilli, A. & Bassler, B. L., 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311(5764), pp. 1113-1116.
- Chibebe, J. J. et al, 2013. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of enterococcus faecium in a whole animal insect model. *PLoS One*, 8(2).
- Costerton, J., Stewart, P. S. & Greenberg, E., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, Volumen 284, pp. 1318–1322.
- Costerton, J. W. et al, 1994. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.*, 176(8), pp. 2137–2142.
- Costerton, W. J. et al, 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.*, Volumen 41, pp. 435-464.
- Dai, T., Huang, Y.-Y. & Hamblin, M. R., 2009. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 6(3-4), pp. 170-188.
- Dai, T. et al, 2009. Photodynamic Therapy for *Acinetobacter baumannii* burn infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(9), pp. 3929-3934.
- Danese, P. N., Pratt, L. A. & Kolter, R., 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol.*, 182(12), pp. 3593–3596.
- Davies, D., Chakrabarty, A. & Geesey, G., 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.*, 59(4), pp. 1181–1186.
- Davies, M. J., 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 3(6), pp. 761–770.
- Deminova, T. N. & Hamblin, M. R., 2004. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 17(3), pp. 245–254.
- Diamond, I. et al., 1972. Photodynamic therapy of malignant tumors. *Lancet*, 2(7788), pp. 1175-1177.
- Dougherty, T. J., 1987. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochemistry and Photobiology*, 45(6), pp. 879-889.
- Dougherty, T. J. et al, 1978. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer research*, Volumen 38, pp. 2628-2635.
- Embleton, M. L., Nair, S. P., Cookson, B. D. & Wilson, M., 2002. Selective lethal photosensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using an IgG–tin (IV) chlorin e6 conjugate. *J Antimicrob Chemother*, 50(6), pp. 857-864.
- Ergaieg, K., Chevanne, M., Cillard, J. & Seux, R., 2008. Involvement of both Type I and Type II mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria photosensitization by a meso-substituted cationic porphyrin. *Solar Energy*, 82(12), pp. 1107–1117.
- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. & Poxton, I., 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*, 4(8), pp. 837–851.

- Farber, J. M. & Peterkin, P. I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, Volumen 55, pp. 476-511.
- Fass, R. J., 1985. The quinolones. *Ann. Intern. Med.*, Volumen 102, pp. 400-402.
- Fernández, L., Breidenstein, E. B. & Hancock, R. E., 2011. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist Updat*, 14(1), pp. 1-21.
- Fernández, L. & Hancock, R. E. W., 2012. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, 25(4), pp. 661-681.
- Fu, X.-j., Fang, Y. & Yao, M., 2013. Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *BioMed Research International*, Volumen 2013, pp. 1-9.
- Ghannoum, M., Parsek, M., Whitely, M. & Mukherjee, P. K., 2016. Microbial biofilms. *Emerg Infect Dis.*, 22(6), p. 1142.
- Gilbert, V. A. & Baggott, J., 1991. *Essentials of Molecular Photochemistry*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Giwerzman, B. et al, 1991. Induction of  $\beta$ -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother*, Volumen 35, pp. 1008-1010.
- Gomer, C. J., Rucker, N., Ferrario, A. & Wong, S., 1989. Properties and applications of photodynamic therapy. *Radiat Res.*, 120(1), pp. 1-18.
- Grinholc, M. et al, 2008. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, Volumen 90, pp. 57–63.
- Gualdi, L. et al, 2008. Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 154(7), pp. 2017-2024.
- Gulig, P. A., 2007. *Salmonella: molecular biology and pathogenesis*. 1 ed. Norfolk: Horizon Scientific Press.
- Gursoy, H., Ozcakir-Tomruk, C., Tanalp, J. & Yilmaz, S., 2013. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Invest*, Volumen 17, pp. 1113–1125.
- Hamblin, M. R. & Hasan, T., 2004. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochem Photobiol Sci*, 3(5), pp. 436-450.
- Hamblin, M. R. et al, 2002. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 49(6), pp. 941-951.
- Harmatz, D. & Blauer, G., 1983. Reactions of photoexcited methylene blue. *Photochem Photobiol.*, 38(3), pp. 385-387.
- Hasebe, A. et al, 2013. Mycoplasma removal from cell culture using antimicrobial photodynamic therapy. *Photomed Laser Surg.*, 31(3), pp. 125-131.
- Hausen, H. Z. & De Villiers, E.-M., 1994. Human papilloma viruses. *Annual Review of Microbiology*, Volumen 48, pp. 427-447.

- Hobley, L. et al, 2013. BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(33), pp. 13600-13605.
- Holden, N. J. & Gally, L. D., 2004. Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *J. Med. Microbiol.*, Volumen 53, pp. 585-593.
- Holmes, A. H. et al, 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*, 387(10014), pp. 176-187.
- Hooper, D. C., 1998. Clinical applications of quinolones. *Biochim Biophys Acta*, 1400(1-3), pp. 45-61.
- Ito, T. & Kobayashi, T., 1977. A survey of in vivo photodynamic activity of xanthenes, thiazines, and acridines in yeast cells. *Photochemistry and Photobiology*, Volumen 26, pp. 581-587.
- Jaffe, H. H. & Miller, A. L., 1966. The fates of electronic excitation energy. *J. Chem. Educ.*, 43(9), p. 469.
- János, M., Jinsong, R., Kristiansen, J. E. & J., N. M., 1992. Effects of some tricyclic psychopharmacons and structurally related compounds on motility of *Proteus vulgaris*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 62(4), pp. 319-320.
- Jefferson, K. K., 2004. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiology Letters*, Volumen 236, pp. 163-173.
- J. E. K., 1990. The antimicrobial activity of psychotherapeutic drugs and stereo-isomeric analogues. *Danish Medical Bulletin*, 37(2), pp. 165-182.
- Jesionek, A. & von Tappeiner, H., 1905. Zur behandlung der hautcarcinome mit fluoreszierenden stoffen. *Arch. Knin. Med.*, Volumen 82, pp. 72-76.
- Jodlbauer, A. & von Tappeiner, H., 1904. Ueber die beteiligung des sauerstoffes bei der photodynamischen wukung fluoreszierender stoffe. *Muench. Med. Wochenschr.*, Volumen 52, pp. 1139-1141.
- Jori, G. et al, 2006. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*, 38(5), pp. 468-481.
- Junqueira, H. C., Severino, D., Dias, L. G. & Gugliotti, M. B., 2002. Modulation of the methylene blue photochemical properties based on the adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys Chem Chem Phys*, Volumen 4, pp. 2320—2328.
- Kollef, M. H. & Fraser, V. J., 2001. Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Ann Intern Med*, 134(4), pp. 298-314.
- Kristiansen, J. E. & Amaral, L., 1997. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volumen 40, pp. 319–327.
- Krueger, J. H. & Walker, G. C., 1984. groEL and dnaK genes of *Escherichia coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an htpR+-dependent fashion. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 81(5), pp. 1499-1503.
- Lauro, F. M. et al, 2002. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. *Photochem Photobiol Sci*, 1(7), pp. 468-470.

- Laxminarayan, R. et al, 2016. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet*, 387(10014), pp. 168-175.
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O. & Beloin, C., 2013. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*, 2(2), pp. 288-356.
- Lewis, K., 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45(4), pp. 999-1007.
- Liddell, H. G. & Scott, R., 1940. *A Greek-English Lexicon*. Perseus ed. s.l.:s.n.
- Lim, H. W. & Soter, N. A., 1993. *Clinical Photomedicine*. New York: Marcel Dekker.
- Lipson, R. L., Baldes, E. J. & Olsen, A. M., 1961. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst.*, Volumen 26, pp. 1-11.
- Liu, S. et al, 2015. Surface charge-conversion polymeric nanoparticles for photodynamic treatment of urinary tract bacterial infections. *Nanotechnology*, 26(49), pp. 1-12.
- López-Chicón, P., Gullías Borau, Ò., Nonell, S. & Agut, M., 2016. Terapia fotodinámica antimicrobiana in vitro aplicada sobre *Trichophyton mentagrophytes* con nuevo azul de metileno como fotosensibilizador. *Actas Dermosifiliogr.* 107(9), pp. 765-770.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J., 2004. *BROCK, Biología de los microorganismos*. 10 ed. Madrid: Pearson Education.
- Malanovic, N. & Lohner, K., 2016. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(8), p. 936–946.
- Malik, Z., Ladan, H. & Nitzan, Y., 1992. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B.*, 14(3), pp. 262-266.
- McEwen, J., 2016. *UC Davis ChemWiki*. [En línea]  
Available at:  
[http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Physical\\_Chemistry/Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy/Jablonski\\_diagram](http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram)  
[Último acceso: 21 06 2016].
- McLauchlin, J. & Rees, C. E., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. Athens: Springer.
- Mehla, K. & Ramana, J., 2016. Structural signature of Ser83Leu and Asp87Asn mutations in DNA gyrase from enterotoxigenic *Escherichia coli* and impact on quinolone resistance. *Gene.*, 576(1), pp. 28-35.
- Meire, M. A., De Moor, R. J., Coenye, T. & Nelis, H. J., 2012. Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *International Endodontic Journal*, Volumen 45, p. 482–491.
- Miller, M. B. & Bassler, B. L., 2001. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, Volumen 55, pp. 165-199.
- Millson, C., Wilson, M., MacRobert, A. J. & Bown, S. G., 1996. Ex-vivo treatment of gastric *Helicobacter* infection by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 32(1-2), pp. 59-65.

- Mohr, H., Bachmann, B., Klein-Struckmeier, A. & Lambrecht, B., 1997. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem Photobiol*, 65(5), pp. 441-445.
- Murray, E. G., Webb, R. A. & Swann, M. R., 1929. A disease of rabbits characterised by a large monomolecular mononucleosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J. Patol. Bacteriol.*, Volumen 29, pp. 407-439.
- Narayanan, N., Johnson, L. & MacDougall, C., 2016. Beyond susceptible and resistant, part III: Treatment of infections due to Gram-negative organisms producing carbapenemases. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 21(2), pp. 110-119.
- National Center for Biotechnology Information., s.f. *PubChem Compound Database*. [En línea] Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23675318#section=Pharmacology-and-Biochemistry> [Último acceso: 23 04 2017].
- Naves, P. et al, 2008. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, Volumen 45, pp. 86-91.
- Nikaido, H., 1996. *Outer membrane*. 2 ed. Washington, D.C.: ASM Press.
- Niu, C. & Gilbert, E. S., 2004. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(12), pp. 6951-6956.
- Onlen, Y. et al, 2007. Antibacterial activity of propolis against MRSA and synergism with topical mupirocin. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13(7), pp. 713-718.
- O'Riordan, K. et al, 2006. Photoinactivation of Mycobacteria in vitro and in a new murine model of localized *Mycobacterium bovis* BCG-induced granulomatous infection. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50(5), pp. 1828-1834.
- Park, J.-H. et al, 2010. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6. *Lasers in Medical Science*, 25(5), pp. 705-710.
- Parsonnet, J. et al, 1991. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med*, 325(16), pp. 1127-1131.
- Partridge, S. R., 2015. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Pathology*, 47(3), pp. 276-284.
- Paulo Tardivo, J. et al, 2005. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(3), p. 175-191.
- Popoff, M. Y. & Le Minor, L. E., 2005. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. 2 ed. New York: Spriger.
- Prigent-Combaret, C. & Lejeune, P., 1999. Monitoring gene expression in biofilms. *Methods Enzymol.*, Volumen 310, pp. 56-79.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. & Lejeune, P., 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 181(19), pp. 5993-6002.
- Prüll, C.-R., 2003. Part of a scientific master plan? Paul Ehrlich and the origins of his receptor concept. *Med Hist.*, 47(3), pp. 332-356.

- Quintiliani, R. J. & Courvalin, P., 1995. *Mechanisms of resistance to antimicrobial agents*. 6 ed. Washington, D.C.: ASM Press.
- Raab, O., 1904. Ueber die wirkung fluorescierenden stoffe auf infusorien. *Z.Biol.*, Volumen 39, pp. 524-546.
- Ragàs, X. et al, 2010. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: In vitro and in vivo studies. *Lasers in Surgery and Medicine*, Volumen 42, pp. 384–390.
- Ragàs, X. et al, 2013. Singlet oxygen in antimicrobial photodynamic therapy: Photosensitizer-dependent production and decay in *E. coli*. *Molecules*, 18(3), pp. 2712-2725.
- Real Academia Española, 2014. *RAE*. [En línea]  
Available at: <http://dle.rae.es/?id=ILAL7RX>  
[Último acceso: 22 06 2016].
- Redfield, R. J., 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing?. *Trends Microbiol*, 10(8), pp. 365-370.
- Redmond, R. W. & Gamlin, J. N., 1999. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem Photobiol*, 70(4), pp. 391-475.
- Reinhardt, C. & Travis, A. S., 2000. Heinrich Caro and the creation of modern chemical industry. En: Boston: Springer Science & Business Media, p. 453.
- Robinson, J. R., 1983. *Photodynamic insecticides: A review of studies on photosensitizing dyes as insect control agents, their practical application, hazards, and residues*. New York: Springer.
- Ryou, J.-H. et al, 2009. Acne-photodynamic therapy with intra-lesional injection of 5-aminolevulinic acid. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 25(1), pp. 57-58.
- Sandoval-Motta, S. & Aldana, M., 2016. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *WIREs Syst Biol Med*, 8(3), pp. 253-267.
- Schastak, S. et al, 2010. Efficient photodynamic therapy against gram-positive and gram-negative bacteria using THPTS, a cationic photosensitizer excited by infrared wavelength. *PLoS ONE*, 5(7), pp. 1-8.
- Scheutz, F. & Strockbine, N. A., 2005. *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. 2 ed. New York: Springer.
- Schleifer, K. H. & Kandler, O., 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.*, 36(4), p. 407–477.
- Schneider Jr., E. J. et al, 1998. Potential mechanisms of photodynamic inactivation of virus by methylene blue. *Photochem Photobiol.*, 67(3), pp. 350-357.
- Sengupta, S., Chattopadhyay, . M. K. & Grossart, H.-P., 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol.*, 4(47), pp. 1-13.
- Serra, D. O. et al, 2013. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio*, Volumen 4, pp. 103-113.
- Severino, D. et al, 2003. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. *Photochem Photobiol*, 77(5), pp. 459-68.

- Shah, D. et al, 2006. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiology*, 6(53).
- Sharma, S. K., Chiang, L. Y. & Hamblin, M. R., 2011. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream?. *Nanomedicine*, 6(10), pp. 1813–1825.
- Sharma, S. K. et al, 2012. Photodynamic therapy for cancer and for infections: What is the difference?. *Isr J Chem.*, 52(8-9), pp. 691-705.
- Shikowitz, M. J. et al, 1998. Efficacy of DHE photodynamic therapy for respiratory papillomatosis: immediate and long-term results. *Laryngoscope*, 108(7), pp. 962-967.
- Silva, E., De Landea, J. R., Edwards, A. M. & Lissi, E., 2000. Lysozyme photo-oxidation by singlet oxygen: properties of the partially inactivated enzyme. *J Photochem Photobiol B*, 55(2-3), pp. 196-200.
- Singh, M. P. & Greenstein, M., 2000. Antibacterial leads from microbial natural products discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 3(2), pp. 167-176.
- S. M., J. R., J. L. B. & T. J. O., 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), pp. 648-656.
- Soukos, N. S. et al, 1998. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(10), pp. 2595-2601.
- Spikes, J. D., 1985. *The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in the health sciences. In primary photo-processes in biology and medicine*. New York: Plenum Press.
- Spikes, J. D., 1991. The origin and meaning of the term “photodynamic” (as used in “photodynamic therapy”, for example). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 9(3), pp. 369-371.
- Spikes, J. D., 1997. Photodynamic action: From paramecium to photochemotherapy. *Photochemistry and Photobiology*, 65(S), pp. 142s-147s.
- Street, C. N., Pedigo, L., Gibbs, A. & Loebel, N., 2009. Antimicrobial photodynamic therapy for the decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the anterior nares. *SPIE Proceedings*, Volumen 7380.
- Strohl, W., 1997. *Biotechnology of Antibiotics*. 2 ed. s.l.:Taylor & Francis.
- Tardivo, J. P. et al, 2004. Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4), p. 345–346.
- Taroco, R., Seija, . V. & Vignoli, R., 2000. *Procedimientos en microbiología clínica*. 1 ed. s.l.:Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Tegos, G. P. et al, 2008. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52(9), pp. 3202-3209.
- Teles, R. et al, 2013. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000*, 62(1), pp. 95–162.
- Tuite, E. M. & Kelly, J. M., 1993. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J Photochem Photobiol B*, 21(2-3), pp. 103-124.

Turcheniuk, K. et al, 2015. Highly effective photodynamic inactivation of *E. coli* using gold nanorods/SiO<sub>2</sub> core–shell nanostructures with embedded verteporfin. *Chem. Commun*, 91(51), pp. 16365-16368.

Universitat de Valencia (CECT), 2016. *Listeria monocytogenes (Murray et al. 1926) Pirie 1940*. [En línea]

Available at: <http://www.cect.org/vstrn.php?cect=4031>

[Último acceso: 1 11 2016].

US Centers for Disease Control and Prevention, 2013. *Antibiotic resistance threats in the United States*. [En línea]

Available at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>

[Último acceso: Julio Julio 2016].

Valentine, J. S., Foote, C. S., Greenberg, A. & Liebman, J. F., 1995. *Active Oxygen in Biochemistry*. 1 ed. s.l.:Springer Netherlands.

Valeriote, . F. & Lin, H. S., 1975. Synergistic interaction of anticancer agents: a celular perspective. *Cancer Chemother Rep.* , 59(5), pp. 895-900.

Van Boeckel, T. P. et al, 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis*, 14(8), pp. 742-750.

van der Woude, M. W., 2006. Re-examining the role and random nature of phase variation. *FEMS Microbiol Lett.*, 254(2), pp. 190-197.

Vera, M. A. et al, 2012. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. *Photochem Photobiol.*, 88(3), pp. 499–511.

Verbeeck, R. K. et al, 2016. Optimizing treatment outcome of first-line anti-tuberculosis drugs: the role of therapeutic drug monitoring. *Eur J Clin Pharmacol*, pp. 1-12.

Vila, J. et al, 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38(10), pp. 2477-2479.

Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M. A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.*, 32(2), pp. 149-167.

Von Tappeiner, H. & Jesionek, H., 1903. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. *Munch. Med. Wschr.*, Volumen 50, pp. 2042-2044.

Von Tappeiner, H. & Raab, O., 1900. Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien nach versuchen von O. *Med. Wochenschr*, 47(5), pp. 5-7.

Wagner, S. J. et al, 1998. Factors affecting virus photoinactivation by a series of phenothiazine dyes. *Photochem Photobiol*, 67(3), pp. 343-349.

Wainwright, M. & Giddens, R. M., 2003. Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dyes and Pigments*, Volumen 57, pp. 245–257.

Wainwright, M. et al, 1997. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Volumen 19, pp. 75-80.

Waksman, S. A., 1952. *Nobel Lecture: Streptomycin: Background, Isolation, Properties, and Utilization*. s.l., Nobel Media AB.

Wilson, M. & Devine, D., 2003. Oral Streptococcal genes that encode biofilm formation. *Medical Implications of Biofilms*, Volumen 1, pp. 212-227.

Wolfson, J. S. & Hooper, D. C., 1985. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.*, 28(4), pp. 581-586.

Yusim, Y., Livingstone, D. & Sidi, A., 2007. Blue dyes, blue people: the systemic effects of blue dyes when administered via different routes. *Journal of Clinical Anesthesia*, 19(4), pp. 315–321.

Zobell, C. E. & Allen, E. C., 1935. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *J Bacteriol.*, 29(3), pp. 239-251.



## Anexo 2: Contribuciones a congresos

Se contribuyó con una comunicación poster al “16th Congress of the European Society for Photobiology”, celebrado del 31 de agosto al 4 de septiembre del 2015 en Aveiro (Portugal).

### A novel photoreactivity of 9-substituted phenalenones

Òscar Gullías-Borau,<sup>1</sup> Roger Bresolí-Obach,<sup>1</sup> Rubén Ruiz-González,<sup>1</sup> Montserrat Agut,<sup>1</sup> Götz Bucher,<sup>2</sup> Santi Nonell,<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Via Augusta, 390, 08017 Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> WestCHEM, School of Chemistry, University of Glasgow, Joseph-Black-Building, University Avenue, Glasgow G12 8QQ, United Kingdom.

Oscar.gullias@iqs.edu

Rogerbresolio@iqs.url.cat

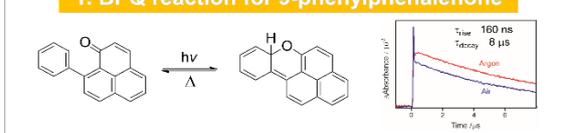
Santi.nonell@iqs.edu



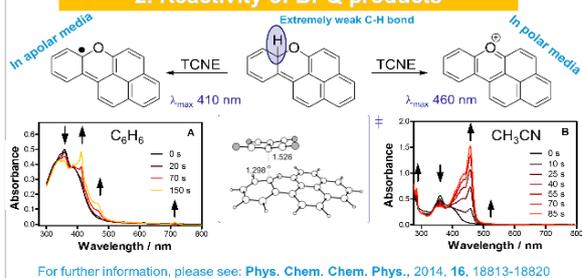
#### Abstract

The singlet and triplet excited states of 9-phenylphenalenones undergo  $\beta$ -phenyl quenching (BPQ) via addition of the carbonyl oxygen to the ortho position of the phenyl substituent. This poster presents the photophysical and photochemical properties of 9-(o-nitrophenyl)-phenalenone. This compound presents unique properties given the fact that the C-H bond in the naphthoxanthene has been replaced by a C-NO<sub>2</sub> bond. This allows the formation of the naphthoxanthene followed by ultrafast C-NO<sub>2</sub> bond rupture, which is dependent in the solvent polarity. It evolves to naphthoxanthenyl radical in apolar media and naphthoxanthenium cation in polar media, with the NO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub><sup>+</sup> counterparts respectively. An additional advantage of this compound is that the photogenerated naphthoxanthenium cation presents better properties for photodynamic therapy than its precursor: its spectra are shifted to the red, it is endowed with water solubility and generates singlet oxygen with non-negligible quantum yield ( $\Phi_S = 0.15$  in PBS). The antimicrobial photodynamic activity has been tested against both Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*) bacteria using the nitrophenylphenalenone as precursor. The initial light irradiation rendered the conversion of the nitrophenylphenalenone to naphthoxanthenium cation without exerting cell death. Further irradiation resulted in reduction of viability up to 6-log<sub>10</sub> reduction with 1  $\mu$ M of compound and 15 J/cm<sup>2</sup> fluence. Moreover, deuteration effects were also observed suggesting type II mechanism.

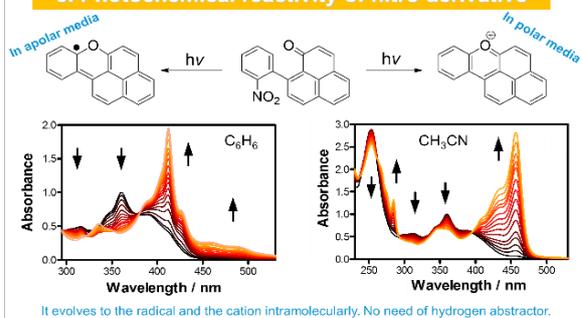
#### 1. BPQ reaction for 9-phenylphenalenone



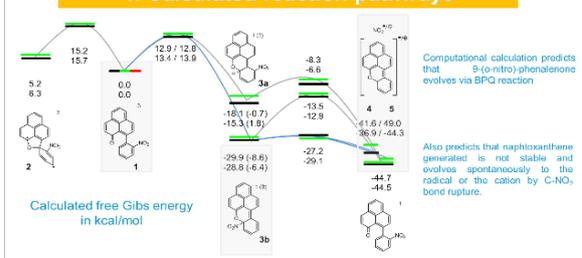
#### 2. Reactivity of BPQ products



#### 3. Photochemical reactivity of nitro derivative

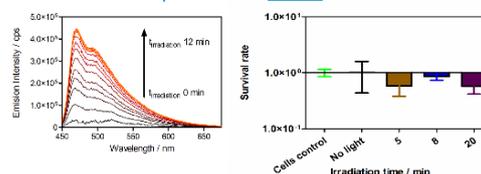


#### 4. Calculated reaction pathways

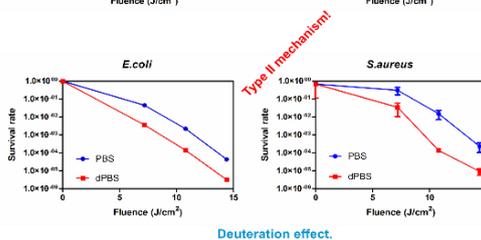
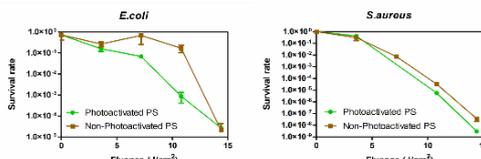


#### 5. Antimicrobial photodynamic activity

Conversion to naphthoxanthenium does not cause cell death.



Previously photoactivation raises inactivation rate.



#### Conclusions

- We have shown that 9-(o-nitrophenyl)-phenalenone photolysis results in the formation of the naphthoxanthenyl radical and the naphthoxanthenium cation in apolar and polar solvent respectively. This reaction for this compound is unimolecular.
- The key intermediate is the nitro-naphthoxanthene which is mainly generated from the singlet state via BPQ reaction and it is the responsible of the homolytic or heterolytic bond rupture for radical and cation generation respectively.
- We have shown that 9-(o-nitrophenyl)-phenalenone photolysis is not associated to cell death. Additionally, the naphthoxanthenium cation is the responsible for the cellular death. Furthermore, inactivations done in dPBS suggests a type II mechanism.

#### Acknowledgements

This work has been supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grant No CTQ2013-48767-C3-1-R).

RBO thanks the European Social Funds and the SUR del DEC de la Generalitat de Catalunya for his predoctoral fellowship (grant No 2015 FI\_B\_00315), and the IQS.

OGB thanks IQS for his predoctoral fellowship.

We thank the European Society for Photobiology for a fellowship to attend the 16th Congress of the ESP.

Figura 72: Póster presentado en el “16th Congress of the European Society for Photobiology”, el 2015 en Aveiro (Portugal). Presenta el efecto aTFD con una fenalenona 9-substituida como fotosensibilizador.

### **Anexo 3: Colaboraciones en artículos relacionados con la tesis**

Se contribuyó a las siguientes publicaciones:

- Patricia López-Chicón, Òscar Gulías Borau, Santi Nonell y Montserrat Agut, 2016. **Terapia fotodinámica antimicrobiana in vitro aplicada sobre *Trichophyton mentagrophytes* con nuevo azul de metileno como fotosensibilizador.** Actas Dermo-Sifiliográficas. 107, 9. 765–770.
- Eduardo Anaya-Plaza, Eveline van de Winckel, Joonas Mikkilä, Jani-Markus Malho, Olli Ikkala, Oscar Gulías, Roger Bresolí-Obach, Montserrat Agut, Santi Nonell, Tomás Torres, Mauri A. Kostainen, & Andrés de la Escosura, 2017. **Photoantimicrobial Biohybrids by Supramolecular Immobilization of Cationic Phthalocyanines onto Cellulose Nanocrystals.** Chemical European Journal. 23, 1 – 8.
- Rubén Ruiz-González, Roger Bresolí-Obach, Òscar Gulías, Montserrat Agut, Huguette Savoie, Ross W. Boyle, Santi Nonell & Francesca Giuntini. 2017. **NanoSOSG: A Nanostructured Fluorescent Probe for the Detection of Intracellular Singlet Oxygen.** Angewandte Chemical International Edition. 56, 2885 –2888.
- Giulia Zampini, Oriol Planas, Òscar Gulías, Montserrat Agut, Santi Nonell y Loredana Latterini. 2017. **Morphology effects on singlet oxygen production and bacterial photoinactivation efficiency by different silica-Protoporphyrin IX nanocomposites.** RSC Advances. 7, 14422–14429.