

1. Objetivos:

1.1. El objetivo general del proyecto

Explorar la eficacia de la terapia fotodinámica (TFD) con la hipericina (HYP) comparándola con la de uno de los fotosensibilizantes más utilizados en TFD antimicrobiana, el azul de metileno (AM), frente a los microorganismos patógenos que con mayor frecuencia producen infecciones en la cavidad oral: bacterias gram positivas (*Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans*) y levadura (*Candida albicans*).

1.2. Objetivos concretos

1. Comparar la actividad bactericida *in vitro* de la TFD con hipericina y azul de metileno en *S. mutans*, *S. sanguis*.
2. Comparar la actividad fungicida *in vitro* de la TFD con hipericina y azul de metileno en *C. albicans*.
3. Comparar la actividad fungicida *in vitro* de la TFD con hipericina y azul de metileno frente a especies de *Candida* resistentes.
4. Comprobar si la hipericina y el azul de metileno presentan efecto de sinergia frente a *S. mutans* y *S. sanguis*.
5. Comprobar si la hipericina y el azul de metileno presentan efecto de sinergia frente a *Candida*.
6. Establecer la toxicidad *in vitro* de la TFD con extracto de hipericina en las células de la mucosa oral: queratinocitos y fibroblastos.

2. Introducción

2.1. Infecciones orales:

La boca es el hábitat favorable para un complejo microecosistema para más de 300 especies de bacterias y algunos hongos debido a la presencia de nutrientes, restos de epitelio y secreciones ¹. La distribución de la microbiota varía cualitativa y cuantitativamente de acuerdo con el hábitat. Muchos de los microorganismos son residentes pero algunas bacterias son ocasionales. Los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Veillonella*, y *Actinomyces* constituyen en un 80% de la flora bucal ², así como *Candida albicans*, la levadura más frecuente en la microbiota bucal. Todos ellos pueden ser patógenos en presencia de determinados factores predisponentes, produciendo infecciones que van desde lesiones superficiales de la mucosa a graves e invasivas diseminaciones sistémicas ³. En la cavidad bucal humana al haber mucha diversidad de microorganismos, éstos se encuentran formando agregados, estructuras que se conocen como biopelículas, o en término común placa dental, que se forman en la superficie dental ⁴. Los biofilms microbianos en la cavidad oral están involucrados en la etiología de diversos procesos orales, que incluyen enfermedades periodontales y endodontales, caries, halitosis, estomatitis, candidiasis así como el fracaso de implantes dentales. Por otro lado, las bacterias de la placa dental son capaces de iniciar una endocarditis bacteriana, en pacientes predispuestos; además, se las ha relacionado con partos prematuros, infecciones uterinas, diabetes e incluso demencia ⁵. El crecimiento en la forma natural de biofilms ⁶ les confiere a estos gérmenes de la boca una resistencia mayor a los antimicrobianos ⁷ comparado a su crecimiento en cultivos en suspensión (forma planctónica) ⁸, ya que se produce unos cambios en sus propiedades ⁹.

Los agentes antimicrobianos, antibióticos y no-antibióticos, se prescriben frecuentemente para el tratamiento de la halitosis y la enfermedad periodontal. No obstante, el riesgo de resistencias y toxicidad es un problema importante ¹⁰. Además, sólo altos niveles y múltiples dosis de los mismos administrados localmente pueden tener el mismo efecto que los que se administran por vía sistémica.

Por todo ello, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas diferentes a las hasta ahora utilizadas supone un importante reto para el control del crecimiento microbiano

en la cavidad oral. Por dicha razón están surgiendo terapias alternativas a los antibióticos para controlar la población de microorganismos productores de caries y enfermedades periodontales en la cavidad oral.

2.2. Terapia Fotodinámica

La TFD es una modalidad terapéutica bien establecida, que fue originalmente desarrollada y posteriormente aprobada para el tratamiento de tumores sólidos ¹¹.

En 1900, un científico alemán, Oscar Raab fue el primero en constatar el efecto tóxico conjunto de la luz y los colorantes, en concreto del naranja de acridina, sobre *Paramecium caudatum*. En 1907, von Tappeiner y Jodlbauer publicaron un libro de texto sobre esta terapia, que se conoce como un proceso de fotosensibilizantes oxígeno-dependiente para el tratamiento de tumores de la piel y la destrucción de las partículas infecciosas ¹².

La TFD se basa en la combinación de tres componentes esenciales : Un fotosensibilizante (FS) no tóxico intrínsecamente que se localiza en el tumor o células microbianas, una luz visible de adecuada longitud de onda que administrada en la zona es específicamente absorbida por el agente fotosensibilizante y en presencia de oxígeno resulta en la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) las cuales inducen la muerte específica de las células tumorales por apoptosis o necrosis, preservado los tejidos sanos circundantes ¹³, ninguno de los componentes es tóxico por separado. Este mecanismo se puede llevar a cabo por dos vías: bien por la transferencia de electrones (reacción de tipo I) o por la transferencia de energía (reacción de tipo II). El electrón que se transfiere puede dar lugar a la producción del anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. En la reacción de tipo II, se produce oxígeno singlete (¹O₂). El oxígeno en estado excitado es el intermediario más importante en esta reacción. Las ROS son moléculas altamente reactivas que provocan diversos efectos en las células como la inactivación de enzimas y otras proteínas o la peroxidación de lípidos dando lugar a la destrucción de membranas celulares, lisosomas y mitocondrias lo que conlleva finalmente la muerte celular ¹⁴. La destrucción celular se puede producir mediante apoptosis o necrosis lo que dependerá, fundamentalmente del fotosensibilizante utilizado, de su localización intracelular y de las estructuras celulares que resulten dañadas ¹⁵. Además, la TFD induce una respuesta vascular, inmunológica y

de la matriz extracelular que intervienen en su efectividad final y en su excelente resultado cosmético ¹⁶. La producción de ROS depende de la concentración del fotosensibilizante ^{17,18}.

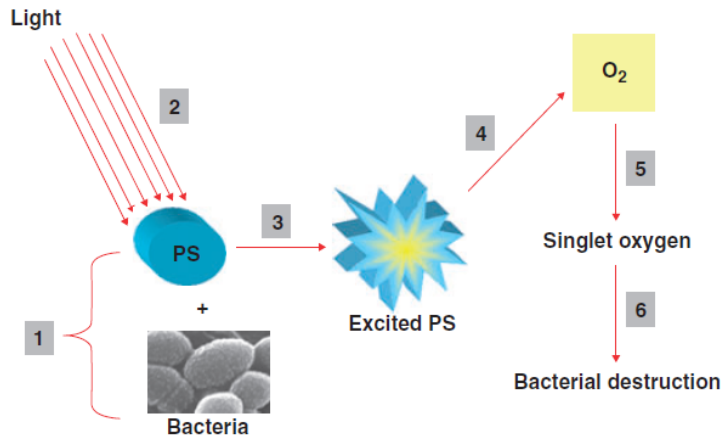


Figura 1. Mecanismo de Acción de la Terapia Fotodinámica Antimicrobiana

La TFD ha tenido un gran éxito como terapéutica de algunos cánceres, especialmente los cutáneos no melanocitarios ¹⁹, y algo menos en la degeneración macular retiniana ²⁰ o el esófago de Barret ²¹, entre otros procesos.

El uso de la TFD como una modalidad terapéutica para el tratamiento de infecciones localizadas representa un campo emergente de investigación. Así, diversos artículos, tanto referentes a experiencias realizadas *in vitro* como *in vivo* avalan su utilidad en el tratamiento de las infecciones producidas por bacterias, hongos, virus y parásitos, es lo que se ha denominado quimioterapia fotodinámica antimicrobiana (PACT en inglés) ²² ²³.

2.3. Terapia fotodinámica antimicrobiana

Este tipo de tratamiento ofrece una serie de ventajas frente a los tratamientos antimicrobianos tradicionales:

- 1) Amplio espectro de acción, ya que un mismo fotosensibilizante puede actuar frente a bacterias, hongos, virus y parásitos;
- 2) Eficacia independiente del patrón de resistencia antibiótica;
- 3) Posibilidad de desarrollar protocolos de TFD que permitan una amplia reducción de la población patógena con un daño muy limitado al tejido huésped;
- 4) La inactivación de los microorganismos fotosensibilizados es un proceso multi-diana, consecuencia de lo cual, por un lado la selección de cepas fotoresistentes es muy improbable y es un fenómeno por ahora no descrito.
- 5) Disponibilidad de formulaciones que permitan una liberación específica del fotosensibilizante al área infectada;
- 6) Uso de fuentes de luz de bajo coste para la activación del agente fotosensibilizante.
- 7) Compatibilidad con cualquiera de los tratamientos antibióticos o antimicóticos que se utilizan en la actualidad.

Los fármacos fotosensibilizadores o fotosensibilizantes deben poseer las siguientes propiedades:

- Absorción elevada en la parte roja del espectro ($> 600\text{nm}$) para asegurar una mayor penetración de la luz en la piel y así poder tratar infecciones internas.
- Rendimiento cuántico de formación de estado triplete elevado, así como un tiempo de vida de este estado triplete suficientemente largo para ser capaz de producir oxígeno singlete.
- Energía del estado triplete mayor que 94 kJ/mol , para poder fotosensibilizar al oxígeno singlete.
- Rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete también elevado.
- Elevada especificidad para asociarse a los microorganismos patógenos,
- Mínima toxicidad en ausencia de luz.
- Rápida eliminación del cuerpo para minimizar posibles efectos secundarios.
- Pureza química y síntesis versátil y económica.

La carga positiva en los fotosensibilizadores, o bien el uso de agentes permeabilizantes ²⁴⁻²⁵, como el EDTA o el PMBN, acentúan su afinidad por los agentes infecciosos con una estructura exterior compleja. Es deseable clínicamente el hecho de no tener que usar agentes químicos adicionales, motivo por el cual la vía de los fotosensibilizadores con carga ha adquirido una gran relevancia. Las estructuras actualmente más prometedoras son las basadas en los fotosensibilizadores cargados positivamente a valores de pH fisiológicos. Así, se han descrito ya algunos fotosensibilizantes con actividad fotodinámica antimicrobiana *in vitro* tanto frente a bacterias como frente a hongos ²⁶⁻²⁷⁻²⁸; En primer lugar se encuentran compuestos sintéticos no-porfirínicos, como los colorantes fenotiacínicos, entre los que se incluye el azul de metileno y sus derivados. En segundo lugar moléculas macrocíclicas como las ftalocianinas y las porfirinas. Y por último un grupo de fotosensibilizantes naturales, entre los que se encuentra la hipericina, entre otros. De todas estas sustancias es el azul de metileno el que en este momento se está desarrollando más activamente para el tratamiento fotodinámico de úlceras infectadas mediante estudios en animales ²⁹.

No obstante lo anterior, la TFD todavía no tiene ninguna indicación clínica antimicrobiana aprobada y su aplicación es anecdótica. Así, en los últimos años se han publicado casos aislados de diversas infecciones tratadas empíricamente mediante TFD con diferentes FSs con prometedores resultados: tiñas de piel lampiña ³⁰, candidiasis ³¹, úlceras y tumores con sobreinfección bacteriana ³²⁻³³, micobacterias ³⁴, parásitos ³⁵ e incluso ácaros ³⁶. Todo ello apunta a que la TFD puede tener un prometedor futuro en el tratamiento de las infecciones de la piel.

El uso de la TFD para uso antimicrobiano en la cavidad oral fue postulado por el Prof. Michael Wilson and colleagues ³⁷ en el *Eastman Dental Institute, University College* de Londres.

El azul de toluidina O (TBO), el azure B y el azul de metileno tienen un efecto bactericida sobre diversos gérmenes orales habituales, como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, y *Fusobacterium nucleatum* cuando se les expone a luz ¹⁰. Además, las bacterias orales en biofilms multi-especies pueden ser destruidas mediante el uso de TBO y luz roja ³⁸. Por último, el uso de lámparas de diodos emisores de luz (LEDs) y TBO indujo la muerte celular y la prevención de formación de biofilms de *S. mutans* ³⁹. Algunas bacterias anaeróbicas,

como *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, y *Capnocytophaga gingivalis* también pueden ser fotoinactivadas por este método utilizando clorina e6 y BLC 1010 como fotosensibilizantes ⁴⁰.

Por todo ello, la TFD ha demostrado ser una buena alternativa a los agentes antimicrobianos convencionales para eliminar las especies subgingivales y tratar la periodontitis ¹⁸. Asimismo, la TFD puede usarse para prevenir la caries dental mediante el ataque de los microorganismos de la placa dental fermentativos así como método mínimamente invasivo de eliminar las bacterias en la lesión de caries ⁴¹.

Recientemente se han comercializado 2 dispositivos de TFD para su uso en periodontitis: *Periowave* en Canadá, (<http://www.periowave.com>), consistente en un sistema laser que utiliza como fotosensibilizante el azul de metileno, otro kit que también utiliza una fenotiazina comercializado en Austria, Alemania, Suiza y Reino Unido (Helbo;Photodynamic Systems GmbH & Co. KG, Grieskirchen,Austria), y por último, Otras compañías incluyen kits con azul de toluidina O (Denfotex Ltd., Dexcel Pharma Technologies) ¹⁸. Hay una compañía que lo comercializa en España, se llama FotoSan y lo comercializa la casa Lasala dental.

El uso de la TFD en las infecciones orales aporta varios beneficios: su aplicación local, no invasiva; rápida muerte de las bacterias con cortas exposiciones al fotosensibilizante y a la luz; escasa probabilidad de desarrollo de resistencias, considerando la toxicidad genérica de la TFD mediante la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs); y la muerte de los gérmenes limitada al lugar de la irradiación y la difusión de las EROs.

El principal reto de la TFD antimicrobiana es encontrar la ventana terapéutica *in vivo* donde las bacterias y los hongos sean destruidos sin efectos citotóxicos en los tejidos sanos circundantes. Los valores de concentración bactericida mínima (CBM) de un fotosensibilizante adecuado (cfu/ml) *in vivo* para matar >99,9% de las bacterias debe ser menor que la concentración de fotosensibilizante necesario para destruir las células huéspedes donde asienta la infección, en este caso de la mucosa oral. En general, se puede conseguir la erradicación de los patógenos en condiciones de una irradiación menor (40-100 mW/cm²) que la utilizada en los procesos cancerosos, y con tiempos de incubación del fotosensibilizante más cortos, lo que garantiza una alta selectividad en comparación con los principales tejidos y células huéspedes de la piel, queratinocitos y fibroblastos. Sin embargo, los estudios para investigar el efecto de la TFD antimicrobiana en la cavidad bucal son escasos ⁴² e inexistentes en las mucosas.

Los microorganismos tienen grandes diferencias en cuanto a estructura celular y organización, lo que obviamente influye en la interacción de los fotosensibilizantes añadidos de forma exógena con los constituyentes celulares, determinando la eficiencia y el mecanismo del proceso de fotoinactivación²⁶. Por ello son de gran interés, los estudios comparativos de eficacia entre diferentes fotosensibilizantes en distintos agentes infecciosos (bacterias y hongos) que ayuden a establecer su uso preferente en unas infecciones frente a otras²². Es decir, estudios que nos permitan seleccionar qué fotosensibilizante funciona mejor en cada una de las infecciones sean bacterianas o fúngicas. Por otro lado, la mayoría de los trabajos publicados se han realizado *in vitro*, mientras que los estudios en animales de experimentación, paso previo para su uso en humanos, son muy escasos²⁹.

Por último, la aplicación tópica del fotosensibilizante en la TFD necesita de una formulación apropiada, según las características del mismo, para alcanzar los microorganismos en la cavidad y la mucosa oral. Por ello se requieren formulaciones apropiadas, vehículos especialmente adhesivos a la mucosa oral y al esmalte dental esenciales en la penetración y/o acumulación de estos fotosensibilizantes⁴³.

La Hipericina

La hipericina (HYP) es un metabolito secundario estructuralmente pertenecen a la clase química de naphthodianthronas y tiene los componentes característicos del género *Hypericum* (Clusiaceae). Las plantas de este género desarrollado (que comprende aproximadamente 450 especies) están ampliamente distribuidas en todo el mundo y se han utilizado desde la antigüedad para una serie de propiedades medicinales⁴⁴, por vía externa como astringente, antiséptico y cicatrizante y por vía oral como tratamiento de las alteraciones del sueño y la depresión (300-900 mg de extrato al día). Más recientemente, se ha conocido su efecto antimicrobiano frente a bacterias, hongos y virus⁴⁵⁻⁴⁶⁻⁴⁷. La hipericina se aisló por primera vez de *Hypericum perforatum* L., que es el representante más importante y reconocido en el comercio de este género. *H. perforatum*, conocido comúnmente como hierba de San Juan⁴⁸, es una hierba aromática, perenne que crece hasta 1 m de altura. Sus hojas se caracterizan por la presencia de glándulas de aceite. Las flores son de color amarillo brillante, naranja, mientras que el cáliz y la corola están marcados con numerosos puntos negros glandulares⁴⁴. Es bien sabido que dicha planta, además de tener efectos beneficiosos

como antidepresivo y en la cicatrización de heridas, es también responsable de inducir problemas de fotosensibilidad; este hecho corroboraba la idea de que existen sustancias fotoactivas en este tipo de plantas ⁴⁹. Más tarde se comprobó que la hipericina, por si sola, podría utilizarse en TFD como fotosensibilizante, donde se podría aplicar su capacidad de combinación con luz visible y oxígeno molecular para provocar la muerte de células seleccionadas ⁵⁰⁻⁵¹.

Dadas sus propiedades fotoactivas y su baja genotoxicidad se han estudiado sus aplicaciones en el fotodiagnóstico por fluorescencia y en TFD, especialmente en tumores cutáneos ⁵²⁻⁵³⁻⁵⁴. Existen escasos estudios acerca de su poder antibacteriano con resultados contradictorios ⁵⁵.

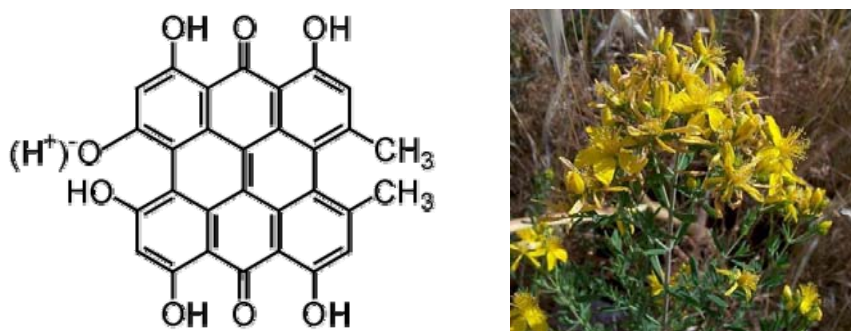


Figura 2. *Hypericum perforatum* o Hierba de San Juan y la molécula de hipericina, su principal principio activo.

Azul de metileno

El azul de metileno (MB), un colorante aprobado por la FDA, es una fenotiacina cuyas moléculas anfipáticas son tricíclicos planos que poseen un átomo de nitrógeno cuaternario intrínseca y tienen una eficiencia fototóxica contra una amplia gama de microorganismos ⁵⁷. Se utiliza generalmente para tratar la metahemoglobinemia y ha sido utilizado con éxito para teñir y visualizar la metaplasia intestinal en el esófago de Barrett y en el estómago para guiar la biopsia endoscópica. Es barato y está disponible rutinariamente en las farmacias. MB es también bien conocido por ser fotodinámicamente activo. Varios estudios han demostrado que la TFD mediada por MB (MB-PDT) efectivamente puede inactivar los virus y destruir las bacterias. Además,

MB-TFD ha demostrado ser eficaz en la destrucción de los tumores en ratones. En los seres humanos, MB-PDT se ha utilizado para el tratamiento de tumores superficiales de vejiga, carcinomas de esófago, el melanoma, y el sarcoma de Kaposi, sin efectos tóxicos reportados. Debido a que está bioquímicamente modificado a una forma incolora, hay poca o ninguna fotosensibilidad sistémica asociada con MB ⁵⁸. Tiene un espectro de absorción de luz a 665 nm, es eficaz en la PDT, mostrando capacidad de generar ¹O₂. Incluso sin luz, tiene una actividad antifúngica y antibacteriana natural cuyo potencial tóxico puede ser aumentado por la activación de la luz ⁵⁹.

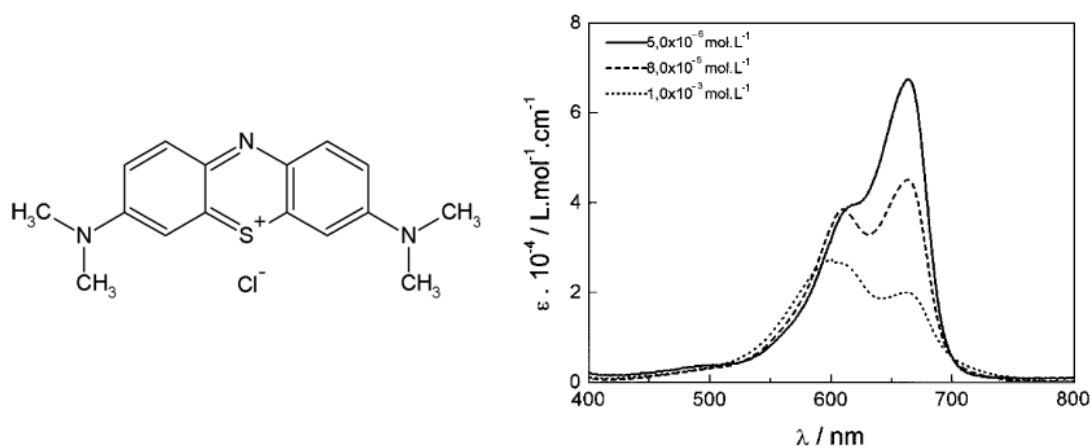


Figura 3: Fórmula química y el espectro de absorción del azul de metileno.

3. Material y Métodos:

3.1. Material

3.1.1 Cepa del estudio

Bacterias:

- *S. mutans* (ATCC 35668)
- *S. sanguis* (ATCC 10556)

Levaduras:

Candida albicans American Type Culture Collection; Rockville, MD, USA (ATCC) 10231

Cepas resistentes:

- *C. albicans* (456325H)
- *C. albicans* (AZN-4635)
- *C. albicans* (AM0Z 0267)

Células:

- queratinocitos humanos (HaCaT)
- fibroblastos humanos normales (hNDF)

3.1.2. Fotosensibilizantes (FSs):

- Hypericin from *Hypericum perforatum* 95% (HPLC) *SIGMA*.
- Methylene blue *SIGMA*.

3.1.3. Reactivos y disolventes:

- Tampón PBS *BIO-RAD*
- Aqua ad Iniectionem *MEINSOL* (agua destilada y desionizada).
- Sabouraud Dextrose Agar CM0041 *OXOID*.
- Columbia Agar Sangre *OXOID*.
- Alcohol etílico a 70° *ALCOHOCEL*
- Cloramfenicol *SIGMA*
- Medio DMEM, FBS 10%, con antibiótico. *Dulbecco's*

3.1.4. Sondas inmunofluorescentes:

- Cell tracker green 1000 μ M (Tinción celular general) *Invitrogen* (Molecular Probes).
- Mitotracker (Tinción de mitocondrias) *Invitrogen* (Molecular Probes).
- DAPI (Tinción nuclear) *Invitrogen* (Molecular Probes).
- DIOC (Tinción de mitocondrias) *Invitrogen* (Molecular Probes).
- Lisotracker (Tinción lisosomas) *Invitrogen* (Molecular Probes).

3.1.5. Instrumentación:

- Lámpara de diodos ámbar, con pico de emisión a 602 ± 10 nm; 37J/cm², 10,3 mW/ cm².
- Lámpara de diodos de luz roja, con pico de emisión a 590 ± 10 nm; 19 mW/ cm².
- Lámpara de halogenuro metálico de luz blanca, con espectro de emisión entre 420 a 700 nm.
- Colorímetro con escala McFarland *DINKO*
- Asa de siembra *Digraski*
- Campana de flujo laminar *Telstar BIO II A*.
- Placas de cultivo *STERILIN*.

3.1.6. Microscopios utilizados

- Microscopio confocal espectral Leica TCS SP2 AOBS;
- Microscopio confocal compacto Olympus FV10i OilTypeambos de la Unidad de Microscopia e Imagen del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (para los estudios de localización del FS).
- Sistema de microscopía multidimensional con control en tiempo real Leica AF6000 LXde la Unidad de Microscopia e Imagen del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.
- Microscopio Olympus BX61 acoplado a una cámara de captura digital Olympus DP50 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, departamento de biología.

3.2. Métodos

3.2.1. Tratamiento fotodinámico

3.2.1.1. Preparación de las siembras de cada germen:

Las siembras de *S. mutans* y *S. sanguis* se realizó partiendo de un liofilizado comercial. *C.albicans* fue proporcionada por Dr Meis del Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen, The Netherlands. Fueron previamente cultivados y archivados en leche descremada conservándose a una temperatura de -80°C. La resiembra a partir de los archivos se realizó mediante el método de siembra por agotamiento.

3.2.1.2. Preparación inóculo para levaduras:

Se realizó un cultivo del género *Candida* en agar Sabouraud-cloranphenicol (SBC), se incubó 24 horas a 35°C. A partir del cultivo se realizó un inóculo de 4 McFarland (McF) debido a que queremos disminuir 6 unidades logarítmicas (unid. log.). y necesitamos un mínimo de 10^6 células. Estas medidas se realizaron con el espectrofotómetro.

3.2.1.3. Preparación inóculo para bacterias:

Se realizó el cultivo del género *Streptococcus* spp utilizando un medio de agar sangre Columbia, posteriormente, se incubó 24 horas a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂. De esa resiembra se utiliza para realizar el inóculo, a 0.5 McFarland, medidas que se realiza con el espectrofotómetro.

3.2.1.4. Realización ensayos

Se coge una placa microtiter de 96 pocillos en la que en cada pocillo se inocula con 90µL de la suspensión del inóculo y se le añade diferentes cantidades de disolución de los diferentes FSs para obtener las diferentes concentraciones deseadas, una vez echado todas las cantidades del FS se rellena el pocillo hasta 100µL con agua. Una vez

finalizado este paso se agita bien cada pocillo para que se mezcle y haya un mejor contacto microorganismo-fotosensibilizante.

3.2.1.5. Irradiación

Una vez han sido preparados los diferentes pocillos en la placa microtiter se procede al proceso de irradiación. Los distintos microorganismos serán expuestos a una lámpara de diodos de longitud de onda adecuada (590 ± 10 nm para la hipericina y 630 ± 10 nm para las fenotiacinas). La dosis de luz administrada irá de 0 a 37 J/cm^2 . Para conseguir esta dosis de luz se colocarán las lámparas a una distancia de 5 cm sobre la placa microtiter variándose el tiempo para conseguir la fluencia deseada, 30 y 60 minutos respectivamente para administrar 18 y 37 J/cm^2 en el caso de la hipericina y 15 y 30 minutos respectivamente en el de las fenotiacinas.

3.2.2. Medición de la fotoinactivación producida con los distintos fotosensibilizantes

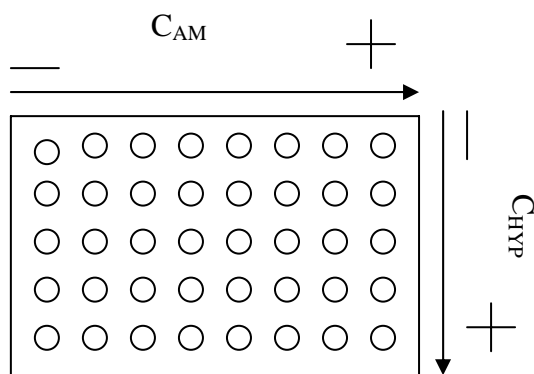
Terminado el proceso de irradiación de las muestras, se procede a la siembra de las mismas en las placas de siembra. Para establecer el daño fotodinámico, la viabilidad de los gérmenes se estudiará por su capacidad de formar colonias tras la TFD subcultivándolas en diferentes medios dependiendo del microorganismo. Se hará un recuento de número de colonias obtenido, comparándolas con el número obtenido en las placas de control: antes de la irradiación incubadas con FS y no iluminadas, no incubadas con FS e iluminadas y no incubadas con FS ni iluminadas. El recuento se hará tras la incubación, dependiendo de la especie (24h *S. sanguis* y 48 horas las levaduras y *S. mutans*).

Para medir el efecto bactericida o fungicida tiene que haber una disminución de 6 unidades logarítmicas que significa que el fotosensibilizante mata al $> 99,9999\%$ de las células. Los experimentos se realizarán por triplicado.

3.2.3. Fotoinactivación combinada usando 2 fotosensibilizantes

En la placa de microtiter de 96 pocillos, se quiere realizar la combinación de dos fotosensibilizantes y por ello se va a llevar a cabo de forma de “tablero de ajedrez” adaptado.

Arriba se hace un barrido de concentraciones de un fotosensibilizante, las concentraciones van de menor a mayor, de izquierda a derecha (fila), el otro FS se utiliza el mismo criterio pero de arriba abajo (columna).



Al rellenar los pocillos se echan las cantidades por columnas o por filas por tanto todo los pocillos de la placa tendrán una concentración diferente de cada fotosensibilizante. Una vez finalizado este paso se agita bien cada pocillo para que se mezcle y haya un mejor contacto microorganismo-fotosensibilizante y se irradia. Los distintos microorganismos serán expuestos a una Lámpara de halogenuro metálico de luz blanca, con espectro de emisión entre 420 a 700 nm. La dosis de luz administrada irá de 0 a 37 J/cm². Para conseguir esta dosis de luz se colocará la lámpara a una distancia de 10cm sobre la placa microtiter variándose el tiempo para conseguir la fluencia deseada, 3min 20s y 6min 51s respectivamente para administrar 18 y 37 J/ cm².

3.2.4. Localización de fotosensibilizante en el germen:

Los experimentos se realizaron en el hospital Lozano Blesa, utilizando técnicas de microscopía confocal bajo la supervisión de la Dra. María Royo. Estudio de la localización celular de hipericina en *Candida* spp.

El objetivo de este experimento fue comprobar que la hipericina penetra en el interior de las células de levaduras mediante estudios de coalescencia con fluoróforos intracelulares con longitudes de onda de emisión diferentes a la de la propia hipericina. Además se intentó determinar en qué lugar de la célula se localiza dicho FS mediante el uso de marcadores mitocondriales y nucleares.

Este estudio no se pudo realizar en bacterias con los medios de los que disponemos dado su pequeño tamaño debido al que tamaño oscila entre 0.7 y 0.9 μm de diámetro comparado con las medidas de *Candida* que se encuentran entre los 2-4 μm o las de fibroblastos o queratinocitos que pueden oscilar de 7-10 μm . La resolución del microscopio no era la adecuada.

3.2.4.1. Localización de hipericina en levaduras

Se realizó un estudio de co-localización de hipericina con MTG (MitoTracker Green) y Dapi en *Candida albicans* ATCC 10231.

1- Marcaje con Hipericina.

- Se mezcla el inóculo preparado en PBS con un stock de hipericina a una concentración de 5000 μM , para conseguir una concentración final de HYP de 5 μM
- Se incuba 24h a 35°C y a oscuridad.
- Se toma 3 eppendorfs y en cada uno de ellos, poner 1 ml de la suspensión incubada.
- Centrifugar 5' a 10.000 rpm; retirar sobrenadante y resuspender en 1ml en SBL en dos y el otro restante en PBS. (Todo en oscuridad).

Habrán 3 tubos para:

- 1- Levadura en SBL +5 μM de MTG.
- 2- Levadura en SBL + 1000 nM de MTG.
- 3- Levadura en PBS + 1000 nM de MTG

2- Marcaje con MTG y lavados:

Se procede hacer una dilución de MTG 100 μ M partiendo de la de 1000 μ M. A esa dilución la llamaremos Dmt y a la de 1000 μ M DMT.

Centrifuga 5' a 10.000 rpm; retirar sobrenadante y resuspender cada pellet, bien en PBS, bien en SBL (Cada uno con lo que corresponda).

- Tubo 1: añadir 5 μ l de DMT + 995 μ l de SBL.
- Tubo 2: añadir 1 μ l de Dmt + 999 μ l de SBL.
- Tubo 3: añadir 5 μ l de Dmt + 999 μ l de PBS.

3- Incubación

Se incuban a 35°C durante 40 minutos y oscuridad.

4- Lavados

- Centrifugación 5' a 10.000rpm; retirar sobrenadante y resuspender en 1000 μ l de SBL o PBS.
- Centrifugación 5' a 10.000rpm; retirar sobrenadante y resuspender en 1000 μ l de suero fisiológico.
- Centrifugación 5' a 10.000rpm; retirar sobrenadante y resuspender en 1000 μ l de SBL o PBS.
- Centrifugación 5' a 10.000rpm; retirar sobrenadante.

5- Toma de muestra y montaje

- Incubación con PFA 3% (paraformaldehído) 300 μ l por tubo, 15 minutos a 35°C y oscuridad.
- Centrifugación 5' a 10.000rpm; retirar el PFA.
- Lavar con 500 μ l de agua destilada (x2), centrifuganco y retirando el sobrenadante.
- Los últimos 500 μ l de agua se vortean y se llevan a las microtitter-plates.
- Centrifugar las placas 30 minutos a 3000rpm las placas.

- Retirar los cubres y ponerlos sobre un porta que contendrá 5 μ l de moviol con 5 μ M de DAPI.
- Sellar con pintañas.

6- Tratamiento de los cubres previo al pegado de células

- Se depositan los cubres en una placa microtiter y se rocian con 100 μ l de polilisina.
- Dejar que la polilisina se adhiera a los cubres.
- Se retira la polilisina y se lava con agua (x2).
- Se retira el agua y se dejan secar los cubres al aire.

3.2.5. Estudio de la toxicidad de la TF con hipericina sobre queratinocitos y fibroblastos:

La viabilidad de las células HaCaT y hNDF tras el tratamiento con hipericina se estudiará mediante el ensayo MTT para establecer los efectos adversos de dicho tratamiento sobre las células sanas de la mucosa oral. Células (típicamente a una concentración 10^6) se cultivarán en microplacas de 48 pocillos a 37°C y 5% CO₂ usando DMEM (FBS 10% v/v, L-glutamina 2mM, Penicilina estreptomicina 1% v/v) como medio de cultivo. Después de lavar con PBS, se incubarán con concentraciones crecientes de hipericina: 0.5, 1, 5 and 10 μ M) y se irradiarán con una lámpara de LEDs de 590 nm durante, 30 y 60 minutos, correspondiente a dosis de luz de 18 and 37 J·cm⁻², respectivamente²⁸. Las células entonces se lavarán con PBS se eliminará cualquier exceso de hipericina y se realizará el ensayo MTT a las 24 h. La toxicidad en oscuridad y la toxicidad de la luz serán los controles del experimento en las mismas condiciones

3.2.6. Localización de fotosensibilizante en fibroblastos y queratinocitos

3.2.6.1. Traspaso celular y preparación de placas.

Se trabaja en campana estéril (etanol 70°, UV) y con flujo constante. La placa de 60 mm debe tener una confluencia de 70-80% de las células. Una vez tengamos esas condiciones se extrae el medio con una pipeta. Agregar 1ml de buffer PBS 1x, suavemente, evitando que se despeguen las células. Dejar 30 segundos, y retirar el buffer. Agregar 300 µl de tripsina 2.5% (diluida con 900 ul de PBS 1x) y dejar reposar 3-5 minutos dentro de la incubadora. Despegar las células de la placa dándole unos golpecitos y traspasar a placa de 6 pocillos para poder continuar con el experimento.

3.2.6.2. Localización en microscopio

Los experimentos se realizaron en la Universidad Autónoma de Madrid en la Facultad de Ciencias, utilizando técnicas de microscopía de fluorescencia bajo la supervisión de la Dra. Ángeles Juarranz.

Se realizó un cultivo de células de la piel a partir de una biopsia cutánea de piel normal obtenida de un voluntario sano. Las células se cultivaron en microplacas de 6 pocillos a 37°C y 5% CO₂ usando DMEM (FBS 10% v/v, L-glutamina 2mM, Penicilina estreptomicina 1% v/v) como medio de cultivo. Una vez la placa tuviese una confluencia al 70% se incubaron con concentraciones crecientes de hipericina 2 y 5 µM durante dos periodos de tiempo: 5 y 24 horas. Se utilizaron sondas para la inmunohistoquímica como el DIOC y Lisotracker a una concentración de 5 µM. Posteriormente se procedió a la observación microscópica y toma de imágenes. La microscopía de fluorescencia se realizó utilizando un microscopio Olympus BX61 acoplado a una cámara de captura digital Olympus DP50.

4. Resultados

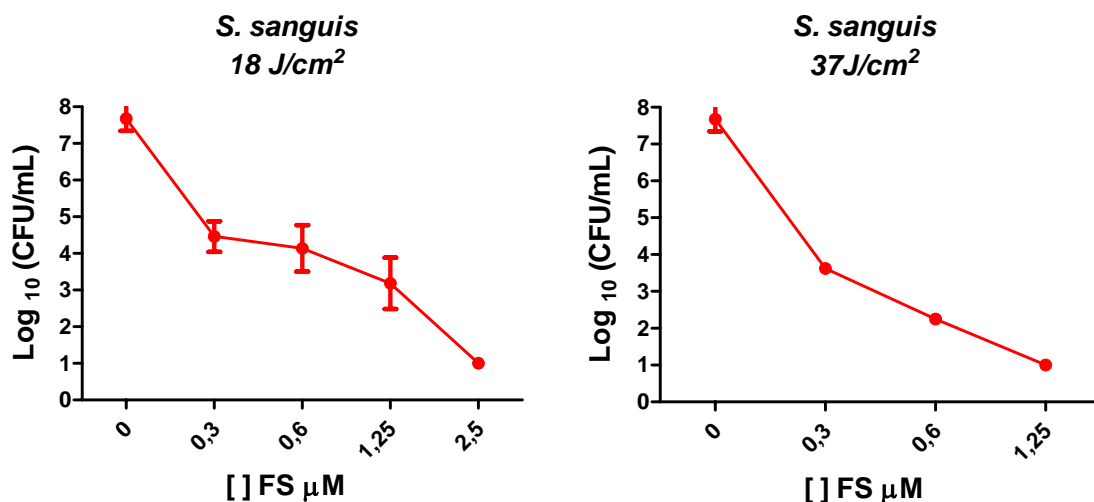
4.1. Fotoinactivación de microorganismos con hipericina

La hipericina consiguió una eficaz fotoinactivación de todos los gérmenes estudiados, aunque las concentraciones y fluencias para conseguirlo fueron diferentes y se exponen a continuación.

4.1.1. *S. sanguis*

- Para una fluencia de 18 J/cm² se necesita una concentración de 2,5 µM de hipericina para reducir 6 unds. Log. con respecto al inóculo inicial.

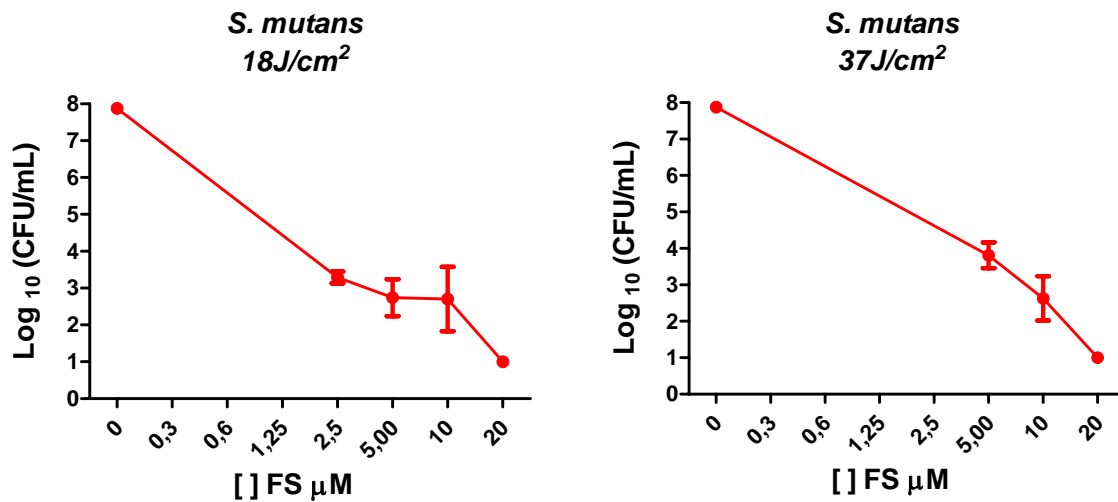
- Para una fluencia de 37 J/cm² se precisa de una concentración de FS de 1,25µM para reducir 6 und. Log.



4.1.2. *S. mutans*:

- Para una fluencia de 18 J/cm² se necesita una concentración de 20 µM de hipericina para reducir 6 unds. Log. con respecto al inóculo inicial.

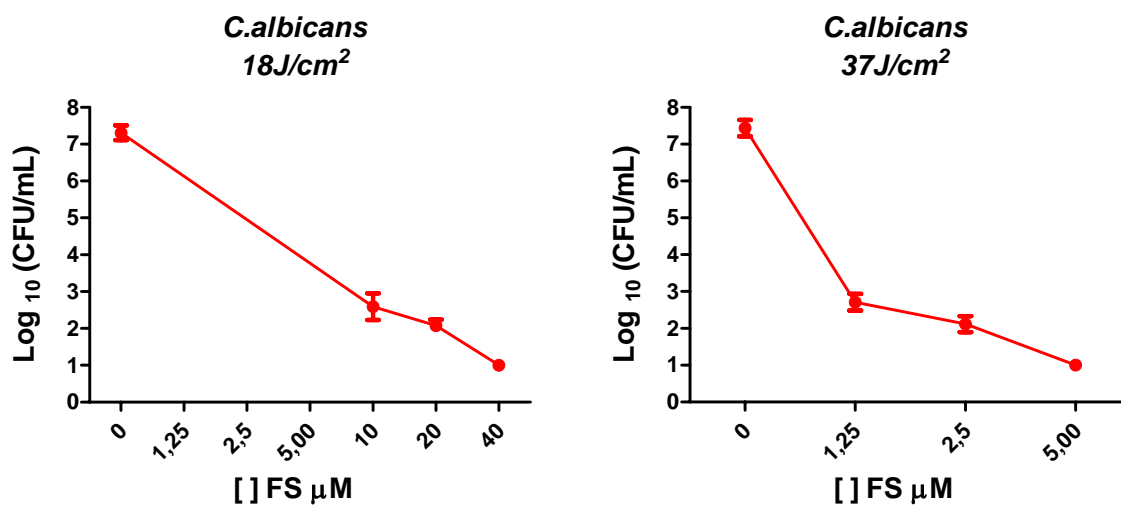
- Para una fluencia de 37 J/cm² se precisa de una concentración de FS de 20 µM para reducir 6 und. Log.



4.1.3. C. albicans ATCC:

- Para una fluencia de 18 J/cm² se necesita una concentración de 40 µM de hipericina para reducir 6 unds. Log. con respecto al inóculo inicial.

- Para una fluencia de 37 J/cm² se precisa de una concentración de FS de 5 µM para reducir 6 und. Log.

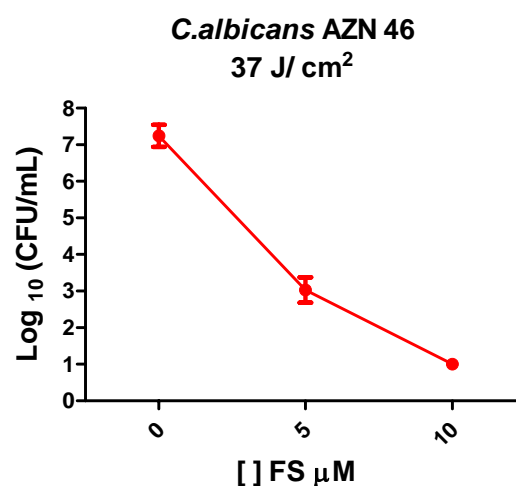
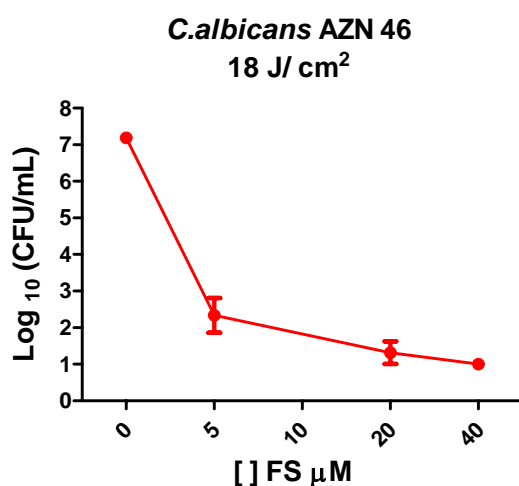


4.1.4. *C.albicans* resistentes:

4.1.4.1. *C. albicans* AZN-4635:

- Para una fluencia de 18 J/cm² se necesita una concentración de 40 µM de hipericina para reducir 6 unds. Log. con respecto al inóculo inicial.

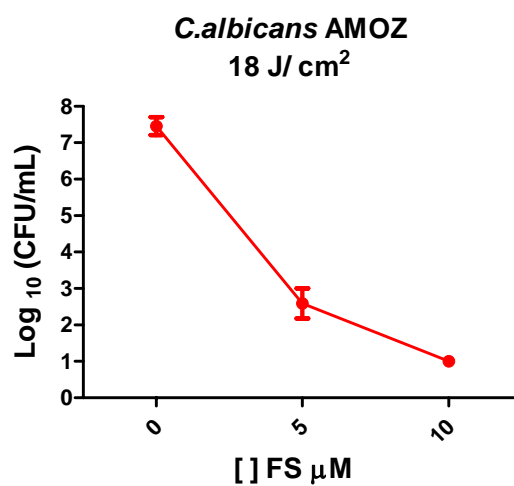
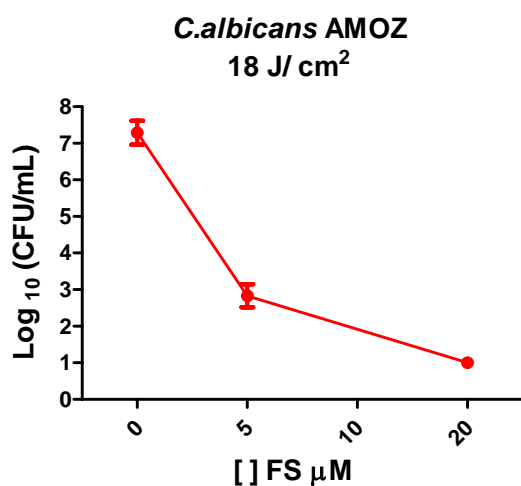
-Para una fluencia de 37 J/cm² se precisa de una concentración de FS de 10 µM para reducir 6 und. Log.



4.1.4.2. *C. albicans* AMOZ-0267:

- Para una fluencia de 18 J/cm² se necesita una concentración de 20 µM de hipericina para reducir 6 unds. Log. con respecto al inóculo inicial.

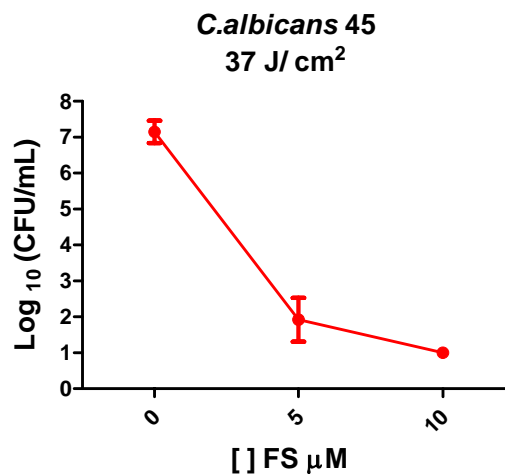
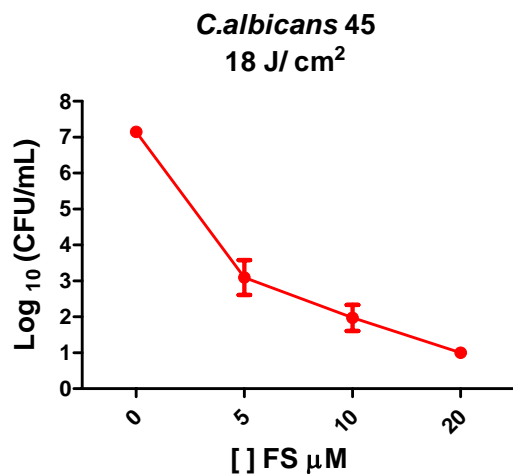
-Para una fluencia de 37 J/cm² se precisa de una concentración de FS de 10 µM para reducir 6 und. Log.



4.1.4.3. *C. albicans* 456325H:

- Para una fluencia de 18 J/cm² se necesita una concentración de 20 μM de hipericina para reducir 6 unds. Log. con respecto al inóculo inicial.

-Para una fluencia de 37 J/cm² se precisa de una concentración de FS de 10 μM para reducir 6 und. Log.



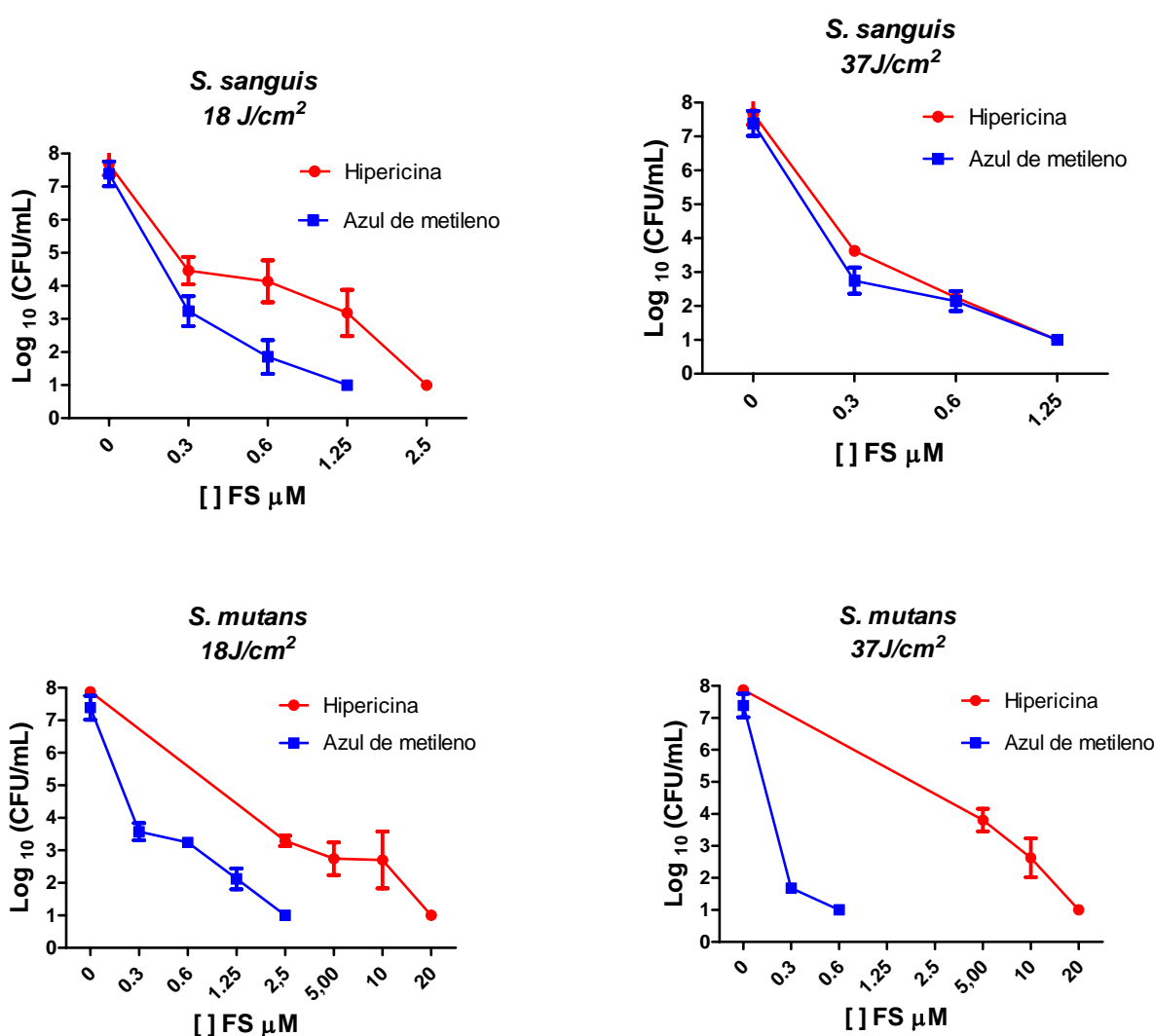
4.2. Comparación de la fotoinactivación de HYP frente a AM

En este apartado se compara la eficacia fotoinactivadora de la HYP con respecto a AM, uno de los fotosensibilizantes más utilizados, junto al azul de toluidina, en TFD antimicrobina de cavidad oral en la literatura.

4.2.1. *S. sanguis* y *S. mutans*

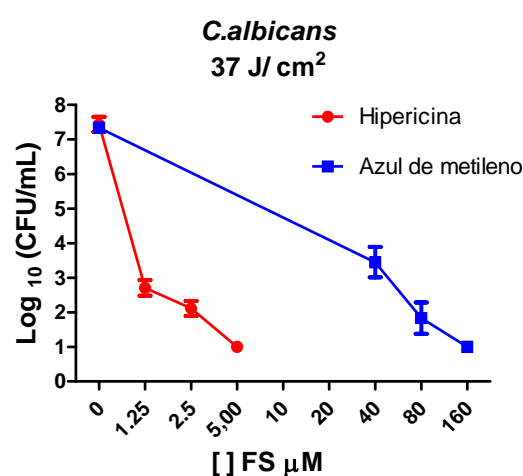
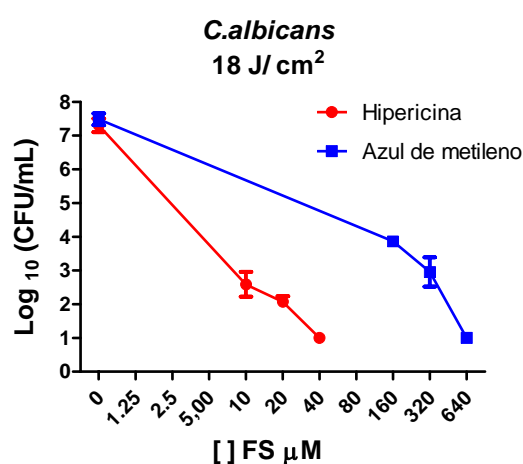
Tal y como se observa en las gráficas, el AM consigue fotoinactivar a *S. sanguis* y *S. mutans* con concentraciones inferiores a las de HYP. Esta diferencias son más notorias en el caso de *S. mutans* que en *S. sanguis*. Así, mientras que la concentración de HYP que produce la disminución de 6 unds. Log. es $2,5\mu\text{M}$, a 18 J/cm^2 $1,25$ a 37 J/cm^2 en *S. sanguis* y para *S. mutans* tanto a 18 J/cm^2 como a 37 J/cm^2 es $20\mu\text{M}$.

, en el caso del AM estas concentraciones son tan sólo de $1,25\mu\text{M}$ a 18 J/cm^2 para *S. sanguis* y $2,5\mu\text{M}$ *S. mutans*, y de $1,25$ y $0,6\mu\text{M}$ a 37 J/cm^2 para *S. sanguis* y *S. mutans* respectivamente.



4.2.2. *C. albicans* ATCC

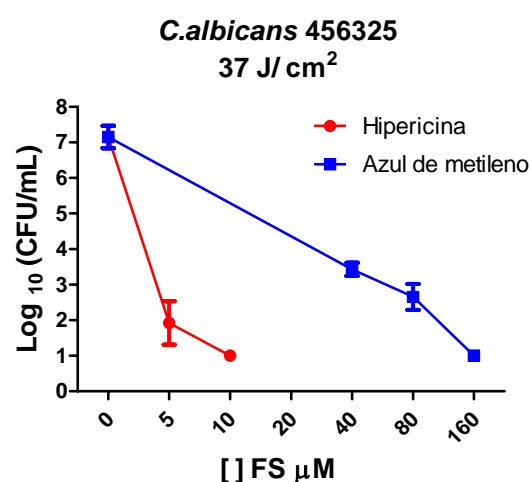
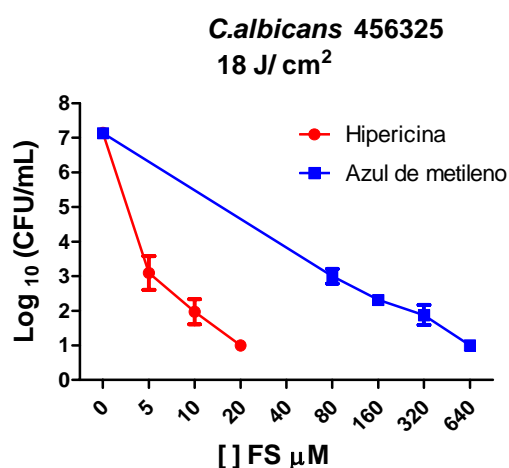
En *C. albicans* ATCC tanto a 18 J/cm² como a 37 J/cm², la concentración de HYP es menor para disminuir las 6 unds. Log. que la concentración de AM. Así, la concentración de HYP que produce la disminución de las 6 unds. Log. es 40 μM a 18 J/cm² y 5 μM a 37 J/cm², mientras que la concentración de AM es 640 μM a 18 J/cm² y 160 μM a 37 J/cm².



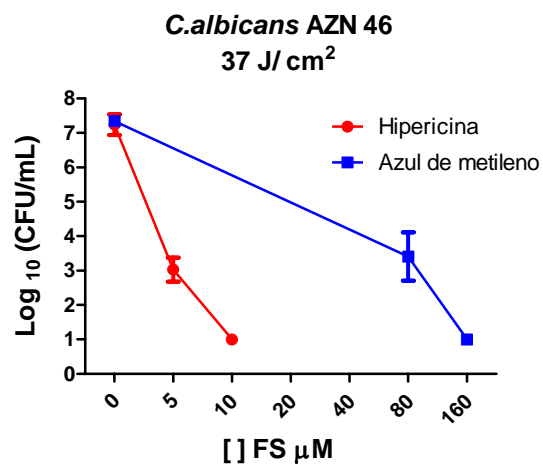
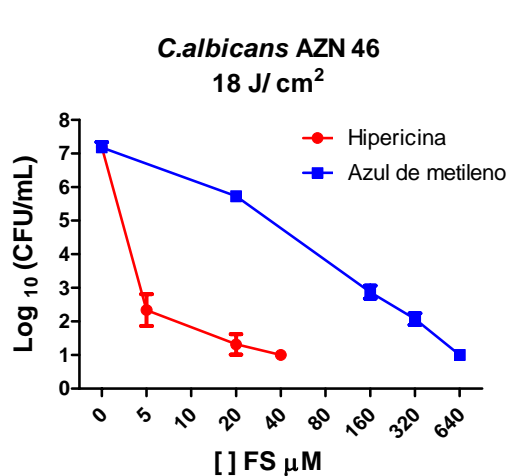
4.2.3. *C. albicans* resistentes

En *C. albicans* resistentes, al igual que ocurre en la especie sensible, las concentraciones de HYP necesarias para su fotoinactivación son menores que las de AM, tanto a 18 J/cm² como a 37 J/cm².

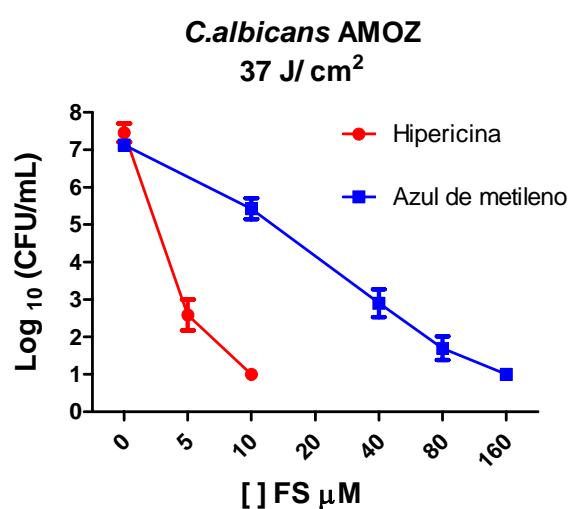
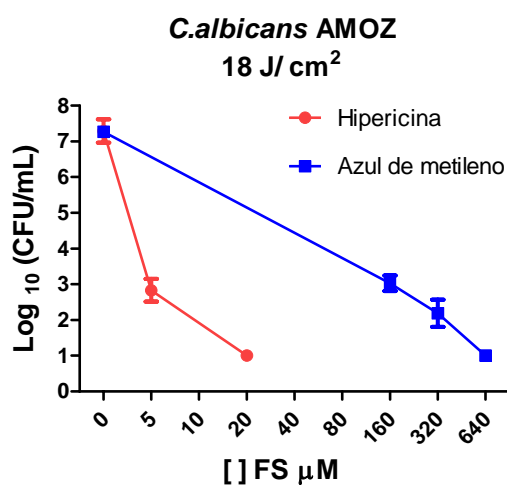
• 4.2.3.1. *C. albicans* 456325



• 4.2.3.2. *C.albicans* AZN-4635



• 4.2.3.3. *C.albicans* AMOZ-0267



En *Candida albicans* 456325 la concentración de HYP que produce la disminución de las 6 unds. Log. es 20 μM a 18 J/cm² y a 37 J/cm² 10 μM . La concentración de AM que produce la disminución de las 6 unds. Log. es 640 μM a 18 J/cm² y a 37 J/cm² 160 μM .

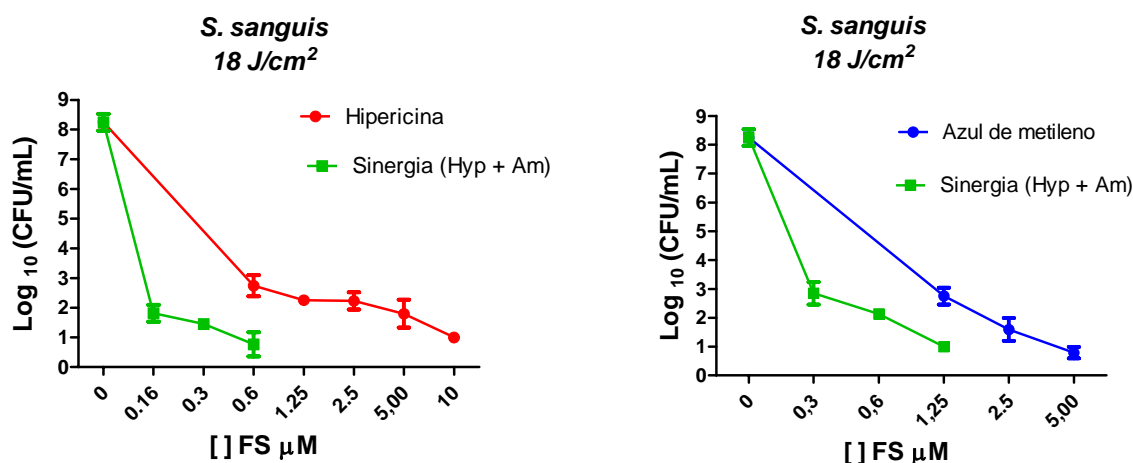
En *Candida albicans* AZN-4635 la concentración de HYP que produce la disminución de las 6 unds. Log. es 40 μM a 18 J/cm^2 y a 37 J/cm^2 10 μM . La concentración de AM que produce la disminución de las 6 unds. Log. es 640 μM a 18 J/cm^2 y a 37 J/cm^2 160 μM .

En *Candida albicans* AM0Z-0267 la concentración de hipericina que produce la disminución de las 6 unds. Log. es 20 μM a 18 J/cm^2 y a 37 J/cm^2 10 μM . La concentración de azul de metileno que produce la disminución de las 6 unds. Log. es 640 μM a 18 J/cm^2 y a 37 J/cm^2 160 μM .

4.3. Fotoinactivación de la combinación de HYP y el AM.

Se realizó estos experimentos con la Lámpara de halogenuro metálico de luz blanca, con espectro de emisión entre 420 a 700 nm. Y por tanto los resultados obtenidos son diferentes a los presentados anteriormente.

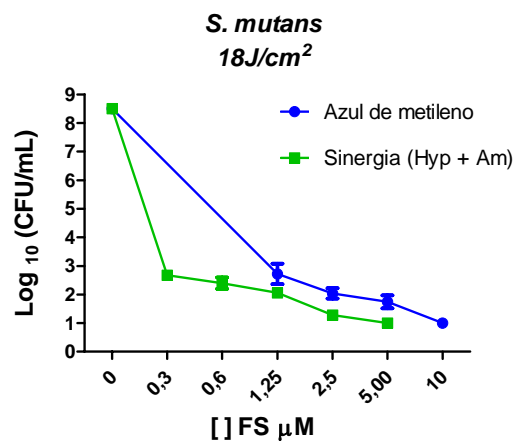
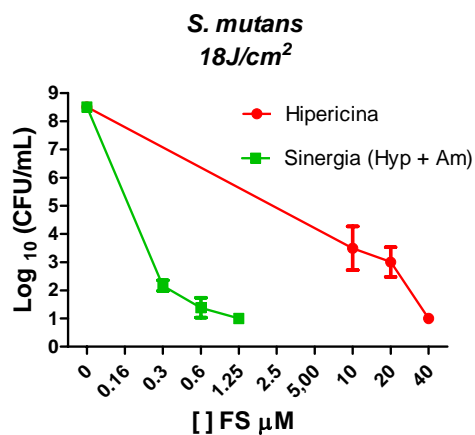
4.3.1. *S. sanguis*



En *S. sanguis* la concentración de HYP que produce la disminución de las 6 unds. Log. es 10 μM a 18 J/cm^2 . La combinación con AM hace que esta concentración se reduzca a 0,6 μM .

La concentración de AM que produce la disminución de las 6 unds. Log. es 5 μM a 18 J/cm^2 , mientras que la combinación con hipericina la reduce a 1,25 μM .

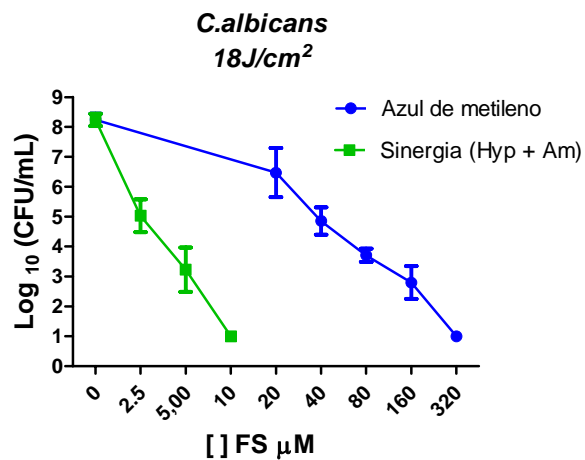
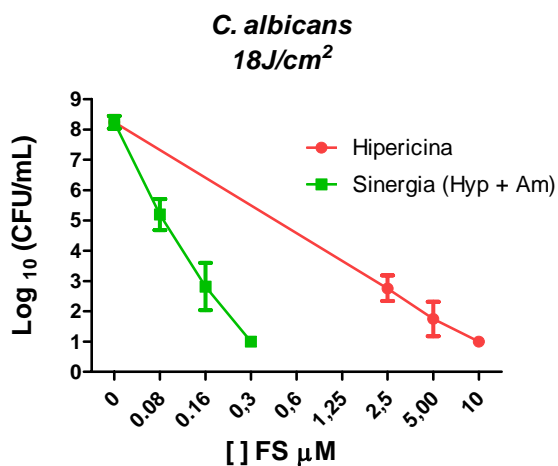
4.3.2. *S. mutans*



En *S. mutans* la concentración de HYP que produce la disminución de las 6 unds. Log. es 40 μM a 18 J/cm². La combinación con AM reduce dicha a 1,25 μM

La concentración de AM que produce la disminución de las 6 unds. Log. es 10 μM a 18 J/cm², mientras que su combinación con HYP la reduce a 5 μM .

4.3.3. *Candida albicans* ATCC

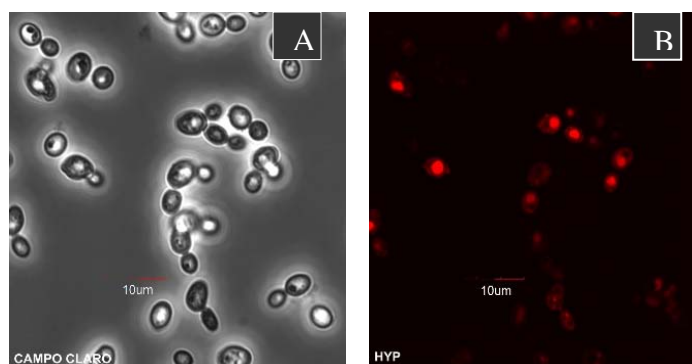


En *C. albicans*, la concentración de HYP que produce la disminución de las 6 unds. Log. es $10\mu\text{M}$ a 18 J/cm^2 . La combinación con AM reduce esta concentración a $0,3\mu\text{M}$.

La concentración de AM que produce la disminución de las 6 unds. Log. es $320\mu\text{M}$ a 18 J/cm^2 , mientras que su combinación con HYP la reduce a $10\mu\text{M}$.

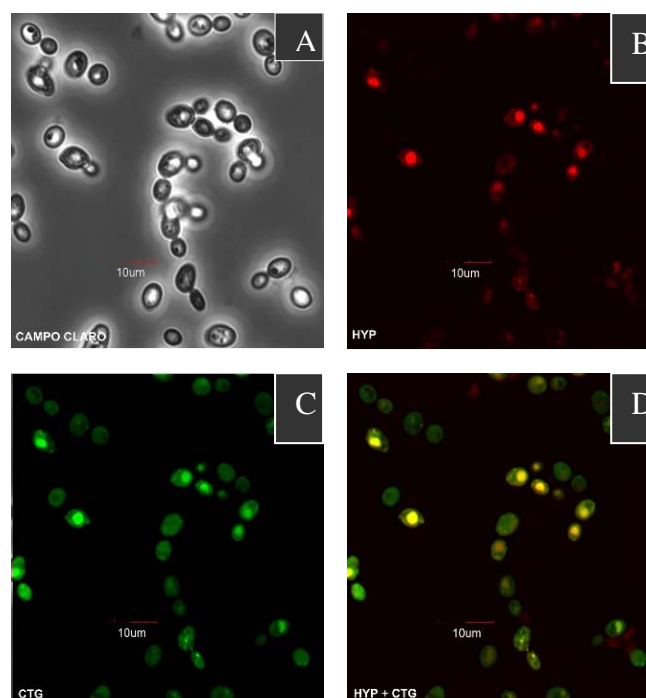
4.4. Localización celular de hipericina en *Candida* ATCC 10231

4.1. Unión de HYP a *C. albicans* ATCC 10231



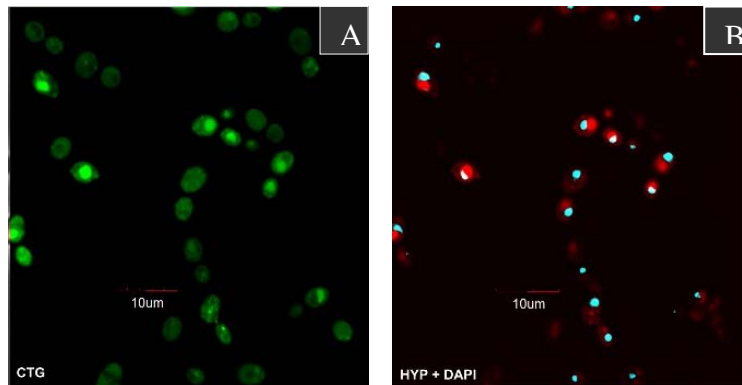
Imágenes con objetivo de 63x: A) *C. albicans* en campo claro, B) *C. albicans* +HYP

4.2. Demostración de la entrada de HYP en *C. albicans* ATCC 10231 por coalescencia con cell-trackergreen:



Imágenes con objetivo de 63x: A) *C. albicans* en campo claro, B) *C. albicans* C) *C. albicans* + CTG, D) *C. albicans* + HYP + CTG.

4.3. Demostración de la no entrada de HYP en el interior del núcleo de las levaduras por la no co-localización con DAPI:

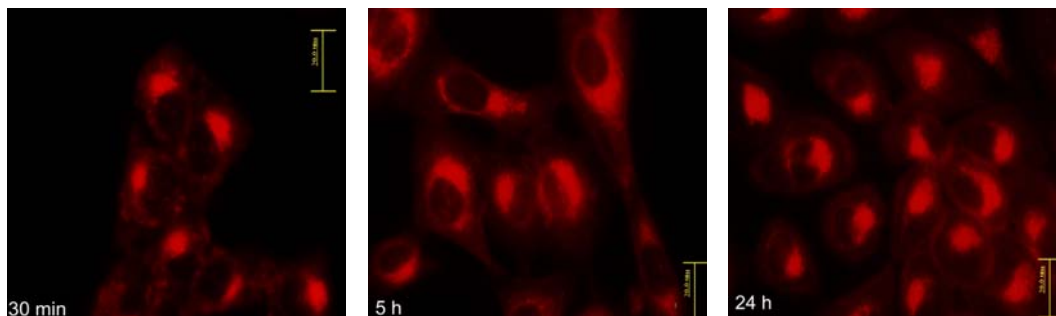


Imágenes con objetivo de 63x: A) *C. albicans*+ CTG, B) *C. albicans* +HYP + DAPI

Mediante estas fotos se observa como el HYP penetra en el interior de la levadura aunque parece no colocarse con DAPI, marcador del núcleo.

4.5. Localización celular de hipericina en células humanas

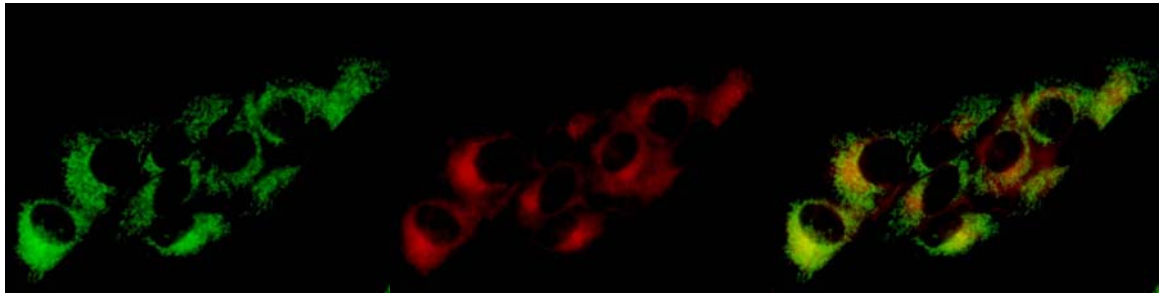
4.5.1. Barrido de tiempos de incubación en fibroblastos:



Se observa que la hipericina está en el interior de los fibroblastos. Desde el inicio de la incubación como se ve en la imagen tras 30 minutos y hasta las 24 horas Se puede

observar que la hipericina se distribuye por el citoplasma y sobre todo alrededor del núcleo.

4.5.2. Demostración co-localización HYP + DIOC e HYP + Lisotracker

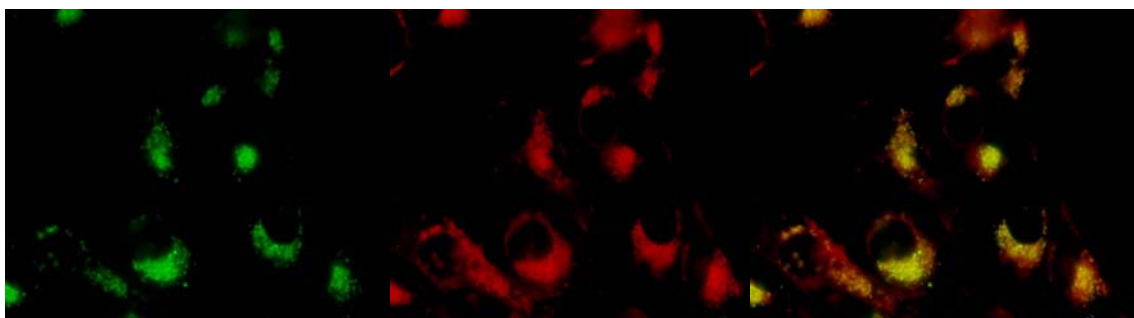


HaCat + DIOC

HaCat + HYP

HaCat + DIOC + HYP

La primera imagen es el control de la localización del DIOC en queratinocitos que se puede ver una localización por el citoplasma en gránulos, en la siguiente foto se puede apreciar la localización de HYP que sobre todo se encuentra alrededor del núcleo y en la última se observa la co-localización de ambos.



HaCat + Lisotracker

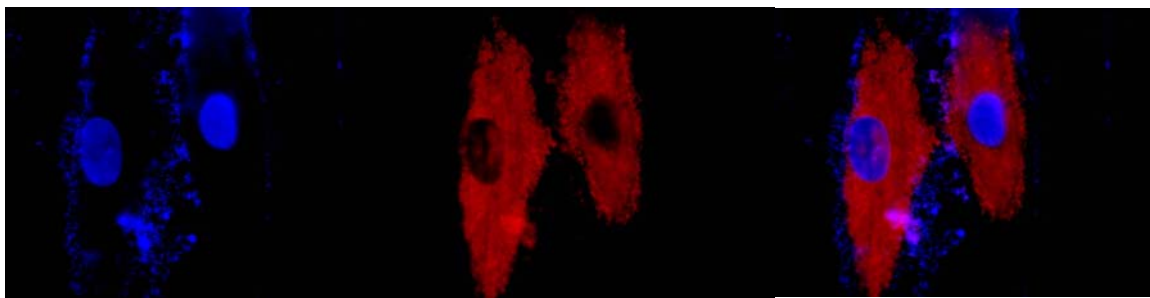
HaCat + HYP

HaCat + Lisotracker + HYP

En estas imágenes, en la primera se puede apreciar la distribución del control del Lisotracker, está más localizado alrededor del núcleo pero en una parte. La segunda foto

la localización de HYP muestra una situación muy parecida a la del Lisotracker, alrededor del núcleo pero en una parte. Por último, en la tercera foto se parecía esa co-localización de ambos.

4.5.3. Demostración de la no entrada de HYP en el interior del núcleo de las células humanas, fibroblastos, por la no co-localización con DAPI:

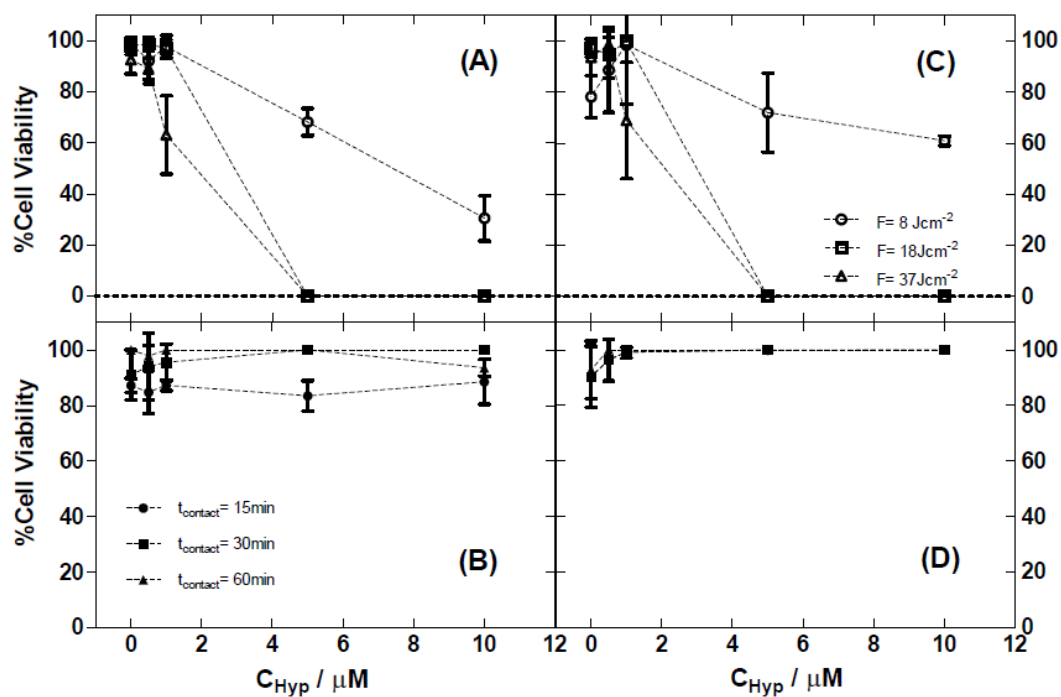


Con respecto a estas imágenes se puede observar la distribución de HYP en fibroblastos, que es por el citoplasma y claramente la no penetración en el núcleo de las células.

4.6. Efecto de la terapia fotodinámica de células humanas

Como se observa en las siguientes figuras, la hipericina ejerce un efecto fototóxico tanto en queratinocitos (A) como en fibroblastos (C). Dicho efecto es dependiente tanto de la concentración del fotosensibilizante como de la dosis de luz administrada.

Concentraciones superiores a 5 μM junto a fluencias iguales o superiores a 18 J/cm^2 inducen una mortalidad del 100% de células. Sin embargo, la hipericina sin luz no tiene efecto citotóxico sobre queratinocitos (B) ni fibroblastos (D).



Graficas: A) viabilidad celular en HaCat y C) en hNDF a diferentes fluencias, 8, 18 y 30 J/cm^2 . C) viabilidad celular en HaCat y (D) hNDF a diferentes tiempos de incubación 15, 30, 60 min en oscuridad. Estos estudios fueron realizados por el grupo de investigación del Prof. S. Nonell en los laboratorios del IQS Universidad Ramon Llull, Barcelona, Spain en colaboración con nuestro grupo

5. Discusión

La TFD antimicrobiana con HYP como FS ejerce un efecto biocida sobre todas las cepas estudiadas.

La concentración necesaria de FS provoca de un efecto fototóxico produciendo la reducción del crecimiento microbiano hasta en 6 unidades logarítmicas, depende de la especie microbiológica sobre la que se aplica la terapia, y, por tanto, de la complejidad del microorganismo. Estos resultados constatan con ensayos preliminares desde los años 60, el AM probaba su efectividad sobre diferentes virus (58).

Los estudios posteriores han revelado el potencial del AM sobre microorganismos de mayor complejidad como bacterias que además posean mecanismos como bombas de expulsión de resistencia a antibióticos comunes (59).

Por otro lado, teniendo en cuenta a la HYP como agente antibacteriano, se demuestra también su efectividad sobre especies de *S. aureus* en estudios como los de Engelhardt et al (60) donde se prueba la actividad fototóxica de la HYP concentraciones menores de FS que las empleadas en este proyecto pero también fluencias mayores.

La fluencia empleada en la terapia influye en su eficacia, de tal forma que se con mayores fluencias se necesitan menores concentraciones de FS. No obstante, este hecho no se cumple en todas las ocasiones, y se observa que hay cepas que requieren concentraciones similares empleando diferentes fluencias, como es el caso de *S. mutans*. En otros estudios como los de Rolim et al (17) se prueba la actividad fototóxica de varios fotosensibilizantes como el azul de toluidina (TBO) y verde de malaquita (MG) eosina (EOS), eritrosina (ERI) y rosa de bengala (RB) viendo que el TBO y MG fue eficaz en la reducción de los recuentos de *S. mutans* por 3 logs a una concentración de 163,5µM a 24 J/cm².

Respecto a la comparación entre cepas de *Candida albicans* sensibles y resistentes a antifúngicos azólicos, no existen diferencias en cuanto a su sensibilidad a la terapia fotodinámica con hipericina. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Dovigo et al en 2011 sobre biofilms de cepas de *Candida* azol resistentes donde se evidencia una sensibilidad mayor de las cepas resistentes a fluconazol frente a las no resistentes (61).

Al comparar la HYP con el AM, que es el fotosensibilizante que habitualmente se está utilizando en la TFD clínica, especialmente en odontología (62) destaca que mientras que este último es más eficaz en los *Streptococcus spp.*, la HYP es más eficaz en *C. albicans*, tanto en las especies resistentes a antifúngicos como en las sensibles. Con este hecho se demuestra que aunque la TFD en general es eficaz frente a todo tipo de gérmenes, existen FS que ejercen un efecto fototóxico de mayor importancia sobre unas especies que sobre otras, lo que demuestra sensibilidades diferentes a la TFDA según el FS empleado. Si bien podría deducirse de esto que la TFDA no podría atacar equitativamente a un amplio espectro de microorganismos filogenéticamente diferentes, es posible asegurar una máxima cobertura en el tratamiento de todas las cepas estudiadas empleando ambos FSs siempre que usemos concentraciones y fluencias suficientes.

Un aspecto novedoso de la presente investigación, es testar la combinación de dos fotosensibilizantes, que a la vista de nuestros resultados actúan de forma sinérgica. Así, en todas las cepas se produce una potenciación de la eficacia de ambos FSs, ya que hay una clara disminución de la concentración fungicida o bactericida al combinarlos. El hecho de que se potencie el efecto fototóxico en la combinación de ambos FSs demuestra que su mecanismo de acción es aditivo. Esta consecuencia se debería al hecho de que cada FS posee, vías de penetración, localización y acción fototóxica diferentes al otro, lo que los convierte en bioquímica y fototóxicamente complementarios (63,56, 64).

Uno de los factores que pueden determinar el diferente y complementario mecanismo de acción de nuestros fotosensibilizantes tanto en las bacterias como en las levaduras estudiadas es la localización de los mismos. En cuanto a la localización celular en *Candida albicans*, con los experimentos realizados se puede observar como la hipericina penetra en las levaduras aunque no podamos precisar en qué organelas se localiza; solo se puede demostrar, visualizando las imágenes que no penetra en el núcleo. Sin embargo, el azul de metileno se acumula en el citoplasma y el núcleo (56). Considerando la baja movilidad e intensa reactividad de los ROS generados dentro de la célula esto podría explicar una acción diferente de los FS en la célula. Si bien este hecho no puede extrapolarse a bacterias, dada la gran diferencia de complejidad estructural entre ambos tipos de células, sigue resultando una de las razones de peso por las que el mecanismo de sinergia es positivo. Otro factor que puede influir es la diferente

producción de especies reactivas del oxígeno durante el proceso fotodinámico, ya que en el caso del azul de metileno la principal es el oxígeno singlete (17).mientras que en el caso de la hipericina es el peróxido de hidrógeno, según nuestro grupo ha demostrado recientemente (48).

A partir de estos experimentos y técnicas utilizadas de localización celular en levaduras solo se puede decir que la hipericina sufre una diseminación intracelular salvo en el núcleo lo que hace que exista una doble ventaja:

- La TFD antimicrobiana con hipericina podría tener múltiples dianas celulares, ya que se localiza de una forma difusa en el interior de la célula, lo que minimiza la posibilidad de aparición de resistencias.

- La hipericina no penetra en el núcleo por lo que se evitan las mutaciones en el DNA, lo que también contribuye a impedir el desarrollo de resistencias.

Una de las limitaciones de nuestro estudio con microscopía de fluorescencia es que los fluoróforos utilizados son válidos para células eucariotas animales. Las levaduras son células eucariotas pero poseen una complejidad menor con respecto a las células animales. Todos estos marcadores funcionaron satisfactoriamente excepto el mitotracker, que en la mayoría de los casos no solo se encontró en las mitocondrias, sino que se diseminó por todo el citoplasma celular.

En la localización en células humanas con los experimentos realizados se puede observar como la hipericina penetra en las células y co-localiza con el Lisotracker y también, pero en menos medida con el DIOC. Se demuestra que no penetra en el núcleo ya que no es capaz de atravesar la membrana nuclear; La hipericina no penetra en el núcleo por lo que se evitan las mutaciones en el DNA y por lo tanto la probabilidad de desarrollo de cáncer en relación con la TFD.

Se abre una nueva línea de estudio debido a la toxicidad de los FSs que producen en células humanas sanas. Es utilizar nanopartículas donde se unan estos compuestos y hacer que la TFD sea más selectiva ya que precisamente uno de los objetivos que se buscan es un tratamiento selectivo que “ataque” únicamente al microorganismo causante de la infección y mantenga intactas las células sanas (65).

6. Conclusiones

1. La HYP es eficaz en la fotoinactivación de los gérmenes responsables de la mayoría de las infecciones de la cavidad oral, *S. mutans*, *S. sanguis* y *C. albicans*.
2. La HYP es menos eficaz que el azul de metileno en la fotoinactivación del *Streptococcus* y más eficaz en *Candidas*.
3. Las cepas y especies de *Candida* resistentes a azoles son susceptibles *in vitro* a la TFD con HYP sin diferencias respecto a las cepa sensible a azoles
4. La combinación de HYP y AM tiene un efecto sinérgico en la fotoinactivación tanto de bacterias como de levaduras.
5. La localización de HYP en levaduras se encuentra en el citoplasma, pero no llega a pasar la membrana nuclear.
6. La localización de HYP en células humanas se distribuye en el citoplasma, y sobre todo alrededor del núcleo co- localizando con el Lisotracker y con el DIOC.
7. La HYP ejerce un efecto fototóxico en células humanas pero es dependiente de la concentración del fotosensibilizante y la dosis de luz administrada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:71-109.
2. Liñares J, Martín-Herrero JE. Bases farmacomicrobiológicas del tratamiento antibiótico de las enfermedades periodontales y periimplantatorias. *Av Periodon Implanton* . 2003; 15, 3:137-147.
3. Rezusta A, López-Chicón P, Paz-Cristobal MP, Alemany-Ribes M, Royo-Díez D, Agut M, Semino C, Nonell S, Revillo MJ, Aspiroz C, Gilaberte Y. In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species. *Photochem Photobiol*. 2012 May; 88(3):613-9.
4. Vahabi S, Fekrazad R, Ayremlou S, Taheri S, Zangeneh N, Dent (Tehran) J. The Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy with Radachlorin and Toluidine Blue on *Streptococcus Mutans*: An in Vitro Study. 2011 Spring; 8(2): 48–54.
5. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:547-58.
6. Borges Pereira a Costa A; Chibebe Junior J; Aparecida Pereira C; da Silva Machado A; Beltrame Junior M; Campos Junqueira C; Olavo Cardoso A. Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a light-emitting diode. *Braz. oral res.* vol.24 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2010.
7. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:114-22.
8. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 2005;32 Suppl 6:7-15.
9. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:85-105.
10. Liu PF, Zhu WH, Huang CM. Vaccines and photodynamic therapies for oral microbial-related diseases. *Curr Drug Metab* 2009; 10:90-4.
11. Gilaberte Y, Serra-Guillén C, de las Heras M, Ruiz-Rodríguez R, Fernández-Lorente M, Benvenuto-Andrade C et al. [Photodynamic therapy in dermatology]. *Actas Dermosifiliogr* 2006;97:83-102.
12. Issa M. C; Manela-Azulay M. II Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *An. Bras. Dermatol.* vol.85 no.4 Rio de Janeiro July/Aug. 2010.
13. Iriana Carla Junqueira Zanin, Reginaldo Bruno Gonçalves, Aldo Brugnera Junior, Christopher Keith Hope, Jonathan Pratten. J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. *Antimicrob. Chemother.* (August 2005) 56 (2): 324-330.
14. Bertoloni G. 1, F.Zambotto, L.Conventi, E.Reddi, G.Jori, Role of specific cellular targets in the hematoporphyrin-sensitized photo-inactivation of microbial cells, *Photochem. Photobiol.* 46 (1987)695–698.
15. Almeida R, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimi et Biophysica Acta* 2004;1704:59-86.
16. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. *Photochemistry and photobiology.* JEADV 2007;21:293-302.

17. Rolim JP, de-Melo MA, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, de Souza JR, Nogueira NA, Zanin IC, Rodrigues LK. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B*. 2012 Jan 5; 106:40-6.
18. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000 2011; 55:143-66.
19. Szeimies R, Morton C, Sidoroff A, Braathen L. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *Acta Derm Venereol* 2005;85:483-90.
20. Bressler NM. Age related macular degeneration. New hope for a common problem comes from photodynamic therapy. *BMJ* 2000; 321:1425-7.
21. Overholt BF, Wang KK, Burdick JS, Lightdale CJ, Kimmey M, Nava HR et al. Five-year efficacy and safety of photodynamic therapy with Photofrin in Barrett's high-grade dysplasia. *Gastrointest Endosc* 2007; 66:460-8.
22. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 2006; 38:468-81.
23. Cassidy C, Tunney M, McCarron P, Donnelly R. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B* 2009;95:71-80.
24. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, van Lier J. "Photosensitizing activity of water-soluble and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*", *FEMS Microbiol. Lett.*, 1990; **71** (1-2): 149-155.
25. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. "Photodynamic inactivation of gram-negative bacteria - problems and possible solutions", *J. Photochem. Photobiol.: B*, 1992; **14** (3): 262-266
26. Maisch T, Szeimies RM, Jori G, Abels C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3: 907-917.
27. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. *Photochemistry and photobiology*. *JEADV* 2007; 21:293-302.
28. Kamp H, Tietz HJ, Lutz M, Piazena H, Sowyrda P, Lademann J, Blume-Peytavi U. Antifungal effect of 5-aminolevulinic acid PDT in *Trichophyton rubrum*. *Mycoses* 2005;48:101-7.
29. Zolfaghari PS, Packer S, Singer M, et al. *In vivo* killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. *BMC Microbiology* 2009, 9:27
30. Sotiriou E, Panagiotidou D, Ioannides D. 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy treatment for tinea cruris caused by *Trichophyton rubrum*: report of 10 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;13:345-349.
31. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J Photochem Photobiol B Biol* 2005;78:1-6.
32. Clayton TH, Harrison PV. Photodynamic therapy for infected leg ulcers. *Br J Dermatol* 2007; **156**: 384–385
33. Gilaberte Y, Pereboom D, Parapeto FJ, Alda JO. Flow cytometric study of the role of superoxide anion and hydrogen peroxide in cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *Photodermatol Photoimmunol & Photomed* 1997;13: 43-49.
34. Wiegell SR, Kongshoj B, Wulf HC. *Mycobacterium marinum* infection cured by photodynamic therapy. *Arch Dermatol* 2006; 142: 1241–1242.
35. Gardlo K, Horska Z, Enk CD et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *JAAD* 2003; **48**: 893–896.

36. Gilaberte Y, Frias M, Rezusta A, Vera-Alvarez J. Photodynamic therapy with methyl aminolevulinate for resistant scalp folliculitis secondary to Demodex infestation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009 Feb 24
37. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol* 1993; 75:299-306.
38. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med* 2002; 31:86-90.
39. Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera A, Teodoro GR, Zângaro RA et al. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomed Laser Surg* 2007; 25:513-8.
40. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004; 75:1343-9.
41. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3:412-8.
42. Zeina B, Greenman J, Corry D, Purcell WM. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol* 2002; 146:568-73.
43. Donnelly R, McCarron P, Tunney M, David Woolfson A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B* 2007; 86:59-69.
44. Karioti A, Bilia A. R. Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2010; 11(2): 562–594.
45. Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol* 2010; 131:511-21.
46. Miskovsky P. Hypericin--a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Curr Drug Targets* 2002; 3:55-84.
47. Hager B, Strauss W, Falk H. Cationic hypericin derivatives as novel agents with photobactericidal activity: synthesis and photodynamic inactivation of *Propionibacterium acnes*. *Photochem Photobiol*; 85:1201-6.
48. López-Chicón P, Paz-Cristobal MP, **Rezusta** A, Aspiroz C, Royo-Cañas M, Andres-Ciriano E, Gilaberte Y, Agut M, Nonell S. On the mechanism of *Candida* spp. photoinactivation by hypericin. *Photochem Photobiol Sci*. 2012 May 8.
49. McGuffin M, Hobbs C, Goldbreg A. eds. *Botanical Safety Handbook*. New York. NY: CRC Press Inc; 1997; 62-63.
50. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:13-28.
51. Donnelly R.F., McCarron P.A., Tunney M.M.; Antifungal photodynamic therapy, *Microbiol.Res.* 163(2008)1–12.
52. Rook AH, Wood GS, Duvic M, Vonderheid EC, Tobia A, Cabana B. A phase II placebo-controlled study of photodynamic therapy with topical hypericin and visible light irradiation in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63:984-90.
53. Kiesslich T, Krammer B, Plaetzer K. Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. *Curr Med Chem* 2006; 13:2189-204.
54. Kubin A, Wierrani F, Burner U, Alth G, Grünberger W. Hypericin--the facts about a controversial agent. *Curr Pharm Des* 2005; 11:233-53.

55. Kubin, A; Wierrani, F; Jindra, RH; et al. Antagonistic effects of combination photosensitization by hypericin, meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) and photofrin II on *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25; 13-21.
56. Renato A. Prates, Ilka T. Kato, Martha S. Ribeiro, George P. Tegós, and Michael R. Hamblin. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2011 July; 66(7): 1525–1532.
57. Lilians S. Peloi et al. Photodynamic effect of light -emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J biosci* 3(2), June 2008.
58. Va A, Mi B, Photodynamic effect of methylene blue as a method for the inactivation of viruses. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 1960 Jul; 31:22-6.
59. Tegós GP, Hamblin MR. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Jan;50(1):196-203
60. Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci*. 2010 Mar;9(3):365-9
61. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* *Mycoses*. 2011 Mar;54(2):123-30.
62. Giannelli M, Formigli L, Lorenzini L, Bani D. Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. A randomized split-mouth clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2012 Jun 22.
63. Garcez AS, Núñez SC, Baptista MS, Daghasanli NA, Itri R, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochem Photobiol Sci*. 2011 Apr;10(4):483-90.
64. Karioti A, Bilia AR. Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2010 Feb 4;11(2):562-94.
65. Shrestha A, Kishen A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. *J Endod*. 2012 Sep;38(9):1275-8.

Bibliografía imágenes

- Figura 1, Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms *Periodontol* 2000 2011; 55:143-66.
- Figura 2, Karioti A, Bilia A, Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2010; 11(2): 562–594.
- Figura 3, Peloi L, Soares R, Biondo C, Souza V, Hioka N, Kimura E, Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J. Biosci*. 33(2), June 2008, 231–237.