

73971

QUIROGA, EZEQUIEL DA
Inactivacion fetodin

2014

73971



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Química

Tesis Doctoral

Doctorado en Ciencias Biológicas

**Inactivación fotodinámica de *Candida albicans*
sensibilizada por porfirinas**

Lic. Ezequiel Darío Quiroga

17087

2014

0001

MFN:
Class:
T. 938

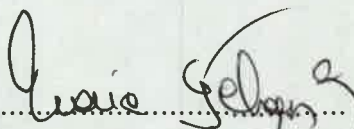
Dirección de tesis:

Director:



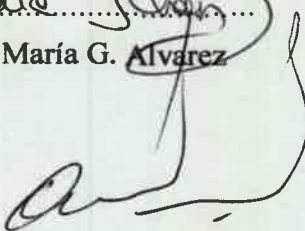
.....
Dr. Edgardo N. Durantini

Co-directora:



.....
Dra. María G. Alvarez

Jurado de tesis:



.....
Dra. Ana Dalcero

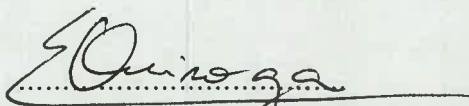


.....
Dra. Fabiana Alovero



.....
Dra. Patricia Piccoli

Doctorando:



.....
Lic. Ezequiel D. Quiroga

AGRADECIMIENTOS

A la UNRC, CONICET y el Ministerio de Ciencia y Tecnología por brindarme los recursos necesarios para llevar adelante mis estudios de postgrado.

A los jurados de tesis (Dra. Ana Dalcero, Dra. Fabiana Alovero, Dra. Patricia Piccoli) por dedicar tiempo para corregir y mejorar este trabajo.

A mis directores Edgardo y Gabriela, por haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender con ellos, por estar siempre presentes y predispuestos a brindar ayuda.

A mis padres y hermanos, por su esfuerzo para ayudarme a llegar hasta acá y por su inmensa confianza.

A mis amigos de Vedia y Rio Cuarto, por su gran compañía y los buenos momentos compartidos.

A los compañeros de trabajo, por su colaboración y por hacerme sentir cómodo y orgulloso de trabajar a su lado.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1. Estructura celular de microorganismos	9
3.2. Características generales de los hongos	10
3.2.1. Mecanismo de acción patógena de los hongos.....	12
3.2.2. Clasificación de las micosis	12
3.3. <i>Candida albicans</i>	13
3.3.1. Generalidades de <i>C. albicans</i>	13
3.3.2. Cultivos de las especies de <i>Candida</i>	19
3.3.3. Hábitat de <i>Candida</i>	20
3.4. Agentes antifúngicos	21
3.4.1. Los azoles	22
3.5. Terapia fotodinámica.....	26
3.5.1. Historia	26
3.5.2. Principios básicos.....	27
3.5.3. Mecanismo de acción	28
3.5.4. Agentes fototerapéuticos	32
3.6. Fotoinactivación de levaduras	32
3.6.1. Principios generales de la IFD de hongos	33
3.6.2. Ventajas de la IFD	34
3.7. Características generales de las porfirinas.....	35
3.7.1. Características espectroscópicas y fotoquímicas.....	36
3.7.2. Fotosensibilizadores derivados de porfirinas	37

3.7.3. Localización del fotosensibilizador y selectividad por los microorganismos	38
4. HIPÓTESIS	43
5. OBJETIVOS.....	47
5.1. Generales	47
5.2. Específicos	47
6. MATERIALES Y MÉTODOS	51
6.1. Materiales	51
6.1.1. Equipamientos generales y reactivos	51
6.1.2. Fotosensibilizadores	51
6.1.3. Sondas fluorescentes	52
6.2. Métodos	52
6.2.1. Sistemas de irradiación.....	52
6.2.2. Microorganismos y condiciones de crecimiento	53
6.2.3. Estudios <i>in vitro</i>	55
6.2.3.1. Estudios espectroscópicos	55
6.2.3.2. Unión del sensibilizador a las células de <i>C. albicans</i>	55
6.2.3.3. Inactivación fotosensibilizada de células de <i>C. albicans</i> en PBS	56
6.2.3.4. Estudios del mecanismo de inactivación fotodinámica en <i>C. albicans</i>	57
6.2.3.5. Efecto fotosensibilizado de la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i>	57
6.2.3.6. Efecto combinado de fluconazol y porfirina sobre <i>C. albicans</i>	58
6.2.4. Estudios en medio sólido.....	58
6.2.4.1. Unión de TMPyP ⁴⁺ en solución e inactivación fotosensibilizada de células de <i>C. albicans</i> sobre agar Sabouraud.....	58
6.2.4.2. Incorporación de TMPyP ⁴⁺ e inactivación fotosensibilizada de <i>C. albicans</i> sobre agar Sabouraud	59

6.2.4.3. Fotosensibilización de <i>C. albicans</i> creciendo en colonias sobre agar Sabouraud	59
6.2.5. Detección de oxígeno molecular singlete en <i>C. albicans</i>	59
6.2.6. Sitios de daño celular	60
6.2.6.1. Interacción de porfirinas con ADN de timo bovino	60
6.2.6.2. Fotólisis de ADN de timo bovino y electroforesis	61
6.2.6.3. Fotoinactivación de <i>C. albicans</i> , purificación y electroforesis del ADN.....	61
6.2.6.4. Estudios por microscopía	62
6.2.6.4.1. Localización celular del fotosensibilizador.....	62
6.2.6.4.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	62
6.2.6.4.3. Microscopía electrónica de barrido	63
6.2.6.5. Controles y análisis estadísticos.....	64
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
7.1. Evaluación de la porfirina TMPyP ⁴⁺ como fotosensibilizador fúngico	67
7.1.1. Propiedades espectroscópicas y fotodinámicas.....	67
7.1.10. Sitios de daño celular	88
7.1.10.1. Interacción de la porfirina con ADN.....	89
7.1.10.2. Fotodaño de ADN de timo bovino fotosensibilizado por TMPyP ⁴⁺	90
7.1.10.3. Efecto de la IFD sobre ADN genómico de <i>Candida albicans</i>	92
7.1.10.4. Estudios de la localización intracelular del sensibilizador	92
7.1.10.5. Efectos de la IFD en la ultraestructura celular	96
7.1.10.6. Estudio del daño de la envoltura celular	96
7.1.2. Unión de TMPyP ⁴⁺ en las células de <i>C. albicans</i>	70
7.1.3. IFD de suspensiones celulares en PBS.....	73
7.1.4. Inactivación fotosensibilizada sobre pseudohifas de <i>C. albicans</i>	75
7.1.5. Efecto fotosensibilizado en la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i>	77

7.1.6. Mecanismo de acción fotodinámico.....	78
7.1.6.1. Fotoinactivación bajo atmósfera anóxica.....	79
7.1.6.2. Efecto del ión azida sobre la IFD.....	79
7.1.6.3. Inactivación fotodinámica en D ₂ O.....	80
7.1.6.4. Efecto del manitol sobre la IFD.....	80
7.1.7. Producción sensibilizada de ¹ O ₂ en cultivos de <i>C. albicans</i>	82
7.1.8. Fotoinactivación de células de <i>C. albicans</i> sobre superficies.....	83
7.1.9. Fotosensibilización de células de <i>C. albicans</i> creciendo en colonias.....	86
7.2. Estudios de las nuevas aminoporfirinas como agentes fototerapéuticos.....	97
7.2.1. Estudio de las propiedades espectroscópicas, fotodinámicas y estabilidad de las porfirinas.....	98
7.2.2. Unión de las porfirinas a las células de <i>C. albicans</i>	101
7.2.3. Tratamiento fotodinámico en suspensiones celulares.....	103
7.2.4. Efecto fotosensibilizado sobre la curva de crecimiento.....	106
7.2.5. Mecanismo de acción fotodinámico.....	108
7.2.5.1. Fotoinactivación bajo atmósfera anóxica.....	108
7.2.5.2. Efecto del ión azida sobre la IFD.....	108
7.2.5.3. Inactivación fotodinámica en D ₂ O.....	109
7.2.5.4. Efecto del manitol sobre la IFD.....	109
7.2.6. Tratamiento de <i>C. albicans</i> con fluconazol y porfirina.....	111
7.2.7. Fotosensibilización de <i>C. albicans</i> creciendo en colonias.....	114
7.2.8. Sitios de daño celular.....	116
7.2.8.1. Localización subcelular del sensibilizador.....	116
7.2.8.2. Efectos de la IFD en la estructura celular interna.....	118
7.2.8.3. Fotodaño sobre la envoltura celular.....	119

8. CONCLUSIONES	123
9. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	131
10. GLOSARIO DE SÍMBOLOS	135
11. GLOSARIO DE FOTSENSIBILIZADORES.....	139
12. REFERENCIAS	143

▼ 1. Resumen

1. RESUMEN

El aumento en la incidencia de las infecciones fúngicas y la aparición de cepas resistentes a las terapias convencionales ha renovado el interés en la inactivación fotodinámica (IFD) de microorganismos. Por tal motivo, en este trabajo se evaluaron derivados de porfirina como posibles agentes fototerapéuticos para la inactivación de *Candida albicans*. Se estudiaron dos porfirinas tetracatiónicas, 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TMPyP⁴⁺) y 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N,N*-trimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TAPP⁴⁺), y una neutra, 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TAPP), la cual puede adquirir cargas positivas a pH fisiológico. En solución, estos agentes mostraron propiedades espectroscópicas y fotodinámicas adecuadas para ser utilizados como fotosensibilizadores. La interacción entre las porfirinas y las células fue rápida (<5 min). Si bien TMPyP⁴⁺ presentó el valor más alto de unión (1,71 nmol/10⁶ cél.), fue eliminada en un 59% después de una etapa de lavado. En contraste, TAPP⁴⁺ y TAPP permanecieron interaccionando fuertemente con las células. El tratamiento de suspensiones celulares (1x10⁶ UFC/mL) con 5 µM de porfirina e irradiadas durante 30 min con luz visible produjo una inactivación del 99,999%. Este procedimiento provocó un retardo en la curva de crecimiento de las levaduras en caldo Sabouraud, principalmente inducido por TAPP⁴⁺ y TAPP. El tratamiento fotodinámico con estas aminoporfirinas combinado con el antifúngico fluconazol, mostró un mejor desempeño de ambas terapias; ya que se requirieron menores dosis de ambos agentes para alcanzar la erradicación celular. Además, estas porfirinas fueron efectivas para la inactivación de *C. albicans* sobre una superficie o creciendo como colonias sobre agar Sabouraud. El mecanismo fotodinámico inducido por las porfirinas durante la inactivación fue principalmente de tipo II, mediante la participación del oxígeno molecular singlete (¹O₂) como principal especie reactiva. Estudios de microscopia de fluorescencia revelaron una distribución de las porfirinas con localización preferente en ciertas regiones subcelulares. Estudios a nivel morfológico mostraron daños en la envoltura celular. De modo que, la alteración de esta estructura sería una causa importante en la inactivación de *C. albicans*. Por lo tanto, las tres porfirinas estudiadas son efectivas para ser aplicadas como fotosensibilizadores en solución o sobre medio sólido. La presencia de cargas positivas aisladas del macrociclo tetrapirrólico permite una unión celular más estable y una notable actividad fotoinactivante para la erradicación de levaduras.

▼ 2. Abstract

2. ABSTRACT

The increased incidence of fungal infections and the emergence of strains resistant to conventional therapies, has improved the interest in photodynamic inactivation (PDI) of microorganisms. Therefore, in this work were evaluated porphyrin derivatives as potential phototherapeutic agents to inactivate *Candida albicans*. Two tetracationic porphyrins were studied, 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimethylaminopropoxy)phenyl]porphyrin (TMPyP⁴⁺) and 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N,N*-trimethylaminopropoxy)phenyl]porphyrin (TAPP⁴⁺), and a neutral, 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimethylaminopropoxy)phenyl]porphyrin (TAPP), which can add positive charges at physiological pH. In solution, these agents showed appropriated spectroscopic and photodynamic properties to be used as photosensitizers. The interaction between porphyrins and cells was fast (<5 min). Although TMPyP⁴⁺ showed highest value of binding (1.71 nmol/10⁶ cells), was eliminated in a 59% after one washing step. In contrast, TAPP⁴⁺ and TAPP remained strongly interacted with the cells. The treatment of cell suspensions (1x10⁶ UFC/mL) with 5 μM porphyrin and 30 min irradiation with visible light induced an inactivation of 99,999%. This procedure produced a growth delay of yeast in Sabouraud broth, mainly induced by TAPP⁴⁺ y TAPP. The photodynamic treatment with these aminoporphyrins combined with the antifungal fluconazole showed an improved result of both therapies because lower doses of the agents were required to obtain the cell eradication. Also, these porphyrins were effective to photoinactivation of *C. albicans* on a surface or growing as colonies on Sabouraud agar. The photodynamic mechanism induced by porphyrins during the inactivation was mainly of type II, through the participation of singlet molecular oxygen (¹O₂) as mainly reactive species. Fluorescence microscopy studies revealed a distribution of porphyrins with preferential localization in some subcellular regions. Morphological studies showed damage in the cell envelope. Thus, alteration of this structure would be a major cause for the inactivation of *C. albicans*. Therefore, the three studied porphyrins are effective to be applied as photosensitizers in cell suspensions or on solid media. The presence of positive charges isolated from the tetrapyrrole macrocycle allows a cell binding more stable and a high photoinactivating activity for the eradicating of yeasts.

▼ 3. Introducción

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Estructura celular de microorganismos

Las células microbianas, a diferencia de las células de animales y de plantas, son capaces de vivir aisladas de la naturaleza y no necesitan existir como partes de los organismos pluricelulares. Una célula microbiana por sí misma es, en general, capaz de llevar a cabo sus procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción independiente de otras células, de la misma o de diferente clase.¹

La estructura básica de una célula consiste en una bicapa lipídica, la membrana plasmática, la cual encierra al citoplasma, una solución acuosa de proteínas, enzimas, nutrientes y sales donde ocurren los procesos físicos y químicos que permiten la vida. A su vez, la mayoría de los microorganismos cuentan con una pared celular por encima de la membrana plasmática débil, que le confiere rigidez y los protege de las agresiones del medio.

Los estudios de la organización interna de las células pusieron de manifiesto la existencia de dos tipos básicos: procariota y eucariota (Figura 1). Estos dos tipos de células son estructuralmente muy diferentes. La disposición del ADN dentro de la célula constituye una de las principales diferencias estructurales entre las mismas. Los eucariotas contienen un núcleo rodeado por una membrana nuclear que encierra varias moléculas de ADN y se dividen por mitosis. Por el contrario, la región nuclear procariota, llamada nucleoide, no está rodeada por una membrana, consta de una sola molécula de ADN y su división no es mitótica. A diferencia de las células procariotas, las eucariotas contienen normalmente, además del núcleo, otras estructuras internas rodeadas por membrana, como las mitocondrias, los cloroplastos y poseen también un citoesqueleto formado por una serie de componentes internos que funcionan como un andamiaje y permiten el movimiento de sus componentes internos. Las células procariotas representan dos importantes ramas evolutivas, bacteria y archae. Existen varios grupos de microorganismos eucariotas, incluyendo algas, hongos y protozoos. Además, todas las formas pluricelulares de vida (plantas y animales) están formadas por células eucariotas.¹

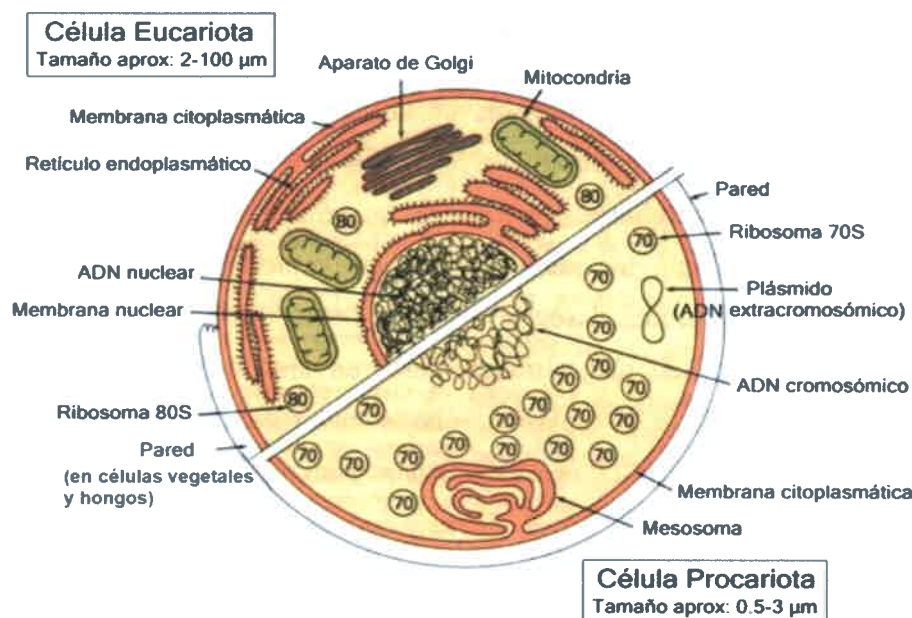


Figura 1. Comparación estructural de las células procariotas y eucariotas

3.2. Características generales de los hongos

Los hongos pueden ser diferenciados fácilmente de los procariotas por ser más grandes, poseer núcleo, vacuolas y mitocondrias; es decir una típica célula eucariota. Aunque los hongos constituyen un conjunto grande y diverso, prácticamente hay dos grupos importantes: los **hongos filamentosos** y las **levaduras**.

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que le da forma a la célula, controla la permeabilidad celular y protege a la célula de los cambios osmóticos. Además de estas importantes funciones, constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella las adhesinas y un gran número de receptores que tras su activación, desencadenarán una compleja cascada de señales en el interior de la célula.

Dada su localización en el exterior de la célula, la pared es el primer lugar de interacción con el hospedador, jugando un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica.²⁻⁴

La pared celular es una estructura esencial para los hongos y su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis. Dado el papel vital que la pared celular juega en la fisiología de la célula fúngica, puede considerarse el talón de Aquiles de

los hongos y por tanto, una diana muy importante para la acción de los fármacos antifúngicos.⁵

La pared celular está compuesta básicamente por polisacáridos y proteínas. La pared de la célula fúngica es una estructura específica diferente de la pared de las células vegetales. Estas últimas están compuestas fundamentalmente de celulosa, mientras que los polisacáridos que se destacan en la pared fúngica son la quitina, el glucano, el manano y el galactomanano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida.

Glicoproteínas: Las proteínas representan el 30-50% del peso seco de la pared fúngica en los hongos levaduriformes y el 20-30% del peso seco de la pared de los hongos filamentosos. La mayoría de las proteínas están asociadas a glúcidos por enlaces Oxígeno o Nitrógeno, formando glicoproteínas.

Quitina: El contenido en quitina de la pared fúngica varía según la fase morfológica del hongo. Representa el 1-2% del peso seco de la pared celular de las levaduras mientras que en los hongos filamentosos puede llegar al 10-20%.

Glucano: El glucano es el polisacárido estructural más importante de la pared y representa el 50-60% del peso seco de esta estructura. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3 (65-90%), aunque también hay glucanos con enlaces β -1,6 (en el género *Candida* pero no en el género *Aspergillus*), β -1,4; α -1,3 y α -1,4. El β -1,3-D-glucano es el componente estructural más importante de la pared, al que se unen covalentemente otros componentes de esta estructura.⁶

El comportamiento biológico de los hongos puede ser saprobio o saprótrofo cuando obtienen sus nutrientes del material orgánico en descomposición o bien pueden alimentarse a partir de otro organismo vivo comportándose como parásito. En efecto, los hongos, por medio de la extremidad terminal de sus hifas, pueden invadir los tejidos vivos. El hombre, se puede ver infectado por algunas especies de hongos, que solo parasitan en su piel (dermatofitos antropófilos) o que normalmente son sáprobios y que en condiciones excepcionales, invaden a sujetos debilitados (hongos oportunistas).⁷

3.2.1. Mecanismo de acción patógena de los hongos

Los hongos pueden ocasionar patologías en el hombre por varios mecanismos:

- Micetismo: intoxicación alimentaria por sustancias químicas constituyentes del hongo ingerido.
- Micotoxicosis: intoxicación por ingestión de toxinas elaboradas por el metabolismo del hongo al crecer en algunos alimentos.
- Alergias: reacciones de hipersensibilidad debidas a mecanismos inmunológicos.
- Micosis: infecciones por invasión de los tejidos superficiales o profundos.

En las micosis hay que considerar dos factores principales: la virulencia del hongo causal y el estado del huésped. Se llaman hongos **patógenos primarios** a los que tienen mayor capacidad infectiva y que no dependen del estado del huésped para desencadenar un proceso infeccioso.

Los hongos que solo pueden ocasionar infecciones en sujetos debilitados y/o inmunodeprimidos, produciendo las llamadas *micosis oportunistas* se denominan **hongos oportunistas**.¹

3.2.2. Clasificación de las micosis

Según su localización anatómica, las micosis se dividen en **superficiales y profundas** en función de que tan solo afecten la piel o las mucosas, o bien penetren más allá de la membrana basal del epitelio.

Las **micosis superficiales** pueden afectar exclusivamente la zona queratinizada del pelo, uñas y epidermis sin despertar ningún tipo de reacción inflamatoria, o bien producir alteraciones más o menos destructivas de piel y mucosas, que se acompañan de inflamación y, en muchas ocasiones, de una respuesta inmunológica.

Las **micosis profundas** pueden ser localizadas y afectar un órgano o sistema de forma exclusiva, o bien ser multiviscerales, e incluso diseminarse a distancia del foco inicial. Estas últimas se denominan **micosis sistémicas**.

Los hongos pueden ser específicos, como en el caso de los dermatofitos, que tan solo ocasionan micosis superficiales, o bien ser polivalentes en el sentido de producir una micosis superficial, una micosis profunda localizada o una micosis sistémica. La levadura *Candida albicans* es un ejemplo de esta situación, puesto que tanto puede originar una micosis en uña o afectar superficialmente la mucosa oral, como una micosis profunda localizada (absceso, artritis, nefritis) o una micosis multisistémica o diseminada (septicemia).⁸

3.3. *Candida albicans*

C. albicans se encuentra clasificada taxonómicamente de la siguiente forma. **Dominio:** Eukaryota, Opisthokonta, **Reino:** Fungi, **Subreino:** Dikarya, **División:** Ascomycota, saccharomyceta, **Subdivisión:** Saccharomycotina, **Clase:** Saccharomycetes, **Orden:** Saccharomycetales, **Familia:** Saccharomycetaceae, mitosporic Saccharomycetales, **Género:** *Candida*, **Especie:** *Candida albicans* (como la más frecuente y virulenta).⁹

El género *Candida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular.¹⁰

Solamente una docena de las especies pertenecientes al género *Candida* poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre, estas son entre otras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* (*pseudotropicalis*), *C. krusei*, *C. guilliermondi*, *C. parakrusei*, *C. zeylanoides*, *C. stellatoidea* y *C. brumptii*.¹¹

3.3.1. Generalidades de *C. albicans*

C. albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas (Figura 2 y Figura 3); sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí.^{7,11-12}

Las levaduras son microorganismos eucariotas, que se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la levadura (Figura 2 y Figura 3). Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se produce la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células. Las blastosporas o blastoconidios, son esporas que se originan de una parte de una célula somática, una hifa u otra espora y se desarrollan antes de la formación del septo que lo separa de la célula de origen.⁷

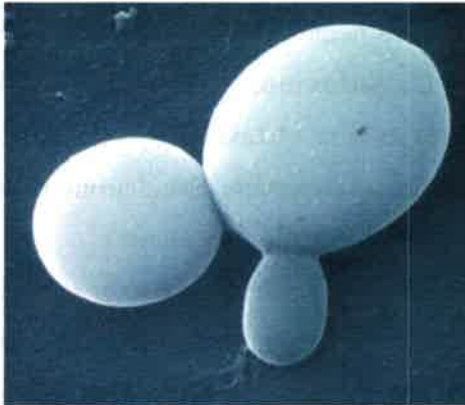


Figura 2. *C. albicans* vista en microscopio electrónico de barrido

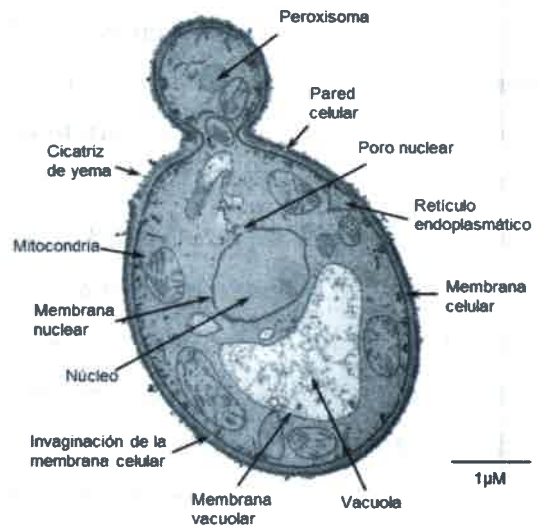


Figura 3. Vista interna de *C. albicans* en proceso de gemación¹³

Todas las especies de *Candida* son similares y presentan tinción Gram positiva, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. Microscópicamente, *C. albicans* presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemantes a hifas.^{7,14}

En contraste con otras especies de *Candida*, *C. albicans* tiene una marcada tendencia a formar esporas grandes de pared gruesa, denominadas clamidosporas (Figura 4), sobre todo cuando se cultivan en un medio especial como agar harina de maíz. La clamidospora tiene un diámetro de 7 a 8 micras. Es una característica morfológica importante en la identificación de *C. albicans*. Asimismo, tiene la capacidad para producir pseudohifas y tubos germinativos (filamentación en suero; Figura 5) cuando las colonias son inoculadas en suero a temperatura de 37°C, observándose los resultados después de 2 o 3 horas. Un tubo germinativo se define como una extensión filamentosa de una célula levaduriforme que mide alrededor de la mitad del ancho y tres a cuatro veces el largo de la célula.^{15,16} Este puede formarse al inocular células de *C. albicans* en suero humano (inclusive si el suero ha sido congelado y almacenado), así como en suero de diversos animales como perros, bovinos, conejos, cochinos de Guinea y caballos. En cambio, este no se forma en suero caliente coagulado.¹⁵ La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical.^{7,14} Así, *C. albicans* puede crecer al menos en tres morfologías diferentes: levaduras, pseudohifas e hifas. La diferencia

fundamental entre hifas y pseudohifas se relaciona con la organización de sus ciclos celulares. En esta levadura los terminos hifa y tubo germinativo a menudo son usados como sinónimos. La proyección hifal que se forma en el primer ciclo celular, antes de la división, es llamada tubo germinativo y no debe ser usado para describir la yema elongada que se forma en el desarrollo de la pseudohifa. El termino hifa se refiere a todos los filamentos ramificados y no ramificados que tienen uno o más septos y no tienen constricciones o divisiones en el cuello de la célula madre.¹⁷ Los eventos que ocurren en los primeros ciclos celulares están descriptos en la Figura 6 A y una comparación entre pseudohifas e hifas en ciclos subsecuentes es mostrada en la Figura 6 B.¹⁸



Figura 4. Clamidospora de *Candida albicans* en agar harina de trigo



Figura 5. Blastoconidios y tubos germinativos de *Candida albicans*

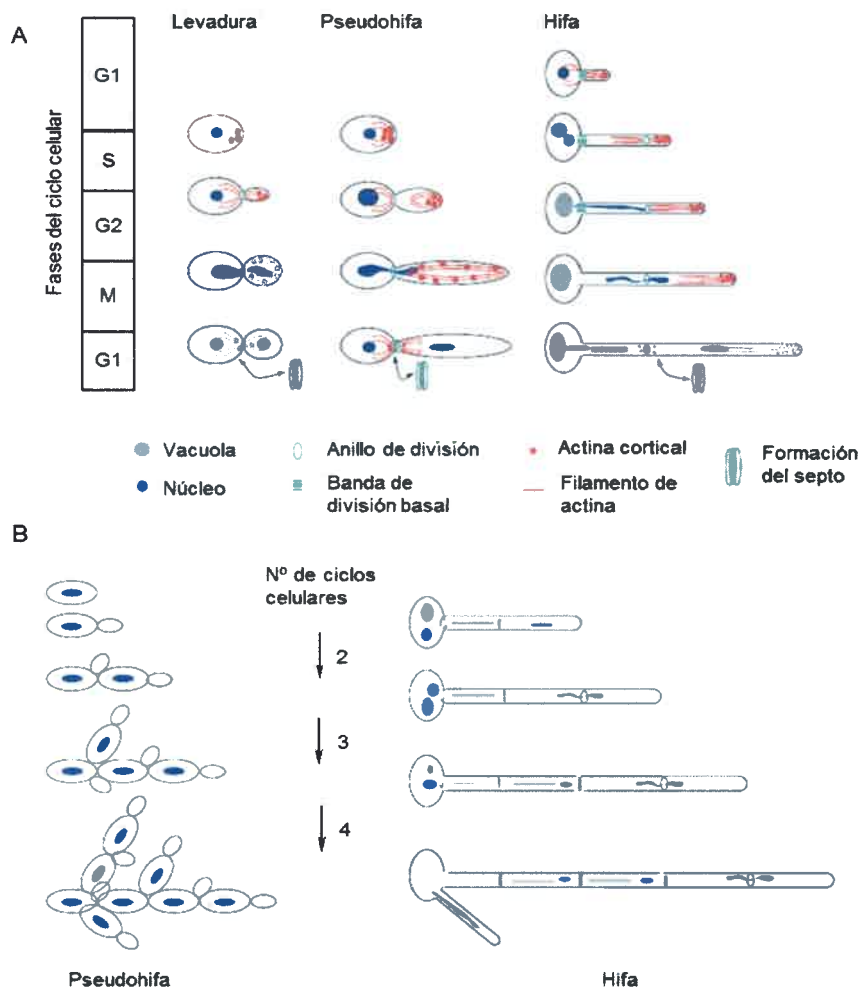


Figura 6. Representación de los ciclos celulares de levaduras, hifas y pseudohifas. (A) Ciclo celular de levaduras y los primeros ciclos celulares de hifas y pseudohifas inducidos desde células de levadura. El tubo germinativo de la hifa emerge antes de la transición G1/S. (B) Representación de 2-4 ciclos celulares en hifas y pseudohifas después de la reinoculación de células de levadura

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable.¹⁹ La fracción lipídica va a depender de la cepa, de la edad del cultivo, de las condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono.²⁰

La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos manano, glucano y quitina. El polisacárido manano representa aproximadamente entre 15,2% y 22,9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D- glucano β -1-3 y el D- glucano β -1-6 constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular. Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas en cantidades que

oscilan entre 6 y 25%, lípidos entre 1 y 7% y quitina entre 0,6 y 9% del peso de la pared celular.²¹⁻²⁶

Estudios ultraestructurales de la pared celular de *C. albicans* han demostrado una compleja microarquitectura. El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinal), la cepa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación.²¹

La mayoría de los investigadores han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera): manoproteínas, β - glucano -quitina, β - glucano, manoproteínas y una capa de fibrillas (Figura 7).²¹⁻²⁸

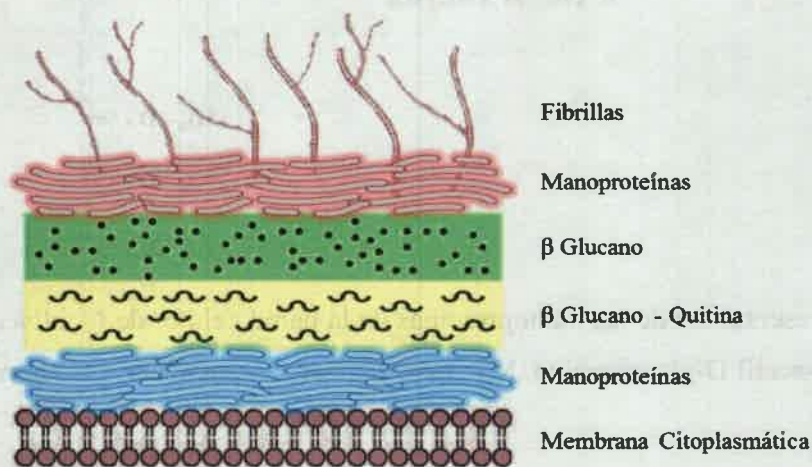


Figura 7. Diagrama esquemático de la pared celular de *C. albicans*

Las capas internas de la pared celular están compuestas mayormente por quitina y glucano.²¹ Estos componentes le dan rigidez a la célula y son esenciales para la división celular.^{29,30} Están presentes tres tipos de glucano: 1) glucano β -1,6 altamente ramificado, 2) glucano β -1,3 altamente ramificado y 3) glucano muy complejo β -1,6- β -1,3 mezclado con quitina. Las proporciones de ciertos tipos de glucano difieren entre las levaduras y los tubos germinales de *C. albicans*.³¹

La capa externa de fibrillas de la pared celular de *C. albicans*, tanto en levaduras como en hifas está compuesta de manano o manoproteínas, aunque este componente también está localizado en varios lugares de la pared celular. Esta capa ha sido descrita en ocasiones como un revestimiento mucoso o capsular.³² El manano ha sido identificado como el antígeno principal de la superficie celular de *C. albicans*.²¹ Basados en estudios de adsorción y de aglutinación este organismo fue agrupado en dos serotipos designados como A y B.³³ La

representación de las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* está constituida por residuos de manosa unidos entre sí por enlaces α -1,6, los cuales se unen a la porción de la proteína a través de dos residuos de *N*-acetil glucosamina (unidos entre sí por enlaces β -1,4) y un residuo de asparagina y residuos de manosa que se unen a la proteína a través de residuos de los aminoácidos serina y treonina (Figura 8).²¹

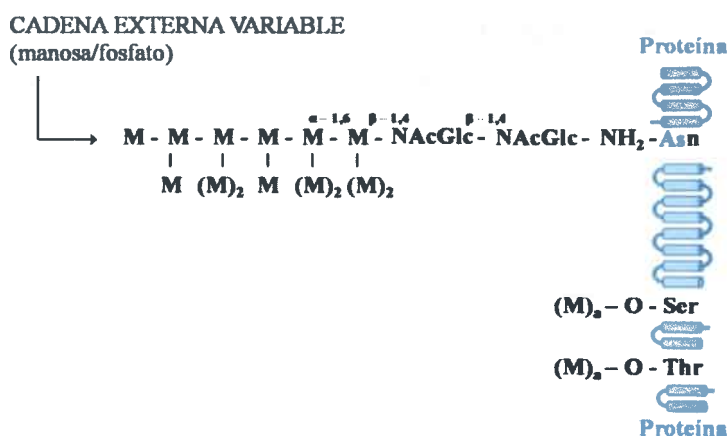


Figura 8. Representación de las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans*; NAcGlc = *N*-acetil D-glucosamina, M = manosa, Ser = serina, Thr = treonina, Asn = asparagina

La membrana citoplasmática es una estructura que reviste gran importancia, ya que los antimicóticos actúan a nivel de la misma, además de contener las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular. Esta presenta una doble capa compuesta por lípidos y posee invaginaciones, que se observan como surcos de 200 a 300 nanómetros de longitud, por 35 a 40 nanómetros de espesor.^{34,35} Fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol constituyen el 90 % de los fosfolípidos de la membrana de *C. albicans*.³⁶ Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y de carbohidratos en menor proporción.^{37,38}

En el citoplasma, al igual que otras células eucariotas, *C. albicans* presenta: ribosomas, mitocondrias con doble capa, gránulos de glucógeno y vacuolas que contienen en algunas ocasiones cuerpos lipídicos y gránulos de polifosfato. El núcleo es típico de una célula eucariota, con membrana nuclear limitante, uno o varios nucléolos, ADN, ARN y varios cromosomas.³⁹

Las levaduras del género *Candida* son la causa principal de infecciones fúngicas invasivas y responsables del 70-90 % de todos los casos.⁴⁰ Dentro del género *Candida*,

C. albicans es la especie más virulenta⁴¹ y la especie predominante encontrada sobre las capas de la mucosa oral, en infecciones vaginales y en infecciones del torrente sanguíneo.⁴² Este microorganismo es un hongo comensal en individuos saludables. Sin embargo, en hospedadores inmunocomprometidos, *C. albicans* puede penetrar el epitelio causando infecciones sistémicas y sanguíneas. Otros factores para el desarrollo de infecciones son la producción del tubo germinativo, crecimiento a 37 °C, producción de proteasas y fosfolipasas, y adherencia de *C. albicans* a las células epiteliales.⁴³ *C. albicans* no es la única especie asociada con la micosis oral en humanos pero es la micosis más común afectando pacientes con VIH. En estos pacientes la candidiasis orofaríngea es una causa mayor de morbilidad. La candidiasis oral puede también conducir a candidiasis esofágica, una complicación aún más preocupante.⁴¹

3.3.2. Cultivos de las especies de *Candida*

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas en agar Sabouraud (AS) y miden de 1,5 a 2 mm de diámetro después de 5 a 7 días. Las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema o “requemado” al continuar envejeciendo. Para aislarlas de las muestras clínicas que siempre llevan bacterias se agregan antimicrobianos como el cloranfenicol al medio simple.⁴⁴

En AS o en otros medios de cultivo similares, las colonias que crecen son lisas, suaves, húmedas, de color y aspecto cremoso (Figura 9). Estas colonias tienen un tamaño que oscila entre 1,5 y 2 mm de diámetro, de consistencia blanda y rápidamente proyectan filamentos hasta la profundidad del agar. Después de 4-5 días se percibe un olor característico de levadura.^{7,44} Otros medios de cultivo en los cuales puede crecer *C. albicans* son: Pagano-Levin, en el cual las colonias se observan de color crema; Albicans ID (Biomerieux), donde las colonias se observan de color azul y CHROMagar® *Candida* (CHROMagar), observándose las colonias de color verde.⁴⁵

Las colonias de *Candida* crecen *in vitro* en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo a pH con rango entre 2,5 y 7,5 y temperatura que oscila entre 20 °C y 38 °C. El crecimiento de colonias se puede detectar entre 48 y 72 horas después de la siembra y los subcultivos pueden crecer más rápidamente.⁷ La habilidad de las levaduras de crecer a 37 °C es una característica importante a ser considerada en su identificación a partir de muestras clínicas. Las levaduras más virulentas crecen rápidamente a temperaturas que oscilan entre 25°C y 37 °C, mientras que las poco virulentas dejan de crecer a 37 °C.⁷



Figura 9. Colonias de *C. albicans* en agar Sabouraud, cultivo de 48 h a 37 °C

3.3.3. Hábitat de *Candida*

Los microorganismos del género *Candida* son oportunistas que se encuentran como comensales en cavidad bucal, intestino, vagina (mujeres gestantes), secreción bronquial, piel del hombre y de ciertos animales. En la cavidad bucal la colonización es significativamente distinta de sitio a sitio.^{7,44}

No obstante, la capacidad de infección por *Candida* disminuye porque existe un equilibrio biológico con la flora comensal bacteriana. En general, *C. albicans* no está presente de manera prolongada en la piel sana, excepto en la región perianal.¹¹

La presencia de *C. albicans* como comensal en las membranas mucosas de sujetos asintomáticos es común, ya que, existe un balance entre los mecanismos de defensa del hospedador y el potencial invasivo por parte de las levaduras.⁴⁶ Sin embargo, en sujetos inmunosuprimidos o médicamente comprometidos, la infección por *C. albicans*, o por otras especies de *Candida* puede derivar en el establecimiento de una candidiasis, la cual se puede manifestar de manera superficial o invasiva.^{46,47}

Los cambios en el hospedador son usualmente los responsables del desequilibrio ecológico. Estos cambios, además de la disminución de los mecanismos de defensa, pueden ser: reducción del flujo salival, disminución de las inmunoglobulinas, debilidad general, estados de malnutrición, desórdenes endocrinos como hipotiroidismo, infección por VIH, antibioticoterapia prolongada, quimioterapia y radioterapia.⁴⁸⁻⁵⁰

C. albicans se puede encontrar en condición facultativamente patógena, desde un estado saprofitico simple, pasando por el comensalismo, hasta la situación de patógeno. Resulta muy difícil la transmisión de la infección por *C. albicans* de animal a hombre, siendo el ciclo de infección más común de animal a animal y de hombre a hombre.⁵¹ *C. albicans*, es el patógeno fúngico humano más importante, causando varias enfermedades desde infecciones de la mucosa superficial hasta desórdenes sistémicos mortales.⁵²⁻⁵⁴

3.4. Agentes antifúngicos

Existen cinco clases principales de fármacos antifúngicos: los análogos de pirimidina fluorada, los polienos, las alilaminas, los azoles y las equinocandinas. En la Tabla 1 se describe el sitio blanco de cada uno y los mecanismos de resistencia exhibidos por parte de los microorganismos.⁵⁵

Tabla 1. Fármacos antifúngicos, sus sitios blanco y posibles mecanismos de resistencia

Clase de antifúngico y sus miembros	Blanco primario (modo de acción)	Mecanismo de resistencia
Análogos de pirimidina fluorada 5-FC	Síntesis de ARN y ADN (incorporación errónea de 5-fluorouracilo)	Mutación en Fur1p (uracilo fosforribosil transferasa)
Polienos nistatina, anfotericina B	Ergosterol de la membrana celular (incrementa la permeabilidad y daño oxidativo)	Inducción de bajo contenido de ergosterol de membrana, en algunos hongos
Alilaminas terbinafina, naftifina	Biosíntesis de ergosterol (inhibición de la escualeno epoxidasa; acumulación de intermediarios de esteroles tóxicos)	Mutaciones en Erg1p, eflujo a través de transportadores ABC, inducción de tolerancia al estrés, inducción de la detoxificación
Azoles miconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol, isavuconazol, pramiconazol, albaconazol	Biosíntesis de ergosterol (inhibición de Erg11p, paso limitante de la biosíntesis de ergosterol; conversión del sustrato Erg11p en esteroides metilados tóxicos)	Mutaciones en Erg11p, sobreexpresión inducida de Erg11p, eflujo a través de transportadores ABC y MFS, tolerancia a los esteroides metilados mediante mutación en ERG3.
Equinocandinas casposfungina, micafungina, anidulafungina	Biosíntesis de la pared celular [Inhibición de $\beta(1,3)$ -glucano sintasa]	Mutación en $\beta(1,3)$ -glucano sintasa

3.4.1. Los azoles

La incidencia de infecciones fúngicas ha aumentado en las últimas tres décadas debido a varios factores: el incremento del número de pacientes inmunodeprimidos (tratamientos quimioterápicos oncológicos, trasplante de órganos, sida, pacientes sometidos a tratamiento esteroideo), el empleo de antibacterianos de amplio espectro y el mayor uso de procedimientos médicos invasores.^{56,57,58}

C. albicans y *Aspergillus* spp. son las principales causas de estas infecciones. Sin embargo, en los últimos años se ha observado la emergencia de especies de *Candida* distintas de *C. albicans*, así como otros hongos oportunistas que antes eran raros. Así se observa un aumento en la proporción de *C. glabrata* y *C. krusei* relacionado con el uso de azoles de primera generación, o de *C. parvovirus* en relación con los catéteres.

El incremento del uso de azoles como profilaxis ha disminuido la incidencia de candidiasis invasora en algunas poblaciones (pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos). Sin embargo, el empleo de los azoles puede llevar a la aparición de cepas de *C. albicans* resistentes, así como a la aparición de especies distintas a ella resistentes a este azol.⁵⁶

En 1969 se publican datos sobre los primeros azoles, clotrimazol y miconazol. Ambos contienen un anillo imidazólico, en el cual recae la actividad del fármaco, pero difieren en la distancia entre el imidazol y el átomo de carbono asimétrico (Figura 10).

La parte activa del clotrimazol se ha utilizado en pocos derivados y siempre para administración tópica. En cambio, la estructura del miconazol ha servido para crear muchos derivados de administración tópica y es la base del ketoconazol, el primer azol con suficiente biodisponibilidad oral para emplearse en el tratamiento de infecciones micóticas profundas. En el ketoconazol se produce un cambio estructural importante respecto al miconazol, que consiste en la introducción de un anillo dioxolano en el carbono asimétrico del grupo activo (Figura 10).

En los años 1980 se introdujeron dos nuevos cambios en la estructura química de estos fármacos que se han mantenido en los derivados más modernos. El primero fue la sustitución del imidazol por un triazol y el segundo el uso de un átomo de flúor en lugar de cloro en el anillo benceno unido al átomo de carbono asimétrico (Figura 11). Ambas modificaciones se han relacionado con una mayor especificidad por la enzima del hongo y menor por la humana.⁵⁹

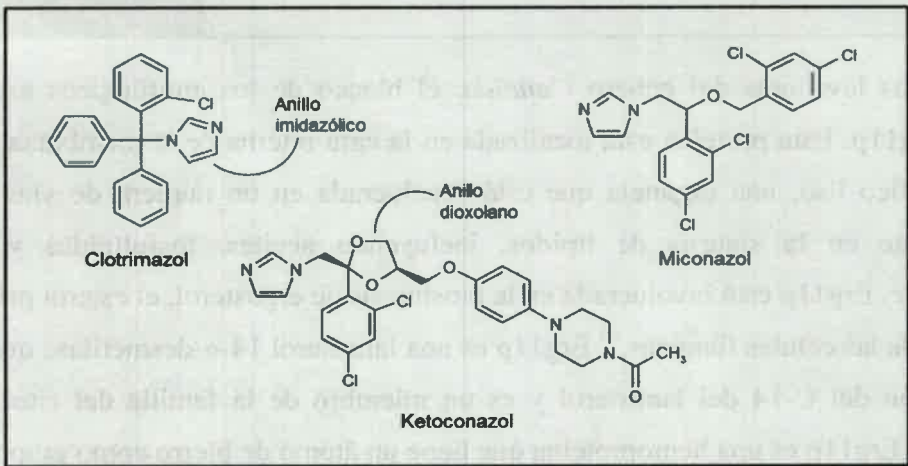


Figura 10. Estructura química de los imidazoles

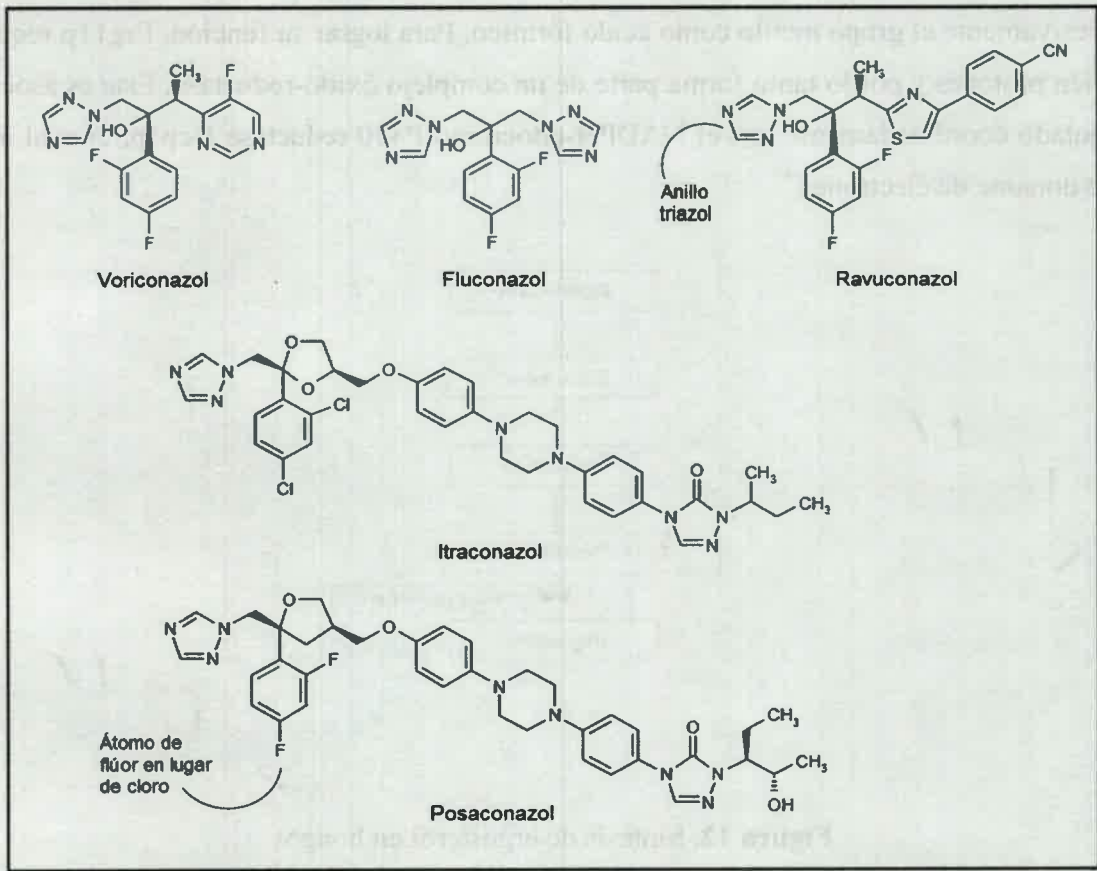


Figura 11. Estructura química de los triazoles

En las levaduras del género *Candida*, el blanco de los antifúngicos azólicos es la proteína Erg11p. Esta proteína está localizada en la cara interna de la membrana del retículo endoplasmático liso, una organela que está involucrada en un número de vías biológicas, especialmente en la síntesis de lípidos, incluyendo aceites, fosfolípidos y esteroides. Precisamente, Erg11p está involucrada en la biosíntesis de ergosterol, el esteroil principal de la membrana de las células fúngicas.⁶⁰ Erg11p es una lanosterol 14- α -desmetilasa que cataliza la desmetilación del C-14 del lanosterol y es un miembro de la familia del citocromo P450 (Figura 12). Erg11p es una hemoproteína que tiene un átomo de hierro como grupo prostético, cuya función es fijar el oxígeno molecular necesario para la actividad enzimática. En efecto, la enzima lo necesita para oxidar tres veces sucesivamente el sustrato lanosterol para eliminar progresivamente el grupo metilo como ácido fórmico. Para lograr su función, Erg11p requiere también protones y por lo tanto forma parte de un complejo óxido-reductasa. Este es asociado y regulado coordinadamente con el NADPH-citocromo P450 reductasa Ncp1p, el cual actúa como donante de electrones.⁶¹

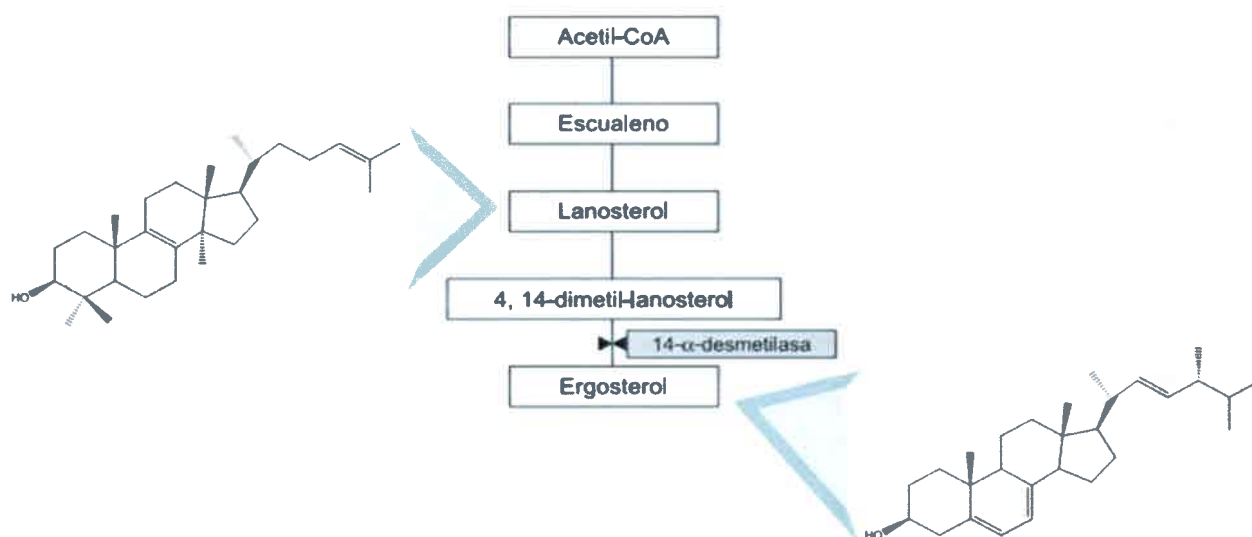


Figura 12. Síntesis de ergosterol en hongos

Los antifúngicos azólicos se comportan como inhibidores competitivos de la fijación de O₂ uniéndose al sexto sitio de coordinación del hierro en el grupo hemo por el nitrógeno del N-heterociclo del anillo del triazol (Figura 13).⁶² Una vez unido al paquete catalítico de la enzima, los azoles impiden la desmetilación del lanosterol. Esto conduce a un déficit de ergosterol y por lo tanto tiene múltiples consecuencias sobre la fisiología de la célula de la levadura. En efecto, el ergosterol desempeña funciones importantes en la célula fúngica tales

como el correcto funcionamiento de las proteínas de membrana, la compartimentalización de la membrana, la endocitosis, la fusión vacuolar y la señalización de feromonas.⁶³ Otra consecuencia de la acción de los azoles es la acumulación de esteroides metilados los cuales son tóxicos para la célula fúngica, en particular 14 α -metil-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol, mas simplemente llamado 14 α -metil-3,6-diol.⁶⁴

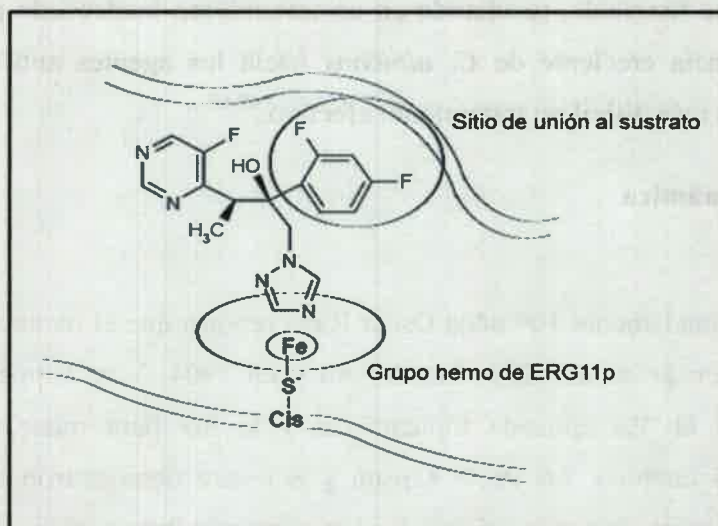


Figura 13. Interacción de los azoles con la enzima ERG 11p⁵⁹

Una movilización fuerte de la comunidad científica permitió la dilucidación de los mecanismos moleculares subyacentes a la resistencia del fluconazol en las levaduras de *Candida*, de los cuales un número de ellos podrían ser extrapolados a la familia triazol completa.⁶⁵ La resistencia a fluconazol puede ser causada por diferentes mecanismos, incluyendo:

- Alteración en la vía biosintética del esteroil. La inhibición de Erg11p por fluconazol resulta en la depleción del ergosterol y también en la acumulación de esteroides metilados, los cuales inhiben el crecimiento. La alteración de la vía biosintética impide la acumulación de estos compuestos inhibidores del crecimiento.
- Expresión incrementada del gen ERG11 que codifica la enzima blanco de fluconazol, Erg11p. Como un mecanismo de retroalimentación para reponer el ergosterol perdido.
- Mutaciones en el gen ERG11, resultan en una sustitución de aminoácidos que alteran la configuración espacial de Erg11p disminuyendo su afinidad al fluconazol.
- Sobreexpresión de genes codificantes de las proteínas transportadoras de membrana, los cuales transportan fluconazol fuera de la célula.

En aislamientos clínicos de *C. albicans*, muchos de estos mecanismos están a menudo combinados para dar lugar a un desarrollo gradual de resistencia a fluconazol clínicamente relevante.⁶⁶

Los tratamientos convencionales para candidiasis oral han demostrado tener un efecto fungistático más que fungicida, resultando en un tratamiento inadecuado para los pacientes. Además, la resistencia creciente de *C. albicans* hacia los agentes antifúngicos tópicos y sistémicos ha hecho más difícil un tratamiento efectivo.⁶⁷⁻⁶⁹

3.5. Terapia fotodinámica

3.5.1. Historia

Hace aproximadamente 100 años Oscar Raab reportó que el naranja acridina era letal para el paramecio en presencia de la luz del sol y en 1904, Von Tappeiner combinó una solución de eosina al 5% aplicada tópicamente y la luz para tratar tumores cutáneos, condilomas y lupus cutáneo. En 1960, Lipson y Schwarz demostraron la localización del agente fotosensibilizante hematoporfirina en los tumores. Pero recién alrededor de 1970, Diamond consigue destruir tumores con luz blanca tras la inyección de hematoporfirina en modelos animales de cáncer. En 1976, Kelly y Snell, indujeron necrosis de papilomas de vejiga sin dañar el tejido sano usando un derivado de la hematoporfirina. En 1978, Daugherty y col. presentaron numerosos estudios acerca de la aplicación de esta técnica nueva en el tratamiento de tumores cutáneos con hematoporfirina administrada por vía endovenosa como sustancia fotosensibilizante y en 1999 se aprobó la aplicación tópica del ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), el cual conduce a la producción endógena de la protoporfirina IX como agente fotosensibilizador.⁷⁰

Si bien la luz ha sido empleada en el tratamiento de enfermedades desde la antigüedad.⁷¹ Sólo recientemente ha sido utilizada con algún grado de importancia en medicina y cirugía. Una de las aplicaciones más recientes y significantes de fotosensibilización en medicina es la detección y el tratamiento de tejidos neoplásicos.⁷²

La terapia fotodinámica (TFD) ha sido utilizada exitosamente en el tratamiento de varios tumores, incluyendo a los de cáncer de piel, cáncer en la cavidad oral, cáncer bronquial, de esófago, de vejiga, tumores en cabeza y cuello, además de tumores no malignos.^{71,91,93} A lo largo de los años muchos efectos biológicos se produjeron aplicando fotosensibilizadores como herbicidas,^{73,74} insecticidas,^{75,76} antibacterianos, antimicóticos y antivirales^{77,78} y para la esterilización de agua, fluidos biológicos y sangre contaminada con microorganismos patógenos.⁷⁷⁻⁸¹

3.5.2. Principios básicos

La interacción de la luz con los organismos vivos puede conducir a la formación de varias especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente). El mecanismo fotoquímico puede involucrar reacciones fotoquímicas directas de las especies excitadas (ionización, dimerización, etc.) o reacciones conducidas por mecanismos de fotosensibilización, los cuales son los mecanismos principales que ocurren durante la irradiación con luz UVA (320-400 nm) y visible (400-700 nm). Cuando la tasa de producción de ROS y RNS supera sus respectivas tasas de supresión, se establece un desbalance redox y éste a menudo está implicado en una serie de condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo cáncer, envejecimiento, fotoenvejecimiento de piel y una variedad de procesos degenerativos.⁸² Por otro lado, el desbalance redox fotoinducido también puede ser inducido artificial e intencionalmente como una estrategia para atacar y destruir blancos celulares y/o tejidos. Tal estrategia, conocida como TFD, ha sido usada satisfactoriamente para tratar varias enfermedades. La TFD requiere la incorporación selectiva de una droga fotoactiva, es decir un fotosensibilizador, en las células o tejidos objetivos, seguido por la subsecuente exposición de la región blanco a luz de longitud de onda apropiada. La acción combinada del fotosensibilizador y la luz generan las especies citotóxicas que en última instancia conducen a la muerte celular.⁸³⁻⁸⁸

La TFD aprovecha las reacciones fotoquímicas originadas de la interacción de agentes fotosensibilizantes, la luz y el oxígeno, con fines terapéuticos. Este procedimiento consta de dos fases. La primera consiste en la fotosensibilización de las células anormales. Esta fotosensibilización se puede lograr administrando agentes exógenos por vía tópica, oral o intravenosa (porfirinas, ftalocianinas, etc.) o estimulando la vía endógena aplicando precursores como el 5-ALA o sus derivados. Los precursores son de preferencia absorbidos por células en fase de proliferación y transformados en protoporfirina.⁸⁹ Las protoporfirinas son componentes de la hemoglobina, cuando no se incorporan a la molécula del hemo pueden absorber energía de los fotones y transferirla a las moléculas de oxígeno que están en la cercanía. La segunda fase involucra la activación del fotosensibilizador en presencia de oxígeno, mediante una luz con longitud de onda específica dirigida contra el blanco terapéutico. La TFD tiene selectividad dual. En primer lugar porque el fotosensibilizador se acumula preferentemente en las células y por otro lado la luz incide sobre las mismas minimizando el daño de las estructuras sanas adyacentes.⁷⁰

La TFD del cáncer es una modalidad terapéutica promisoriosa para el tratamiento y cura de algunos tumores sólidos.^{90,91} Los tejidos neoplásicos tratables incluyen a aquellos tumores que pueden ser irradiados externamente o internamente por endoscopia a través del uso de fibras ópticas.^{92,93} También, la TFD es efectiva para el manejo de lesiones cutáneas superficiales premalignas, malignas y benignas, en casos en los cuales el tamaño, el sitio o el número de las lesiones limitan la eficacia o la aceptabilidad de las terapias convencionales. La TFD es un procedimiento apropiado para personas que tienen contraindicada la cirugía por su edad, enfermedades asociadas (cardiopatía, trastornos de la coagulación, etc.) o como es el caso de los pacientes trasplantados, dado que permite su tratamiento de forma menos agresiva. La tasa de efectos adversos es baja y los resultados cosméticos son buenos.⁹⁴

3.5.3. Mecanismo de acción

Los agentes fotosensibilizadores tienen una configuración electrónica estable, la cual está en un estado singlete en su nivel energético basal o más bajo, ⁰Sens.⁹⁵ Esto significa que no hay espines electrónicos desapareados (Figura 14).^{96,97}

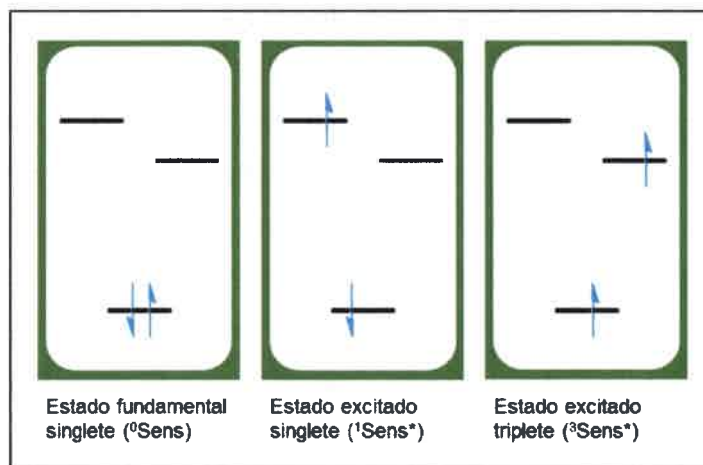


Figura 14. Estado fundamental singlete (⁰Sens) de una molécula y estados excitados singlete (¹Sens*) y triplete (³Sens*). Los símbolos (↑↓) y (↑↑) representan pares de electrones apareados y desapareados, respectivamente

Después de la absorción de un fotón de luz de longitud de onda específica, las moléculas del fotosensibilizador son promovidas a un estado excitado, ¹Sens*, el cual es también un estado singlete y es de corta duración con un tiempo de vida media entre 1-10 ns.^{95,98} El fotosensibilizador puede regresar al estado basal emitiendo un fotón de luz (fluorescencia) o por conversión interna con pérdida de energía como calor. Alternativamente,

la molécula puede convertirse al estado triplete, $^3\text{Sens}^*$. Esta conversión ocurre por un sistema de intercruciamiento el cual involucra un cambio en el espín de un electrón.⁹⁹ Desde este estado, el agente excitado, también puede regresar al estado basal emitiendo un fotón de luz (fosforescencia) o por decaimiento térmico. El fotosensibilizador en estado triplete posee menor energía que el estado singlete pero tiene un tiempo de vida mayor que permite intervenir en procesos biomoleculares (Figura 15).

El mecanismo fotoquímico asociado con la muerte celular ha sido clásicamente descrito por dos categorías de oxidaciones fotosensibilizadas. La primera categoría (mecanismo tipo I) tiene en cuenta muchos procesos redox de un electrón (electrón o electrones acoplados a protones, o transferencia de átomos de hidrogeno directa) entre el fotosensibilizador en estado electrónicamente excitado triplete ($^3\text{Sens}^*$) y un blanco celular tal como lípidos insaturados de membrana, proteínas, ADN o incluso oxígeno molecular disuelto. Los radicales formados en esta etapa inicial tendrán electrones desapareados centrados en átomos de carbono, oxígeno, azufre o nitrógeno.⁸² Usualmente, pero no siempre, los tripletes son reducidos, generando radicales aniónicos (o semireducidos) y los fotosensibilizadores son oxidados, formando radicales catiónicos (o semioxidados). El oxígeno molecular reacciona rápidamente con radicales aniónicos o semireducidos, formando radical anión superóxido, reponiendo el fotosensibilizador en estado fundamental. El oxígeno además puede unirse a muchos radicales, formando por ejemplo, radicales peroxilo con radicales centrados en carbono.⁸² Las reacciones que ocurren después de esta etapa inicial, pueden involucrar reacciones de radicales con otros sustratos (oxígeno, peróxido de hidrogeno, metales de transición con actividad redox, óxido de nitrógeno y sitios redox activos de biomoléculas), causando producción intracelular de una gran variedad de radicales, ROS y RNS citotóxicos, incluyendo radicales hidroxilo, los cuales son considerados ser las ROS más reactivas, capaces de sustraer átomos de hidrógeno de los grupos metileno.^{82,100-102} Por otro lado, la energía electrónica disponible en el fotosensibilizador en estado triplete puede ser transferida al oxígeno molecular y conducir a la producción intracelular de oxígeno molecular singlete ($^1\text{O}_2$) (mecanismo tipo II).¹⁰⁰ Debido a que ambos, radicales libres y $^1\text{O}_2$, pueden ser especies altamente citotóxicas, los dos mecanismos tipo I y II pueden inducir la destrucción de blancos biológicos (Figura 16).^{83-88,100,101}

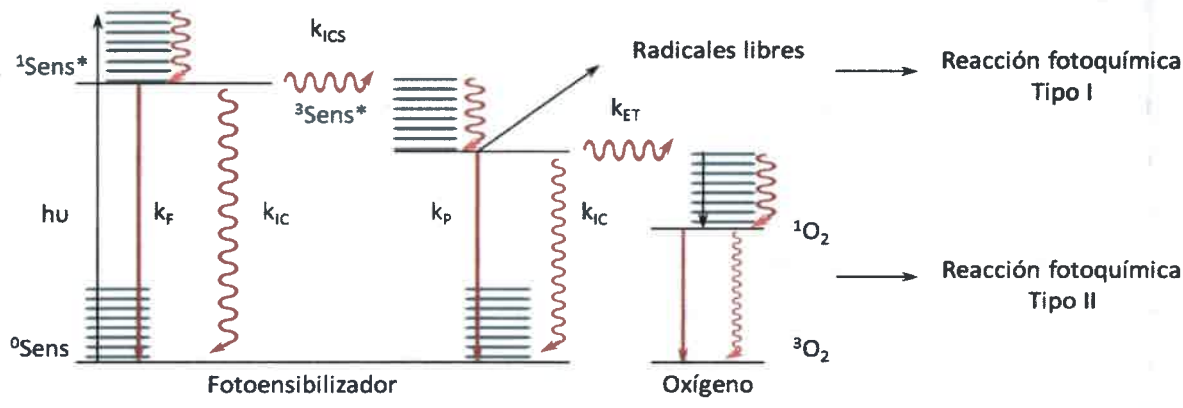


Figura 15. Procesos fotoquímicos involucrados en inactivación fotodinámica. Fluorescencia (F), conversión interna (IC), sistema de intercruzamiento (ICS), fosforescencia (P), transferencia de energía (ET)

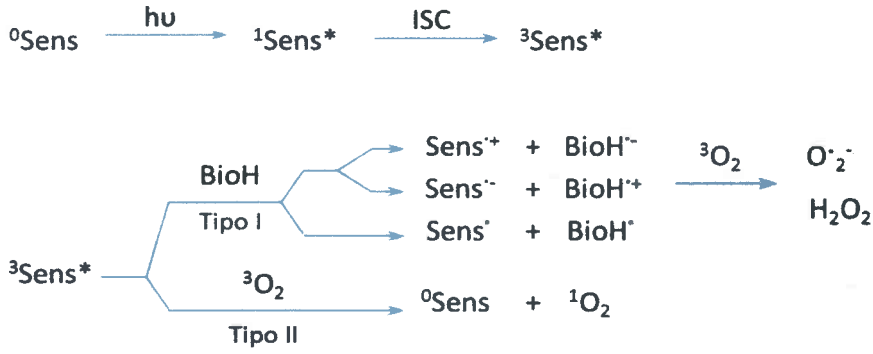


Figura 16. Mecanismos del proceso fotodinámico

Cualquier especie electrónicamente excitada puede participar en ambos mecanismos de fotosensibilización, la competencia entre estas vías de reacción son moduladas principalmente por las propiedades y concentraciones de los distintos sustratos disponibles en el medio de reacción, así como por el nivel energético del triplete y los potenciales de óxido-reducción del triplete asociado con el fotosensibilizador.¹⁰⁰⁻¹⁰² Los procesos de tipo II pueden ser más eficientes para las aplicaciones en TFD que sus respectivos homólogos tipo I.⁸³⁻⁸⁸ Esta última premisa se origina en la observación de que la producción de radicales libres a través de mecanismos de tipo I puede conducir a la destrucción del fotosensibilizador, aunque los derivados radicales provenientes del fotosensibilizador pueden ser recuperados al agente fotodinámico mediante la reacción con moléculas de oxígeno. Por el contrario, los eventos de transferencia de energía (tipo II) son más propensos a preservar el fotosensibilizador. Sin embargo, la evaluación del potencial del fotosensibilizador para las aplicaciones en TFD

puede ser engañosa cuando se basa solamente sobre las propiedades fotoquímicas y fotofísicas (estudios *in vitro*).¹⁰¹⁻¹⁰⁵ Además, no siempre es fácil predecir la participación de los mecanismos tipo I y II en ambientes biológicos complejos.^{86,101-103}

Por lo tanto, se cree que el $^1\text{O}_2$ es el factor principal responsable de la acción fotodinámica.^{85,106} Este oxígeno altamente reactivo tiene un tiempo de vida corto de aproximadamente 10^{-6} s (Figura 17) y las células eucariotas tienen un diámetro de $\sim 10\text{-}30\ \mu\text{m}$. Así, el efecto inicial producido por el $^1\text{O}_2$ está espacialmente confinado al lugar de formación y la muerte celular depende de la localización intracelular del fotosensibilizador.¹⁰⁷ En consecuencia, la difusividad limitada puede aumentar la respuesta localizada sin daño a los tejidos del huésped. Sin embargo, incluso en los casos donde pueden ocurrir reacciones de tipo I, las reacciones de tipo II comúnmente tienen lugar en tándem y es difícil diferenciar los efectos fotobiológicos que son debidos exclusivamente a las especies radicales.¹⁰⁸ Para determinar el mecanismo involucrado en la toxicidad del fotosensibilizador, los estudios de fotosensibilización celular pueden ser llevados a cabo en presencia de recolectores y desactivantes específicos de especies de oxígeno activas.¹⁰⁹

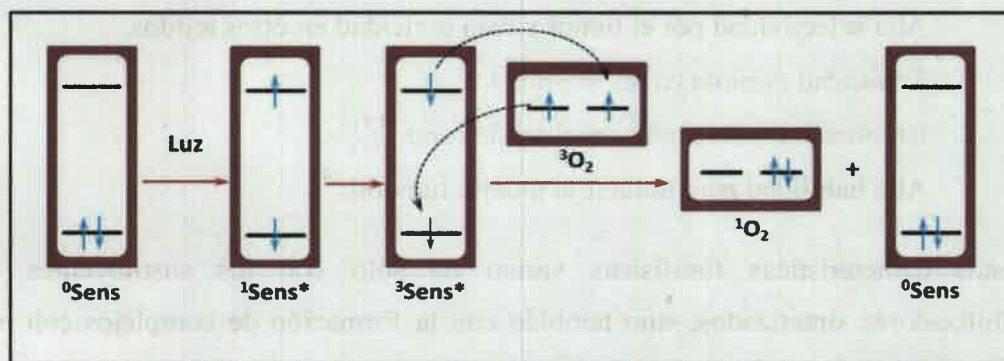


Figura 17. Fotogeneración de $^1\text{O}_2$ durante el proceso fotodinámico

En resumen, ambos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente y la relación entre los dos procesos depende principalmente del sensibilizador, del sustrato y de la naturaleza del medio.¹¹⁰ Sin embargo, en condiciones aeróbicas está aceptado que $^1\text{O}_2$ es la principal especie responsable de la inactivación celular.^{107,111,112}

3.5.4. Agentes fototerapéuticos

Dentro de las familias de los fotosensibilizadores propuestos para aplicaciones en TFD, podemos mencionar porfirinas, clorinas, ftalocianinas, fullerenos, fenotiazinas y aminotriarilmetanos. Algunos de los requisitos más importantes que debe caracterizar a un fotosensibilizador para lograr una actividad fotodinámica efectiva son:^{113,114}

- Un proceso de síntesis adecuado.
- Alta pureza química.
- Alto coeficiente de absorción en la región visible del espectro cercana a la ventana fototerapéutica (600 a 800 nm).
- Energía del estado triplete apropiada ($E_T > 95$ kJ/mol) para poder transferir eficientemente la energía al estado fundamental del oxígeno.^{113,114}
- Estado excitado triplete con un tiempo de vida largo para producir 1O_2 eficientemente ($\tau_T > 1$ μ s).^{72,79}
- Alta selectividad por el tumor y baja toxicidad en otros tejidos.
- Toxicidad mínima en la oscuridad.
- Eliminación más rápida en el tejido sano.^{94,115}
- Alta habilidad para inducir la muerte tumoral.¹¹⁶

Estas características fotofísicas varían no sólo con los sustituyentes de los fotosensibilizadores sintetizados, sino también con la formación de complejos con metales, tales como paladio, cinc, cobre y cadmio.¹¹⁷

3.6. Fotoinactivación de levaduras

La creciente resistencia a los agentes antifúngicos de uso en terapéutica aumentó la atención en la inactivación fotodinámica (IFD) de los hongos.¹¹⁸ El interés en la IFD de levaduras se basó inicialmente en el papel de la levadura como organismo modelo. Son fáciles de cultivar y pueden ser utilizadas en las investigaciones que se dificultan para ser realizadas con células más complejas. Las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* se han utilizado como los organismos modelos para determinar el daño celular inducido por inactivación fotodinámica en las células eucariotas.¹¹⁹⁻¹²² Luego la atención se centró principalmente en la IFD de hongos patógenos o potencialmente patógenos como el *Aspergillus fumigatus*,¹²³ *Trichophyton rubrum*^{124,125} y especialmente *C. albicans*.^{53,126,127} Este último es un habitante común de la boca, de la garganta, de la zona

digestiva y de la piel y en anfitriones con un sistema inmune comprometido puede llegar a ser patógeno.^{128,129} La candidiasis en la orofaringe es una de las infecciones oportunistas más comunes que acompaña a pacientes de SIDA, y la resistencia de *C. albicans* a fluconazol, un agente antifúngico usado con frecuencia por tales pacientes, ha sido demostrada.^{118,130,131}

La IFD surge como una alternativa probable debido a que no induce resistencia ni provoca efectos mutagénicos.¹³² Además, la posibilidad de erradicar hongos por la activación de drogas con luz parece tener un potencial terapéutico inmediato para el manejo de enfermedades infecciosas.

3.6.1. Principios generales de la IFD de hongos

Muchos sensibilizadores, mayormente pertenecientes a tres grupos químicos (fenotiazinas, porfirinas y ftalocianinas) han sido investigados. Como regla general, los sensibilizadores deberían ser desprovistos de toxicidad en ausencia de la activación con luz y en presencia de irradiación evitar efectos de genotoxicidad y mutagenicidad.^{133,134} El peligro de daños en el ADN en hongos es reducido por la presencia de una membrana que envuelve al núcleo y puede actuar como una barrera a la penetración de los sensibilizadores o de sus fotoproductos.¹³⁵ El efecto fotodinámico antimicrobiano ha sido declarado estrictamente dependiente de parámetros físicos y químicos como la banda de absorción (λ_{\max}), la intensidad de absorción (ϵ_{\max}) y la cantidad producida de $^1\text{O}_2$.¹³⁶ Además, los mecanismos y la eficiencia de la inactivación celular son dependientes de otras propiedades químicas como el balance lipofilicidad/hidrofiliicidad (log P), el grado de ionización (pK_a) y la presencia de grupos cargados eléctricamente que califica el tipo y la eficacia de los mecanismos celulares de incorporación del fotosensibilizador y las vías de su distribución entre los compartimientos subcelulares.¹³⁶

La pared celular del hongo le provee protección del ambiente.¹³⁷ Por lo tanto, la eficiencia del proceso fotosensible es marcadamente más pronunciado por agentes con mayor capacidad de penetración en el interior celular. Recientemente, los derivados de porfirinas catiónicas han sido investigados para la aplicación en el tratamiento y control de levaduras.¹³⁸⁻

140

La región del espectro visible usado para activar el sensibilizador es un tema importante según el tipo de tratamiento a realizar. La luz con longitudes de onda en las regiones del rojo lejano y el infrarrojo cercano (600-800 nm) puede penetrar profundamente en la piel de los mamíferos. Por lo tanto, los fotosensibilizadores con bandas de absorción en

esas longitudes de onda son necesarios para los tratamientos de infecciones que pueden colonizar en zonas más profunda de los tejidos. Sin embargo, los fotosensibilizadores que absorben en la región azul pueden ser adecuados para el tratamiento de las especies de *Candida* que pueden invadir tejidos superficiales, tales como la piel.¹⁴¹

La IFD de levaduras está basada en la administración de un fotosensibilizador, el cual es acumulado preferencialmente en la célula microbiana. La subsiguiente irradiación con luz visible, en presencia de oxígeno, produce específicamente daños en la célula que, consecuentemente, inactiva a los microorganismos (Figura 18).⁸⁵ La IFD posee la ventaja sobre otras terapias de tener una selectividad dual, ya que no sólo el fotosensibilizador puede ser específico de una clase de células, sino que también la luz puede ser irradiada puntualmente en el área afectada.¹⁴²

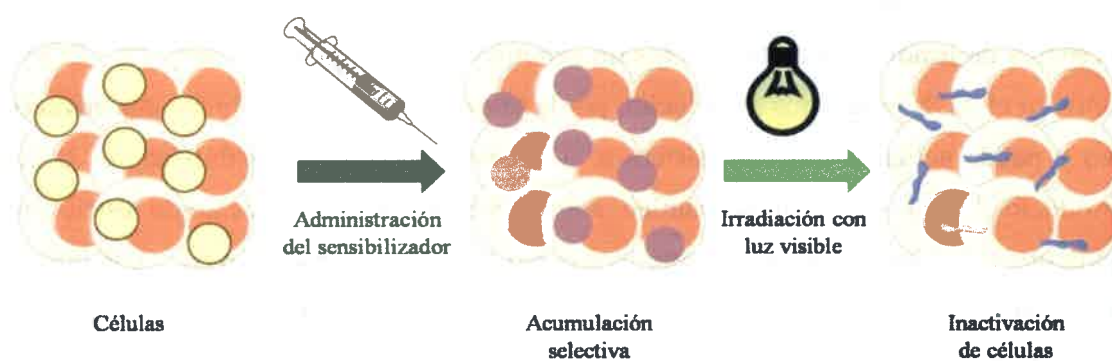


Figura 18. Inactivación fotodinámica de células fúngicas

3.6.2. Ventajas de la IFD

Estudios alentadores sobre IFD de *C. albicans* muestran la importancia de desarrollar posibles alternativas para la terapia antimicrobiana tópica. Los descubrimientos de estos estudios han mostrado que la IFD actúa marcadamente más rápido contra los microorganismos que los fármacos antimicrobianos. Al mismo tiempo, patógenos sensibles y resistentes son eliminados en la misma medida.¹²⁷ Se ha observado que la terapia fotodinámica posee la capacidad de fotodegradar factores de virulencia secretados, como proteínas, enzimas y lipopolisacáridos.^{143,144}

En los últimos años no se han detectado efectos mutagénicos en células fotosensibilizadas, los mecanismos de IFD no son blanco específicos y muchos componentes celulares diferentes son dañados por las ROS, así que la resistencia es poco probable que se desarrolle por el uso prolongado.^{145,146}

Los tejidos infectados localizados y superficiales, tales como en la candidiasis mucocutánea, son fácilmente accesibles para la distribución tópica del fotosensibilizador y la luz. Esta distribución parece ser la característica más prometedora de la IFD, debido a que no hay daño del tejido circundante ni se altera la flora bacteriana residual.¹²⁷ En la Figura 19 se comparan las ventajas del tratamiento fotodinámico en relación al tratamiento con antibióticos.¹⁴⁷

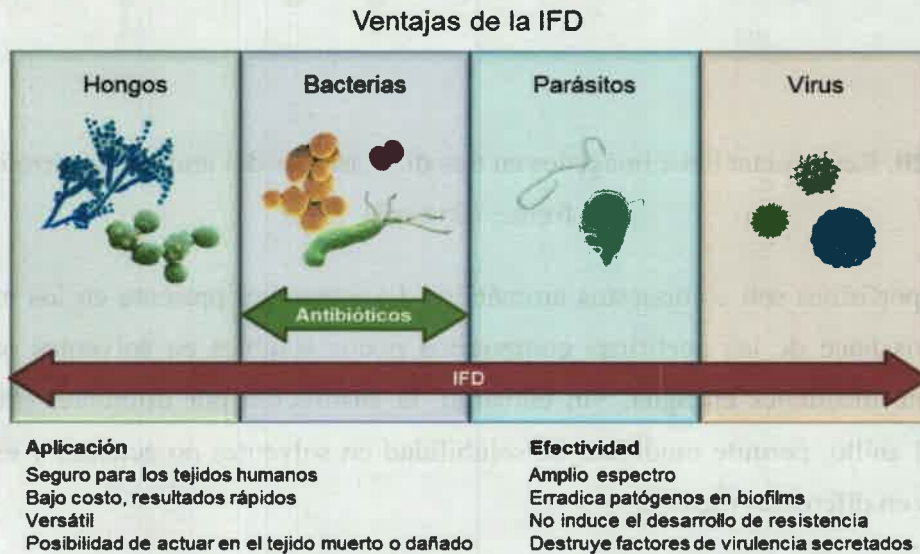


Figura 19. Descripción esquemática de las ventajas de la IFD para infecciones localizadas comparada con las drogas antibióticas

3.7. Características generales de las porfirinas

Los núcleos porfirínicos consisten en cuatro anillos del tipo pirrólico unidos por grupos metino originando un macrociclo (Figura 20). Las porfirinas son estructuras planas con un tamaño de aproximadamente 9 Å de diámetro y con una cavidad central de 4 Å que permite acomodar una gran variedad de iones metálicos logrando, de esta manera, variar las propiedades del macrociclo.⁷²

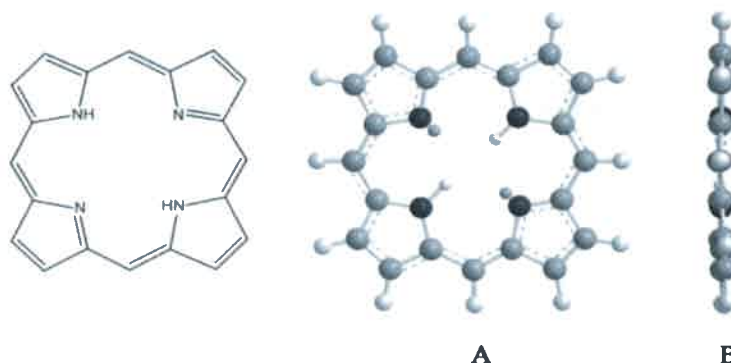


Figura 20. Representación e imágenes en tres dimensiones del anillo tetrapirrólico. (A) frente, (B) perfil

Las porfirinas son compuestos aromáticos. La estructura presente en los macrociclos tetrapirrólicos hace de las porfirinas compuestos pocos solubles en solventes orgánicos y prácticamente insolubles en agua. Sin embargo, la sustitución por diferentes grupos en la periferia del anillo, permite modificar su solubilidad en solventes no acuosos y estudiar sus propiedades en diferentes medios.

3.7.1. Características espectroscópicas y fotoquímicas

Las porfirinas presentan dos clases de bandas en el espectro de absorción visible: una banda intensa ($\epsilon \sim 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) alrededor de 420 nm, llamada banda *Soret*, y cuatro bandas de menor intensidad ($\epsilon \sim 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en la zona comprendida entre 500-700 nm, denominadas bandas *Q* (Figura 21).¹⁴⁸ Estas últimas son denotadas por números romanos a partir del sitio de menor energía. Las bandas de absorción de las porfirinas en la región visible del espectro son debido principalmente a transiciones del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

Los espectros de emisión de las porfirinas presentan dos bandas a 650 y 750 nm, las cuales han sido asignadas a las transiciones *Q* (0-0) y *Q* (0-1) que corresponden a los decaimientos desde el primer estado excitado a los dos primeros niveles vibracionales del fundamental (0 y 1 respectivamente).¹⁴⁹ La emisión de fluorescencia es un parámetro importante para la cuantificación en sistemas biológicos, principalmente para determinar la incorporación y la localización intracelular del agente.¹⁵⁰

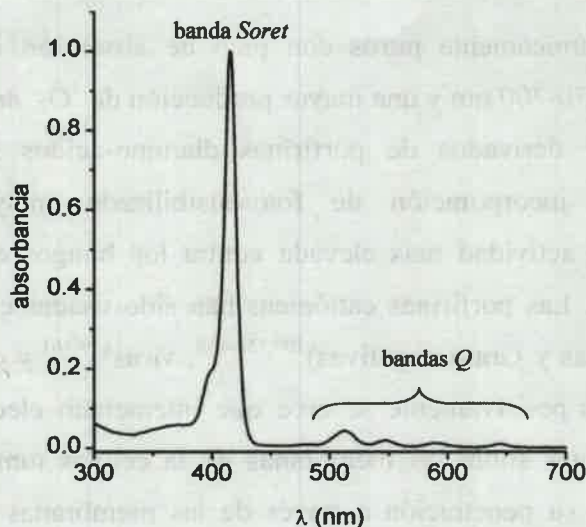


Figura 21. Espectro de absorción de 5, 10, 15, 20-tetrafenilporfirina (TPP) en *N,N*-dimetilformamida

3.7.2. Fotosensibilizadores derivados de porfirinas

El primer fotosensibilizador utilizado en ensayos clínicos ha sido el derivado de hematoporfirina (HPD). Es una compleja mezcla de porfirinas monoméricas y oligomérica. Es considerado un fotosensibilizador de primera generación. Tiene diferentes picos de absorción en la región de 400-650 nm y sus propiedades antifúngicas han sido investigadas desde la década del 80.¹¹⁹

Los HPD no son tóxicos para las células en condiciones de oscuridad, dentro de un amplio rango de concentraciones. Luego de la irradiación estos pueden matar efectivamente las células fúngicas, aunque los mecanismos de fotosensibilización son totalmente diferentes de aquellos descritos para el azul de metileno y otros colorantes de fenotiazina.^{136,151}

Los HPD, no son incorporados por *Saccharomyces cerevisiae* y *C. albicans* y la actividad fototóxica es principalmente promovida por las moléculas libres en el medio acuoso.^{119,152} Estas, luego de la irradiación, provocan una alteración inicial limitada de la membrana citoplasmática que permite la penetración del fotosensibilizador al interior de la célula, la translocación hacia el interior de las membranas y el consecuente fotodaño de los blancos intracelulares.¹⁵³

Posteriormente, nuevos compuestos derivados de porfirinas fueron evaluados por su posible actividad antifúngica. Estas drogas han sido sintetizadas para obtener

fotosensibilizadores químicamente puros con pico de absorción intenso en el rango de longitudes de onda de 650-700 nm y una mayor producción de $^1\text{O}_2$. *meso*-arilglicosilporfirinas anfifílicas neutras¹⁵⁴ y derivados de porfirinas diamino-acidos solubles en agua¹²² se caracterizan por una incorporación de fotosensibilizador mayor en las células y consecuentemente, una actividad más elevada contra los hongos en comparación con las moléculas hidrofóbicas. Las porfirinas catiónicas han sido usadas en la fotoinactivación de bacterias (Gram positivas y Gram negativas)^{109,155-158}, virus¹⁵⁹⁻¹⁶¹ y otros patógenos.^{140,162-166} Las porfirinas cargadas positivamente se cree que interactúan electrostáticamente con las cargas negativas presentes sobre las membranas de la células tumorales y las superficies bacterianas, facilitando su penetración a través de las membranas y consecuentemente su eficacia fotodinámica.^{81,167} Además de actuar sobre la membrana plasmática;¹⁶⁸⁻¹⁷¹ los blancos subcelulares primarios y/o secundarios importantes para las porfirinas catiónicas son: la mitocondria celular,¹⁷²⁻¹⁷⁵ los lisosomas,¹⁷⁴⁻¹⁷⁷ el retículo endoplasmático¹⁷⁵⁻¹⁷⁸ y el núcleo¹⁷⁹.

3.7.3. Localización del fotosensibilizador y selectividad por los microorganismos

Actualmente se conoce que los sensibilizadores catiónicos son más eficientes que sus contrapartes neutrales o aniónicos en la IFD de las células microbianas, especialmente como antibacterianos de amplio espectro, como ha sido demostrado por su mayor actividad contra bacterias Gram negativas.^{81,180} Estos microorganismos tienen una estructura más compleja debido a la presencia de una membrana externa cargada negativamente que forma una barrera física y funcional entre la célula y su ambiente.¹⁸¹ Ha sido demostrado que los agentes aniónicos y neutrales pueden ser efectivos contra bacterias Gram negativas cuando son co-administrados con un agente catiónico tal como polimixina.¹⁸² Sin embargo, los sensibilizadores catiónicos parecen ser más eficientes,^{79,81,85} y son el tipo predominante usado en IFD.¹⁸³

Por otro lado, hay menos estudios sistemáticos sobre el tipo de propiedades fisicoquímicas necesarias en un fotosensibilizador con el fin de hacerlo efectivo en la mediación de la IFD de levaduras y otros hongos. Los hongos presentan blancos mucho más complejos que las bacterias. Por ejemplo, las levaduras, las cuales constituyen un gran grupo de organismos eucariotas bastante dispares, están envueltas por una pared externa ancha compuesta de una mezcla de glucano, manano, quitina y lipoproteínas y separada de la membrana plasmática por un espacio periplásmico. Esta capa gruesa conforma una barrera de permeabilidad intermedia entre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Figura 22).¹⁴⁷

Sin embargo, la evidencia disponible sugiere que la respuesta de las células fúngicas al proceso fotodinámico está estrictamente menos controlada por factores estructurales comparada con las bacterias.¹⁸⁴

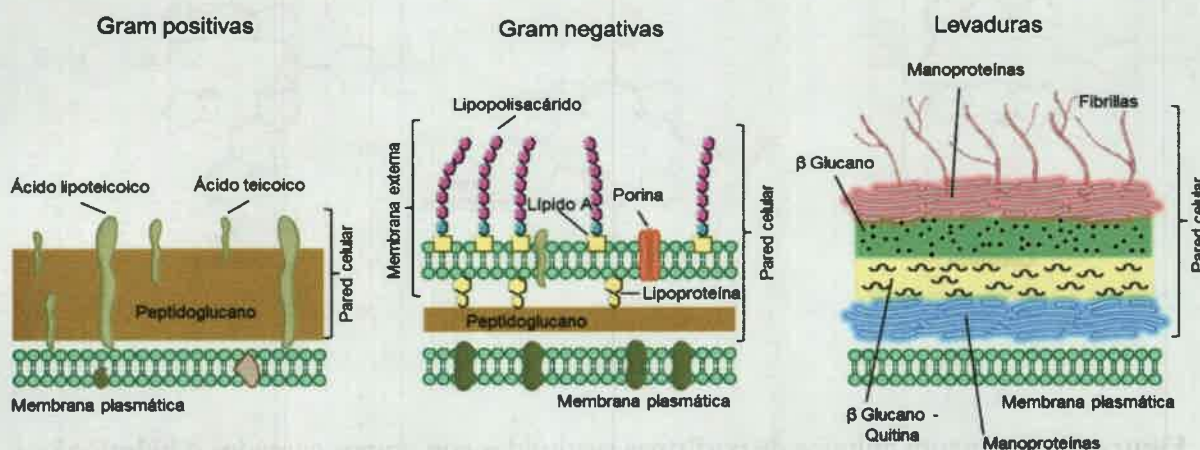


Figura 22. Esquema de la constitución de la pared celular de las bacterias Gram positivas y negativas y de las levaduras

Es conocido que el número y la distribución de las cargas positivas sobre el macrociclo de la porfirina afecta sus sitios preferenciales de localización y eficacia fotodinámica.^{105,168,174,185,186} Las moléculas anfifílicas que contienen ambos sitios hidrofóbicos e hidrofílicos (cargados) en la periferia del macrociclo generalmente presentan más alta eficacia biológica, posiblemente debido a su afinidad aumentada por la interface lípido/acuosa y consecuentemente una mejorada permeabilidad de membrana (Figura 23).¹⁸⁷ El patrón de localización es importante, los blancos adyacentes al fotosensibilizador tienen mayor probabilidad de estar involucrados en el proceso fotodinámico, debido a la alta reactividad y al corto tiempo de vida del 1O_2 generado. Esta especie es un agente oxidante no específico, capaz de actuar sobre una variedad de estructuras biológicas. En consecuencia, no hay defensa celular contra esta especie citotóxica.¹⁸³

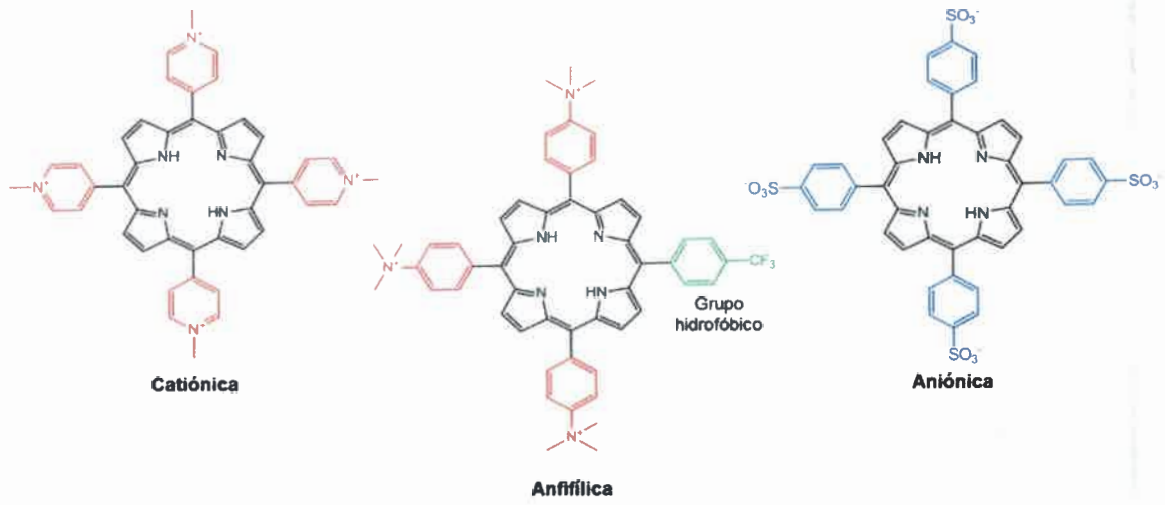


Figura 23. Estructura química de porfirinas sustituidas con grupos cargados o hidrofóbicos

▼ 4. Hipótesis

4. HIPÓTESIS

La acción combinada de un fotosensibilizador derivado de porfirina y la luz visible produce especies reactivas de oxígeno, las cuales causan daño en el microentorno celular provocando la muerte de *Candida albicans* y actuando como antifúngicos eficientes.

▼ 5. Objetivos

5. OBJETIVOS

5.1. Generales

Desarrollar nuevos agentes fotosensibilizadores derivados de porfirinas para la inactivación fotodinámica de levaduras.

5.2. Específicos

- a. Caracterizar las propiedades espectroscópicas de absorción y de fluorescencia de fotosensibilizadores tetracatiónicos derivados de porfirina, tal como 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metil-4-piridil)porfirina (TMPyP⁴⁺), 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TAPP) y 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N,N*-trimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TAPP⁴⁺).
- b. Determinar la unión y la localización intracelular de los fotosensibilizadores en las células de *C. albicans*.
- c. Evaluar la citotoxicidad de las porfirinas en suspensiones celulares y en colonias de *C. albicans* en la oscuridad.
- d. Estudiar la inactivación fotodinámica de la levadura en suspensión y analizar el efecto de la concentración del fotosensibilizador, de la dosis de irradiación, del tiempo de incorporación y de la densidad celular.
- e. Establecer condiciones para la fotoinactivación de *C. albicans* sobre medios sólidos.
- f. Determinar el mecanismo de acción fotoquímica predominante en los procesos de fotoinactivación de *C. albicans*.
- g. Analizar posibles sitios de fotodaño celular producidos por el efecto de los fotosensibilizadores en el ADN.
- h. Evaluar el daño estructural de *C. albicans* causado por el tratamiento fotodinámico.
- i. Analizar el efecto combinado de los fotosensibilizadores amino sustituidos (TAPP y TAPP⁴⁺) y fluconazol sobre la supervivencia de *C. albicans*.
- j. Comparar el desempeño de cada porfirina en relación a la estructura de las mismas.

▼ 6. Materiales y Métodos

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

6.1.1. Equipamientos generales y reactivos

Los espectros UV-visible y de fluorescencia fueron registrados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu Corporation, Tokio, Japón) y en un fluorómetro Spex FluoroMax (Horiba Jobin Yvon Inc, Edison, NJ, EEUU), respectivamente. Los espectros fueron registrados a $25,0 \pm 0,5$ °C, usando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La absorción de los cultivos fúngicos fue determinada en un espectrofotómetro Barnstead Turner SP-830 (Dubuque, IA, EEUU) y la intensidad de la luz establecida con un equipo Radiometer Laser Mate-Q, Coherent (Santa Clara, CA, EEUU). Los estudios de microscopía de luz transmitida fueron realizados con un Axiostar plus Carl Zeiss Transmitted-light Microscope (Jena, Alemania). En los ensayos biológicos fueron utilizados caldo Sabouraud (CS, Britania, Buenos Aires, ARG), agar-agar (Britania, Buenos Aires, ARG) y cajas de Petri (10 y 5 cm de diámetro) descartables. Los medios de cultivos fueron esterilizados en autoclave (All America, Model 25x-2, Manitowoc, EEUU) a 20 psi ~ 115 -121 °C durante 20 min.

El agua deuterada (D_2O , Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU) fue utilizada directamente, los compuestos azida sódica (Aldrich Milwaukee, WI, EEUU), manitol (Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU) y dodecilsulfato de sodio (SDS, Cicarelli, Santa Fe, ARG.) fueron empleados a partir de soluciones stock de cada uno sin purificación previa.

6.1.2. Fotosensibilizadores

El compuesto 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metil-4-piridil)porfirina ($TMPyP^{4+}$) fue provisto por Aldrich (Milwaukee, WI, EEUU). Una solución stock de $TMPyP^{4+}$ ($\sim 0,5$ mM) fue preparada disolviéndola en 1 mL de agua. La concentración fue chequeada por espectroscopia de absorción, teniendo en cuenta el valor del coeficiente de extinción molar en agua ($\epsilon^{Soret} = 2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).¹⁸⁸ Los agentes 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TAPP) y 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N,N*-trimetilaminopropoxi)fenil]porfirina ($TAPP^{4+}$) fueron obtenidos como se describió anteriormente por Caminos y col (2005).¹⁸⁹ Una solución stock para cada una de estas dos porfirinas ($\sim 0,5$ mM), fue preparada pesando el compuesto sólido y disolviendo en 1 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF). La concentración fue corroborada por espectroscopia de absorción mediante los coeficientes de extinción molar en DMF ($\epsilon^{Soret} \text{ TAPP y } TAPP^{4+} = 1,64 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

6.1.3. Sondas fluorescentes

El fluorocromo Cell Tracker Blue (CMAC) (7-amino-4-clorometilcumarina, Invitrogen, Buenos Aires, ARG) fue usado disolviendo 5 mg de CMAC en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). La sonda Hoescht 33258 (Ho, Sigma, Missouri, EEUU) fue utilizada a partir de una solución acuosa de 1 mg/mL.

6.2. Métodos

6.2.1. Sistemas de irradiación

La irradiación fue realizada con un proyector de diapositivas Novamat 130 AF (Braun Photo Technik, Nürnberg, Alemania) equipado con una lámpara de halógeno de 150 W dispuesto en diferentes configuraciones, según el experimento, como se puede observar en la Figura 24. Los cultivos fúngicos fueron irradiados con el arreglo I, donde la luz fue filtrada a través de una cubeta transparente de 2,5 cm conteniendo agua para absorber el calor. El rango de longitud de onda fue seleccionado entre 350-800 nm por medio de filtros ópticos.¹⁹⁰ La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento fue de 90 mW/cm². El efecto fotosensibilizado en la curva de crecimiento fue realizado con el arreglo II, el cual permitió mantener la temperatura de incubación (37°C).

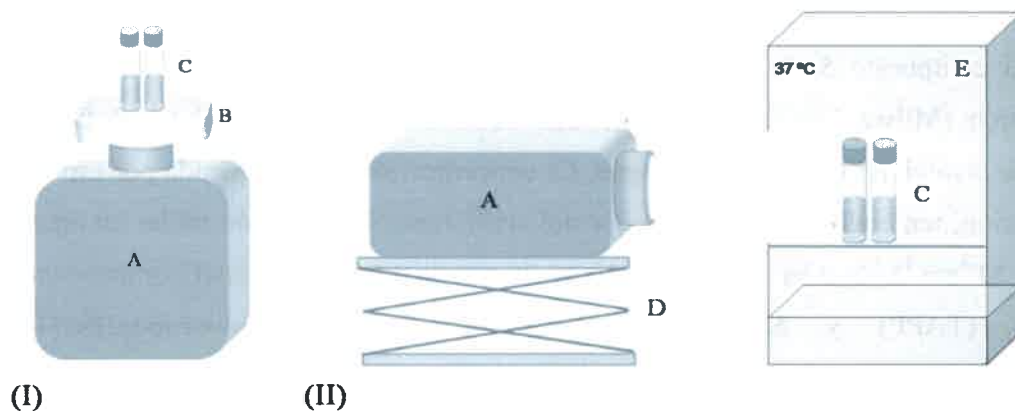


Figura 24. Diferentes arreglos de irradiación utilizados: (I) fotosensibilización de suspensiones de *C. albicans* en PBS, (II) retardo de crecimiento de *C. albicans*. A: proyector, B: filtro de agua, C: muestras, D: elevador, E: estufa de incubación.

6.2.2. Microorganismos y condiciones de crecimiento

La cepa de *Candida* sp. (PC31) fue aislada a partir de una muestra clínica de lesión en piel humana y fue caracterizada de acuerdo a los procedimientos convencionales.¹⁹¹ La primera caracterización del cultivo se basó en la observación macroscópica de las colonias (pigmentación y forma), su modo de reproducción vegetativa, la formación de pseudohifas y la producción de ascosporas.

La identificación de la levadura fue realizada por el método automatizado mini API ID 20C AUX (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), el cual es un sistema estandarizado para la identificación de levaduras basado en la asimilación de carbohidratos.¹⁹² La lectura de estos resultados indicó que la cepa en estudio pertenecería a la especie *Candida albicans*.

C. albicans fue cultivada en aerobiosis durante toda la noche (overnight-ON) en CS a 37 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (cultivo ON, Figura 25). Luego 1 mL de este cultivo fue transferido a 4 mL de buffer fosfato salino (PBS, pH=7,0) 10 mM, las células fueron recolectadas por centrifugación de los cultivos (3000 rpm por 15 min) y resuspendidas en 500 µL de PBS, para obtener $\sim 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC)/mL.

Una alícuota de 1 mL del cultivo ON fue transferida a 3 mL de CS, las células fueron recolectadas por centrifugación y resuspendidas en 4 mL de PBS, correspondiente a $\sim 10^7$ UFC/mL. A partir de ésta suspensión de $\sim 10^7$ UFC/mL las células fueron diluidas apropiadamente para obtener $\sim 10^6$ UFC/mL en PBS. En todos los experimentos, 2 mL de las suspensiones celulares fueron colocadas en tubos de cultivo de pyrex (13x100 mm) y fue agregado el fotosensibilizador de la correspondiente solución stock ($\sim 0,5$ mM). Para evaluar la viabilidad celular de *C. albicans*, fueron realizadas diluciones seriadas y alícuotas de 100 µL fueron sembradas en placas de agar Sabouraud (AS) con espátula de Drigalsky. Luego de ~ 48 h de incubación a 37 °C fue efectuado el recuento de UFC.

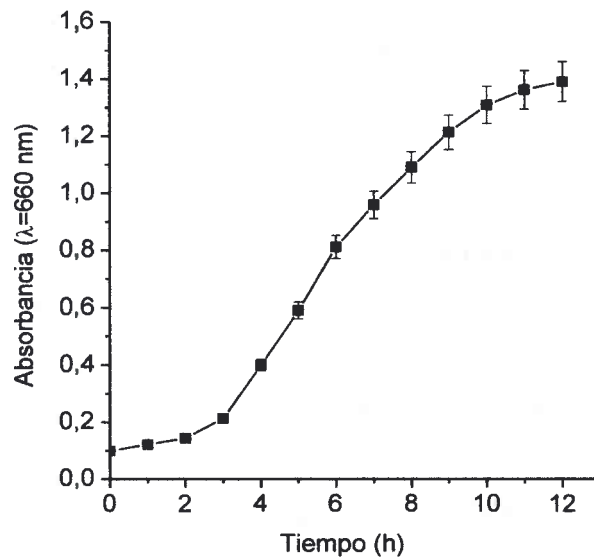


Figura 25. Curva de crecimiento de *C. albicans* en AS a 37°C.

Alternativamente, para observar la filamentización de *C. albicans* en suero, la densidad celular fue ajustada a $\sim 10^6$ UFC/mL en suero humano, manteniéndose en este medio durante 2 h. En este período de tiempo las células cambiaron su forma de crecimiento de levadura a pseudohifa (Figura 26). Esta fase es característica de *C. albicans* y juega un rol importante en la patogenicidad y virulencia de esta especie.



Figura 26. *C. albicans* creciendo como pseudohifa luego de 2 h a 37°C en suero humano.

6.2.3. Estudios *in vitro*

6.2.3.1. Estudios espectroscópicos

Los espectros de absorbancia y fluorescencia de los fotosensibilizadores estudiados fueron obtenidos en agua para TMPyP⁴⁺ y en DMF para TAPP y TAPP⁴⁺. Además, la fotoestabilidad de estos dos últimos agentes, fue evaluada determinando la absorbancia y emisión de fluorescencia en medio biológico a distintos tiempos de irradiación. Los cultivos de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^6$ UFC/mL) fueron incubados durante 30 min con 5 μ M de porfirina e iluminados a distintos tiempos con luz visible (0, 5, 15 y 30 min) a través del dispositivo descrito en la Figura 24 I. A cada tiempo de irradiación, fue medida la absorbancia (TAPP $\lambda_{\text{abs}}=422\text{nm}$, TAPP⁴⁺ $\lambda_{\text{abs}}=420\text{nm}$) y la emisión de fluorescencia (TAPP $\lambda_{\text{exc}}=422\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=657\text{nm}$; TAPP⁴⁺ $\lambda_{\text{exc}}=420\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=658\text{nm}$) de cada porfirina.

6.2.3.2. Unión del sensibilizador a las células de *C. albicans*

Suspensiones de *C. albicans* (2 ml, $\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS se incubaron en oscuridad a 37°C a 1 y 5 μ M de fotosensibilizador por diferentes tiempos. Los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm por 15 min y resuspendidos en 2 mL de solución acuosa de SDS al 2% P/V. También fue determinada la unión del fotosensibilizador en cultivos a los que les fue realizado de 1 a 4 lavados. Cada lavado consistió en la centrifugación del cultivo (3000 rpm por 15 min) y la resuspensión del pellet en 2 ml de PBS. Después fue realizada una resuspensión final en SDS (2% P/V). Luego, fueron incubados durante la noche a 4°C y sonicados durante 30 min. La concentración del sensibilizador en el sobrenadante fue medida por espectrofluorometría (TMPyP⁴⁺ $\lambda_{\text{exc}}=425\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=656\text{nm}$; TAPP $\lambda_{\text{exc}}=422\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=659\text{ nm}$; TAPP⁴⁺ $\lambda_{\text{exc}}=420\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=660\text{ nm}$). Los valores de fluorescencia obtenidos de cada muestra fueron referidos al número total de células contadas en la suspensión. La concentración del fotosensibilizador en la muestra fue estimada por comparación con una curva de calibración obtenida con soluciones estándar de cada porfirina en SDS al 2% P/V (Figura 27). En la Tabla 1 se muestran los valores de las pendientes obtenidos de las curvas de calibración de cada porfirina.

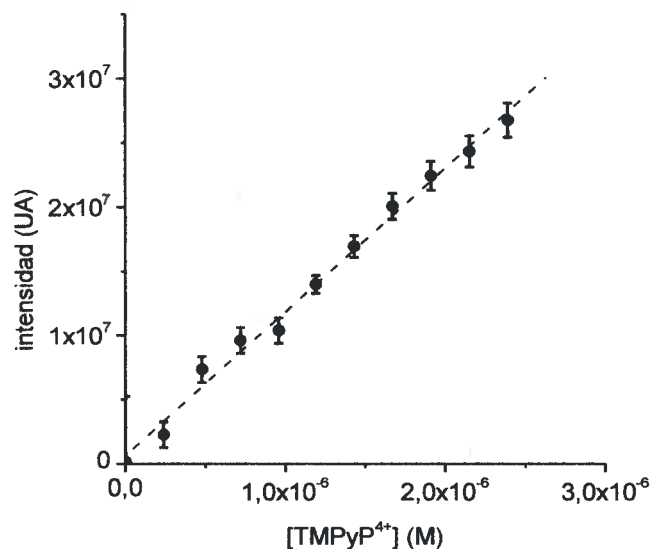


Figura 27. Curva de calibración de TMPyP⁴⁺ en SDS al 2% P/v
($\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 656 \text{ nm}$)

Tabla 2. Pendientes obtenidas de la curva de calibración de fluorescencia de TAPP y TAPP⁴⁺ en SDS al 2% P/v

Porfirina	Pendiente (M ⁻¹)
TMPyP ⁴⁺	1,12x10 ¹³
TAPP	1,35x10 ¹⁴
TAPP ⁴⁺	1,27x10 ¹⁴

6.2.3.3. Inactivación fotosensibilizada de células de *C. albicans* en PBS

Las suspensiones celulares de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^6 - 10^8$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas con 1, 5 y 10 μM de porfirina por 30 min en oscuridad a 37 °C. Después, los cultivos fueron expuestos a diferentes tiempos de luz visible, usando el sistema de irradiación descrito antes (Figura 24 I). También fue estudiada la afinidad de las porfirinas por las células, realizando 1 o 2 lavados de las suspensiones (2 mL, $\sim 10^6$ UFC/mL), luego de aplicar el fotosensibilizador y antes de la irradiación. Cada lavado consistió en la centrifugación del cultivo (3000 rpm por 15 min) y la resuspensión del pellet en 2 mL de PBS.

Para estudiar el efecto de la porfirina en las células creciendo como pseudohifas se siguieron dos tipos de procedimiento: a) en primer lugar las pseudohifas en suero humano fueron tratadas con la porfirina (10-20 μM) durante 30 min en la oscuridad e irradiadas en este medio por diferentes tiempos; b) las pseudohifas en suero humano fueron centrifugadas (3000 rpm por 15 min) y resuspendidas en PBS, luego tratados con la porfirina (10 μM) durante 30 min en la oscuridad e irradiadas en PBS por diferentes tiempos.

6.2.3.4. Estudios del mecanismo de inactivación fotodinámica en *C. albicans*

Con el objetivo de conocer los mecanismos que ocurren durante la inactivación fotodinámica, fueron realizados estudios en ausencia de oxígeno, desplazando el oxígeno con argón en los tubos de cultivo por 15 min previa irradiación, y manteniendo la atmósfera de argón durante la iluminación. La azida sódica (100 mM) o el manitol (100 mM) fueron añadidos a las suspensiones de levaduras desde una solución stock en agua de 1 y 2 M respectivamente, y las células fueron incubadas por 30 min a 37 °C en la oscuridad previo al tratamiento con el fotosensibilizador. Para el ensayo de fotoinactivación en D_2O , las células fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 min y resuspendidas en 2 mL de D_2O . Luego las suspensiones celulares fueron incubadas con la porfirina como se describió anteriormente. Los controles fueron los cultivos fúngicos creciendo con y sin fotosensibilizador en oscuridad y cultivos iluminados sin sensibilizador.

Las suspensiones celulares control y tratadas fueron diluidas en forma consecutiva con PBS y cada dilución fue sembrada por duplicado en placas de AS, para contar las UFC luego de ~48 h de incubación a 37°C.

6.2.3.5. Efecto fotosensibilizado de la curva de crecimiento de *C. albicans*

Suspensiones de células de *C. albicans* fueron cultivadas toda la noche como se describió anteriormente. Una porción (1 mL) de este cultivo fue transferido a 20 mL de CS fresco. La suspensión fue homogenizada y alícuotas de 2 mL fueron incubadas con 5 μM del sensibilizador a 37 °C. El crecimiento del cultivo fue medido por turbidez a 660 nm. Luego, los cultivos fueron expuestos por diferentes intervalos de tiempo a luz visible (90 mW/cm^2). El dispositivo utilizado fue descrito en la Figura 24 II. Experimentos de control fueron realizados en presencia de fotosensibilizador sin iluminación, sin sensibilizador e irradiados y un doble control.

6.2.3.6. Efecto combinado de fluconazol y porfirina sobre *C. albicans*

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de fluconazol y en la IFD mediada por TAPP/TAPP⁴⁺, suspensiones de células de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^3$ UFC/mL) fueron incubadas, por un lado, con distintas cantidades de fluconazol (0,25; 0,5; 1 y 1,5 μ g/mL) y por otro lado con esas mismas cantidades de antifúngico más el agregado de 1 μ M de fotosensibilizador. También fueron incubadas solamente con 1 μ M de porfirina y fueron realizados controles en oscuridad con y sin porfirina. Todas las suspensiones que contenían fotosensibilizador fueron iluminadas durante 30 min, con el dispositivo descrito en la Figura 24 I. La diferencia del crecimiento entre los distintos tratamientos fue medida por turbidez a 660 nm. Bajo condiciones similares, fue estudiado el retardo de la curva de crecimiento de *C. albicans*. Para este estudio, las suspensiones celulares (2 mL, $\sim 10^3$ UFC/mL) fueron incubadas con: (a) 5, 10 y 15 μ g/mL de fluconazol, (b) con esas mismas cantidades de antifúngico y 1 μ M de porfirina, y (c) solamente con fotosensibilizador. El dispositivo utilizado fue descrito en la Figura 24 II. El crecimiento fue medido por turbidez, como se mencionó anteriormente. Experimentos de control fueron realizados en presencia de sensibilizador sin iluminación, sin sensibilizador e irradiados y un doble control.

6.2.4. Estudios en medio sólido

6.2.4.1. Unión de TMPyP⁴⁺ en solución e inactivación fotosensibilizada de células de *C. albicans* sobre agar Sabouraud.

Suspensiones de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas 30 min en oscuridad a 37 °C en diferentes concentraciones de fotosensibilizador (1; 2,5 y 5 μ M). Las células fueron diluidas 1/1000 en PBS y 100 μ L de los cultivos fueron esparcidos sobre placas de AS de 5 cm de diámetro. Estas fueron incubadas por 30 min y luego irradiadas por 30 min con luz visible mediante la forma descrita en la Figura 24 I. Después de 48 h de incubación a 37 °C fue efectuado el recuento de UFC. Además, la viabilidad celular de *C. albicans* fue determinada para cultivos tratados con 5 μ M de TMPyP⁴⁺ a diferentes tiempos de irradiación. Experimentos de control fueron realizados en ausencia y en presencia del fotosensibilizador en oscuridad, como así también controles iluminados sin porfirina.

6.2.4.2. Incorporación de TMPyP⁴⁺ e inactivación fotosensibilizada de *C. albicans* sobre agar Sabouraud

Diferentes cantidades de TMPyP⁴⁺ (2,2; 4,5; 6,7 y 9,0 nmol) fueron esparcidas en placas de AS (5 cm de diámetro) en un área de ~0,6 cm² desde una solución 0,5 mM en agua. Las placas fueron sembradas con una suspensión de *C. albicans* (~10⁶ UFC/mL) en PBS e incubadas a 37 °C por 30 min en oscuridad. Posteriormente fueron irradiadas durante 30 min (el dispositivo utilizado fue descrito en la Figura 24 I) e incubadas por 48 h a 37 °C en oscuridad.

6.2.4.3. Fotosensibilización de *C. albicans* creciendo en colonias sobre agar Sabouraud

Suspensiones de *C. albicans* (~10⁶ UFC/mL) en PBS fueron sembradas en placas de 5 o 10 cm de diámetro conteniendo AS e incubadas a 37 °C por 24 h. Alrededor de 15 colonias pequeñas por placas fueron obtenidas usando este procedimiento. Cada porfirina fue agregada a las colonias en las cantidades correspondientes, que no resultaban tóxicas en oscuridad y que mostraban su mayor efecto fotodinámico en presencia de luz. Así, TMPyP⁴⁺ fue estudiada a 9,0 nmol y las aminoporfirinas TAPP y TAPP⁴⁺ a 2,5; 5 y 7,5 nmol. Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad por 30 min a 37 °C, para permitir la unión del sensibilizador a las células. Posteriormente fueron irradiadas durante 3 h con luz visible desde un proyector (Figura 24 I) o con luz solar natural directa al mediodía (~80 mW/cm²). Después, las placas fueron incubadas en oscuridad a 37°C y los tamaños de las colonias de *C. albicans* fueron evaluados luego de distintos tiempos. La viabilidad de las células después del tratamiento de IFD fue determinada transfiriendo muestras de estas colonias a una placa nueva de AS agar Sabouraud.

6.2.5. Detección de oxígeno molecular singlete en *C. albicans*

La sensibilización de ¹O₂ fue medida por el método de detección de fosforescencia en tiempo resuelto (DFTR).¹⁹³ Un láser Q-switched Nd:YAG (Spectron Laser Systems, Rugby, Warwickshire, Inglaterra) fue utilizado como fuente de excitación, operando a 532 nm (18 ns de amplitud media) para excitar la porfirina. La radiación fosforescente emitida (principalmente a 1270 nm) fue detectada en ángulo recto con un detector de amplificación de germanio Judson J16/8Sp, después de pasar a través de los filtros apropiados. La salida del detector fue acoplada a un osciloscopio digital (Hewlett-Packard HP-54504A, Santa Rosa, CA, EEUU). En las determinaciones dinámicas el solvente fue D₂O en lugar de agua, con el

fin de aumentar el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$.¹⁹⁴ Aproximadamente cinco disparos fueron necesarios para promediar los tiempos de decaimiento, obteniendo una adecuada relación señal/ruido. No fue observado un cambio en el espectro de absorción de la porfirina después de estos experimentos, indicando una fotodegradación no significativa del fotosensibilizador. Las señales promediadas fueron analizadas como decaimientos mono-exponenciales.¹⁹³ Suspensiones celulares de *C. albicans* saturadas de aire en D_2O fueron empleadas en todos los casos. Dos protocolos fueron seguidos: a) A una solución de porfirina ($5 \mu\text{M}$) en D_2O fue añadido un pellet de células ($\sim 10^6$ UFC/mL), el cual fue obtenido por centrifugación (3000 rpm por 15 min) de las células en D_2O ; b) Una suspensión celular ($\sim 10^6$ UFC/mL) fue tratada con porfirina como se describe antes, luego los cultivos fueron centrifugados (3000 rpm por 15 min) y las células fueron resuspendidas en D_2O .

6.2.6. Sitios de daño celular

6.2.6.1. Interacción de porfirinas con ADN de timo bovino

Una solución *stock* de ADN de timo bovino (ADNfb) fue preparada en PBS y la concentración, calculada en pares de base (pb.), fue determinada mediante espectroscopía de absorción ($\epsilon = 13100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pb. a 260 nm).¹⁹⁵

Alícuotas sucesivas de $1 \mu\text{L}$ de ADN de timo bovino ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$ pb.) fueron agregadas a soluciones del sensibilizador en 2 mL de PBS ($\lambda = 420$, $A \sim 0,311$) hasta llegar a una concentración final de $5 \mu\text{M}$ de ADN. Esta titulación fue seguida mediante espectroscopía de absorción, controlando el cambio de intensidad y la posición de la banda *Soret*. La constante de unión de la porfirina al ADN fue calculada utilizando el modelo de McGhee-von Hippel, de acuerdo a la **Ecuación 1**, siguiendo el procedimiento establecido en la bibliografía.^{196,197}

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{(\Delta A)_\infty} + \frac{1}{(\Delta A)_\infty K [\text{ADN}]}$$

Ecuación 1

La constante de asociación K para la formación del complejo porfirina-ADN fue calculada mediante los cambios de absorbancia en el máximo de la banda *Soret* (ΔA), considerando una relación estequiométrica 1:1, y que la concentración del ADN fue ampliamente mayor a la del sensibilizador, donde $(\Delta A)_\infty$ representa el cambio de absorbancia extrapolada a $[\text{ADN}] \rightarrow \infty$. La representación gráfica de $1/(\Delta A)$ en función de $1/[\text{ADN}]$ permite obtener el valor de K .

6.2.6.2. Fotólisis de ADN de timo bovino y electroforesis

Una mezcla de $1,3 \times 10^{-4}$ M de ADN de timo bovino y $20 \mu\text{M}$ de fotosensibilizador en 1 mL de buffer Tris-EDTA (TE, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6), fue irradiado con luz visible (90 mW/cm^2) a temperatura ambiente por 1, 2, 3, 4 y 5 h. Después de la irradiación, las muestras fueron analizadas por electroforesis. Una alícuota de $15 \mu\text{L}$ fue tomada a cada tiempo de irradiación y mezclada con $3 \mu\text{L}$ de buffer de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% p/v, sacarosa 40% p/v, ácido acético 1,15%, Tris 40 mM, EDTA 1 mM).

El ADN fue analizado por electroforesis en una cuba IBI MP 1015 Horizontal Gel Electrophoresis Unit (Shelton Scientific, Iowa, EEUU), con una distancia entre electrodos de 27 cm y con un potencial ($2,4 \text{ V/cm}$) aplicado proveniente de una fuente de energía PS251 (Sigma-Aldrich, Techware, USA). La solución de corrida fue buffer Tris-Borato EDTA (TBE), compuesta por: Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 2 mM, (pH = 8). Los geles fueron realizados en agarosa (Sigma, Missouri, EEUU) disolviendo 1 g en 100 mL de buffer TBE y calentados para su disolución a baño de María. Una vez que la temperatura de esta solución transparente-blanquecina descendió a $<60 \text{ }^\circ\text{C}$, fue adicionado $1 \mu\text{g/mL}$ de la solución de bromuro de etidio (BrEt) para identificar los fragmentos de ADN por fluorescencia. La solución fue vertida en la cuba para dejar solidificar con los peines. El marcador de peso molecular (MK) utilizado fue ADN de fago *Lambda*, digerido por la enzima de restricción *Hind II* (Promega, Madison, WI, EEUU), obteniéndose fragmentos de entre 125 a 23.130 pares de bases y a una concentración de $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los geles de electroforesis fueron observados y fotografiados sobre un transiluminador UV (Labnet, USA).

6.2.6.3. Fotoinactivación de *C. albicans*, purificación y electroforesis del ADN

Las células de levadura fueron sometidas al tratamiento fotodinámico, luego la extracción y la purificación del ADN cromosomal fue realizado, siguiendo el procedimiento establecido en el equipo de extracción Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, EEUU). Las muestras de ADN, en estos ensayos, fueron obtenidas en una ultracentrífuga no refrigerada para tubos Eppendorf Biofugepico Heraeus Instruments (Promega, Alemania). Una vez extraído el ADN, las muestras fueron adicionadas con buffer de carga 6X para la posterior siembra. Las corridas electroforéticas fueron realizadas en una cuba horizontal siguiendo la metodología descrita previamente.

6.2.6.4. Estudios por microscopía

6.2.6.4.1. Localización celular del fotosensibilizador

La localización celular del agente antes y después de IFD fue analizada mediante microscopía de fluorescencia, evaluando la emisión roja de la porfirina. Para ello, suspensiones de células de *C. albicans* (2 ml, $\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas con 5 μ M del fotosensibilizador a 37 °C durante 30 min en la oscuridad; luego de irradiar las muestras durante diferentes tiempos utilizando el dispositivo I de la Figura 24, se procedió a su análisis en el microscopio de fluorescencia (Axiophot, Zeiss, Alemania) acoplado a una cámara color (AxioCamHRc, Zeiss, Alemania).

Además, mediante el agregado de sondas fluorescentes específicas, tales como el CMAC para la localización del lumen vacuolar y Ho 33258 para la localización nuclear, fue visualizada la ubicación preferencial del sensibilizador.¹⁹⁸ Para estos ensayos, suspensiones de células de *C. albicans* (2 mL, $\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas con 5 μ M del sensibilizador a 37 °C durante 30 min en la oscuridad; irradiadas durante diferentes tiempos utilizando el dispositivo I de la Figura 24 y centrifugadas (3000 rpm por 15 min). Posteriormente fue descartado el sobrenadante y se agregaron los marcadores Ho (1 μ g/mL) o CMAC (100 μ M) durante 10 min a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron analizadas en el microscopio de fluorescencia. Los controles con el sensibilizador sin irradiación ni marcador, con el marcador (CMAC o Ho) sin el sensibilizador ni la iluminación de la muestra y con el sensibilizador y marcador (CMAC o Ho) en oscuridad fueron realizados.

Los filtros utilizados para detectar la fluorescencia del marcador nuclear Ho (λ_{exc} : 352 nm, λ_{em} : 461 nm) y del vacuolar CMAC (λ_{exc} : 353 nm, λ_{em} : 466 nm) están constituidos por un filtro de excitación (BP 365/12), un espejo dicróico (FT 395) y un filtro de emisión (LP 397). Mientras que la fluorescencia de cada porfirina fue observada utilizando el juego de filtros DBP 406/23 + 530/45, DFT 435 + 570, DBP 467/30 + 618/75.

6.2.6.4.2. Microscopía electrónica de transmisión

El daño producido por la IFD en la estructura celular microbiana fue analizado mediante cambios morfológicos utilizando la microscopía electrónica de transmisión (TEM).¹⁹⁹

Para contar con una cantidad apropiada de muestra se trabajó con suspensiones de $\sim 10^7$ UFC/mL y la concentración del fotosensibilizador fue aumentada 10 veces en proporción al

aumento del número de células a erradicar, alcanzándose dosis de 50 μM de porfirina. Las muestras celulares fueron incubadas a 37 °C por 30 min en la oscuridad y luego irradiadas durante 30 min con luz visible (90 mW/cm^2), usando el dispositivo I de la Figura 24.

Experimentos control fueron realizados en presencia del sensibilizador sin iluminación y sin sensibilizador e irradiados. Luego, fue tomada una alícuota para realizar las diluciones correspondientes y fueron sembradas en placas con AS, para determinar las UFC/mL. Los cultivos de *C. albicans* fueron incubados a 37°C durante 48 h. Luego, fueron tomados 500 μL de dichos cultivos y mezclados en Eppendorfs junto con los fijadores formaldehído 4% y glutaraldehído 2% con volúmenes iguales en tampón cacodilato 0,1 M, durante un período mínimo de 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron centrifugados para obtener pellets celulares y enviados al servicio de microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Los pellets fueron lavados 3 veces en tampón cacodilato y tratados con tetróxido de osmio al 1% en la misma solución tampón a temperatura ambiente durante 1-2 h. Luego, el material fue deshidratado en soluciones acuosas de acetona de graduaciones crecientes (50%, 70% y 90%) durante 5 min en cada uno de ellas y el proceso fue completado con 3 pasajes, de 15 min cada uno, en acetona 100%. La inclusión fue realizada en la resina epóxica araldita en estado líquido, la cual polimeriza a 60°C, durante 24-48 h.^{200,201} Las secciones ultrafinas (80-100 nm de espesor) fueron montadas en grillas de níquel, coloreadas con acetato de uranilo en solución alcohólica (2 min) y citrato de plomo (2 min) y observadas al microscopio electrónico de transmisión Leo 906E (Zeiss, Alemania) con una cámara MegaView III.²⁰²

6.2.6.4.3. Microscopía electrónica de barrido

Para evaluar el daño de la superficie celular durante el tratamiento, fueron realizados estudios mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Suspensiones de $\sim 10^7$ UFC/mL fueron incubadas con 50 μM de TMPyP^{4+} , TAPP o TAPP^{4+} por 30 min en oscuridad y luego irradiadas 30 min con luz visible utilizando el dispositivo de la Figura 24 I. Experimentos de control fueron realizados en presencia del fotosensibilizador sin iluminación y un doble control sin porfirina ni irradiado. Luego, a una alícuota de 500 μL de cada muestra se le agregó 500 μL de glutaraldehído al 2% y 500 μL de formaldehído al 4% y fueron fijadas durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas (2 min a 13.000 rpm), el sobrenadante descartado y el pellet resuspendido en alcohol al 30%, manteniéndolo así durante 15 min a temperatura ambiente. Este último paso fue repetido varias veces

resuspendiendo la muestra en una solución de alcohol cada vez más concentrada, hasta alcanzar el 100% de alcohol. Luego, una alícuota de cada muestra fue colocada sobre ambas caras de un portaobjeto permitiendo que se fijara por secado.

Las muestras fueron analizadas en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas CINDECA (CONICET/UNLP) en La Plata. En primer lugar, cada una fue secada por el método de punto crítico con un equipo EMITECH K850 (Inglaterra), luego fueron metalizadas con un metalizador Balzers por el método de sputtering y estudiadas en un microscopio Philips SEM 505 (Holanda), que cuenta con un programa para la obtención de imágenes digitales (Digitalizador de Imagen Soft Imaging System ADDA II (SIS)).

6.2.6.5. Controles y análisis estadísticos

Los experimentos controles fueron llevados a cabo en presencia de porfirina en oscuridad y en ausencia de porfirina con las células irradiadas y en oscuridad. La cantidad de DMF usada como solvente de las aminoporfirinas no fue tóxica para las células de *C. albicans*. Tres valores fueron obtenidos para cada condición y cada experimento fue repetido tres veces de forma independiente. El test T para muestras no apareadas fue utilizado para establecer las diferencias significativas entre los grupos. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). Los datos fueron representados como la media \pm desviación estándar de cada grupo.



▼ 7. Resultados y Discusión

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Evaluación de la porfirina TMPyP^{4+} como fotosensibilizador fúngico

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio con una serie de porfirinas catiónicas y aniónicas han mostrado que las primeras son fotosensibilizadores efectivos ya que se unen fuertemente a las células de *C. albicans*.¹⁴⁰ Este efecto está acompañado por un incremento en la inactivación fotodinámica en comparación con las porfirinas aniónicas, donde el efecto fotocitotóxico es prácticamente nulo debido a su baja unión celular.

Uno de los agentes fotosensibilizadores establecidos como más efectivos para la erradicación de las bacterias es 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metil-4-piridil)porfirina (TMPyP^{4+}), la cual posee la estructura molecular mostrada en la Figura 28.^{199,203-205} Sin embargo, no hay una investigación organizada utilizando TMPyP^{4+} que demuestre la efectividad de este agente en la IFD de levaduras.

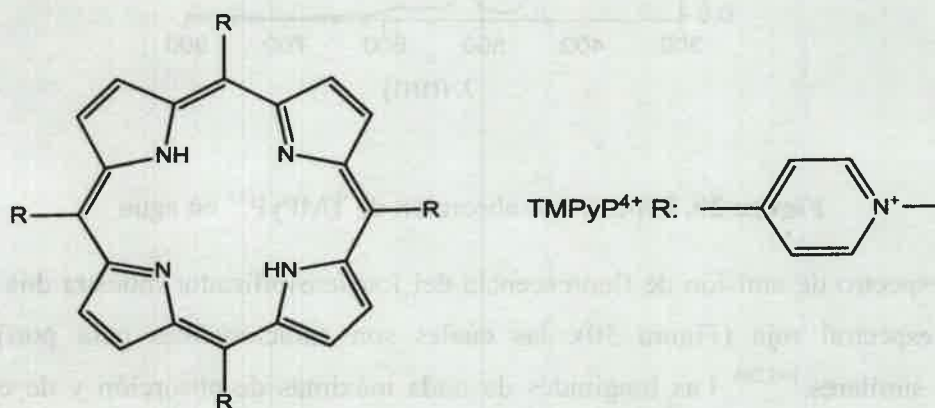


Figura 28. Estructura molecular de 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metil-4-piridil)porfirina (TMPyP^{4+})

7.1.1. Propiedades espectroscópicas y fotodinámicas

La porfirina tetracatiónica TMPyP^{4+} es un fotosensibilizador soluble en solventes polares y en agua. El espectro de absorción de TMPyP^{4+} muestra las típicas bandas, *Soret* a 425 nm y cuatro bandas *Q* a 518, 555, 585 y 642 nm (Figura 29), las cuales son típicas de los derivados tetrafenilporfirínicos con los nitrógenos centrales del anillo como base libre. La banda *Soret* de absorción aguda en agua, indica que esta porfirina está disuelta en forma monomérica en este medio. Por el contrario, la formación de agregados moleculares de porfirinas conduce a un ensanchamiento y deformación principalmente de la banda *Soret*.¹⁴⁸ La agregación del fotosensibilizador no es conveniente para producir una inactivación

efectiva de microorganismos, debido a que disminuye considerablemente la actividad fotodinámica.

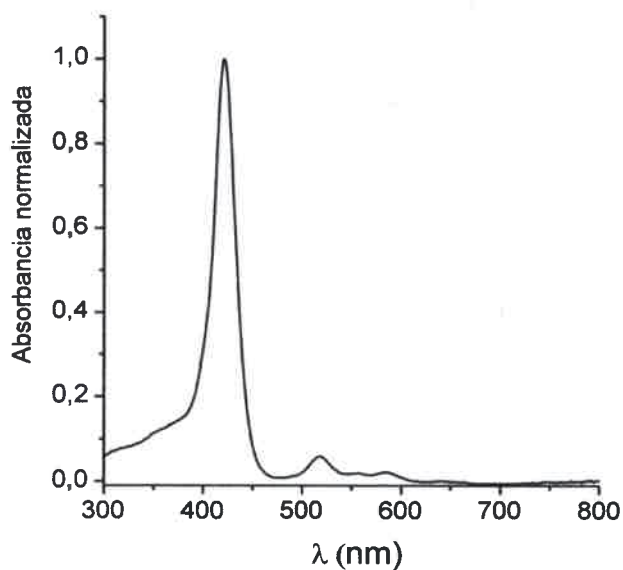


Figura 29. Espectro de absorción de TMPyP^{4+} en agua

El espectro de emisión de fluorescencia del fotosensibilizador muestra dos bandas en la región espectral roja (Figura 30), las cuales son características para porfirinas con estructuras similares.^{193,206} Las longitudes de onda máximas de absorción y de emisión de fluorescencia y el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) de TMPyP^{4+} se resumen en la Tabla 3. Estos valores son apropiados para la detección y la cuantificación del fotosensibilizador en medio biológico.

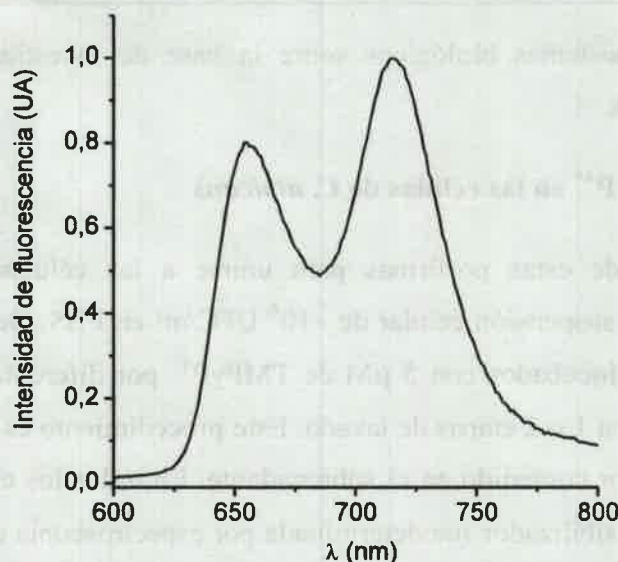


Figura 30. Espectro de emisión de fluorescencia de TMPyP^{4+} en agua ($\lambda_{\text{exc}}=656 \text{ nm}$)

Tabla 3. Máximo de absorción y de emisión de fluorescencia, rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) y de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ)

Porfirina	Absorción λ_{max} (nm)					Emisión λ_{max} (nm)		Φ_F	Φ_Δ
$\text{TMPyP}^{4+}_{(\text{agua})}$	425	518	555	585	642	656	715	0,011 ^a	0,74 ^b

a. Ref. 207, b. Ref. 208

Estudios previos han mostrado que TMPyP^{4+} presenta un rendimiento cuántico de producción (Φ_Δ) de $^1\text{O}_2$ de 0,74 en agua.²⁰⁸ Por lo tanto, este fotosensibilizador posee una alta eficiencia en la formación de $^1\text{O}_2$. Esta es una propiedad muy importante de los fotosensibilizadores porque se cree que las reacciones inducidas por $^1\text{O}_2$ son la causa principal del daño celular sensibilizado por porfirinas bajo condiciones aeróbicas.¹⁰⁹ Estos valores son bastante similares al reportado para 5,10,15,20-tetra(4-*N,N,N*-trimetilamoniofenil)porfirina (TMAP^{4+}) ($\Phi_\Delta=0,77$) en agua.²⁰⁹ Sin embargo, los valores de Φ_Δ pueden cambiar significativamente de acuerdo al medio, disminuyendo cuando el fotosensibilizador está parcialmente agregado. Además, el microambiente biológico del fotosensibilizador puede inducir importantes modificaciones en las propiedades fotofísicas de la porfirina determinadas en solución.¹⁰³ En consecuencia, hay limitaciones para predecir la eficiencia fotodinámica del

fotosensibilizador en sistemas biológicos sobre la base de investigaciones fotofísicas en soluciones homogéneas.

7.1.2. Unión de TMPyP⁴⁺ en las células de *C. albicans*

La capacidad de estas porfirinas para unirse a las células de *C. albicans* fue comparada primero en suspensión celular de $\sim 10^6$ UFC/ml en PBS. De esta manera, cultivos de *C. albicans* fueron incubados con 5 μ M de TMPyP⁴⁺ por diferentes tiempos a 37 °C en oscuridad, y sometidos a 1 o 2 etapas de lavado. Este procedimiento es usado para eliminar el exceso de sensibilizador contenido en el sobrenadante. En todos los casos, la concentración intracelular del fotosensibilizador fue determinada por espectroscopia de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 425$ nm, $\lambda_{em} = 656$ nm).

La cantidad de TMPyP⁴⁺ recuperada, luego del ensayo, es mostrada en la Figura 31. Bajo estas condiciones, en las células que no fueron lavadas la porfirina alcanza un valor máximo de unión a las células a un corto tiempo, dando valores de $\sim 1,73$ y $1,71$ nmoles/ 10^6 células para 15 y 30 min de incubación, respectivamente. Por lo tanto, una prolongación en el tiempo de incubación no causa un incremento apreciable en la cantidad de fotosensibilizador unido a las células. La tendencia observada en TMPyP⁴⁺ fue muy similar a la encontrada para TMAP⁴⁺. Sin embargo, un valor ligeramente más alto de afinidad se logró para TMPyP⁴⁺ con respecto a TMAP⁴⁺, la cual alcanzó $\sim 1,35$ nmol/ 10^6 células.¹⁴⁰ Después del primer lavado de los cultivos tratados se observó una gran pérdida del fotosensibilizador, con respecto a las muestras sin lavar, pero con el segundo lavado se obtuvo una disminución significativamente menor. La pérdida de TMPyP⁴⁺ no es proporcional al número de lavados, sugiriendo que solo una fracción del fotosensibilizador, adicionado durante el tratamiento, se une fuertemente a las células de levadura.

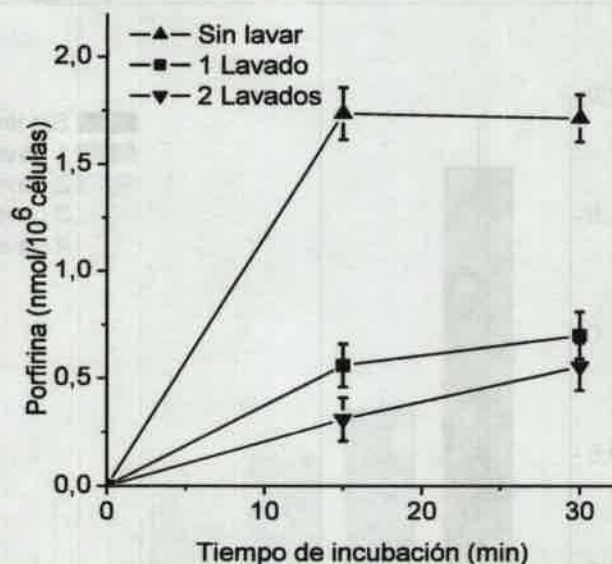


Figura 31. Cantidad de TMPyP⁴⁺ recuperada de células de *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml) tratadas con 5 μ M de sensibilizador a diferentes tiempos de incubación a 37 °C y etapas de lavado. Los valores representan la media \pm desviación estándar

Cuando las suspensiones de células fueron sometidas desde una a cuatro etapas de lavados, la cantidad de TMPyP⁴⁺ incorporada a las células disminuyó, siguiendo la misma tendencia que en el caso anterior (Figura 32). En el primer lavado se observa un marcado descenso del 59% del sensibilizador. Esto puede deberse a que hay moléculas de la porfirina que están débilmente unidas a las células y son eliminadas principalmente con la primera etapa de lavado. Sin embargo, la cantidad de sensibilizador eliminado con respecto al lavado anterior fue de 28%, 24% y 13% después de dos, tres y cuatro lavados, respectivamente. Estos resultados indican que las restantes moléculas de TMPyP⁴⁺ están fuertemente unidas a la membrana o incorporadas intracelularmente y son difíciles de remover (Figura 33). Un comportamiento similar al observado para TMPyP⁴⁺ en *C. albicans* se observó previamente en células bacterianas Gram positivas y Gram negativas.²⁰³

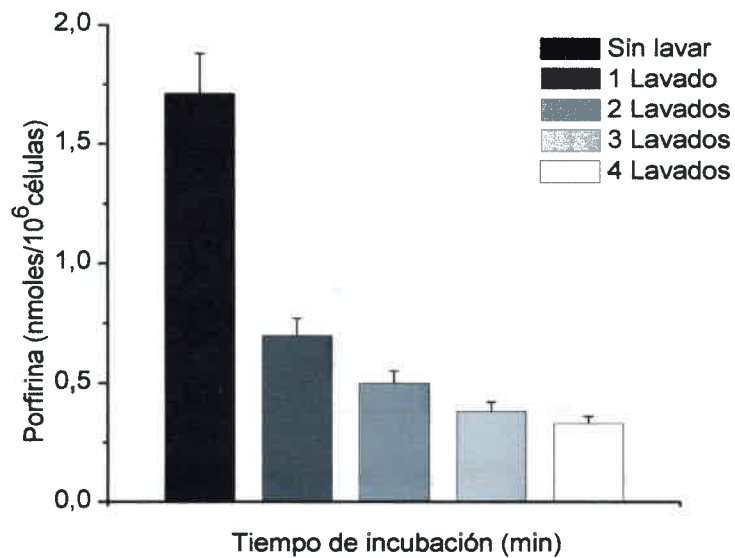


Figura 32. Cantidad de TMPyP⁴⁺ recuperada de células de *C. albicans* (~10⁶ UFC/ml) tratadas con 5 μ M de sensibilizador por 30 min a 37 °C y diferentes etapas de lavados. Los valores representan la media \pm desviación estándar

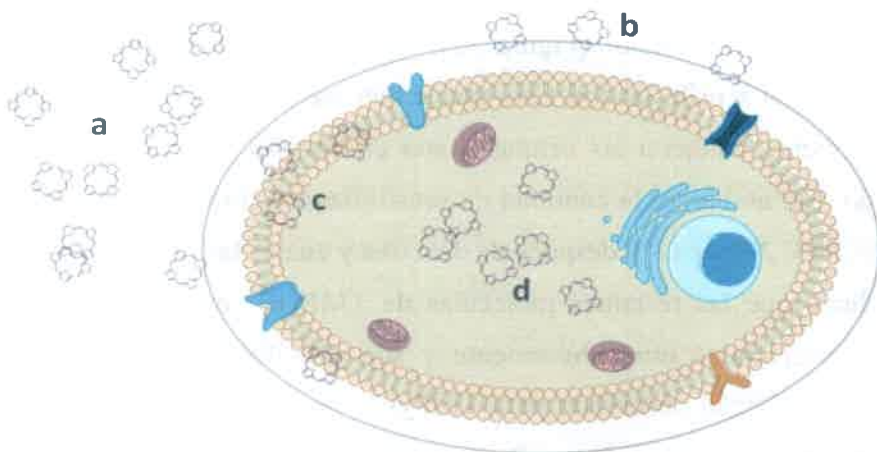


Figura 33. Tipos de interacción del fotosensibilizador en suspensión celular. a) fotosensibilizador en solución; b) fotosensibilizador débilmente unido a la célula; c) y d) fotosensibilizador fuertemente unido o incorporado

7.1.3. IFD de suspensiones celulares en PBS

La IFD de *C. albicans* fue primero evaluada en suspensiones celulares de PBS, tratadas con diferentes concentraciones de TMPyP⁴⁺ (1-10 μ M), por 30 min a 37 °C en oscuridad, e irradiadas a diferentes intervalos de tiempo con luz visible. Los experimentos controles muestran que la viabilidad de *C. albicans* no fue afectada solo con iluminación sin el fotosensibilizador o por incubación en la oscuridad con una concentración de porfirina hasta 5 μ M. Esto indica que la mortalidad celular obtenida luego de la irradiación de los cultivos tratados es debido al efecto fotosensibilizador del agente. La viabilidad de *C. albicans* luego de la irradiación de 30 min fue dependiente de la concentración de porfirina usada en el tratamiento (Figura 34). Bajo estas condiciones, el aumento en la concentración del sensibilizador a 5 μ M es acompañado por un incremento en la eficiencia de la IFD con respecto a 1 μ M. Por otro lado, los cultivos tratados con 10 μ M resultaron tóxicos en la oscuridad (73% de supervivencia celular). Sin embargo, la irradiación por 30 min demostró que en estas condiciones se produce una disminución de 5 log en la sobrevivencia de *C. albicans*, mostrando que la actividad fotodinámica es muy efectiva.

La IFD también fue investigada en cultivos tratados con 5 μ M de TMPyP⁴⁺, usando diferentes períodos de irradiación. Como se observa en la Figura 35, la eficiencia en la actividad fotodinámica de esta porfirina es dependiente de la dosis de luz irradiada, y la fotoinactivación aumenta con el tiempo de irradiación con luz visible. Así, se alcanza una disminución en la supervivencia celular de ~5 log, cuando los cultivos son tratados con 5 μ M de sensibilizador y 30 min de irradiación. Estos resultados representan un valor del 99,999% de inactivación celular. Resultados comparables fueron observados para células de *C. albicans* tratadas con TMAP⁴⁺.¹⁴⁰ A diferencia de TMPyP⁴⁺, la fotoinactivación producida por TMAP⁴⁺ fue casi proporcional a la cantidad de sensibilizador en solución, indicando que no hay saturación intracelular del sensibilizador bajo estas condiciones experimentales. Además, un corto tiempo de irradiación (5 min) fue suficiente para producir una alta inactivación (~99,99 %) de células tratadas con 5 μ M de TMAP⁴⁺. Este comportamiento también se observó con la bacteria Gram positiva *Enterococcus seriolicida* tratada con 7,4 μ M de TMAP⁴⁺ y 5 min de irradiación, mientras que el efecto de ambas porfirinas fue similar para la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*, tratada con 7,4 o 8,9 μ M de TMAP⁴⁺ o TMPyP⁴⁺, respectivamente y 15 min de iluminación.²⁰³ Es claro que no hay diferencia entre TMPyP⁴⁺ y TMAP⁴⁺ en *C. albicans* usando 5 μ M de sensibilizador y 30 min de irradiación, pero la

eficiencia de TMPyP^{4+} es inferior a TMAP^{4+} a concentraciones bajas o a períodos cortos de irradiación.

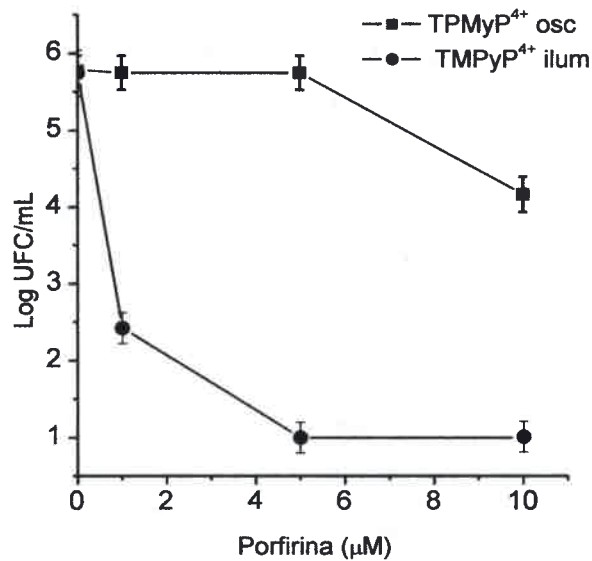


Figura 34. Curva de supervivencia de *C. albicans* (10^6 UFC/ml) incubada con diferentes concentraciones de TMPyP^{4+} por 30 min a 37°C en oscuridad y expuesta a luz visible por 30 min. Los valores representan la media \pm desviación estándar

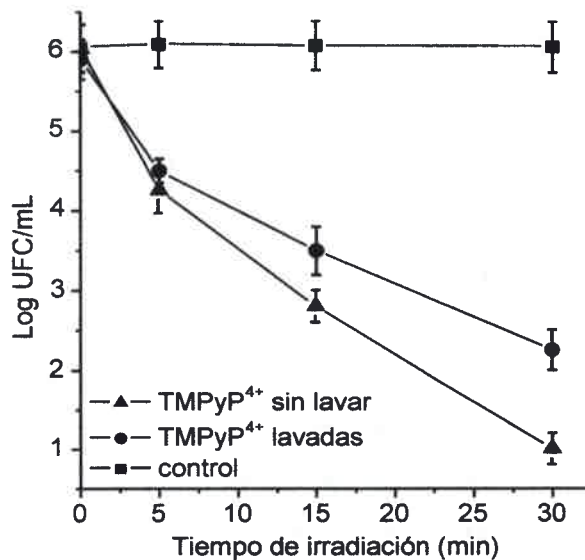


Figura 35. IFD de *C. albicans* incubado con $5\ \mu\text{M}$ de TMPyP^{4+} por 30 min a 37°C en oscuridad y expuesta a luz visible a diferentes tiempos de irradiación. Los valores representan la media \pm desviación estándar

Para TMPyP⁴⁺ se observó una disminución en la inactivación celular después de un lavado (Figura 35). Aunque, dado que con un lavado se pierde un 59% de la porfirina unida, se esperaría una pérdida de efectividad mayor. En estudios previos se observó un comportamiento similar en células de *C. albicans* tratadas con diferentes concentraciones de 5-fenil-10,15,20-tris(*N*-metil-4-piridil)porfirina.¹³⁹ Esto demuestra que las moléculas de fotosensibilizador fuertemente unidas a las células son las más activas para producir el efecto fotocitotóxico que condujo a la muerte celular.

Por otra parte, la IFD de *C. albicans* inducida por TMPyP⁴⁺ fue analizada usando diferentes densidades celulares. Si bien, los cultivos de $\sim 10^6$ UFC/mL son eficientemente fotoinactivados con 5 μ M de sensibilizador, a densidades celulares mayores ($\sim 10^7$) no se observó una disminución importante en la viabilidad de *C. albicans*, cuando estos cultivos son tratados bajo las mismas condiciones. La inactivación celular fue de 5 y 3 log en cultivos de 10^6 y 10^7 UFC/mL, respectivamente. Efectos similares de densidad celular sobre IFD fueron previamente demostrados para diferentes microorganismos.²¹⁰ Esto se debe a que la cantidad de porfirina permaneció constante de un ensayo a otro y por lo tanto la proporción porfirina/célula disminuye, resultando insuficiente para provocar daños letales en las levaduras. Esto implica que un aumento en el número de células fúngicas requiere de un tratamiento más severo.

7.1.4. Inactivación fotosensibilizada sobre pseudohifas de *C. albicans*

Una importante característica morfológica de *C. albicans* es la capacidad de producir tubos germinativos cuando es incubada en suero a una temperatura de 37°C (filamentización en suero). Este proceso se ha propuesto como un potencial factor de virulencia en su patogénesis,^{211,212} ya que es la primera etapa en el desarrollo de las hifas verdaderas. La formación del tubo germinativo es una característica morfológica que incrementa la habilidad del hongo para adherirse y penetrar en el tejido infectado.²¹³ Por este motivo, la IFD de TMPyP⁴⁺ fue estudiada también bajo estas condiciones. Luego de la incubación de las levaduras durante 2 h en suero humano se obtuvo una suspensión del organismo creciendo en forma de pseudohifa. Esto se evidenció mediante el análisis de las muestras bajo el microscopio óptico, se observaron proyecciones desde las células, denominadas tubos germinativos (Figura 36).

La aplicación de la IFD sobre los filamentos en suero fue realizada utilizando 10 y 20 μ M de TMPyP⁴⁺. En estas condiciones no se afectó la supervivencia de *C. albicans* para ningún tiempo de tratamiento (15 y 30 min), ya que no hubo diferencias significativas con el

grupo control. En estudios previos de IFD realizados con fotosensibilizadores catiónicos sobre *E. coli* se observó que la presencia de plasma redujo considerablemente el efecto fotocitotóxico, debido a que los sensibilizadores tienen mayor afinidad por las proteínas del suero y por ende su incorporación celular es menor.²¹⁴ Los estudios diseñados para mimetizar condiciones *in vivo* han demostrado que la eficiencia de la inactivación fotodinámica de *C. albicans* por porfirinas es reducida por la presencia de suero y albúmina en concentraciones que podrían encontrarse en una herida.^{139,215}

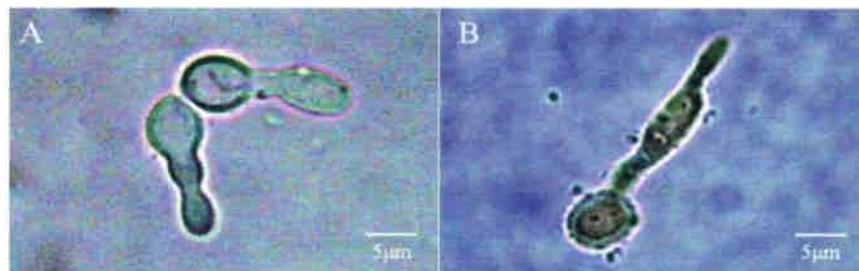


Figura 36. Tubos germinativos en *C. albicans*: (A) incubadas en suero humano por 2 h a 37 °C, (B) resuspendidas en PBS

Por otro lado, en las células filamentosas resuspendidas en PBS y tratadas con 10 µM de TMPyP⁴⁺ se observó una pérdida de la supervivencia celular de ~0,62 log para 15 min de irradiación. Con un aumento en el tiempo de irradiación a 30 min se obtuvo una disminución en la viabilidad celular de ~2,12 log (Figura 37). Aunque se alcanzó una fotoinactivación significativa de *C. albicans* creciendo como pseudohifa, no se logró el efecto observado frente a las levaduras en suspensión celular.

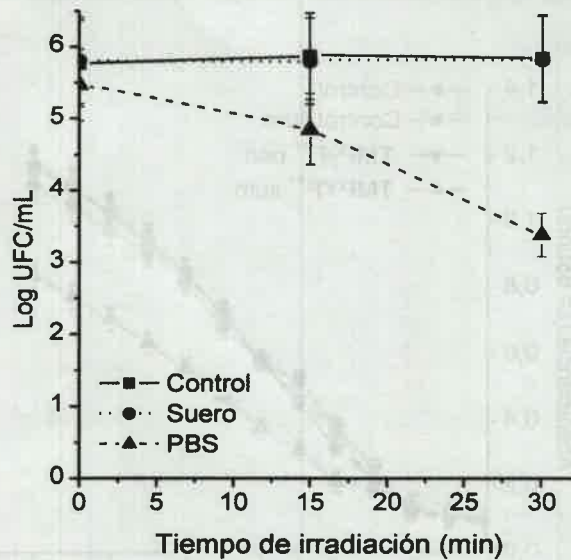


Figura 37. Inactivación de pseudohifas de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubadas con $10 \mu\text{M}$ de TMPyP⁴⁺ en oscuridad por 30 min a 37°C y expuesta a luz visible por 15 y 30 min (90 mW/cm^2)

7.1.5. Efecto fotosensibilizado en la curva de crecimiento de *C. albicans*

El retardo en el crecimiento de cultivos de *C. albicans* sensibilizado con TMPyP⁴⁺ fue llevado a cabo en condiciones óptimas de crecimiento en CS a 37°C . Estos experimentos fueron realizados para asegurar que la IFD en células es todavía posible cuando los cultivos no están en condiciones de inanición o el efecto del lavado con PBS. Así, $5 \mu\text{M}$ de TMPyP⁴⁺ se agregaron a cultivos frescos de *C. albicans* alcanzando la fase lag, e irradiados con luz visible a 37°C . En la Figura 38, se observó que el retardo en el crecimiento de *C. albicans* fue estadísticamente significativo en la muestra tratada con TMPyP⁴⁺ e iluminada. Luego de 12 h de irradiación, las células no continuaron su crecimiento de acuerdo a lo indicado por la medición de la turbidez del cultivo a 650 nm. La curva de crecimiento tuvo una distribución exponencial con una fase de latencia durante las primeras 3 h y una fase de crecimiento exponencial luego de este tiempo. Hacia el final de las serie de mediciones, a las 12 h aproximadamente, se observó el inicio de la fase estacionaria. En la Tabla 4, puede observarse el efecto descrito comparando la velocidad de crecimiento de las células tratadas mediante IFD en relación a los controles.

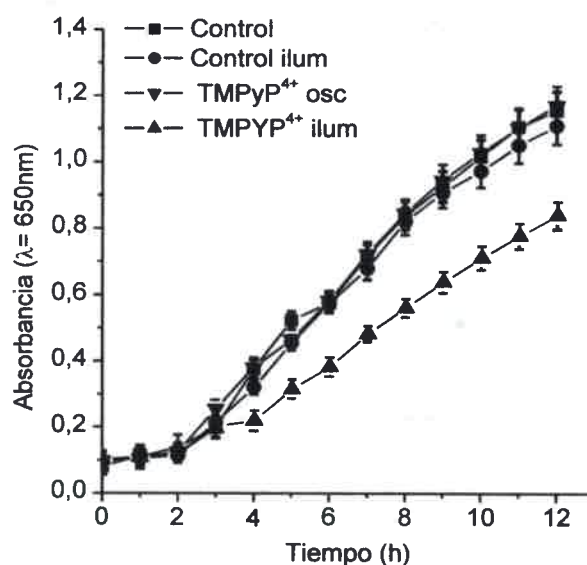


Figura 38. Curva de retardo del crecimiento de *C. albicans* incubadas con 5 μM de TMPyP⁴⁺ expuestas a diferentes tiempos de irradiación con luz visible en CS a 37 °C. Los valores representan la media ± desviación estándar

Tabla 4. Velocidad de crecimiento (v, h⁻¹) de *C. albicans* tratada con 5 μM de TMPyP⁴⁺

Tratamiento	Velocidad de crecimiento
Control	0,117 ± 0,006
Control Iluminado	0,111 ± 0,006
TMPyP ⁴⁺ en oscuridad	0,121 ± 0,006
TMPyP ⁴⁺ Iluminada	0,085 ± 0,004

7.1.6. Mecanismo de acción fotodinámico

Un aspecto interesante en estos sistemas es analizar el mecanismo de acción fotodinámico que conduce a la inactivación celular. Así, con el propósito de establecer el fotoproceso (Tipo I y II) predominante que interviene durante la IFD, las suspensiones de levadura fueron tratadas en presencia de: a) atmósfera de argón, b) azida sódica (100 mM), c) D₂O y d) manitol (100 mM). Como fue investigado anteriormente, el tratamiento de

C. albicans con 5 μM de TMPyP^{4+} provocó una disminución en la supervivencia de ~ 5 log UFC/mL (Figura 41, línea 4), mientras que la viabilidad celular no fue afectada por la irradiación con luz visible o el fotosensibilizador por separado (Figura 41, línea 2 y 3).

7.1.6.1. Fotoinactivación bajo atmósfera anóxica

Para estudiar la importancia del oxígeno durante el proceso fotodinámico, el tratamiento se realizó en condición de anoxia bajo una atmósfera de argón. La supervivencia celular se comparó en ambas condiciones experimentales, aire y argón (Figura 41, líneas 4 y 6). Como pudo observarse, la pérdida de viabilidad fue muy dependiente del oxígeno para esta porfirina. Prácticamente, no hay inactivación celular a baja concentración de oxígeno. Mientras que el argón por sí mismo no fue tóxico (Figura 41, línea 5). Estos resultados indicaron que la presencia de oxígeno es fundamental para alcanzar una erradicación celular completa con este agente. Un comportamiento comparable fue previamente encontrado para la inactivación de la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* sensibilizada por TMAP^{4+} .²¹⁶

7.1.6.2. Efecto del ión azida sobre la IFD

El ión azida (N_3^-) es soluble en agua y desactiva $^1\text{O}_2$ por desactivación física, con una constante de velocidad de *quenching* $k_q = 5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$.¹⁰⁹ Sin embargo, el ión azida también desactiva el estado triplete del sensibilizador (Figura 39), e incluso puede actuar como un atrapador del radical hidroxilo. Por lo tanto no es totalmente decisivo para distinguir entre los dos mecanismos posibles. La fotoinactivación de *C. albicans* incubada con 5 μM de porfirina fue estudiada en presencia de 100 mM de este ión. Esta concentración no fue tóxica en la oscuridad (Figura 41, línea 7). La sobrevivencia celular fue muy dependiente de la presencia de la azida sódica y produce una gran reducción en la inactivación de *C. albicans* sensibilizada por TMPyP^{4+} (Figura 41, línea 8). Por lo tanto, el ión azida desactiva especies fototóxicas, produciendo un importante efecto protector sobre *C. albicans*. Si bien este experimento, por sí mismo, no permitió distinguir entre ambos mecanismos (tipo I y II), indicó que la presencia de las especies reactivas de oxígeno fue indispensable en el proceso de inactivación celular.

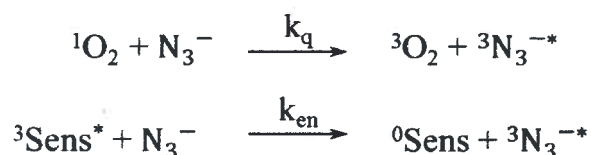


Figura 39

7.1.6.3. Inactivación fotodinámica en D₂O

Para evaluar la fotoinactivación mediada por ${}^1\text{O}_2$, la reacción se llevó a cabo en D₂O. El ${}^1\text{O}_2$ tiene un tiempo de vida (τ) más largo en D₂O (68 μs) que en agua (4,2 μs), por lo tanto las reacciones que involucren el ${}^1\text{O}_2$ serán favorecidas.²¹⁷ La viabilidad de las levaduras no se vio afectada solo por el D₂O (Figura 41, línea 9). Sin embargo, la irradiación de las células de *C. albicans* incubadas con TMPyP⁴⁺ en D₂O produjo una fotoinactivación mayor de la que se observó en agua (Figura 41, línea 10). Estos resultados, en conjunto con los anteriores en presencia de azida, dieron un indicio de que el ${}^1\text{O}_2$ estaría involucrado en el proceso fotocitotóxico. Resultados similares fueron encontrados para *C. albicans* tratada con las porfirinas TMAP⁴⁺ y 5-(4-trifluorofenil)-10,15,20-tris(4-*N,N,N*-trimetilamoniofenil)porfirina (TFAP³⁺).²¹⁸

7.1.6.4. Efecto del manitol sobre la IFD

En general, la participación del ${}^1\text{O}_2$ en varios procesos fotosensibilizados *in vivo*, se acepta por el aumento en la inactivación, observado en D₂O y la inhibición de azida de los diversos tipos de reacción oxidativa.^{109,219-221} De todas formas, para confirmar el mecanismo predominante de acción se usó manitol como un inhibidor de las reacciones de tipo I. Este compuesto actúa como un recolector del radical anión superóxido e hidroxilo (Figura 40).²²¹ El agregado de 100 mM de manitol no fue citotóxico para las células (Figura 41, línea 11). En estas condiciones, el tratamiento fotodinámico, llevado a cabo con TMPyP⁴⁺ mostró un leve incremento en la viabilidad celular, aunque no fue estadísticamente significativo (Figura 41, línea 12). Estos ensayos indicaron, que las reacciones de tipo I no intervienen durante la IFD con esta porfirina y el mecanismo de inactivación se da a través de las reacciones de tipo II por acción del ${}^1\text{O}_2$.

Todos estos resultados coincidieron con otro estudio, de este mismo sensibilizador aplicado sobre *E. coli*, donde queda establecido que el ${}^1\text{O}_2$ es la especie reactiva causante del daño celular.¹¹¹

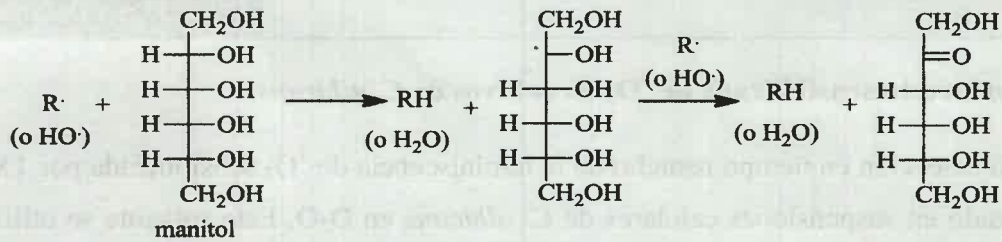


Figura 40

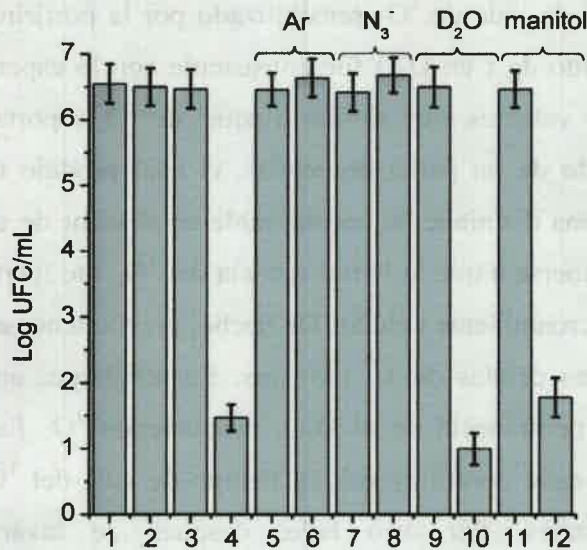


Figura 41. Supervivencia de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubada con $5 \mu\text{M}$ TMPyP $^{4+}$ en oscuridad por 30 min a 37°C y expuesta a luz visible por 30 min ($90 \text{ mW}/\text{cm}^2$); 1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control irradiado; 3) cultivo control tratado con TMPyP $^{4+}$ y mantenido en oscuridad; 4) cultivo tratado con TMPyP $^{4+}$ e irradiado; 5) cultivo control bajo argón e irradiado; 6) cultivo tratado con TMPyP $^{4+}$ bajo argón e irradiado; 7) cultivo control con 100 mM de azida e irradiado; 8) cultivo tratado con TMPyP $^{4+}$ con 100 mM azida e irradiado; 9) cultivo control en D_2O e irradiado; 10) cultivo tratado con TMPyP $^{4+}$ D_2O e irradiado; 11) cultivo control con 100 mM de manitol e irradiado; 12) cultivo tratado con TMPyP $^{4+}$ con 100 mM de manitol e irradiado. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

7.1.7. Producción sensibilizada de $^1\text{O}_2$ en cultivos de *C. albicans*

La detección en tiempo resuelto de la luminiscencia de $^1\text{O}_2$ sensibilizada por TMPyP^{4+} fue realizado en suspensiones celulares de *C. albicans* en D_2O . Este solvente se utilizó para incrementar el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ fuera de las células.²²² Primero, la señal de luminiscencia del $^1\text{O}_2$ se determinó en una solución de TMPyP^{4+} en D_2O y después del agregado de un pellet de $\sim 10^6$ células/mL. Las señales, analizadas por un ajuste mono-exponencial y el tiempo de vida de $^1\text{O}_2$ sensibilizado por la porfirina están resumidas en la Tabla 5. El valor obtenido de τ en D_2O fue consistente con lo esperado para el $^1\text{O}_2$ en este medio homogéneo. Este valor es muy similar a aquel de $^1\text{O}_2$ reportado en solución de D_2O ($\tau=65 \mu\text{s}$).²²³ El agregado de un pellet de células, el cual produjo una suspensión de $\sim 10^6$ células/mL, da lugar a una disminución considerable en el valor de τ ($\sim 30 \mu\text{s}$). El tiempo de vida más corto puede deberse a que la luminiscencia del $^1\text{O}_2$ fue fuertemente desactivada por las biomoléculas del microambiente celular. De hecho, previamente se observó que TMPyP^{4+} se une fuertemente a las células de *C. albicans*. Sin embargo, una pequeña fracción de moléculas de porfirina permaneció en el D_2O , produciendo $^1\text{O}_2$ fuera de las células. Así, ambas especies pueden estar contribuyendo al tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ observado bajo estas condiciones experimentales. Por otro lado, después de lavar las células solo el fotosensibilizador fuertemente unido permaneció en la suspensión celular. Por lo tanto, el $^1\text{O}_2$ solo se generó dentro de las células de *C. albicans*, y de esta forma, el valor de τ es considerablemente más chico debido a que la desactivación del $^1\text{O}_2$ fue más eficiente en las células (Figura 42). Resultados similares fueron observados para fotosensibilizadores asociados a membranas o incluidos en el interior de las células fantasmas de glóbulos rojos en suspensión.²²³

Tabla 5. Rendimiento cuántico (Φ_Δ) de $^1\text{O}_2$ de TMPyP^{4+} y tiempo de vida de $^1\text{O}_2$ (τ) en D_2O y suspensiones celulares sensibilizadas.

Porfirina	Φ_Δ^a	τ (μs) ^b	τ (μs) ^c	τ (μs) ^d
TMPyP^{4+}	0,71	61±5	30±3	9±1

^ade ref. 224 en agua, ^bporfirina en D_2O , ^cporfirina en D_2O tratada con un pellet de células ($\sim 10^6$ células/mL), ^dporfirina unida a las células en D_2O .

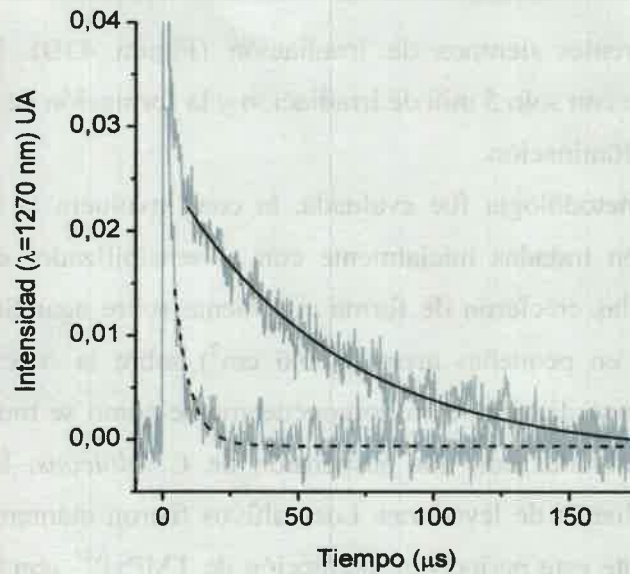


Figura 42. Trazas de decaimiento de luminiscencia del $^1\text{O}_2$ a 1270 nm sensibilizado por TMPyP $^{4+}$ en D_2O (línea continua) y TMPyP $^{4+}$ unida a *C. albicans* en una suspensión celular de $\sim 10^6$ células/mL en D_2O (línea discontinua)

7.1.8. Fotoinactivación de células de *C. albicans* sobre superficies

La inactivación fotosensibilizada de *C. albicans* sobre superficies puede ser usada para inactivar células creciendo *in vivo* como un foco localizado de infección, sobre piel o sobre áreas accesibles para ser irradiadas con luz visible artificial o natural.^{225,226} Además, el tratamiento fotodinámico fue propuesto como una nueva posibilidad para proteger alimentos del deterioro microbiano.²²⁷ Por esto la actividad fotodinámica de TMPyP $^{4+}$ fue evaluada en células de *C. albicans* inmovilizadas sobre AS.

La incorporación del sensibilizador en las células se realizó de dos modos. En primer lugar, las suspensiones celulares de *C. albicans* en PBS se incubaron con diferentes concentraciones de TMPyP $^{4+}$ (1; 2,5 y 5 μM) por 30 min a 37 °C en oscuridad. Luego, las células fueron sembradas en placas y estas se incubaron por 30 min a 37 °C en oscuridad. En este experimento el sensibilizador se incorporó en solución y después las células fueron localizadas sobre superficies de agar, para ser iluminadas por 30 min con luz visible. En este ensayo, una concentración de 5 μM se seleccionó como óptima ya que, bajo estas condiciones, no hubo formación de colonias luego de 48 h de realizado el tratamiento (Figura 43 A). Además, la actividad fotodinámica de TMPyP $^{4+}$ se evaluó, para la misma

concentración, a diferentes tiempos de irradiación (Figura 43B). La viabilidad celular disminuyó rápidamente con solo 5 min de irradiación y la formación de colonias no se detectó después de 30 min de iluminación.

Una segunda metodología fue evaluada, la cual involucra la IFD de células de *C. albicans* que no fueron tratadas inicialmente con el sensibilizador en solución. En estos experimentos, las células crecieron de forma confluyente sobre agar Sabouraud conteniendo TMPyP⁴⁺ impregnada en pequeñas áreas (~ 0,6 cm²) sobre la superficie. Así, diferentes cantidades de porfirina se distribuyeron homogéneamente como se muestra en la Figura 44. Las placas fueron sembradas con una suspensión de *C. albicans*, las cuales permitieron obtener una capa confluyente de levaduras. Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad por 30 min a 37 °C. Durante este periodo la interacción de TMPyP⁴⁺ con las células tuvo lugar. Después de este tratamiento, las placas fueron irradiadas con luz visible por 30 min e incubadas por 48 h a 37 °C en oscuridad. Como puede observarse en la Figura 44 B, no hubo crecimiento celular de *C. albicans* en las áreas tratadas con TMPyP⁴⁺, aunque el tamaño del halo de inhibición producido se incrementa con la cantidad de sensibilizador depositada. Así, un área más pequeña se obtiene para 2,2 nmol y el cambio de tamaño es menor por encima de los 4,5 nmol de TMPyP⁴⁺. En contraste, la modificación del “césped” celular no fue observado para los controles tratados con porfirina y mantenidos en oscuridad (Figura 44 A). Por lo tanto, la acción fotodinámica inducida por TMPyP⁴⁺ conduce a la muerte celular de *C. albicans* sobre una superficie de agar, aun cuando el cultivo no es previamente incubado con el fotosensibilizador.

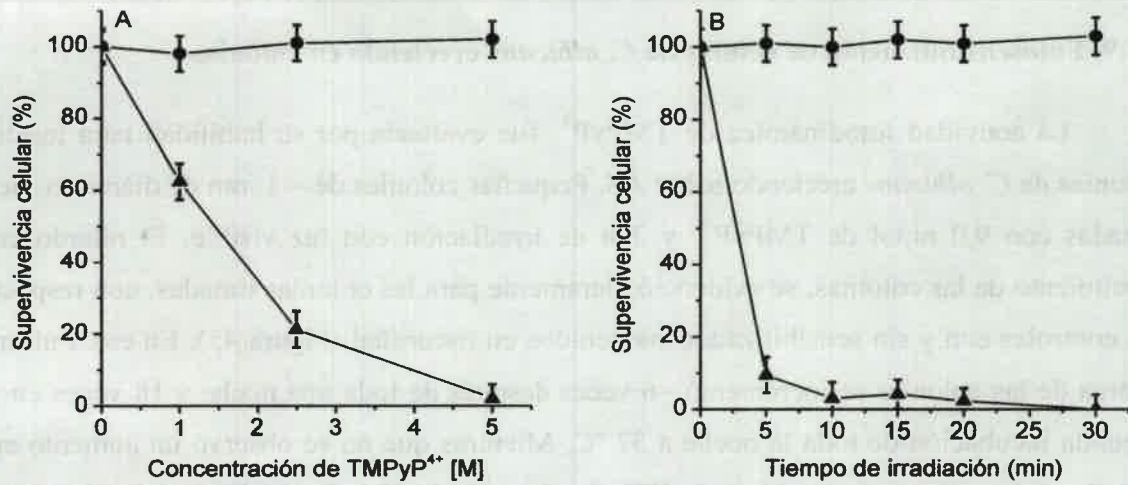


Figura 43. Inactivación de células de *C. albicans* sobre agar Sabouraud. La suspensión celular ($\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS fue incubada con TMPyP⁴⁺ por 30 min a 37 °C en oscuridad, las células fueron sembradas sobre agar e irradiaron con luz visible. (A) Células tratadas con diferentes concentraciones de TMPyP⁴⁺ e irradiadas por 30 min (▲); (B) células incubadas con 5 μM de TMPyP⁴⁺ e irradiadas a distintos tiempos (▲). Control no tratado e irradiado (●). Los valores representan la media \pm desviación estándar

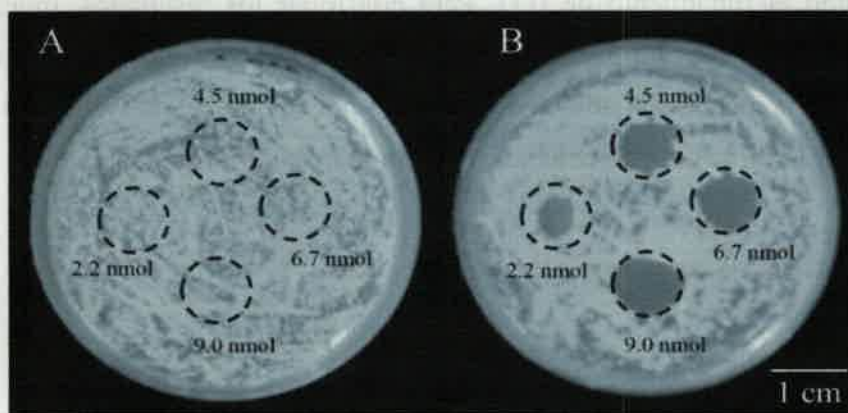


Figura 44. Inactivación de células de *C. albicans* sobre agar Sabouraud irradiadas con luz visible por 30 min. Los círculos indican las áreas con diferentes cantidades de sensibilizador

7.1.9. Fotosensibilización de células de *C. albicans* creciendo en colonias

La actividad fotodinámica de TMPyP⁴⁺ fue evaluada por su habilidad para inactivar colonias de *C. albicans* creciendo sobre AS. Pequeñas colonias de ~ 1 mm de diámetro fueron tratadas con 9,0 nmol de TMPyP⁴⁺ y 3 h de irradiación con luz visible. El retardo en el crecimiento de las colonias, se evidenció claramente para las colonias tratadas, con respecto a los controles con y sin sensibilizador mantenidos en oscuridad (Figura 45). En estos últimos, el área de las colonias se incrementó ~6 veces después de toda una noche y 18 veces en una segunda incubación de toda la noche a 37 °C. Mientras que no se observó un aumento en el tamaño en las colonias sometidas a la IFD aun después de 48 h de incubación. Por lo tanto, el retardo del crecimiento observado fue debido al efecto de fotosensibilización de TMPyP⁴⁺.

Por otro lado, un estudio similar fue realizado exponiendo las placas de cultivos directamente a la luz solar del mediodía (80 mW/cm²) por 3 h (Figura 46 A). Durante la irradiación, la temperatura de los cultivos fue alrededor de 35 °C. Esto indicó que no hubo inactivación térmica de las levaduras, como lo demostraron los experimentos controles (Figura 46 B). Bajo estas condiciones experimentales, una acción fotodinámica similar se observó a la obtenida utilizando luz artificial de un proyector.

En ambos casos, el crecimiento de las colonias no se detectó incluso después de seis días de realizado el tratamiento de IFD. Para confirmar los resultados, muestras de estas colonias tratadas con el sensibilizador e irradiadas fueron transferidas a una nueva placa de AS. Después de una incubación adicional de toda la noche a 37 °C, la viabilidad de las células no se detectó por la formación de colonias, indicando una completa inactivación celular.

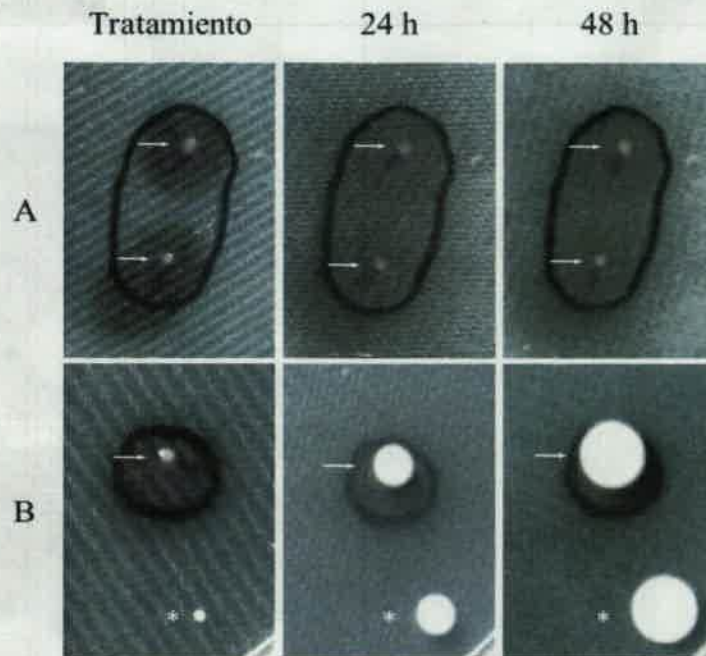


Figura 45. Crecimiento de colonias de *C. albicans* en agar Sabouraud tratadas con 9,0 nmol de TMPyP⁴⁺. El sensibilizador fue esparcido sobre la colonia (→) de una solución stock (~0.5 mM) y fue incubado por 30 min a 37 °C antes de la irradiación, algunas colonias no fueron tratadas con porfirina (*). Fila A, colonias irradiadas con luz visible (90 mW/cm²) por 3 h e incubadas en oscuridad. Fila B, controles incubados en oscuridad

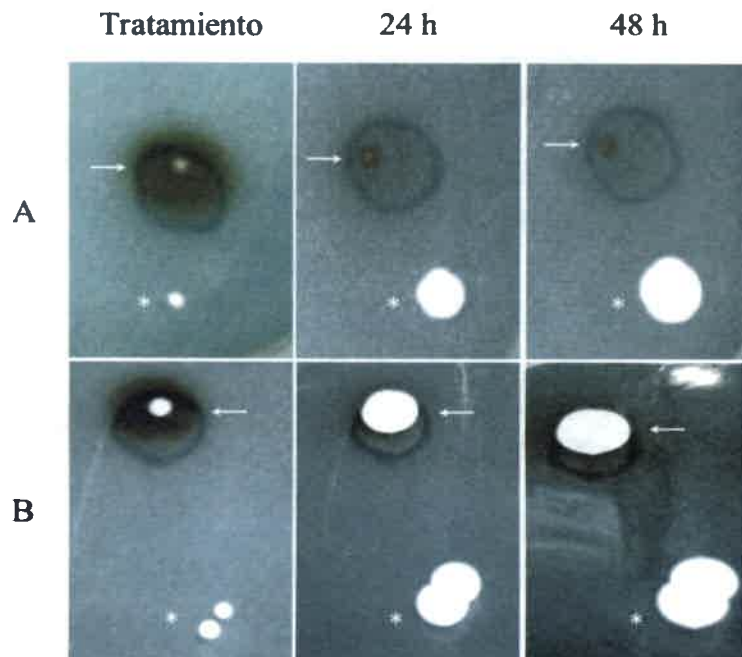


Figura 46. Crecimiento de colonias de *C. albicans* sobre agar Sabouraud tratadas con 9,0 nmol de TMPyP⁴⁺. El sensibilizador fue esparcido sobre la colonia (→) de una solución stock (~0.5 mM) y fue incubado por 30 min a 37 °C antes de la irradiación, algunas colonias no fueron tratadas con porfirina (*). Fila A, colonias irradiadas con luz solar del mediodía (80 mW/cm²) por 3 h e incubadas en oscuridad. Fila B, controles incubados en oscuridad

7.1.10. Sitios de daño celular

Dependiendo de la localización del agente fotosensibilizador, el proceso puede inducir daño al retículo endoplasmático, mitocondria, membrana plasmática y/o lisosomas.²²⁸ También se ha observado, que el ¹O₂ generado es capaz de reaccionar con las membranas celulares, péptidos y ácidos nucleicos.^{85,106} Por lo que se lo ha visto involucrado en la peroxidación de lípidos conduciendo a la lisis de las membranas celulares, lisosomas y mitocondrias, y en la inactivación de enzimas y otras proteínas.²²⁹ Específicamente, el ¹O₂ oxida las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas. Entre los aminoácidos proteínogénicos, histidina, tirosina, metionina, cisteína y triptófano son conocidos por ser oxidados por esta especie a pH fisiológico.^{230,231}

Aunque el daño en el ADN de los hongos es reducido por la presencia de la membrana nuclear, muchos fotosensibilizadores catiónicos interaccionan fuertemente con el ADN y la fotosensibilización de varios tipos de células eucariotas podría resultar en lesiones del material genético.²³² Por otro lado, la pared celular fúngica provee estructura a la célula y la

protege del ambiente.¹³⁷ Por lo tanto, la eficiencia del proceso de fotosensibilización es marcadamente más pronunciada por agentes que sean capaces de llegar al interior de la célula. Por estas razones se estudió la capacidad de TMPyP^{4+} para generar daños, en el ADN y sobre las envolturas celulares, que conduzcan a la pérdida de la viabilidad celular.

7.1.10.1. Interacción de la porfirina con ADN

Se estudió la interacción de la porfirina TMPyP^{4+} con el ADN de timo bovino. La afinidad de este fotosensibilizador por el ADN fue analizada por espectroscopia de absorción UV-visible. Mientras que las *bandas Q* de TMPyP^{4+} se ven poco modificadas por la adición de ADN, la banda *Soret* exhibe un decrecimiento en la intensidad a medida que aumenta la concentración de ADN, permitiendo la cuantificación de la unión porfirina-ADN (Figura 47).

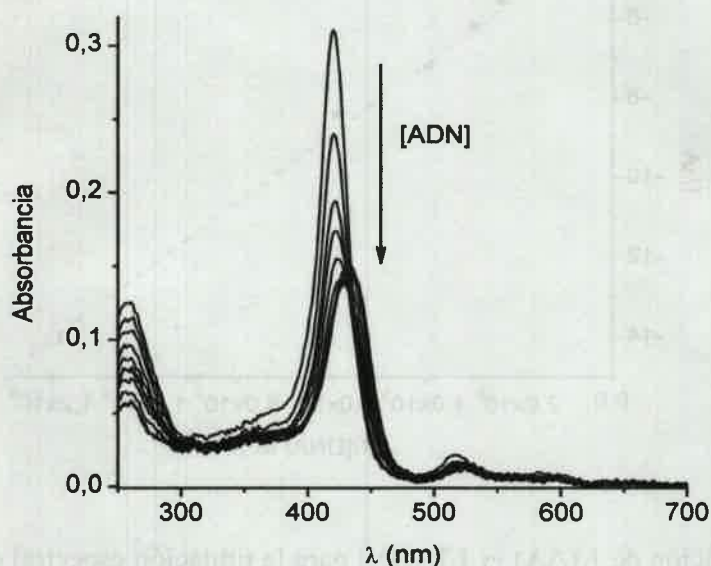


Figura 47. Variación del espectro de absorción de la porfirina TMPyP^{4+} en PBS a diferentes concentraciones de ADN de timo bovino (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 μM)

La interacción se caracterizó por un corrimiento del máximo *Soret* hacia el rojo de unos ~ 10 nm y por una intensa hipocromicidad ($\sim 50\%$). El gran descenso hipocrómico sugiere que los electrones- π de la porfirina se perturbaron por la asociación con el ADN. El espectro de absorción se analizó para obtener el valor de las constantes de unión observada para la formación de los complejos porfirina-ADN (K_{ADN}). La representación de la recta descrita por la Ecuación 1 para la formación del complejo se muestra en la Figura 48. A partir de la relación entre la ordenada al origen y la pendiente fue calculado un valor de

constante de unión aparente, $K_{ADN} = 4,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, para TMPyP^{4+} . Este resultado indica que hay una fuerte interacción entre el fotosensibilizador catiónico TMPyP^{4+} y las cadenas del ADN.

Las características espectrales de los complejos TMPyP^{4+} -ADN han sido previamente reportadas.^{196,233} En otros estudios con TMPyP^{4+} como agente fotosensibilizador de *E. coli*, se determinó mediante fluorescencia resuelta en el tiempo que esta porfirina se une al ADN, ya sea intercalándose entre los pares de bases guanina y citosina, o uniéndose al surco en los sitios adenina - timina.¹¹¹

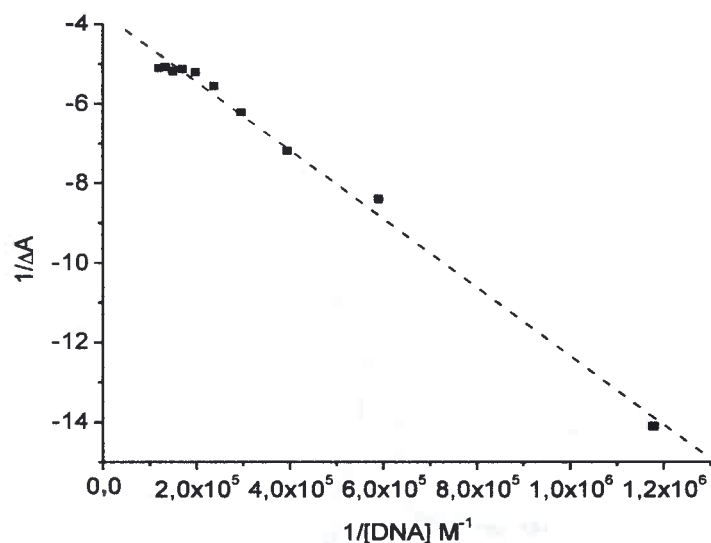


Figura 48. Variación de $1/(\Delta A)$ vs $1/[\text{ADN}]$ para la titulación espectral de TMPyP^{4+} con ADN en PBS, $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$. Línea de ajuste por regresión lineal de la Ecuación 1 (línea discontinua)

7.1.10.2. Fotodaño de ADN de timo bovino fotosensibilizado por TMPyP^{4+}

El daño fotoinducido del ADN de timo bovino, fotosensibilizado por TMPyP^{4+} , fue estudiado en solución de buffer TE. Las muestras de ADN y porfirina fueron irradiadas con luz visible bajo condiciones aeróbicas por 1, 2, 3, 4 y 5 h. La integridad del ADN fue analizada por electroforesis en gel de agarosa. En presencia del fotosensibilizador fue observada una reducción en la velocidad de migración del ADN, provocando al menos una reversión parcial de la dirección de migración. Este retardo en la migración del ADN puede ser explicado por el efecto de la carga de la porfirina catiónica.²³⁴ Previamente fue demostrado que esta porfirina corre junto con el ADN durante la electroforesis.²³⁵ Esta

porfirina tetracatiónica migra al cátodo cuando se la somete a electroforesis, mientras que el ADN, estando negativamente cargado, se mueve en la dirección opuesta. Como TMPyP⁴⁺ se une fuertemente al ADN, es esperado que ambos corran juntos (Figura 49). Este efecto no permitió observar claramente el posible fotodaño del ADN inducido por TMPyP⁴⁺ a diferentes tiempos de irradiación. A pesar de esto, es posible notar que las bandas de ADN desaparecieron después de la irradiación.

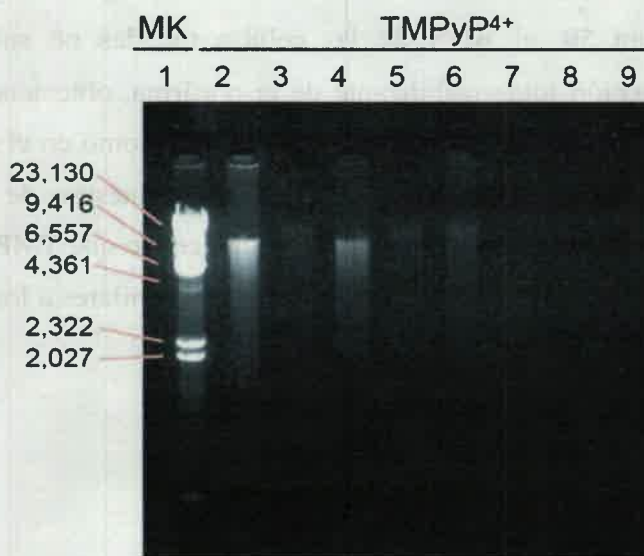


Figura 49. Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ADN de timo bovino en buffer TE (pH 7,6) irradiadas por 1, 2, 3, 4 y 5 h (líneas 5-9, respectivamente) con luz visible (90 mW/cm²) en presencia de TMPyP⁴⁺ (20 μM). Línea 1: Marcador de peso molecular de ADN, línea 2: ADN control, línea 3: ADN control con TMPyP⁴⁺ (20 μM) en oscuridad, línea 4: control de ADN irradiado

Aunque la constante de unión de TMPyP⁴⁺ fue tan grande como la hallada para las porfirinas TMAP⁴⁺ y TFAP³⁺,^{140,238} estos valores de K_{ADN} no tienen en cuenta el tipo de unión. En general, tres modelos de unión han sido descritos para la interacción de porfirinas catiónicas con ADN, los cuales involucran intercalación, unión externa al surco y unión externa con porfirinas autoagregadas.²³⁶ Previamente fue establecido que TMPyP⁴⁺ es capaz de intercalarse en el ADN de timo bovino y esta unión resulta en una superhélice de ADN covalentemente cerrada.²³⁷ También, fue observado que el efecto fotodinámico produjo la conversión del plásmido pBR322 de su forma circular cerrada a abierta bajo la irradiación con luz visible en presencia de TMPyP⁴⁺.²³⁵

7.1.10.3. Efecto de la IFD sobre ADN genómico de *Candida albicans*

La actividad fotodinámica de TMPyP⁴⁺ fue analizada *in vitro* para observar la posible fotodegradación del ADN genómico en las células de *C. albicans*. Para ello, los cultivos fueron tratados con 5 μ M del sensibilizador e irradiados por 30 min con luz visible. El ADN genómico extraído fue examinado mediante electroforesis en gel de agarosa. Como puede observarse en la Figura 50, el ADN de las células tratadas no sufrió ningún tipo de fragmentación por la acción fotosensibilizante de la porfirina, obteniéndose una sola banda tanto en la muestra sometida a IFD (Figura 50, columna 3) como en el control irradiado sin tratar con TMPyP⁴⁺ (Figura 50, columna 2). Además, las muestras de ADN de las células tratadas se movieron del mismo modo que el control, indicando que TMPyP⁴⁺ no interaccionó con el ADN extraído de la células. Estos resultados fueron similares a los encontrados para la porfirina tetracatiónica TMAP⁴⁺.²³⁸

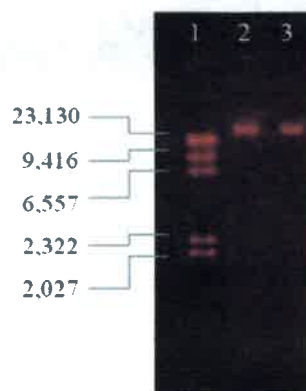


Figura 50. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico extraído de células de *C. albicans*: 1-Marcador de peso molecular: Lamda-Hind III, 2- Cultivo control irradiado 30 min sin TMPyP⁴⁺, 3- Cultivo tratado con 5 μ M de TMPyP⁴⁺ e irradiado 30 min

7.1.10.4. Estudios de la localización intracelular del sensibilizador

Se ha demostrado que el fotosensibilizador TMPyP⁴⁺ se une rápidamente a *C. albicans*. Pero también, es importante desde el punto de vista del tratamiento fotodinámico, determinar la ubicación subcelular del agente. Con este motivo fue realizado un estudio de localización de la porfirina mediante microscopía de fluorescencia. Las muestras tratadas y controles fueron observadas bajo el microscopio y se obtuvieron imágenes en campo claro y en

fluorescencia. La Figura 51 muestra la fluorescencia roja (~656 nm) correspondiente al sensibilizador en los cultivos incubados por 30 min con 5 μM de TMPyP⁴⁺. De esta manera, se observa como la porfirina se distribuyó por toda la célula. Después de repetidas observaciones, la fluorescencia de TMPyP⁴⁺ pierde intensidad debido a la fotodescomposición de la molécula, inducida por la luz proveniente de la fuente del microscopio.

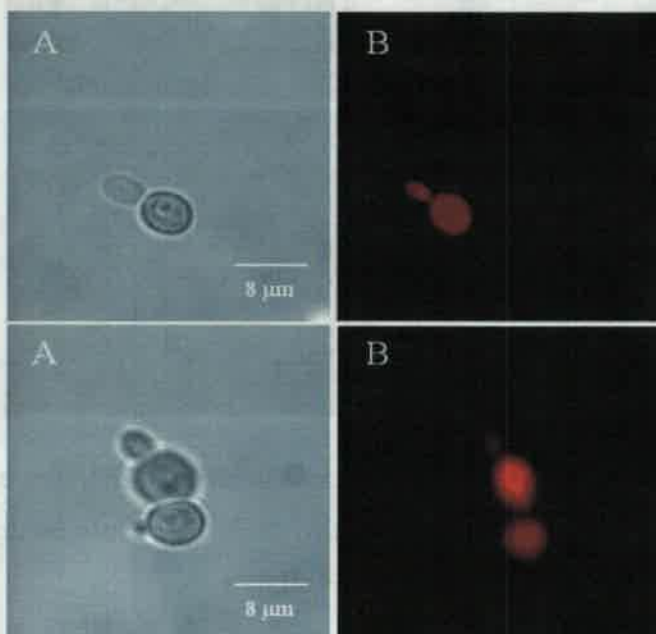


Figura 51. Localización de TMPyP⁴⁺ [5 μM] en células de *C. albicans* en A) campo claro y B) fluorescencia. Cultivos controles incubados con 5 μM de TMPyP⁴⁺ 30 min en oscuridad

La localización intracelular de TMPyP⁴⁺ fue estudiada luego de la incubación e irradiación durante 30 min (Figura 52). La distribución fue de manera similar a la observada para los cultivos sin irradiar. Por lo tanto, estos estudios no permitieron detectar cambios significativos en la distribución de TMPyP⁴⁺ en las células fúngicas posterior al tratamiento mediante la IFD. Esta técnica de microscopía de fluorescencia puede que no sea suficientemente sensible para observar una relocalización del fotosensibilizador. En estudios previos mediante fluorescencia resuelta en el tiempo fue propuesta una redistribución de la porfirina TMAP⁴⁺ en *C. albicans* luego del tratamiento de IFD.²³⁹ Estos resultados también indican que el agente se mantiene relativamente estable en el período de tiempo irradiado.

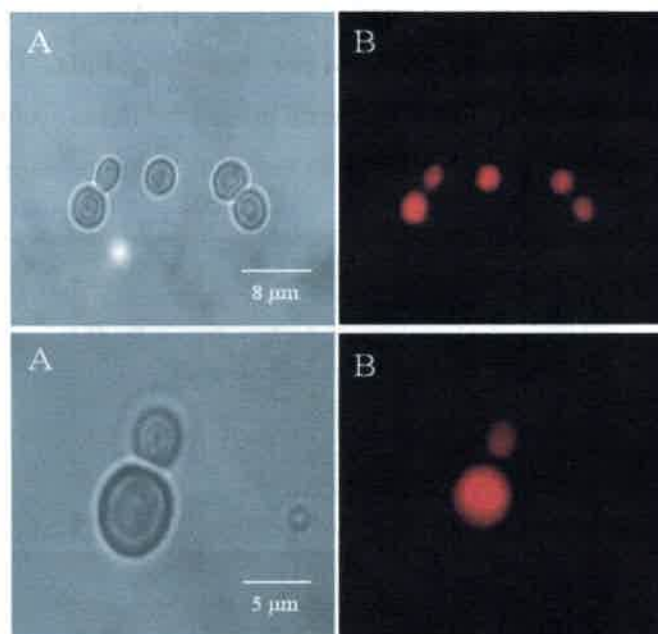


Figura 52. Localización de TMPyP^{4+} [$5\mu\text{M}$] en células de *C. albicans* en A) campo claro y B) fluorescencia. Cultivos incubados con $5\mu\text{M}$ de TMPyP^{4+} por 30 min en oscuridad e irradiados 30 min

Luego, con la incorporación de sondas específicas de organelas celulares como Ho 33258 para el núcleo y CMAC para las vacuolas,¹⁹⁸ fue posible confirmar si la porfirina tenía mayor afinidad por estas estructuras. En la Figura 53 A y B se observan los cultivos controles en presencia del fluorocromo Ho 33258 mostrando una intensa fluorescencia en la región correspondiente al núcleo celular. De forma semejante, en la Figura 53 C y D, se evidencia la presencia de la vacuola a través de la sonda CMAC.

En las células tratadas con TMPyP^{4+} y marcadas con Ho 33258 y CMAC (Figura 54), se observó que la distribución del fotosensibilizador no tenía un patrón definido y se localizaba nuevamente en toda la célula, incluso en las organelas marcadas. Por tal motivo en los cultivos tratados mediante IFD no se visualiza una tinción nuclear y vacuolar bien definida como en los controles de dichas sondas (Figura 53). Estos resultados difieren con los obtenidos por Lambrechts y col., donde observaron que el sensibilizador catiónico 5-fenil-10,15,20-tris(*N*-metil-4-piridil)porfirina penetra en el núcleo durante el tratamiento fotodinámico, pero no en la vacuola.¹⁹⁸

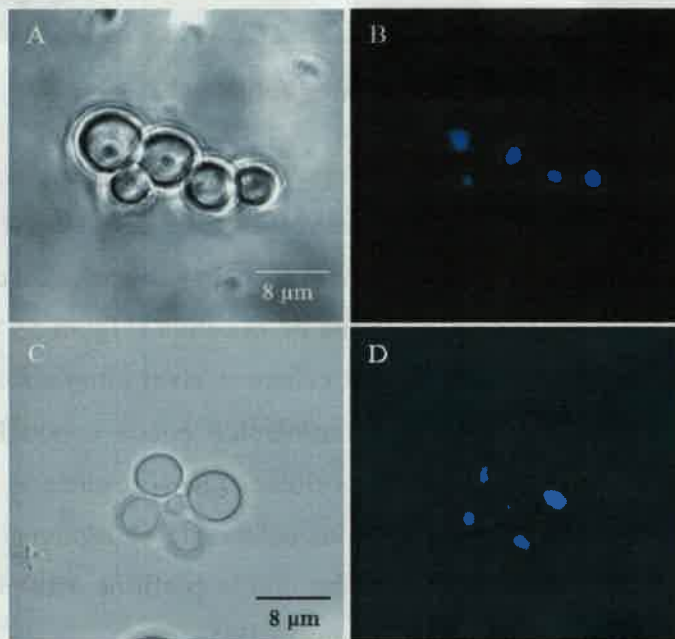


Figura 53. Células de *C. albicans* marcadas con: Ho 33258, A) campo claro y B) fluorescencia; y CMAC, C) campo claro y D) fluorescencia. Cultivos incubados con Ho33258 [1µg/ml] y CMAC [100µM] 10 min

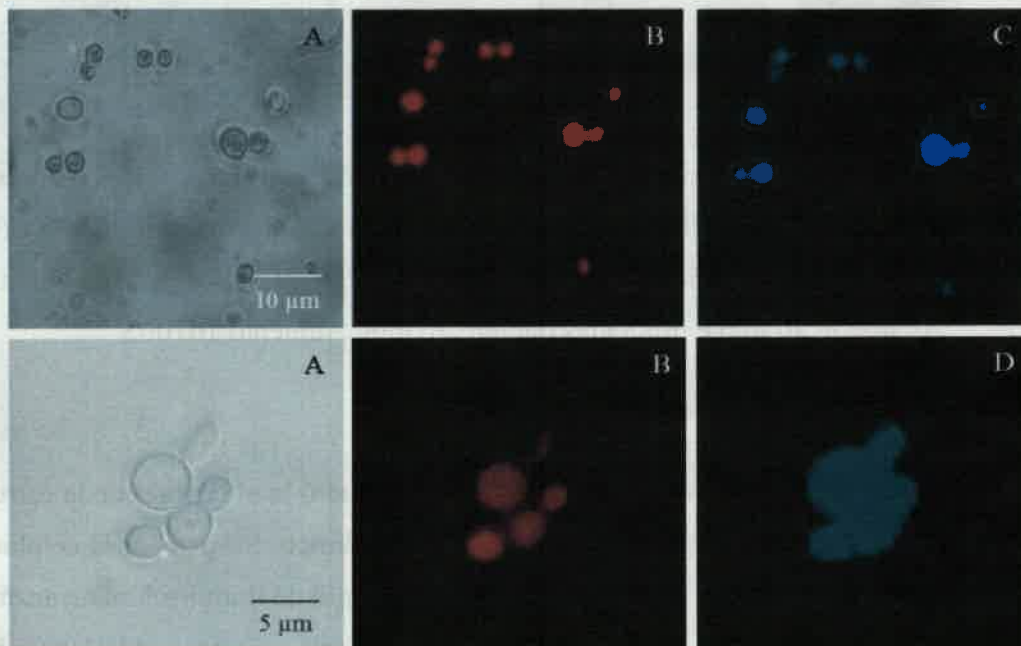


Figura 54. Localización celular de TMPyP⁴⁺, (A) campo claro, (B) fluorescencia de la porfirina, (C) fluorescencia de Ho y (D) fluorescencia de CMAC. Cultivos incubados con TMPyP⁴⁺ [5µM] 30 min e irradiados 30 min

7.1.10.5. Efectos de la IFD en la ultraestructura celular

Mediante TEM se pudo evaluar el daño provocado por el proceso de IFD a nivel de la envoltura celular y del citoplasma. En las células incubadas con 10 μM del sensibilizador e irradiadas por 30 min se observó un aumento en el espesor y la aparición de irregularidades en la envoltura celular y en la organización interna de la célula (Figura 55 C). Mientras que en los controles (Figura 55 A y B) la integridad celular a nivel citoplasmático y de envoltura celular permanece intacta. Así, el efecto fotodinámico puede conducir a una pérdida de funcionalidad de la membrana y la pared celular. Estos resultados se asemejan a los encontrados por Lambrechts y col.¹³⁹, donde las células de *C. albicans* fueron investigadas por microscopía electrónica luego de ser tratadas con la porfirina catiónica 5-fenil-10,15,20-tris(*N*-metil-4-piridil)porfirina e irradiadas con luz visible.

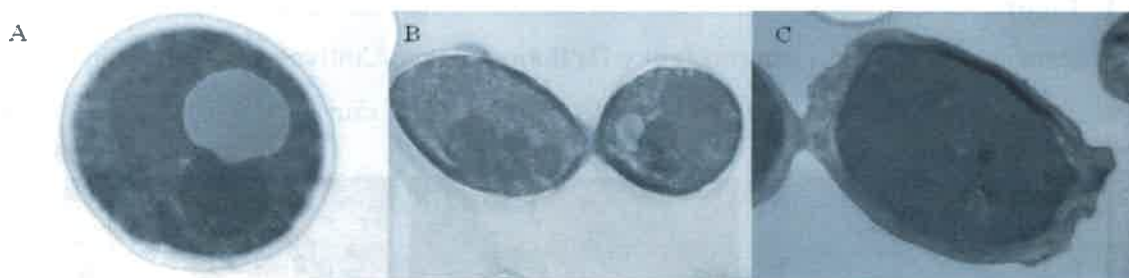


Figura 55. (A) Células de *C. albicans* control. Aumento 21560X (B) *C. albicans* en presencia del sensibilizador TMPyP^{4+} [10 μM] mantenidas en la oscuridad. Aumento 13000X (C) Células de *C. albicans* en presencia del sensibilizador TMPyP^{4+} [10 μM] mantenidas en la oscuridad 30 min e irradiadas durante 30 min. Aumento 16700X

7.1.10.6. Estudio del daño de la envoltura celular

A través de microscopía electrónica de barrido se estudió la alteración de la estructura de la envoltura de *C. albicans* luego del tratamiento fotodinámico. Suspensiones celulares de $\sim 10^7$ UFC/mL fueron tratadas con 50 μM de TMPyP^{4+} y 30 min de iluminación, alcanzándose una reducción de la viabilidad celular de $\sim 4,5$ log UFC/mL. Estas condiciones fueron equivalentes a las obtenidas con $\sim 10^6$ UFC/mL y 5 μM de TMPyP^{4+} . De forma que, la dosis de porfirina utilizada no fue tóxica y el tratamiento también fue eficiente. A nivel de la envoltura de la célula puede observarse que tanto en las células control como en las tratadas con el fotosensibilizador en oscuridad, la superficie se mantuvo relativamente lisa sin imperfecciones detectables (Figura 56, A y B). Por otro lado, en las levaduras sometidas a la

IFD se observan notorias irregularidades en la superficie celular (Figura 56, C), lo que indica que el tratamiento fotodinámico con TMPyP^{4+} tiene efecto sobre la pared de *C. albicans*.



Figura 56. Suspensiones de *C. albicans* (10^7 UFC/mL): (A) Células control sin tratar. (B) Cultivos en presencia del sensibilizador TMPyP^{4+} [$50 \mu\text{M}$] mantenidos en la oscuridad. (C) Células incubadas con TMPyP^{4+} [$50 \mu\text{M}$] 30 min e irradiadas durante 30 min. Aumento 5000X

Por lo tanto, la interacción con el ADN no contribuye a la citotoxicidad de las células, al menos bajo estas condiciones de tratamiento de IFD. Mientras que, los procesos fotooxidativos en la célula tienen un gran efecto sobre las envolturas celulares y también producen alteraciones en los componentes citoplasmáticos.

7.2. Estudios de las nuevas aminoporfirinas como agentes fototerapéuticos

Con la finalidad de evaluar nuevos derivados de porfirinas como potenciales agentes fototerapéuticos, se realizaron ensayos para determinar la eficacia de 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TAPP) y 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N,N*-trimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TAPP^{4+}) (Figura 57) en la IFD de *C. albicans*. En ambos sensibilizadores el anillo tetrapirrólico está sustituido por grupos amino alifáticos. En TAPP estos grupos no están cargados pero son precursores de cationes a pH fisiológico, mientras que TAPP^{4+} posee cargas positivas intrínsecas. Además, en ambas estructuras los grupos positivos están separados del anillo central por una cadena alifática, la cual le confiere mayor movilidad para interactuar con los componentes celulares y mantiene las propiedades fisicoquímicas de la porfirina sin modificaciones.

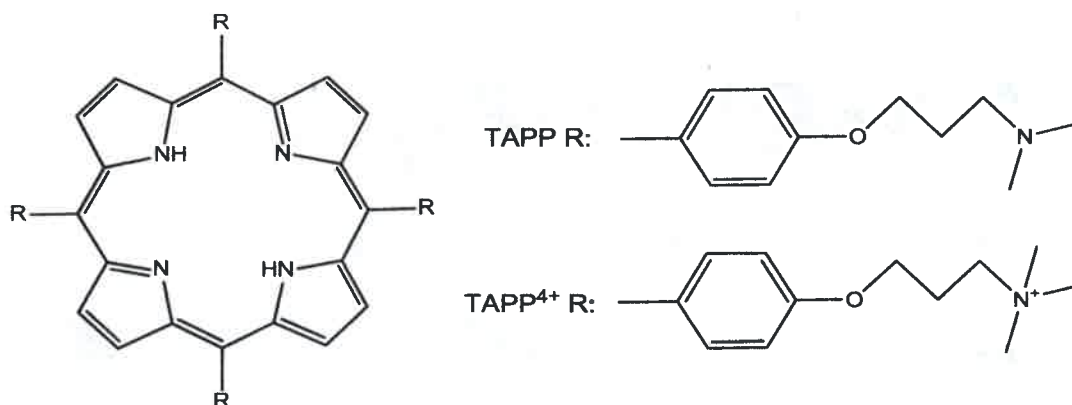


Figura 57. Estructura molecular de 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TAPP) y 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N,N*-trimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TAPP⁴⁺).

7.2.1. Estudio de las propiedades espectroscópicas, fotodinámicas y estabilidad de las porfirinas

Los espectros de absorción de TAPP y TAPP⁴⁺ llevados a cabo en DMF (Figura 58, A y B). Estos poseen características similares a las observadas con TMPyP⁴⁺. Ambos agentes, presentan una banda aguda de absorción cercana a los 420 nm y las características bandas *Q* de menor intensidad a longitudes de onda mayores (500-650 nm). Estas porfirinas se encuentran disueltas en estado monomérico en DMF, como lo demuestra la forma aguda de la banda *Soret*. En agua, la forma de las bandas de absorción es bastante similar entre TAPP y TAPP⁴⁺. Un pequeño efecto hipsocrómico de 4 nm en el máximo de la banda *Soret*, fue producido en agua con respecto a DMF. Además, se pudo observar un leve ensanchamiento de estas bandas con respecto a la de TMPyP⁴⁺, posiblemente debido a alguna agregación parcial.

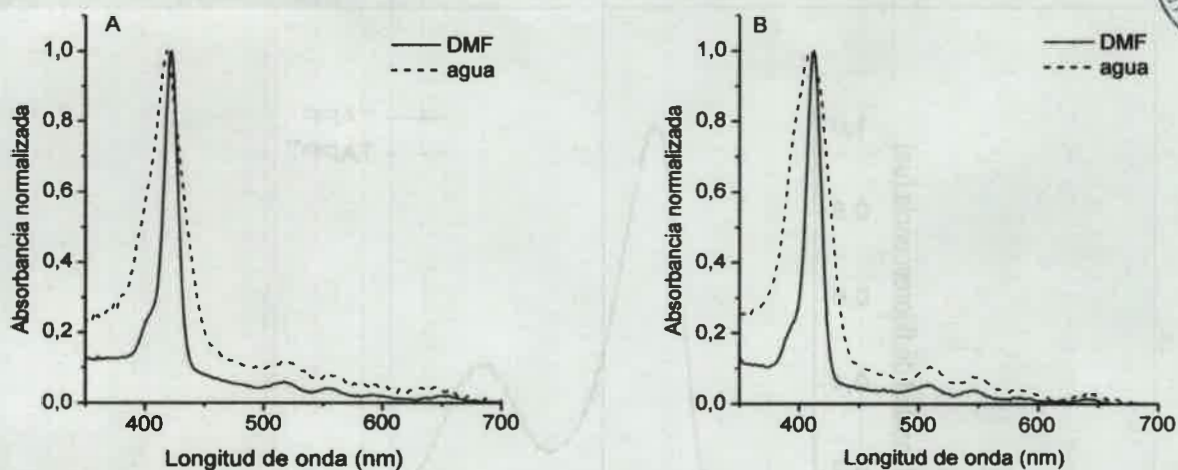


Figura 58. Espectro de absorción de TAPP (A) y TAPP⁴⁺ (B), en DMF (línea continua) y agua (línea discontinua)

En los espectros de emisión de fluorescencia se observan las dos bandas características de este tipo de porfirinas, en la región espectral roja (Figura 59). En estos nuevos agentes, la primera banda de emisión presenta una intensidad significativamente mayor a la segunda, a diferencia de TMPyP⁴⁺, donde la segunda banda es algo más intensa que la primera.

El rendimiento cuántico de producción de ¹O₂, de TAPP y TAPP⁴⁺, es de 0,53 y 0,49 respectivamente (Tabla 6)²⁴⁰, estos valores son menores que el obtenido para TMPyP⁴⁺ (0,74). De todas formas, estas propiedades espectroscópicas y fotodinámicas, resultaron ser aptas para proceder con los estudios de inactivación celular, detección y cuantificación de las porfirinas en medio biológico.

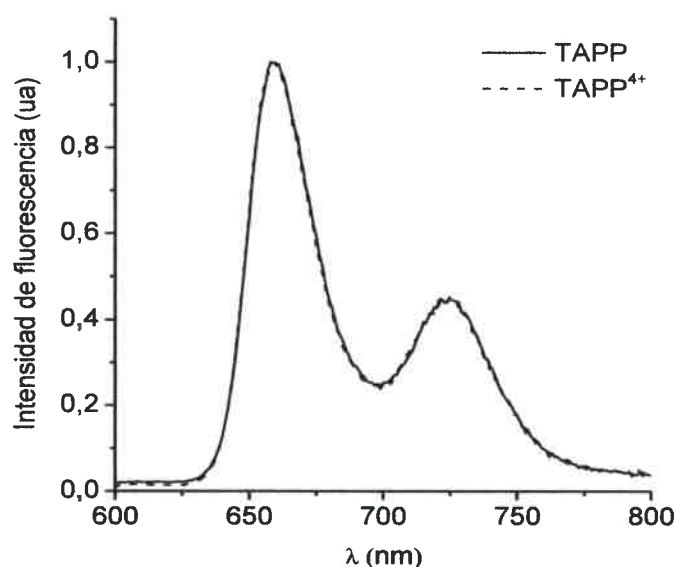


Figura 59. Espectro de emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc}=515$ nm) de TAPP (línea continua), TAPP⁴⁺ (línea discontinua) en DMF.

Tabla 6. Máximo de absorción y de emisión de fluorescencia, rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) y producción de ¹O₂ (Φ_Δ)

Porfirina	Absorción λ_{max} (nm)					Emisión λ_{max} (nm)		Φ_F	Φ_Δ
TAPP _(DMF)	422	517	556	593	650	659	725	0,15	0,53
TAPP ⁴⁺ _(DMF)	422	518	553	594	652	659	725	0,13	0,49

La fotodescomposición autosensibilizada produce una reducción en la actividad del fotosensibilizador y podría usarse convenientemente para eliminar la fotosensibilidad en el lugar de tratamiento.²⁴¹ El estudio de este fenómeno permite tener una estimación sobre la estabilidad de los diferentes sensibilizadores. Con tal motivo, la fotoestabilidad de TAPP y TAPP⁴⁺ fue estudiada en medio biológico, bajo las mismas condiciones empleadas durante los ensayos de inactivación celular. La descomposición del sensibilizador fue analizada a través de la disminución en la absorción de la banda *Soret*. Según esta medida, al final del tratamiento con luz visible se pierde un ~20% de porfirina (Figura 60).

El mecanismo de fotodegradación puede ser complejo y además ser diferente en solución y en medio biológico.²⁴¹ El microentorno biológico donde va actuar el sensibilizador puede inducir importantes modificaciones en las propiedades fotofísicas de las porfirinas,

comparado a las establecidas en solución. Estos resultados indican que la eficiencia de fotosensibilización decrece con la dosis de luz. Para los tratamientos por IFD, si el sensibilizador se descompone muy rápido durante la irradiación, la inactivación de las células microbianas podría ser incompleta. Sin embargo, una velocidad de fotodescomposición relativamente lenta, como en este caso, permitiría aplicar la IFD eficientemente y eliminar el fotosensibilizador del medio.

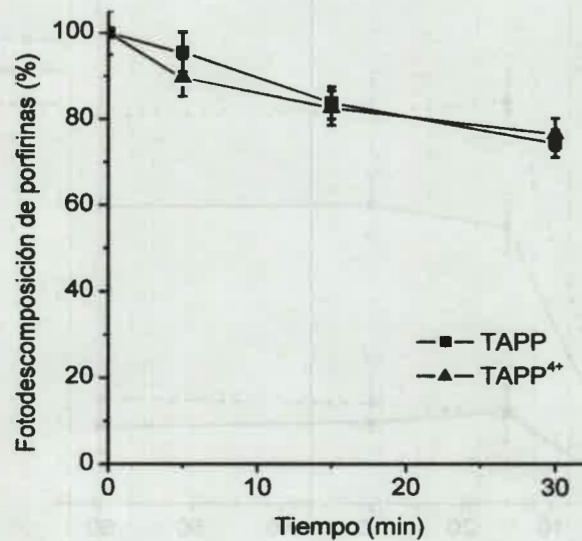


Figura 60. Fotodescomposición de TAPP y TAPP⁴⁺ en suspensiones celulares de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubada con 5 μ M de porfirina en oscuridad por 30 min a 37 °C y expuesta a luz visible por diferentes tiempos (90 mW/cm²). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes

7.2.2. Unión de las porfirinas a las células de *C. albicans*

La cantidad de aminoporfirinas unidas y/o incorporadas se estudió para en suspensiones celulares de $\sim 10^6$ UFC/ml en PBS con 1 ó 5 μ M de porfirina durante 15 ó 30 min. También, se evaluó la fuerza de unión, mediante la aplicación de lavados a las muestras, previos a la determinación de la concentración intracelular del fotosensibilizador por espectroscopia de fluorescencia.

Al igual que lo observado para TMPyP⁴⁺, con estos nuevos agentes se alcanza un máximo de unión a 15 min de incubación para las dos concentraciones estudiadas en este caso. La cantidad de sensibilizador recuperado fue similar para 1 μ M de ambas porfirinas, siendo de 0,35 y 0,33 nmoles/10⁶ células para TAPP y TAPP⁴⁺, respectivamente. Mientras

que a una concentración mayor (5 μM), se observa diferencia más marcada entre estos agentes. La cantidad de TAPP determinada fue de 1,04 nmoles/ 10^6 células y para TAPP⁴⁺ se alcanzó un valor de 1,5 nmoles/ 10^6 células. Al igual que antes, el aumento en el tiempo de incubación a 30 e incluso 60 min no condujo a un incremento significativo en la incorporación de estas porfirinas, para ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 61).

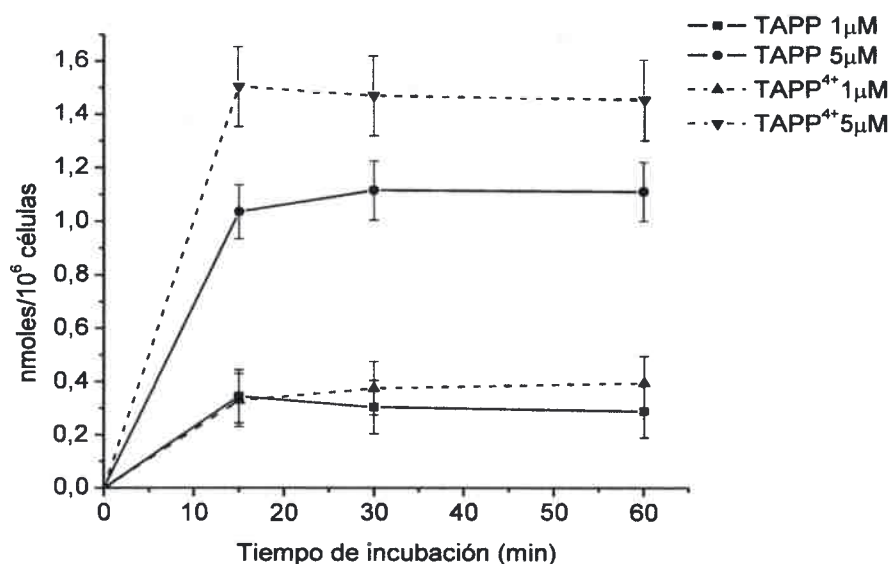


Figura 61. Cantidad de TAPP y TAPP⁴⁺ recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con 1 y 5 μM de sensibilizador a diferentes tiempos de incubación a 37 °C.

Los valores representan la media \pm desviación estándar

A diferencia TMPyP⁴⁺, en la Figura 62 puede observarse que la aplicación de uno y dos lavados de las células incubadas con 5 μM de TAPP o TAPP⁴⁺, no tuvo un efecto significativo en relación a las muestras sin lavar para ninguno de los dos agentes estudiados. Esto refleja la gran afinidad entre estos compuestos y la levadura. Además, este comportamiento fue el mismo para 15 y 30 min de incubación. Nuevamente se observa que, en proporción, la cantidad de TAPP⁴⁺ fue mayor que TAPP.

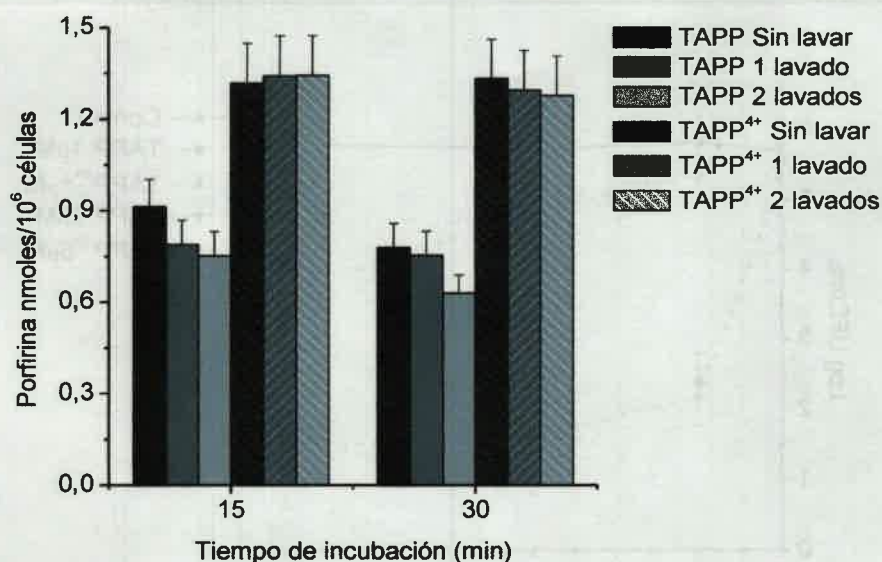


Figura 62. Cantidad de TAPP y TAPP⁴⁺ recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con 5 μM de sensibilizador por 15 y 30 min a 37 °C y diferentes etapas de lavados. Los valores representan la media \pm desviación estándar

7.2.3. Tratamiento fotodinámico en suspensiones celulares

La IFD de los fotosensibilizadores TAPP y TAPP⁴⁺, se evaluó en suspensiones de *C. albicans* en PBS a concentraciones de 1 y 5 μM de porfirina y diferentes tiempos de irradiación con luz visible.

Al igual que lo observado con TMPyP⁴⁺, para estos dos agentes la eficiencia en la inactivación de *C. albicans* fue proporcional a la concentración de sensibilizador utilizado. Además, a la menor concentración (1 μM) de ambas porfirinas también puede apreciarse dependencia lineal con el tiempo de irradiación (Figura 63). Mientras que, a mayor concentración (5 μM), sólo se observó un incremento en la inactivación celular cuando el tiempo de tratamiento aumentó de 5 a 15 min. Luego de 30 min de irradiación con luz visible, la pérdida de supervivencia no cambió significativamente con respecto al punto anterior, llegando a ser de 4,33 y 4,81 log, respectivamente. Por lo tanto, estos agentes mostraron ser eficaces en la inactivación de *C. albicans*, para estas condiciones experimentales. Para una concentración de 5 μM , estos fotosensibilizadores provocaron una fuerte inactivación a 5 min de tratamiento llegando a ser máxima luego de 15 min de irradiación. Mientras que, para la misma concentración de TMPyP⁴⁺, se requirieron 30 min de irradiación con luz visible para alcanzar una erradicación celular completa.

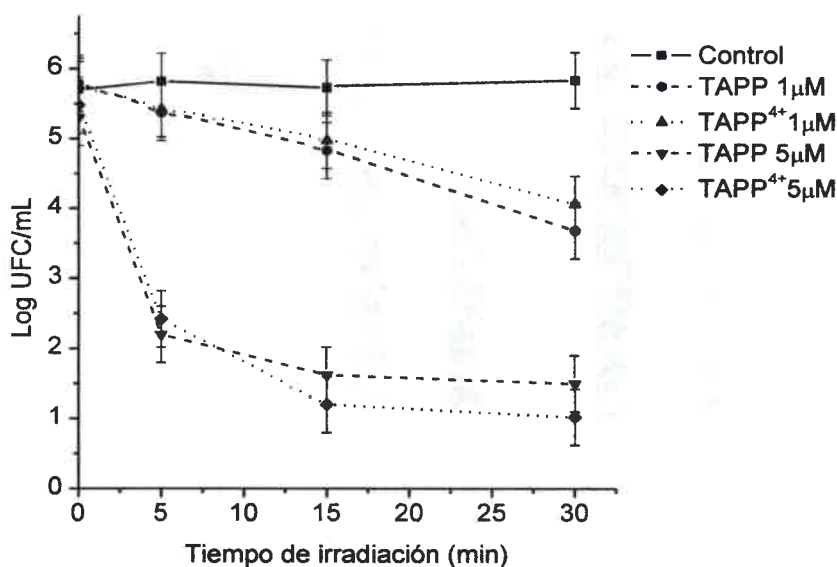


Figura 63. Supervivencia de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubada con 1 y 5 μ M de TAPP y TAPP⁴⁺ en oscuridad por 30 min a 37 °C y expuesta a luz visible por 5, 15 y 30 min (90 mW/cm²). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes

En la Figura 64, puede observarse que las células lavadas una o dos veces, siguen respondiendo al tratamiento de la misma forma que las suspensiones celulares que no fueron lavadas. En todos los casos, las levaduras fotoinactivadas, sufren una reducción en su viabilidad de ~ 5 log UFC/mL. Esto coincide con resultados anteriores, de TAPP y TAPP⁴⁺, donde se demostró que la cantidad de sensibilizador unido a las células no se modifica significativamente por efecto de los lavados.

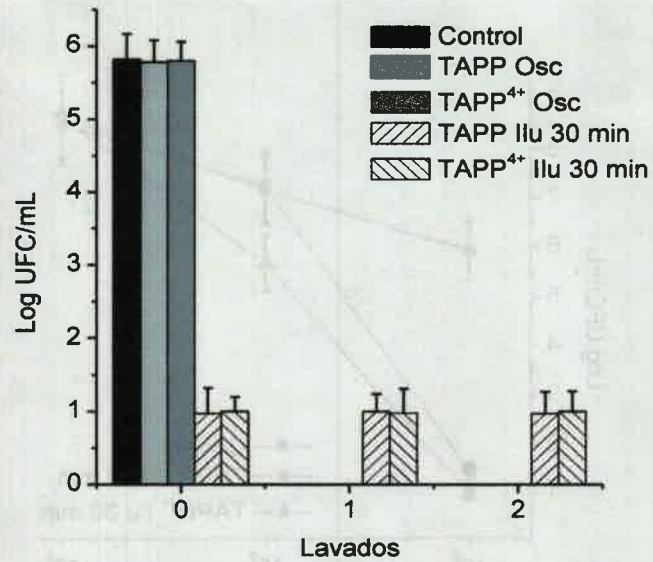


Figura 64. Inactivación de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubada con $5 \mu\text{M}$ de TAPP y TAPP⁴⁺, sin lavar o bajo el efecto de 1 y 2 lavados previos a la irradiación con luz visible por 30 min. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Cuando el tratamiento con estas aminoporfirinas es llevado a cabo a densidades celulares mayores de 10^6 UFC/mL, se observa la misma tendencia que para TMPyP⁴⁺. En estas condiciones, si la concentración de fotosensibilizador se mantiene constante, la cantidad de porfirina disponible por célula no es suficiente para alcanzar una inactivación celular apropiada (Figura 65).

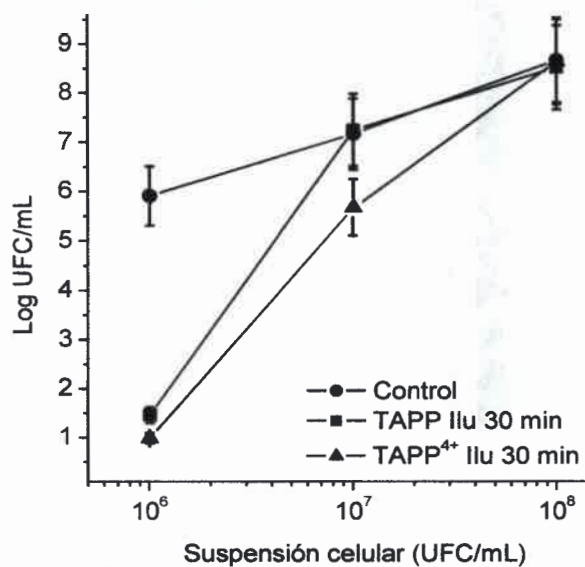


Figura 65. Supervivencia de *C. albicans* ($\sim 10^6$ $\sim 10^7$ y $\sim 10^8$ UFC/mL) incubada con $5 \mu\text{M}$ de TAPP y TAPP⁴⁺ en oscuridad por 30 min a 37°C y expuesta a luz visible por 30 min (90 mW/cm^2). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes

7.2.4. Efecto fotosensibilizado sobre la curva de crecimiento

Los cultivos tratados con $5 \mu\text{M}$ de TAPP y TAPP⁴⁺ sufrieron un retardado más importante en el crecimiento, en relación al observado para TMPyP⁴⁺. En particular, el derivado tetracatiónico de estas dos porfirinas tuvo un efecto algo mayor sobre la viabilidad celular (Figura 66).

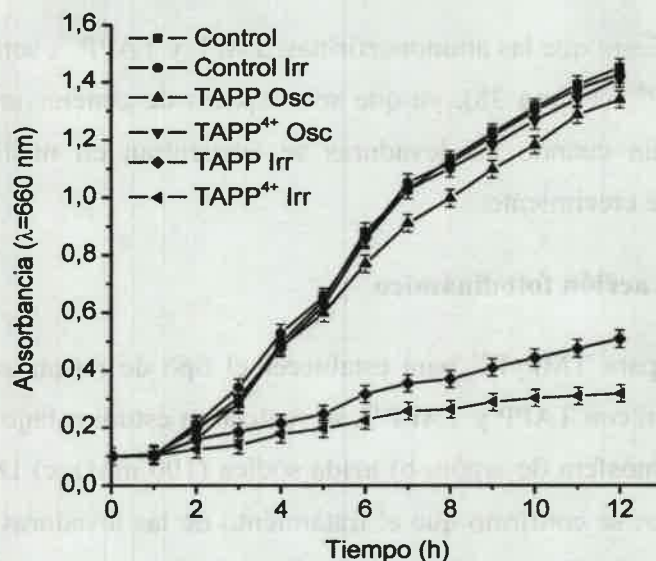


Figura 66. Curva de retardo del crecimiento de *C. albicans* incubadas con 5 μM de TAPP y TAPP⁴⁺ expuestas a diferentes tiempos de irradiación con luz visible en CS a 37 °C. Los valores representan la media \pm desviación estándar.

Tabla 7. Velocidad de crecimiento (v , h^{-1}) de *C. albicans* tratada con 5 μM de TAPP y TAPP⁴⁺

Tratamiento	Velocidad de crecimiento
Control	0,146 \pm 0,007
Control iluminado	0,137 \pm 0,007
TAPP en oscuridad	0,123 \pm 0,006
TAPP ⁴⁺ en oscuridad	0,141 \pm 0,007
TAPP iluminada	0,039 \pm 0,002
TAPP ⁴⁺ iluminada	0,022 \pm 0,001

Las células de *C. albicans* expuestas a las porfirinas en la oscuridad o iluminadas sin sensibilizador mostraron crecimiento similar al control. Por lo tanto, los datos ilustran que el retardo del crecimiento es debido al efecto de la IFD del sensibilizador sobre las células. Estos

datos ponen de manifiesto que las aminoporfirinas, TAPP y TAPP⁴⁺, son sensibilizadores más efectivos que TMPyP⁴⁺ (Figura 38), ya que son capaces de generar una gran pérdida de la viabilidad celular, aún cuando las levaduras se encuentran en medio nutritivo y a una temperatura óptima de crecimiento.

7.2.5. Mecanismo de acción fotodinámico

Al igual que para TMPyP⁴⁺ para establecer el tipo de mecanismo que se desarrolla durante la inactivación con TAPP y TAPP⁴⁺, se realizaron estudios bajo distintas condiciones experimentales: a) atmósfera de argón, b) azida sódica (100 mM), c) D₂O y d) manitol (100 mM). En primer lugar, se confirmó que el tratamiento de las levaduras con 5 μM de ambos agentes, provocó una inactivación de 4,5 log UFC/mL (Figura 67 y Figura 68, línea 4), en relación a los cultivos controles.

7.2.5.1. Fotoinactivación bajo atmósfera anóxica

El tratamiento, llevado a cabo en una atmosfera de argón, permitió simular condiciones de baja concentración de oxígeno. De forma similar a lo obtenido para TMPyP⁴⁺, con estas nuevas porfirinas se alcanzó una disminución en la viabilidad de ~ 1 log UFC/mL para TAPP y una inactivación aún menor para TAPP⁴⁺, a diferencia de lo observado en las muestras tratadas en presencia de oxígeno (Figura 67 y Figura 68, líneas 4 y 6). Por lo tanto, para TAPP y TAPP⁴⁺, el oxígeno resultó indispensable para lograr un tratamiento efectivo de *C. albicans*.

7.2.5.2. Efecto del ión azida sobre la IFD

Debido al efecto inhibitorio del ión azida sobre el ¹O₂ y el estado triplete del sensibilizador, nuevamente se realizaron ensayos en presencia de este compuesto, para estudiar de forma más directa, aunque no decisiva, la participación del ¹O₂ durante el tratamiento fotodinámico con TAPP y TAPP⁴⁺. Con el agente TAPP, se observó una leve inactivación bajo estas condiciones, pero el efecto protector de la azida contra el tratamiento fotodinámico se mantuvo (Figura 67, línea 8). Mientras que TAPP⁴⁺, fue más dependiente de la presencia del ión azida y la inactivación fue nula, de la misma forma que se observó para TMPyP⁴⁺ (Figura 68, línea 8).

7.2.5.3. Inactivación fotodinámica en D₂O

Cuando el tratamiento es llevado a cabo en un medio con D₂O, se esperó un aumento de la inactivación celular, si la especie citotóxica responsable es el ¹O₂. De esta forma, como el valor de inactivación alcanzado en agua, fue cercano al límite de detección del método, para los estudios con 5 μM de porfirina (Figura 67 y Figura 68, línea 4), es difícil visualizar un aumento en la inactivación celular cuando el tratamiento se realizó en D₂O. Así, para apreciar mejor este efecto, los ensayos con las aminoporfirinas se realizaron en una concentración de 1 μM. En estos estudios las células tratadas con 1 μM de TAPP o TAPP⁴⁺ y 30 min de irradiación fueron levemente inactivadas (Figura 67 y Figura 68, línea 10), y el mismo tratamiento llevado a cabo en D₂O fue significativamente más eficiente con ambas porfirinas, sobre todo con TAPP⁴⁺ (Figura 67 y Figura 68, línea 11). Estos resultados sugieren, que el ¹O₂ tuvo una participación importante durante el tratamiento fotodinámico con estos sensibilizadores.

7.2.5.4. Efecto del manitol sobre la IFD

El agregado de manitol en los cultivos a tratar, permitió establecer el aporte de los mecanismos de tipo I al proceso de inactivación celular, debido a su efecto atrapador del radical anión superóxido e hidroxilo. Bajo estas condiciones, la eficacia del tratamiento fue la misma que en ausencia de manitol, para los nuevos agentes estudiados (Figura 67 y Figura 68, línea 13).

Por lo tanto se confirmó, que las especies reactivas de las reacciones de tipo I no participaron de la inactivación celular y el principal responsable del daño durante el tratamiento es el ¹O₂, de la misma forma que lo que se observó para las porfirinas tetracatiónicas TMPyP⁴⁺ y TMAP⁴⁺ y para la tricatiónica TFAP³⁺.²¹⁸

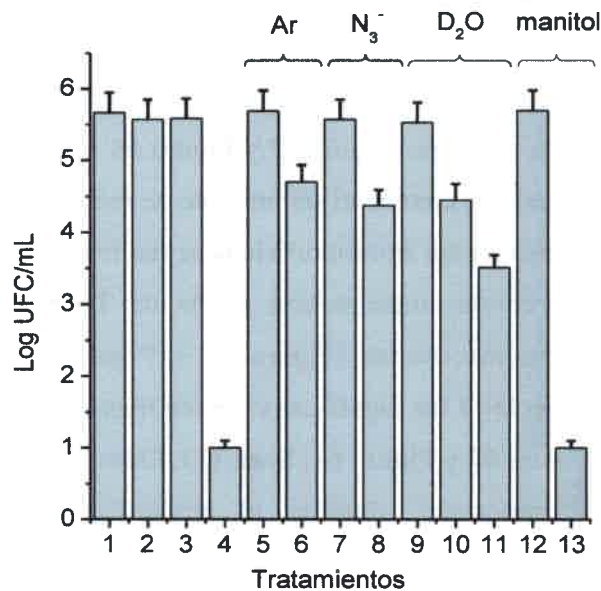


Figura 67. Supervivencia de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubada con TAPP en oscuridad por 30 min a 37 °C y expuesta a luz visible por 30 min (90 mW/cm^2); 1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control irradiado; 3) cultivo control tratado con TAPP y mantenido en oscuridad; 4) cultivo tratado con 5 μM de TAPP e irradiado; 5) cultivo control bajo argón e irradiado; 6) cultivo tratado con TAPP bajo argón e irradiado; 7) cultivo control con 100 mM de azida e irradiado; 8) cultivo tratado con TAPP y 100 mM de azida e irradiado; 9) cultivo control en D_2O e irradiado; 10) cultivo tratado con 1 μM de TAPP e irradiado; 11) cultivo tratado con 1 μM de TAPP en D_2O e irradiado; 12) cultivo control con 100 mM de manitol e irradiado; 13) cultivo tratado con TAPP y 100 mM de manitol e irradiado. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

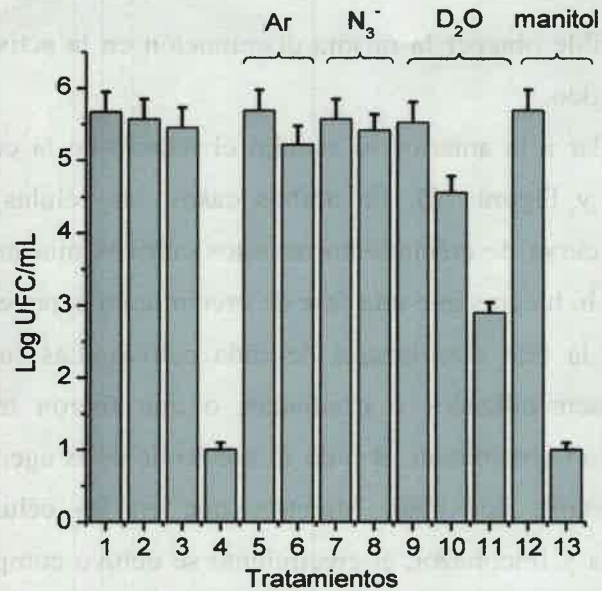


Figura 68. Supervivencia de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubada con TAPP⁴⁺ en oscuridad por 30 min a 37 °C y expuesta a luz visible por 30 min (90 mW/cm^2); 1) cultivo control en oscuridad; 2) cultivo control irradiado; 3) cultivo control tratado con TAPP⁴⁺ y mantenido en oscuridad; 4) cultivo tratado con $5 \mu\text{M}$ de TAPP⁴⁺ e irradiado; 5) cultivo control bajo argón e irradiado; 6) cultivo tratado con TAPP⁴⁺ bajo argón e irradiado; 7) cultivo control con 100 mM de azida e irradiado; 8) cultivo tratado con TAPP⁴⁺ y 100 mM de azida e irradiado; 9) cultivo control en D₂O e irradiado; 10) cultivo tratado con $1 \mu\text{M}$ de TAPP⁴⁺ e irradiado; 11) cultivo tratado con $1 \mu\text{M}$ de TAPP⁴⁺ en D₂O e irradiado; 12) cultivo control con 100 mM de manitol e irradiado; 13) cultivo tratado con TAPP⁴⁺ y 100 mM de manitol e irradiado. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

7.2.6. Tratamiento de *C. albicans* con fluconazol y porfirina

A través de un tratamiento combinado, de las porfirinas TAPP y TAPP⁴⁺ con el antifúngico fluconazol, fue posible estudiar si las dos terapias mejoraban el control de la proliferación de *C. albicans*. En primer lugar se estudió el efecto producido variando la concentración de fluconazol. Los resultados mostraron que fluconazol tiene una concentración inhibitoria mínima (CIM) de $1 \mu\text{g/mL}$ sobre esta levadura. Luego, para una concentración de porfirina de $1 \mu\text{M}$ (menor a la utilizada para erradicar a *C. albicans*), distintas concentraciones de antifúngico ($0,25$; $0,5$; 1 y $1,5 \mu\text{g/mL}$) y 30 min de irradiación, la CIM obtenida fue de $0,25 \mu\text{g/mL}$ con ambos sensibilizadores. Por lo tanto, el efecto fotodinámico mejora la acción

del fluconazol y es posible obtener la misma disminución en la actividad microbiana a una dosis menor del antifúngico.

De manera similar a la anterior se estudió el retardo en la curva de crecimiento de *C.albicans* (Figura 69 y Figura 70). En ambos casos, las células controles tuvieron un crecimiento normal, la curva de crecimiento de estos cultivos muestra una zona de latencia durante las primeras 12 h, luego sigue una fase de crecimiento exponencial y hacia el final se puede ver el inicio de la fase estacionaria de cada cultivo. Las suspensiones que fueron incubadas con el fotosensibilizador e irradiadas, o que fueron tratadas con fluconazol muestran un retardo en el crecimiento debido al efecto de cada agente. Sin embargo, estos cultivos mostraron bastante actividad. Mientras que en las células tratadas de forma combinada con porfirina y fluconazol, el crecimiento se detuvo completamente para las tres concentraciones de fluconazol estudiadas. Este efecto también pudo observarse en la Tabla 8, donde la velocidad de crecimiento de los cultivos tratados con IFD y fluconazol fue nula.

El efecto fotodinámico de TAPP y TAPP⁴⁺ hace más efectiva la acción del fluconazol sobre estas levaduras. Estudios previos demostraron que el pretratamiento de biofilms de *Staphylococcus aureus* con IFD, seguido del agregado de vancomicina a valores de concentración significativamente inferiores a la concentración inhibitoria del biofilm, causó la disrupción de la matriz del mismo y permite una inactivación casi completa de la bacteria.²⁴²

El tratamiento en conjunto de las células de *C. albicans* con fluconazol y porfirina, permitió obtener una inactivación celular en la oscuridad por efecto del triazol y aumentó la muerte de las levaduras por la IFD en presencia de luz visible.

Tabla 8. Velocidad de crecimiento (v , h^{-1}) de *C. albicans* tratada con distintas dosis de fluconazol, y estas dosis combinadas con $1 \mu M$ de TAPP y TAPP⁴⁺ más luz visible

Tratamientos	Velocidad de crecimiento	
	TAPP	TAPP ⁴⁺
Control	0,174 ± 0,009	0,155 ± 0,008
Control en oscuridad	0,168 ± 0,008	0,15 ± 0,008
Control iluminado	0,159 ± 0,008	0,142 ± 0,007
Porfirina iluminada	0,099 ± 0,005	0,099 ± 0,005
Fluconazol 5 μg	0,098 ± 0,005	0,076 ± 0,004
Fluconazol 10 μg	0,1 ± 0,005	0,081 ± 0,004
Fluconazol 15 μg	0,099 ± 0,005	0,055 ± 0,003
Fluconazol 5 μg + porfirina	0	0
Fluconazol 10 μg + porfirina	0	0
Fluconazol 15 μg + porfirina	0	0

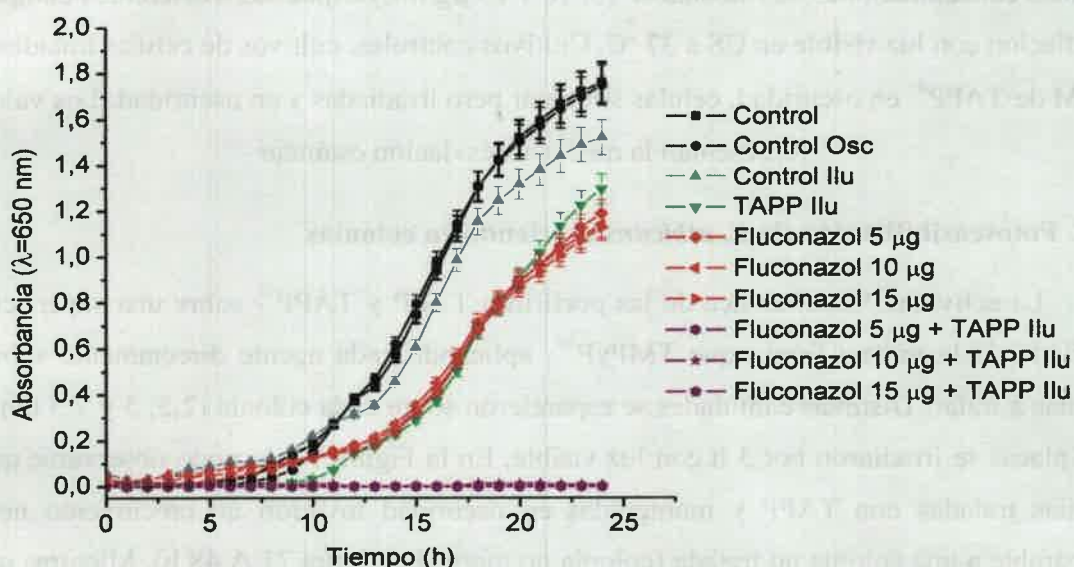


Figura 69. Curva de retardo del crecimiento de *C. albicans* incubadas con $1 \mu M$ de TAPP y distintas concentraciones de fluconazol (5, 10 y 15 $\mu g/mL$) expuestas a diferentes tiempos de irradiación con luz visible en CS a 37 °C. Cultivos controles, cultivos de células tratadas con $1 \mu M$ de TAPP en oscuridad, células sin tratar pero irradiadas y en oscuridad. Los valores representan la media \pm desviación estándar

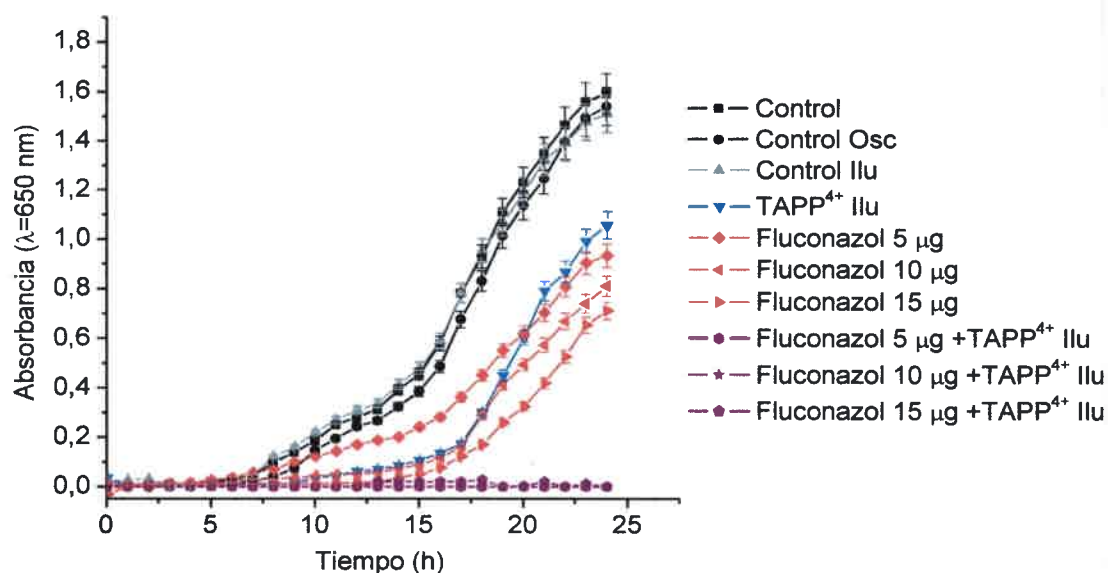


Figura 70. Curva de retardo del crecimiento de *C. albicans* incubadas con $1\mu\text{M}$ de TAPP⁴⁺ y distintas concentraciones de fluconazol (5, 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$) expuestas a diferentes tiempos de irradiación con luz visible en CS a 37 °C. Cultivos controles, cultivos de células tratadas con $1\mu\text{M}$ de TAPP⁴⁺ en oscuridad, células sin tratar pero irradiadas y en oscuridad. Los valores representan la media \pm desviación estándar

7.2.7. Fotosensibilización de *C. albicans* creciendo en colonias

La actividad fotodinámica de las porfirinas TAPP y TAPP⁴⁺ sobre una superficie fue estudiada de la misma forma que TMPyP⁴⁺, aplicando cada agente directamente sobre las colonias a tratar. Distintas cantidades se esparcieron sobre cada colonia (2,5; 5 y 7,5 nmoles), y las placas se irradiaron por 3 h con luz visible. En la Figura 71 A, pudo observarse que las colonias tratadas con TAPP y mantenidas en oscuridad tuvieron un crecimiento normal, comparable a una colonia no tratada (colonia no marcada, Figura 71 A 48 h). Mientras que en las placas irradiadas con luz visible (Figura 71 B), las colonias tratadas no continuaron creciendo aun después de 144 h de realizado el tratamiento, para ninguna de las tres cantidades de porfirina usada. A diferencia de la colonia irradiada en ausencia de sensibilizador (colonia no marcada, Figura 71 B) o las que permanecieron en oscuridad. Por lo que, la detención del crecimiento se debió al efecto fotodinámico.

En la Figura 72 A se observa que las colonias tratadas con una cantidad mayor a 2,5 nmoles de TAPP⁴⁺, tienen un tamaño algo menor que las colonias incubadas con 2,5 nmoles o que las no tratadas (colonias no marcadas). De todas formas, luego de 48 h de aplicado el

sensibilizador, fue evidente que las células continúan creciendo, por lo que no resultó ser tóxica para ninguna de las tres cantidades de porfirina que se emplearon. Luego de ser irradiadas, las colonias no aumentaron de tamaño (Figura 72B), en relación a la colonia irradiada en ausencia de sensibilizador (colonia no marcada) o los controles en oscuridad, hasta 48 h después del tratamiento. Sin embargo, a las 144 h se observó que la colonia tratada con la menor cantidad del sensibilizador (2,5 nmoles), se recuperó y continuó creciendo. Las otras dos colonias permanecen inactivas, producto del efecto de fotosensibilización de TAPP⁴⁺. En comparación con TMAP⁴⁺, estos sensibilizadores produjeron un efecto fotosensible similar y el incremento en el tamaño de las colonias fue suprimido de igual forma con estas porfirinas catiónicas.¹⁴⁰

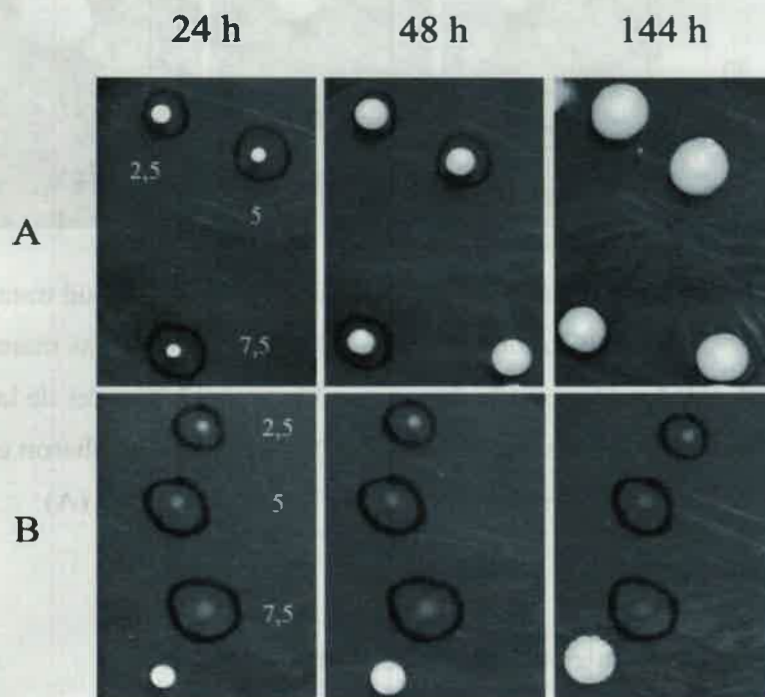


Figura 71. Crecimiento de colonias de *C. albicans* en agar Sabouraud tratadas con 2,5; 5 y 7,5 nmol de TAPP. El sensibilizador fue esparcido sobre las colonias marcadas (círculo) de una solución stock (~0.5 mM) y se incubaron por 30 min a 37 °C antes de la irradiación. Las colonias se irradiaron con luz visible (90 mW/cm²) por 3 h y se incubaron en oscuridad (B). Los controles se incubaron a 37 °C en oscuridad (A)

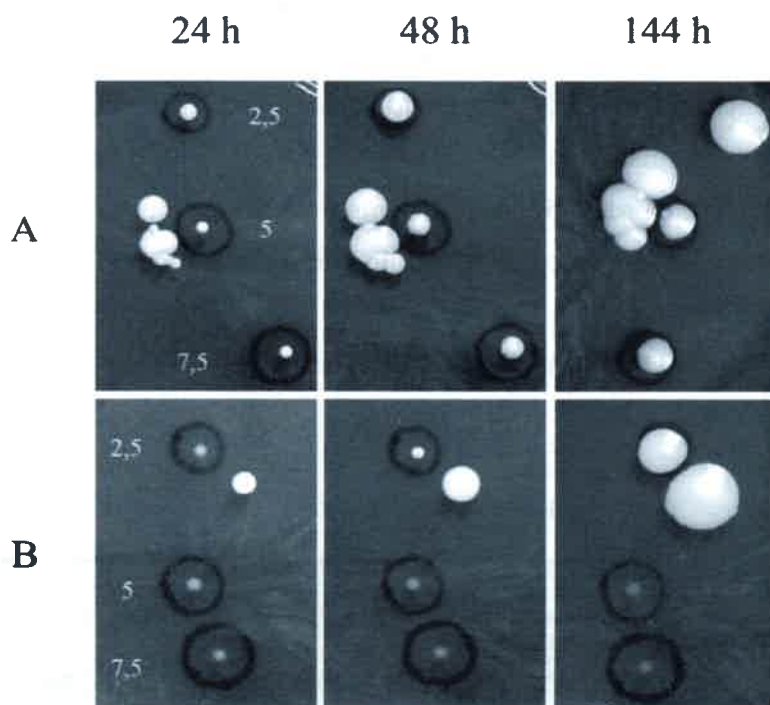


Figura 72. Crecimiento de colonias de *C. albicans* en agar Sabouraud tratadas con 2,5; 5 y 7,5 nmol de TAPP⁴⁺. El sensibilizador fue esparcido sobre las colonias marcadas (círculo) de una solución stock (~0.5 mM) y se incubaron por 30 min a 37 °C antes de la irradiación. Las colonias se irradiaron con luz visible (90 mW/cm²) por 3 h y se incubaron en oscuridad (B).

Los controles se incubaron a 37 °C en oscuridad (A)

7.2.8. Sitios de daño celular

7.2.8.1. Localización subcelular del sensibilizador

Como se discutió anteriormente, las nuevas porfirinas estudiadas interaccionan activamente con las células. Por lo tanto, al igual que para TMPyP⁴⁺, se analizó la localización del fotosensibilizador dentro de las levaduras. En la Figura 73 se observa la fluorescencia roja correspondiente a TAPP para cultivos controles y tratados. En ambos casos el sensibilizador se distribuyó, mayormente, por toda la célula, aunque en ciertas ocasiones (Figura 73, A1 y B1) pudo verse que la porfirina posee mayor afinidad hacia ciertas regiones intracelulares.

El análisis de la fluorescencia de los cultivos incubados con TAPP⁴⁺ (Figura 74), mostró que la distribución preferencial hacia ciertos compartimientos subcelulares es un poco más evidente, para este sensibilizador, con respecto a TAPP. En ambos casos, la intensidad y

distribución de fluorescencia fue la misma antes y después de la IFD. A diferencia de TMPyP^{4+} , las dos aminoporfirinas estudiadas parecen localizarse en ciertos sitios dentro de la célula más que en otros, sobre todo TAPP^{4+} .

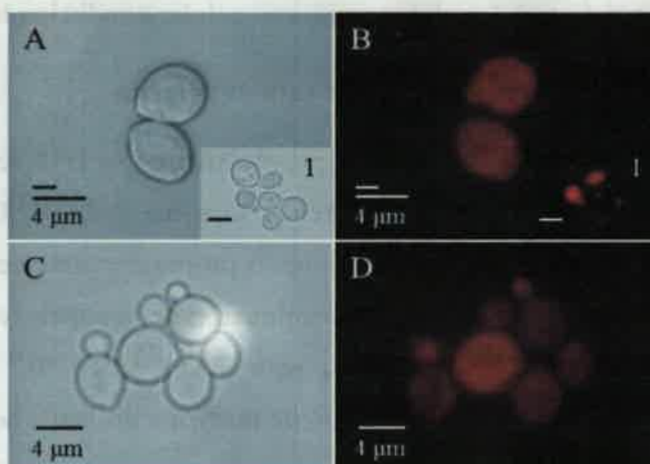


Figura 73. Localización de TAPP [5 μM] en células de *C. albicans* controles no irradiadas, A) campo claro y B) fluorescencia. Cultivos tratados con 5 μM de TAPP y luz visible por 30 min, C) campo claro y D) fluorescencia

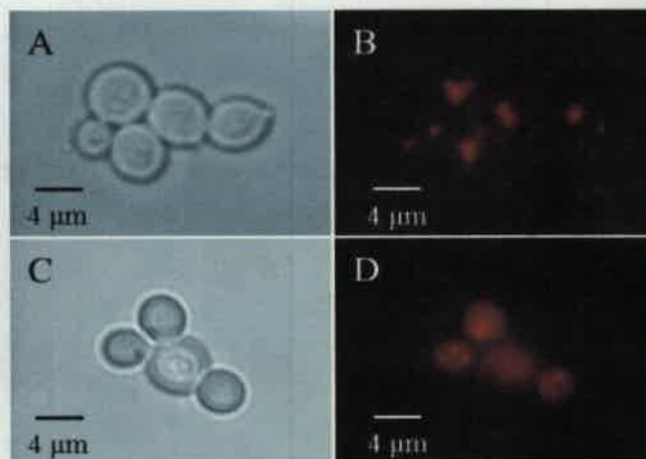


Figura 74. Localización de TAPP^{4+} [5 μM] en células de *C. albicans* controles no irradiadas, A) campo claro y B) fluorescencia. Cultivos tratados con 5 μM de TAPP^{4+} y luz visible por 30 min, C) campo claro y D) fluorescencia

La interacción del fotosensibilizador con las células juega un papel preponderante en la IFD de microorganismos.²⁴³ Tanto los estudios de unión como las imágenes de fluorescencia muestran que estas porfirinas presentan una elevada afinidad por *C. albicans*.

Así, la formación de ROS, mayormente representado por $^1\text{O}_2$, es producida principalmente en las proximidades del sitio de acción del fotosensibilizador y el tiempo de vida de las especies reactivas es suficiente para dañar el microentorno celular conduciendo a la inactivación.

7.2.8.2. Efectos de la IFD en la estructura celular interna

Para estudiar el daño morfológico provocado por la IFD se trabajó con cultivos de concentraciones celulares 10 veces mayores a lo usual ($\sim 1 \times 10^7$ UFC/mL), por lo que la cantidad de agente utilizado también se aumentó proporcionalmente 10 veces ($50 \mu\text{M}$). Con estas nuevas condiciones, se alcanzó una disminución de la supervivencia celular similar a la obtenida anteriormente (~ 5 log UFC/mL) para TAPP y TAPP⁴⁺ después de 30 min de irradiación. Por otro lado, esta concentración de porfirina utilizada no fue tóxica por sí misma en los cultivos no irradiados. Las células tratadas con los nuevos agentes se analizaron mediante TEM. Los estudios revelaron cambios morfológicos, como pérdida de la forma esférica y alteración del material intracelular (Figura 75). Cabe aclarar que las células incubadas con estas porfirinas que no fueron irradiadas también se vieron algo modificadas por la presencia del fotosensibilizador, en relación a las muestras sin tratar. Sin embargo, las células sometidas a IFD no fueron viables, mientras que los cultivos mantenidos en oscuridad tuvieron un crecimiento normal.

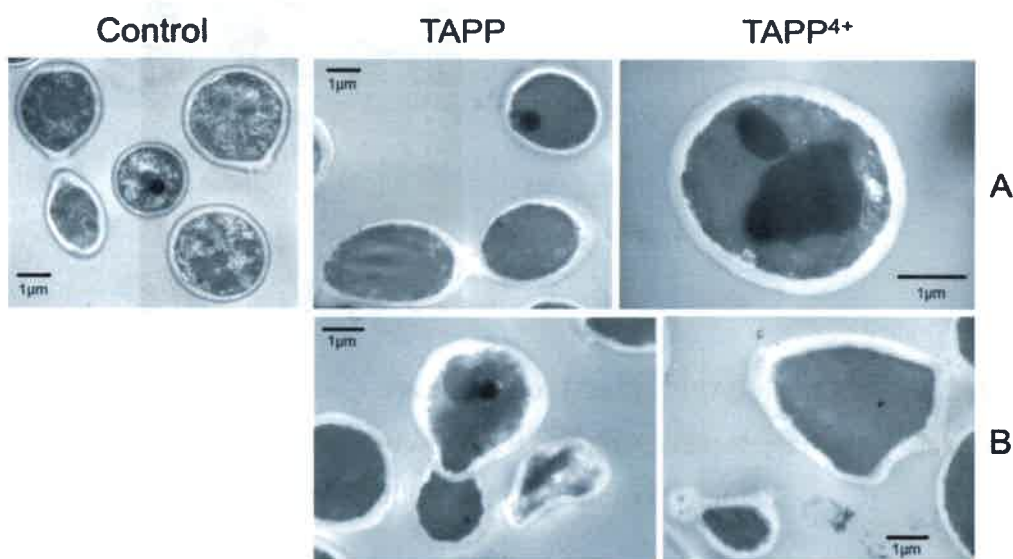


Figura 75. Suspensiones de *C. albicans* (10^7 UFC/mL) tratadas con $50 \mu\text{M}$ de fotosensibilizador en oscuridad (A) e irradiadas 30 min con luz visible (B)

7.2.8.3. Fotodaño sobre la envoltura celular

Para estudiar el daño sobre la pared celular mediante SEM se trabajó con cultivos celulares más concentrados ($\sim 10^7$ UFC/mL), facilitando el análisis microscópico. Estas muestras tratadas con 50 μ M de TAPP o TAPP⁴⁺ y 30 min de iluminación, mostraron una inactivación celular de $\sim 4,5$ log UFC/mL, similar a la obtenida para suspensiones de $\sim 10^6$ UFC/mL y 5 μ M de porfirina. La nueva dosis utilizada tampoco fue tóxica en condiciones de oscuridad. El análisis de la superficie de las células sometidas a IFD mostró que las mismas presentaban deformaciones como arrugas y ampollas (Figura 76 B), mientras que en los cultivos controles la pared celular no se alteró. Así, como se vio con TMPyP⁴⁺, estos nuevos agentes también producen un daño directo sobre la pared de las levaduras.

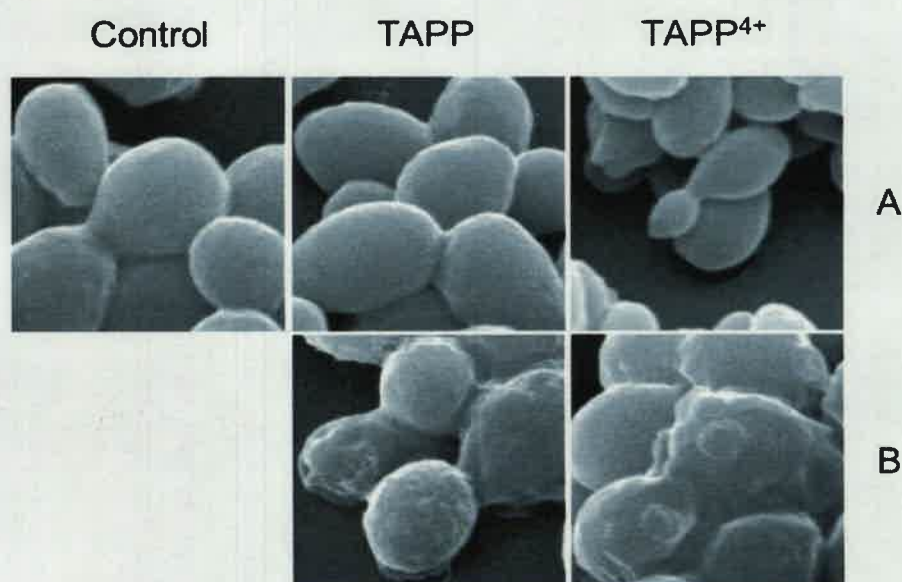


Figura 76. Suspensiones de *C. albicans* (10^7 UFC/mL) tratadas con 50 μ M de fotosensibilizador en oscuridad (A) e irradiadas 30 min con luz visible (B). Aumento 5000X

▼ 8. Conclusiones

8. CONCLUSIONES

En este trabajo fueron evaluados tres derivados de porfirina como fotosensibilizadores para inactivar *C. albicans*, tanto en suspensión como sobre una superficie. La Tabla 9 muestra un resumen de las propiedades y efectos inducidos por estas porfirinas en la IFD de *C. albicans*. Estos agentes presentan las características indispensables para ser utilizados en el tratamiento de IFD, como absorción de luz en la región visible del espectro y una producción de $^1\text{O}_2$ apropiada, la cual es esencial para una eficaz inactivación celular. También, poseen un rendimiento cuántico de fluorescencia adecuado, que permite estudiar el comportamiento de estos agentes en medio biológico, sin sacrificar su capacidad fotodinámica.

La porfirina TMPyP^{4+} , contiene cuatro grupos catiónicos en los nitrógenos piridínicos en la periferia del macrociclo. TAPP y TAPP^{4+} también poseen cuatro sustituyentes, que en el primer caso pueden cargarse positivamente a pH fisiológico, mientras que en TAPP^{4+} la carga es permanente. Sin embargo, a diferencia de TMPyP^{4+} , en estos dos agentes la carga está separada del sustituyente unido al macrociclo por una cadena alifática. Esta disposición le otorga mayor movilidad a los grupos cargados, permitiendo una mejor interacción con la superficie de los sustratos celulares.

La unión de cada sensibilizador a las células alcanzó valores apropiados para llevar a cabo el efecto fototóxico, y en los tres casos se obtuvieron valores similares para 15 y 30 min de incubación, indicando que estas porfirinas se unen rápidamente. Las diferencias estructurales entre los sensibilizadores, anteriormente mencionadas, se ven reflejadas en parte, al analizar la fuerza con que estos agentes se unen a las células de *C. albicans*. Cuando las suspensiones celulares fueron sometidas a diferentes etapas de lavado para eliminar el exceso de sensibilizador contenido en el sobrenadante, la concentración intracelular de TMPyP^{4+} disminuyó considerablemente después del primer lavado (~59%) y luego permaneció constante. Por lo que solo una fracción de esta porfirina se unió fuertemente. Mientras TAPP y TAPP^{4+} lograron unirse más eficientemente, ya que luego de la aplicación de los lavados no se observaron pérdidas significativas del sensibilizador.

En los estudios *in vitro* se logró una IFD efectiva de *C. albicans*. Para TMPyP^{4+} , suspensiones de 10^6 UFC/mL fueron inactivadas en ~5 log (99.999% de muerte celular) con una dosis de 5 μM de sensibilizador y de 30 min de irradiación. El mismo tratamiento con TAPP y TAPP^{4+} alcanza valores de inactivación de 4,33 y 4,81 log respectivamente. Aunque una eficiencia similar se obtuvo a tiempos de tratamientos de 15 min. Con las tres porfirinas se observó un incremento en el fotodaño celular al aumentar la concentración de

sensibilizador en un rango de 1-5 μM , el cual es mayormente acompañado por una alta concentración de porfirina en el interior de la célula. En todos los casos, la IFD disminuyó considerablemente al mismo tiempo que la densidad celular aumenta. El número de células a tratar es un factor del cual depende en gran medida la concentración de sensibilizador a utilizar, ya que a mayor número de células la cantidad de porfirina disponible es menor. De esta forma, la dosis se debe aumentar proporcionalmente con el tamaño del cultivo a erradicar. Aunque los tres agentes mostraron un desempeño similar, las aminoporfirinas TAPP y TAPP⁴⁺ fueron más efectivas a tiempos cortos de tratamiento.

En los estudios con TAPP y TAPP⁴⁺, cuando las suspensiones celulares son sometidas a una y dos etapas de lavado, antes del tratamiento con luz visible, la cantidad de porfirina unida inicialmente permaneció invariable. Por lo que, la eficiencia del tratamiento no disminuyó y es la misma que para los cultivos no lavados. A diferencia de TMPyP⁴⁺, donde la inactivación celular disminuyó después de los lavados debido a que se pierde parte de la porfirina unida débilmente a las células. La explicación de este fenómeno subyace, al igual que antes, en la estructura de estos agentes, específicamente en la posición de las cargas catiónicas con respecto al anillo tetrapirrólico. Las aminoporfirinas poseen estas cargas en el extremo de la cadena alifática de los sustituyentes, lo que les confiere movilidad a las mismas y permite que estos fotosensibilizadores interactúen mejor con las células, resultando en una unión más estrecha. También se observaron diferencias entre estos agentes al estudiar el efecto de la IFD sobre la curva de crecimiento de *C. albicans*. El efecto inhibitorio de TAPP y TAPP⁴⁺ fue significativamente mayor en comparación al efecto de retardo del crecimiento que se observó para TMPyP⁴⁺.

Tabla 9. Comparación de las propiedades y efectos inducidos por porfirinas utilizadas en la IFD de *C. albicans*

Porfirina	Φ_F	$\Phi_{\Delta}^1 \text{O}_2$	Incorporación celular nmoles/ 10^6 cel.	Pérdida en 1° lavado (%)	IFD [$5\mu\text{M}$] (log UFC/mL)		Mecanismo de acción	Reducción de vel. de crec.(%)	Daño morfológico	Acción sobre superficies
					15 min	30 min				
TMPyP ⁴⁺	0,011 (agua)	0,74 (agua)	1,71	59,00	3,24	5,00	tipo II	27	envoltura celular	efectiva
TAPP	0,15 (DMF)	0,53 (DMF)	1,00	6,50	4,13	4,80	tipo II	73	envoltura celular	efectiva
TAPP ⁴⁺	0,13 (DMF)	0,49 (DMF)	1,50	1,60	4,55	4,82	tipo II	85	envoltura celular	efectiva

Mediante el cultivo de las células de *C. albicans* en suero humano, estos organismos cambiaron de una forma de crecimiento levaduriforme a una de pseudohifa, forma más patógena de este organismo. El tratamiento fotodinámico con TMPyP⁴⁺ de estos filamentos en suero no tuvo efecto sobre la viabilidad celular debido a que, en presencia de los componentes del suero, el fotosensibilizador tuvo mayor afinidad hacia estos que con las células.

En lo que respecta al proceso oxidativo que ocurrió durante la inactivación de las levaduras, el efecto citotóxico inducido por las tres porfirinas estudiadas fue insignificante bajo condiciones anóxicas en comparación a una atmósfera aeróbica. La presencia de oxígeno fue esencial para la formación de especies oxidantes que participan en las reacciones fotoquímicas de tipo I y II. Para evaluar la fotoinactivación mediada por ¹O₂, la IFD se realizó en D₂O, donde las reacciones llevadas a cabo por esta especie oxidante se vieron favorecidas. Bajo esta condición, el efecto fotocitotóxico fue mayor en D₂O que en solución acuosa, para los tres fotosensibilizadores. A su vez la presencia de azida sódica produjo una fotoprotección casi completa de las células de *C. albicans* sensibilizadas por estos agentes. Esto sugiere que el ión azida causa una reducción del efecto fotodinámico por desactivación del ¹O₂. Además, con la presencia de manitol como inhibidor de las reacciones de tipo I la eficacia del tratamiento no se afectó significativamente. Esto demuestra que las reacciones fotoquímicas de tipo I no intervinieron significativamente en el mecanismo de acción, mientras que los de tipo II, a través del ¹O₂, tienen una participación preponderante en el proceso fotodinámico desencadenado por estas porfirinas.

En relación a estos últimos resultados, al determinar por luminiscencia el tiempo de vida del ¹O₂ producido por TMPyP⁴⁺ se observó que el τ de esta especie reactiva, luego del agregado de un pellet de células de *C. albicans*, disminuyó en relación al fotosensibilizador en solución homogénea de D₂O. Esto indica que la luminiscencia del ¹O₂ fue inhibida fuertemente por las biomoléculas del microambiente celular, donde la sensibilización tuvo lugar con la porfirina catiónica. De todas formas bajo estas condiciones, una fracción de porfirina aún permanece en el D₂O contribuyendo a fotosensibilizar ¹O₂ en el solvente. Por otro lado, después de una etapa de lavado donde solo permanecieron las moléculas de fotosensibilizador estrechamente unidas a las células, se obtuvo un tiempo de vida para ¹O₂ todavía más corto.

El fluconazol es un antifúngico ampliamente utilizado para el tratamiento de infecciones fúngicas. La CIM de este compuesto para *C. albicans* se redujo 4 veces por tratamiento combinado con IFD llevada a cabo con 1 μ M de TAPP o TAPP⁴⁺. De la misma forma, la curva de crecimiento de la levadura se retardó más en presencia de un efecto

combinado ejercido por la IFD y fluconazol. Por lo tanto, el tratamiento de *C. albicans* con fluconazol pudo ser complementado con TAPP o TAPP⁴⁺, mejorando el control sobre el crecimiento microbiano a dosis relativamente bajas.

Una de las aplicaciones de la IFD es la erradicación de microorganismos creciendo como un foco localizado de infección, así como el tratamiento de las superficies que deben permanecer asépticas. Teniendo en cuenta esto, se realizaron una serie de estudios para inactivar *C. albicans* creciendo en medio sólido. Bajo estas condiciones, células tratadas con TMPyP⁴⁺ en solución e irradiadas 30 min sobre AS fueron completamente erradicadas, luego no se detectó formación de colonias en estos medios de cultivo. El tratamiento también fue efectivo para las células sembradas sobre superficies de agar conteniendo áreas esparcidas con diferentes cantidades de sensibilizador TMPyP⁴⁺. Por lo tanto, esta porfirina podría ser usada para prevenir el crecimiento de levaduras sobre superficies que deben mantenerse estériles, tales como áreas de cirugía.

El crecimiento celular en colonias condujo a un incremento en la resistencia al tratamiento antifúngico de IFD, comparado con los cultivos creciendo en suspensión en medio líquido. La acción fotosensibilizante de los tres agentes se analizó en células de *C. albicans* creciendo en colonias inmovilizadas sobre superficies de AS. Los experimentos con colonias pequeñas mostraron que el crecimiento de las levaduras fue suprimido y que una erradicación completa de *C. albicans* fue posible usando 9 nmol de TMPyP⁴⁺ y ~5 nmoles de TAPP y TAPP⁴⁺, para 3 h de irradiación con luz visible. Además, la capacidad fotocitotóxica de TMPyP⁴⁺ permaneció alta para las colonias irradiadas con luz solar natural. En todos estos casos, las colonias no mostraron evidencia de crecimiento y no aparecieron células viables luego del tratamiento. Por lo tanto, los resultados indicaron que las células de *C. albicans* creciendo en colonias pueden ser eficientemente controladas por el tratamiento de IFD con estas porfirinas.

Analizando específicamente el daño intracelular que ocurrió durante el proceso, se estudió el ADN extraído de las levaduras sometidas a la IFD. Los resultados revelaron que el material genético no se dañó durante el tratamiento; a pesar de la gran afinidad entre esta biomolécula y TMPyP⁴⁺. Por lo que, el ADN celular, podría estar protegido por la membrana nuclear y la cantidad de sensibilizador en el núcleo no sería suficiente para provocar una fragmentación detectable. La unión entre el ADN y el fotosensibilizador resultó ser tan estrecha, que modificó la velocidad de migración durante el análisis electroforético de una muestra de ADN de timo bovino fotosensibilizada con TMPyP⁴⁺.

Mediante la microscopía de fluorescencia se estableció la localización intracelular de TMPyP⁴⁺ en *C. albicans*. Los estudios revelaron la presencia de la porfirina en las células debido a la emisión roja del sensibilizador. Además, luego de la aplicación de sondas fluorescentes específicas del núcleo y de las vacuolas se comprobó que TMPyP⁴⁺ también estaba presente en estas organelas. De forma similar, en la mayoría de las muestras analizadas, TAPP se distribuyó prácticamente por toda la célula. Mientras que, el análisis de las levaduras incubadas con TAPP⁴⁺, mostró una concentración mayor del agente en compartimientos subcelulares con respecto al citoplasma. La forma en que el agente se distribuyó en la célula es una característica importante, ya que debido al tiempo de vida relativamente corto y la baja difusión de las ROS generadas, los sitios más cercanos al sensibilizador tienen una mayor probabilidad de participar en el proceso fotodinámico.

Mediante TEM, se evaluó el daño analizando cambios en la morfología ultraestructural de la célula. Un daño directo en la envoltura celular se observó en las muestras tratadas con TMPyP⁴⁺, al igual que en las muestras irradiadas en presencia de las aminoporfirinas, donde fue evidente la alteración de la forma esférica de la levadura. La morfología de las células tratadas también se analizó por SEM. En estos estudios, nuevamente se observó que la IFD de *C. albicans*, produce alteraciones apreciables en la envoltura celular. Por lo tanto, esta estructura es un sitio blanco de la acción fotodinámica de los tres agentes estudiados.

En resumen, la presente investigación indicó que, la porfirina catiónica TMPyP⁴⁺ fue efectiva para ser aplicada en el tratamiento de *C. albicans* creciendo en suspensiones celulares o como focos localizados de infección, de la misma manera que los nuevos agentes TAPP y TAPP⁴⁺. El proceso de inactivación de los tres agentes fue llevado a cabo, principalmente, por la producción de ¹O₂. El agente TAPP, puede cargarse a pH fisiológico, por lo que su actividad fotosensibilizante resultó semejante a TAPP⁴⁺. En estos dos sensibilizadores, la posición de las cargas sobre las cadenas alifáticas les confiere movilidad y permitió una mejor interacción con el microorganismo. Además, la IFD con estas aminoporfirinas puede contribuir a mejorar las terapias actuales con antifúngicos.

▼ 9. Glosario de abreviaturas

9. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
AS	agar Sabouraud
BrEt	bromuro de etidio
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CMAC	Cell Tracker Blue (7-amino-4-clorometilcumarina)
CS	caldo Sabouraud
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
EDTA	ácido etilendiamintetraacético
Fase <i>Lag</i>	fase de latencia
Ho	Hoescht 33258
IFD	inactivación fotodinámica
ON	del inglés overnight, toda la noche
p.b	unidad de pares de bases enfrentadas en el ADN doble cadena
PBS	del inglés, Phosphate Buffer Saline, solución amortiguadora de fosfato salino, pH=7,0
ROS	especies reactivas del oxígeno
SDS	dodecilsulfato de sodio
SEM	microscopía electrónica de barrido
TAPP	5,10,15,20-tetrakis[4-(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina
TAPP ⁴⁺	5,10,15,20-tetrakis[4-(3- <i>N,N,N</i> -trimetilaminopropoxi)fenil]porfirina

TBE	solución amortiguadora Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 2 mM, pH= 8,0
TE	solución amortiguadora pH= 8, Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM
TEM	microscopía electrónica de transmisión
TFAP ³⁺	5-(4-trifluorfenil)-10,15,20-tris(4- <i>N,N,N</i> -trimetilamoniumfenil)porfirina
TFD	terapia fotodinámica
TMAP ⁴⁺	5,10,15,20-tetra (4- <i>N,N,N</i> -trimetilamoniumfenil)porfirina
TMPyP ⁴⁺	5,10,15,20-tetrakis(N-metil-4-piridil)porfirina
UFC	unidades formadoras de colonias
VIH	virus de inmunodeficiencia humana

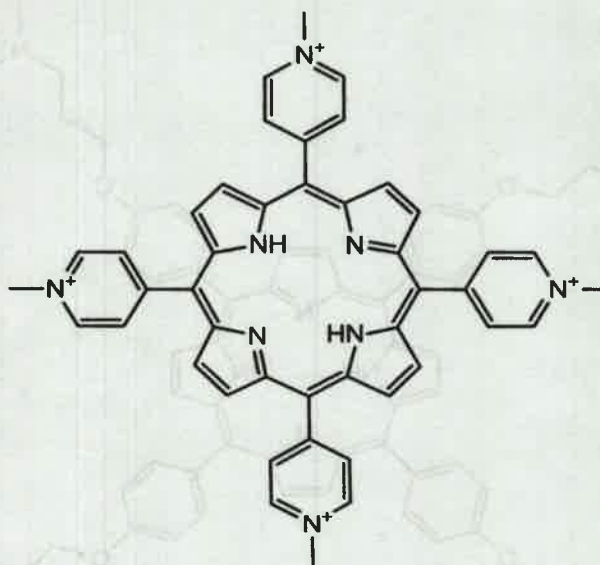
▼ 10. Glosario de símbolos

10. GLOSARIO DE SÍMBOLOS

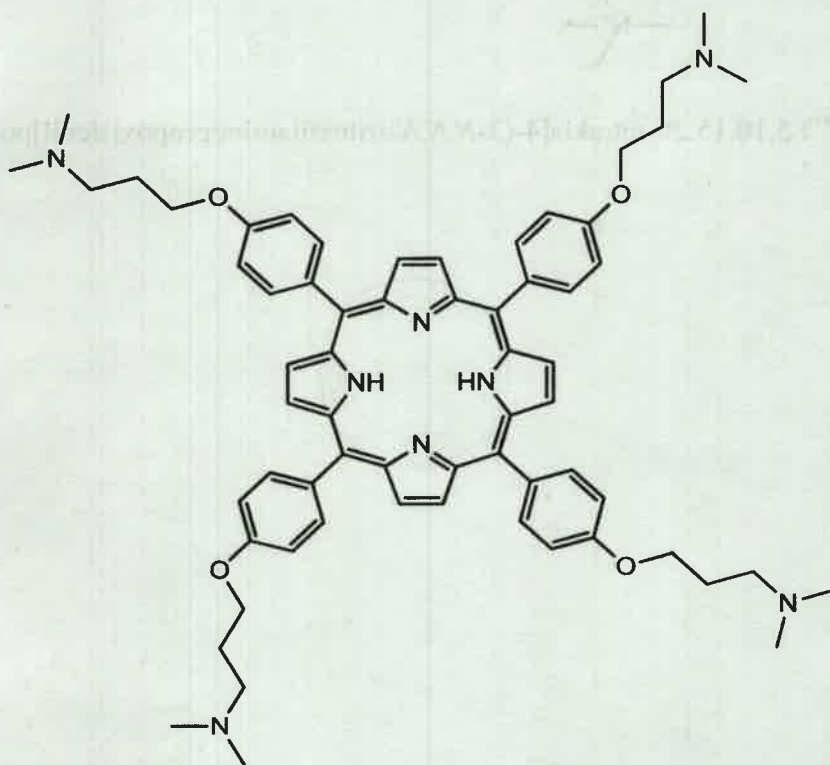
ϵ	absortividad molar
A	absorbancia
PC31	cepa de <i>Candida albicans</i>
k_{obs}	constante de velocidad observada
λ	longitud de onda
λ_{em}	longitud de onda de emisión de fluorescencia
λ_{exc}	longitud de onda de excitación de fluorescencia
λ_{abs}	longitud de onda de absorción
λ_{max}	longitud de onda de un máximo de absorción o emisión
$^1\text{O}_2$	oxígeno molecular singlete
$^3\text{O}_2$	oxígeno molecular triplete
Φ_{F}	rendimiento cuántico de fluorescencia
Φ_{Δ}	rendimiento cuántico de formación de oxígeno molecular singlete
$^0\text{Sens}$	sensibilizador en estado basal
$^1\text{Sens}^*$	sensibilizador en estado excitado singlete
$^3\text{Sens}^*$	sensibilizador en estado excitado triplete
τ	tiempo de vida

▼ 11. Glosario de fotosensibilizadores

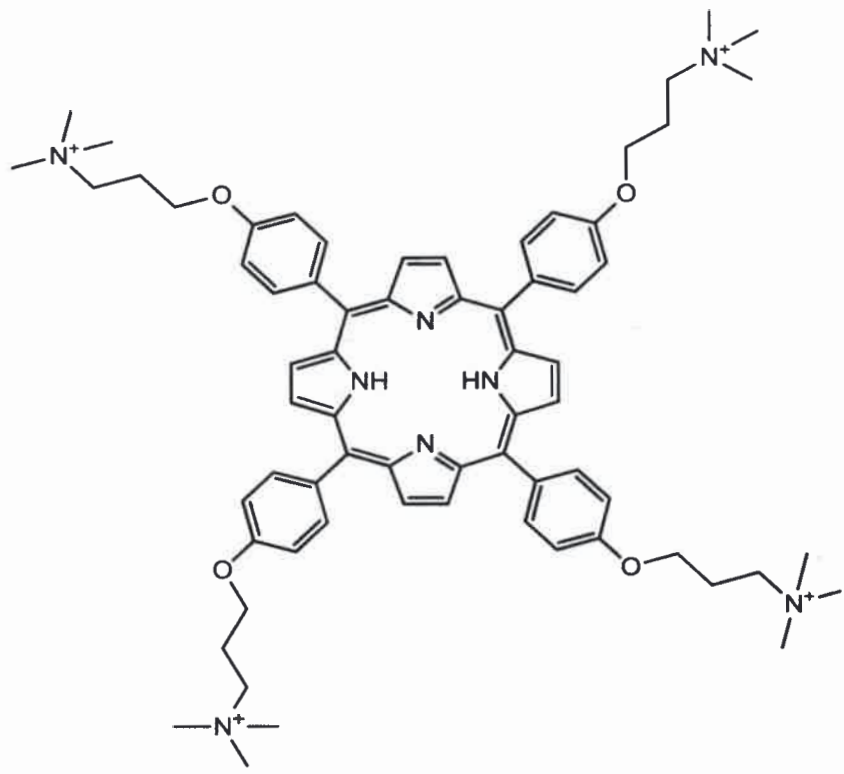
11. GLOSARIO DE FOTOSENSIBILIZADORES



TMPyP⁴⁺: 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metil-4-piridil)porfirina



TAPP: 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil] porfirina



TAPP⁴⁺: 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N,N*-trimetilaminopropoxi)fenil]porfirina



▼ 12. Referencias

12. REFERENCIAS

1. Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. Brock. Biology of microorganisms. Pearson Education, New Jersey, 2003.
2. Chaffin, W.L.; López-Ribot, J.L.; Casanova, M.; Gozalbo, D.; Martínez, J.P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62: 130-180.
3. Nimrichter, L.; Rodrigues, M.L.; Rodrigues, E.G.; Travassos, L.R. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. Microbes Infect, 2005, 7: 789-798.
4. Pontón, J.; Omaetxebarria, M.J.; Elguezabal, N.; Alvarez, M.; Moragues, M.D. Immunoreactivity of the fungal cell wall. Med Mycol, 2001, 39: 101-110.
5. Heitman, J. Cell biology. A fungal Achilles' heel. Science, 2005, 309: 2175-2176.
6. Pontón, J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Rev Iberoam Micol, 2008, 25: 78-82.
7. Webb, B.C.; Thomas, C.J.; Willcox, M.D.P.; Harry, D.W.S.; Knox, K.W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. Aust Dent J, 1998, 43: 45-50.
8. Solís Cuesta, F.; Linares Sicilia, M.J.; Casal Román, M.; Moreno Giménez, J.C. Clasificación de las infecciones fúngicas. Características microbiológicas de interés clínico. Estudio de resistencia. Infecciones fúngicas superficiales. Medicine, 2006, 57: 3683-3692.
9. <http://www.uniprot.org/taxonomy/5476>.
10. Hay, R.J. Systemic candidiasis in heroin addicts. Brit Med J, 1986, 292: 1096.
11. Samson, J. Candidiosis buccales: Epidémiologie, diagnostic et traitement. Rev Mens Suisse Odontostomatol, 1990, 100: 548-559.
12. Volk, W.A.; Benjamin, D.C.; Kadner, R.J.; Parsons, J.T. Microbiología Médica. Interamericana Mc Graw-Hill, 1989, 3ra Edición, pp. 533-560.
13. Osumi, M. The Ultrastructure of Yeast: Cell Wall Structure and Formation. Micron. 1998, 29: 207-233.
14. Odds, F.C. Pathogenesis of *Candida* infections. J Am Acad Dermatol, 1994, 31: S2-S5.
15. Mackenzie, D.W.R. Serum tube identification of *Candida albicans*. J Clin Pathol, 1962, 15: 563-565.

16. Shepherd, M.G. Fungi and parasites in the oral cavity. En Slots, J.; Taubman, M.A. Contemporary oral microbiology and immunology. St. Louis - U.S.A. Mosby -Year Book, Inc. 1992, 1: 373-376.
17. Odds, F.C. *Candida* and Candidosis. Balliere Tindall, London, 1988.
18. Sudbery, P.; Gow, N.; Berman, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004, 12: 317-324.
19. Ghannoum, M.A.; Burns, G.R.; Abu Elteen, K. Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida spp.* to human buccal epithelial cells. Infect Immun. 1986, 54: 189-193.
20. Pierce, A.M.; Pierce, H.D.; Unrau, A.M.; Oehlschlager, A.C. Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans*. Can J Biochem. 1978, 56: 135-142
21. Calderone, R.; Braun, P. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiol Rev. 1991, 55: 1-20.
22. Arnold, W.N. Localization of acid phosphatase and b-fructo-furanidase within yeast envelopes. J Bacteriol. 1972, 112: 1346-1352.
23. Pugh, D. Cawson, R.A. The surface layer of *Candida albicans*. Microbios. 1979, 23: 19-23.
24. Ram, S.P.; Romana, L.K.; Shepherd, M.G.; Sullivan, P.A. Exo (1-3)-b-glucanase, autolysin and trehalase activities during yeast growth and germ-tube formation in *Candida albicans*. J Gen Microbiol. 1984, 130: 1227-1236.
25. Molina, M.; Cenamor, R.; Nombela, C. Exo-1,3-glucanase activity in *Candida albicans*: effect of the yeast to mycelium transformation. J Gen Microbiol. 1987, 133: 609-617.
26. Reiss, E.; Stone, S.H.; Hasenclever, H.F. Serological and cellular immune activity of peptidoglucomannan fractions on *Candida albicans* cells walls. Infect Immun. 1974, 9: 881-890.
27. Cassone, A.; Simonetti, N.; Strippoli, V. Ultrastructural changes in the cell wall during germ tube formation from blastospores of *Candida albicans*. J Gen Microbiol. 1973, 77: 417-426.
28. Howlett, J.A.; Squier, C.A. *Candida albicans* ultrastructure: colonization and invasion of oral epithelium. Infect Immun. 1980, 29: 252-260.
29. Notario, V. b-Glucanases from *Candida albicans*: purification, characterization and the nature of their attachment to cell wall components. J Gen Microbiol. 1982, 128: 747-759.

30. Hilenski, L.; Naider, F.; Becker, J.M. Polyoxin D inhibits colloidal gold wheat germ agglutinin labelling of chitin in dimorphic forms of *Candida albicans*. J Gen Microbiol. 1986, 132: 1441-1451.
31. Chattaway, F.W.; Holmes, M.R.; Barlow, A.J. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. J Gen Microbiol. 1968, 51: 367-376.
32. Reiss, E.; Derepentigny, L.; Kuykendall, R.J.; Carter, A.W.; Galindo, R.; Auger, P.; Bragg, S.L.; Kaufman, L. Monoclonal antibodies against *Candida tropicalis* mannan: antigen detection by enzyme immunoassay and immunofluorescence. J Clin Microbiol. 1986, 24: 796-802.
33. Hanseclever, H.F.; Mitchell, W. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. J Bacteriol. 1961, 82: 570-573.
34. Preusser, H.; Roster, H. Freeze-fracture studies of the plasmalemma of *Candida albicans* after treatment with econazole-nitrate. Sabouraudia. 1979, 17: 389-398.
35. Pesti, M.; Novak, E.K.; Ferenczy, L.; Svoboda, A. Freeze fracture electron microscopical investigation of *Candida albicans* cells sensitive and resistant to nystatin. Sabouraudia. 1981, 19: 17-26.
36. Abdi, M.; Drucker, D.B. Phospholipid profiles in the oral yeast *Candida*. Arch Oral Biol. 1996, 41: 517-522.
37. Marriott, M.S. Isolation and chemical characterization of plasma membranes from the yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. J Gen Microbiol. 1975, 86: 115-132.
38. Hubbard, M.J.; Surait, R.; Sullivan, P.A.; Shepherd, M.G. The isolation of plasma membrane and characterization of the plasma membrane ATPase from the yeast *Candida albicans*. Eur J Biochem. 1986, 154: 375-381.
39. Rajasingham, K.C.; Cawson, R.A. Septal ultrastructure in *Candida albicans*. Acta Microbiol Pol. 1978, 27: 389-391.
40. Lamagni, T.L.; Evans, B.G.; Shigematsu, M.; Johnson, E. M. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-9). Epidemiol Infect. 2001, 126: 397-414.
41. Samaranayake, L.P.; Keung Leung, W.; Jin, L. Oral mucosal fungal infections. Periodontol. 2000. 2009, 49: 39-59.
42. ten Cate, J. M.; Klis, F.M.; Pereira-Cenci, T.; Crielaard, W.; de Groot, P.W.J. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. J Dent Res. 2009, 88: 105-115.

43. Koga-Ito, C.Y.; Lyon, J.P.; Vidotto, V.; de Resende, M.A. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathol.* 2006, 161: 219-223.
44. Nolte, W. *Microbiología Odontológica*. México. Ed. Interamericana. 1986, 4 ed, pp: 549-590.
45. Williams, D.W.; Lewis, M.A.O. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Diseases.* 2000, 6: 3-11.
46. Sykes, L.M.; Coogan, M.M. Yeast counts as a measure of host resistance in dental patients. *J of the D A S A.* 1997, 52: 19-23.
47. Shepherd, M.G. The pathogenesis and host defence mechanisms of oral candidosis. *NZ Dent J.* 1986, 82: 78-82.
48. Webb, B.C.; Thomas, C.J.; Willcox, M.D.P.; Harry, D.W.S.; Knox, K.W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Aust Dent J.* 1998, 43: 160-166.
49. Marsh, P.; Martin, M. *Oral Microbiology*. London, Great Britain. Chapman & Hall. Third Edition. 1992, 212-226.
50. Rossie, K.; Guggenheimer, J. Oral candidiasis: clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1997, 9 (6): 635-641.
51. Mata, M. *Candida albicans* saprófito y patógeno de la cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana.* 1973, 40 (2-3): 663-680.
52. Fidel, P.L. *Candida*-host interactions in HIV-disease: relationships in oropharyngeal candidiasis. *Adv Dent Res.* 2006, 19: 80-84.
53. Bliss, J.M.; Bigelow, C.E.; Foster, T.H.; Haidaris C.G. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48: 2000-2006.
54. Munin, E.; Giroldo, L.G.; Alves, L.P.; Costa, M.S. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2007, 88: 16-20.
55. Cannon, R.D.; Lamping, E.; Holmes, A.R.; Niimi, K.; Baret, P.V.; Keniya, M.V.; Tanabe, K.; Niimi, M.; Goffeau, A.; Monk B.C. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2009, 22: 291-321.
56. Lizasoain, M.; Diaz-Pedroche, C.; Lumbreras, C. Aportación de los azoles de segunda generación en las infecciones por *Candida* spp. *Rev Esp Quimioterap.* 2004, 17: 105-108.

57. Shrimali, G. P.; Bhatt, J. K.; Rajat, R.; Parmar, R. V.; Nayak, S.; Chandralekha, D. Isolation of *aspergillus* species from sputum samples: a study conducted in a tertiary care hospital, Ahmedabad. *Natl J Med Res.* 2013, 3: 289-291.
58. Abu-Elteen, K. H.; Hamad, M. A. Changing epidemiology of classical and emerging human fungal infections: a review. *Jor J Biol Sci.* 2012, 5: 215-230.
59. Sábada, B.; García-Quetglas, E.; Azanza, J.R. Relación entre estructura y función de los azoles. *Rev Esp Quimioterap.* 2004, 17: 71-78.
60. Noël, T. The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. *J Mycol Med.* 2012, 22: 173-178.
61. Urlacher, V.B.; Eiben, S. Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* 2006, 24: 324-330.
62. Podust, L.M.; Poulos, T.L.; Waterman, M.R. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001, 98: 3068-3073.
63. Gray, K.C.; Palacios, D.S.; Dailey, I.; Endo, M.M.; Uno, B.E.; Wilcock, B.C.; Burke, M. D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012, 109: 2234-2239.
64. Kelly, S. L.; Lamb, D. C.; Corran, A. J.; Baldwin, B. C.; Kelly, D. E. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 β , 6 α -diol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995, 207: 910-915.
65. White, T.C.; Marr, K.A.; Bowden, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998, 11: 382-402.
66. Morschhäuser, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1587: 240-248.
67. Goldman, G.H.; da Silva Ferreira, M.E.; dos Reis Marques, E.; Savoldi, M.; Perlin, D.; Park, S.; Godoy Martinez, P.C.; Goldman, M.H.S.; Colombo, A.L. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Micr Infec Dis.* 2004, 50: 25-32.
68. Brion, L.P.; Uko, S.E.; Goldman, D.L. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: Systematic review. *J Infection.* 2007, 54: 521-529.
69. Ribeiro, M.A.; Rodrigues, C.P. Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated *in vitro*: is there any clinical implication?. *Diagn Micr Infec Di.* 2007, 57: 71-75.

70. Allevato, M.A. Terapia fotodinámica. *Act Terap Dermatol.* 2006, 29: 302-311.
71. Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001, 74: 656-669.
72. Bonnett, R. Chemical aspects of photodynamic therapy. Amsterdam, Gordon and Breach Science Publishers. 2000.
73. Rebeiz, C.A.; Montazer-Zouhoor, A.; Hopen, H.J.; Wu, S.M. Photodynamic herbicides: 1. concept and phenomenology. *Enzyme Microb Tech.* 1984, 6: 390-396.
74. Nandihalli, U.B.; Rebeiz, C.A. Photodynamic herbicides. 9. Structure activity study of substituted 1,10-phenanthrolines as potent photodynamic herbicide modulators. *Pestic Biochem Phys.* 1991, 40: 27-46.
75. Rebeiz, C.A.; Gut, L.J.; Lee, K.; Juvik, J.A.; Rebeiz, C.C.; Bouton, C.E. Photodynamics of porphyric insecticides. *Crit Rev Plant Sci.* 1995, 14: 329-366.
76. Ben Amor, T.; Jori, G. Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. *Insect Biochem Mol Biol.* 2000, 30: 915-925.
77. Wainwright, M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci.* 2004, 5: 406-411.
78. Wainwright, M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *Int. J Antimicrob Agents.* 2003, 21: 510-520.
79. Wainwright, M.; Crossley, K.B. Photosensitising agents-circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int Biodeter Biodegrad.* 2004, 53: 119-126.
80. DeRosa, M.C.; Crutchley, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev.* 2002, 233-234: 351-371.
81. Jori, G.; Brown, S.B. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci.* 2004, 5: 403-405.
82. Halliwell, B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med.* 2009, 46: 531-542.
83. Kessel, D. Photodynamic therapy. *Sci Med.* 1998, 5: 46-55.
84. Hultén, L.M.; Holmström, M.; Soussi, B. Harmful singlet oxygen can be helpful. *Free Radic Biol Med.* 1999, 27:1203-1207.
85. Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998, 42: 13-28.
86. MacDonald, I.J.; Dougherty, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. *J Porphyrins Phthalocyanines.* 2001, 5: 105-129.
87. Wainwright, M. Photosensitizers in Biomedicine. Wiley, Oxford, 2009.
88. Tardivo, J.P.; Del Giglio, A.; Paschoal, L.H.; Baptista, M.S. New photodynamic therapy protocol to treat AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Photomed Laser Surg.* 2006, 24: 528-531.

89. Kormeili T; Yamauchi P.; Lowe, N. Topical Photodynamic Therapy in clinical dermatology. *Br J Dermatol.* 2004, 150: 1061-1069.
90. Dougherty, T. J. Photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1993, 58: 895-900.
91. McCaughan, J. S. Jr. Photodynamic therapy. A review. *Drugs & Aging.* 1999, 15: 49-68.
92. Jochan, D. Clinical experiences and expectations, Chap. 3.8. In: Moser, J. G., Ed, *Photodynamic tumor therapy, 2nd and 3rd generation photosensitizers.* Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 1998, pp 213-226.
93. Kübler, A.C. Photodynamic therapy. *Med Laser Appl.* 2005, 20: 37-45.
94. Morton, C.A.; Brown, S.B.; Collins, S.; Ibbotson, S.; Jenkinson, H.; Kurwa, H.; Langmack, K.; Mckenna, K.; Moseley, H.; Pearse, A.D.; Stringer, M.; Taylor, D.K.; Wong, G.; Rhodes, L.E. Guidelines for topical photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2002, 146: 552-567.
95. Konan, Y.N.; Gurny, R.; Allemann, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2002, 66: 89-106.
96. Isaacs, N. S. *Physical organic chemistry,* Longman Scientific and Technical, Essex UK, 1992.
97. Kalyanasundaram, K. *Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes,* Academic Press, London UK, 1992.
98. Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1998, 90: 889-905.
99. Oschner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1997, 39: 1-18.
100. Foote, C. S. Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science.* 1968, 162: 963-970.
101. Castano, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy. Part 1. Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2004, 1: 279-293.
102. Mroza, P.; Pawlacz, A.; Sattia, M.; Lee, H.; Whartone, T.; Galie, H.; Sarnac, T.; Hamblin, M.R. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: type I versus type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med.* 2007, 43: 711-719.
103. Aveline, B.M.; Redmond, R.W. Can cellular phototoxicity be accurately predicted on the basis of sensitizer photophysics?. *Photochem Photobiol.* 1999, 69: 306-316.
104. Pogue, B.W.; Ortel, B.; Chen, N.; Redmond, R.W.; Hasan, T.A. photobiological and photophysical-based study of phototoxicity of two chlorins. *Cancer Res.* 2001, 61: 717-724.

105. Engelmann, F. M.; Mayer, I.; Gabrielli, D.S.; Toma, H.E.; Kowaltowski, A.J.; Araki, K.; Baptista, M.S. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *J Bioenerg Biomembranes*. 2007, 39: 175-185.
106. Maisch, T.; Szeimies, R. M.; Lehn, N.; Abels, C. Antibacterial photodynamic therapy. A new treatment for superficial bacterial infections?. *Hautarzt*. 2005, 56: 1048-1055.
107. Ogilby, P.R. Singlet oxygen: there is still something new under the sun, and it is better than ever. *Photochem Photobiol Sci*. 2010, 9: 1543-1560.
108. Tanielian, C.; Mechin, R.; Seghrouchni, R.; Schweitzer, C. Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen. *Photochem Photobiol*. 2000, 71: 12-19.
109. Ergaieg, K.; Chevanne, M.; Cillard, J.; Seux, R. 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*. 2008, 82: 1107-1117.
110. Henderson, B.W.; Dougherty, T.J. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*. 1992, 55: 145-157.
111. Ragàs, X.; Agut, M.; Nonell, S. Singlet oxygen in *Escherichia coli*: New insights for antimicrobial photodynamic therapy. *Free Radical Biology & Medicine*. 2010, 49: 770-776.
112. Jori, G.; Schindl, L.; Schindl, A.; Polo, L. Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized process *in vivo*. *J Photochem Photobiol, A*. 1996, 102: 101-107.
113. Villanueva, A.; Vidania, R.; Stockert, J.C.; Cañete, M.; Juarrans, A. Photodynamic effects on cultured tumor cells. Cytoskeleton alterations and cell death mechanisms, Chap. 3. In: H. S. Nalwa Ed, *Handbook of Photochemistry and Photobiology*. American Scientific Publishers, Valencia. 2002, 4: 79-117.
114. Penning, L.C.; Dubbelman, T.M. Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anti-Cancer Drugs*. 1994, 5: 139-146.
115. Goldman M. Terapia fotodinámica. Serie Dermatología Estética, Jeffrey Dover ed., 2006.
116. Grossweiner, L.I. The science of phototherapy, Chap. 8. In: *Photodynamic therapy*. London, CRC Press. 1994, pp 139-155.
117. Ali, H.; van Lier, J.E. Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem. Rev*. 1999, 99: 2379-2450.
118. Rex, J.H.; Rinaldi, M.G.; Pfaller, M.A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995, 39: 1-8.

119. Ito, T. Photodynamic action of hematoporphyrin on yeast cells—a kinetic approach. *Photochem Photobiol.* 1981, 34: 521-524.
120. Paardekooper, M.P.; Van den Broek, J.; De Bruijne, A.W.; Elferink, J.C.; Dubbelman, T.M.; Van Steveninck, J. Photodynamic treatment of yeast cells with the dye toluidine blue: all-or-none loss of plasma membrane barrier properties. *Biochim Biophys Acta.* 1992, 1108: 86-90.
121. Strakhovskaya, M.G.; Shumarina, A.O.; Fraikin, G.Y.; Rubin, A.B. Endogenous porphyrin accumulation and photosensitization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of 2,2'-dipyridyl. *J Photochem Photobiol.* 1999, 49:18-22.
122. Zoladek, T.; Nguyen, B.N.; Jagiello, I.; Graczyk, A.; Rytka, J. Diamino acid derivatives of porphyrins penetrate into yeast cells, induce photodamage, but have no mutagenic effect. *Photochem Photobiol* 1997, 66: 253-259.
123. Friedberg, J.S.; Skema, C.; Baum, E.D.; Burdick, J.; Vinogradov, S.A.; Wilson, D.F.; Horan, A.D.; Nachamkin, I. *In vitro* effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother.* 2001. 48: 105-107.
124. Smijs, T.G.M.; Schuitmaker, H.J. Photodynamic inactivation of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Photochem Photobiol.* 2003, 77: 556-560.
125. Smijs, G.M; Bouwstra, J.A.; Schuitmaker, H.J.; Talebi, M.; Pavel, S. A novel *ex vivo* skin model to study the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment in different growth phases. *J Antimicrob Chemother.* 2007, 59: 433-440.
126. Strakhovskaya, M.G.; Zhukhovitskii, V.G.; Mironov, A.F.; Seregin, A.M.; Stranadko, E.F.; Rubin, A.V. Fungicidal activity of khlorin photosensitizers. *Dokl Biochem Biophys.* 2002, 384: 155-158.
127. Pereira Gonzales, F.; Maisch, T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol.* 2012, 116: 1-10.
128. Fridkin, S.K.; Jarvis, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996, 9: 499-511.
129. Garber, G. An overview of fungal infections. *Drugs.* 2001, 61(Suppl. 1): 1-12.
130. Morschhäuser, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1587: 240-248.
131. Dunkel, N.; Blaß, J.; Rogers, P. D.; Morschhäuser, J. Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1

- overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol.* 2008, 69: 827-840.
132. Wilson, M.; Yianni, C. Killing of methicilin-resitant *Staphylococcus aureus* by low-power laser light. *J Med Microbiol.* 1995, 42: 62-66.
133. Detty, M.R.; Gibson, S.L.; Wagner, S.J. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *J Med Chem.* 2004, 47: 3897-3915.
134. Allison, R.R.; Sibata, C.H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010, 7: 61-75.
135. Zeina, B.; Greenman, J.; Purcell, W.M.; Das, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy, *Br J Dermatol.* 2001, 144: 274-278.
136. Bertoloni, G.; Rossi, F.; Valduga, G.; Jori, G.; Ali, H.; van Lier, J.E. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios.* 1992, 71: 33-46.
137. Osumi, M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron.* 1998, 29: 207-233.
138. Lambrechts, S.A.G.; Aalders, M.C.G.; Van Marle, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005, 49: 2026-2034.
139. Lambrechts, S.A.G.; Aalders, M.C.G.; Verbraak, F.D.; Lagerberg, J.W.M.; Dankert, J.B.; Schuitmaker, J.J.; Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2005, 79: 51-57.
140. Cormick, M.P.; Alvarez, M.G.; Rovera, M.; Durantini, E.N. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eur J Med Chem.* 2009, 44: 1592-1599.
141. Calzavara-Pinton, P.G.; Venturini, M.; Sala R.A. Comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J Photochem Photobiol B.* 2005, 78: 1-6
142. Demidova, T.N.; Gad, F.; Zahra, T.; Francis, K.P.; Hamblin, M.R. Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 2005, 81: 15-25.
143. Hamblin, M.R.; Zahra, T.; Contag C,H.; McManus, A.T.; Hasan, T. Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections *in vivo*. *J Infect Dis.* 2003, 187: 1717-1725.

144. Komerik, N.; Wilson, M.; Poole, S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol.* 2000, 72: 676-680.
145. Omar, G.S.; Wilson, M.; Nair, S.P. Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light. *BMC Microbiol.* 2008, 8: 111.
146. Dai, T.; Tegos, G.P.; Zhiyentayev, T.; Mylonakis, E.; Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasión model. *Lasers Surg Med.* 2010, 42: 38-44.
147. Dai, T.; Huang, Y.Y.; Hamblin, M.R. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009, 6: 170-188.
148. Bonnett, R.; Smith, K.M. General features of the structure and chemistry of porphyrin compounds, in *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Elsevier, Amsterdam. 1975, 1: 20-27.
149. Pineiro, M.; Carvalho, A.L.; Pereira, M.M.; Rocha Gonsalves, A.M.d'A.; Arnaut, L.G.; Formosinho, S.J. Photoacoustic measurements of porphyrin triplet-state quantum yields and singlet-oxygen efficiencies. *Chem. Eur. J.* 1998, 4: 2299-2307.
150. Milanesio, M.E.; Alvarez, M.G.; Durantini, E.N. Methoxyphenyl porphyrin derivatives as phototherapeutic agents. *Curr Bioact Compd.* 2010, 6: 97-105.
151. Johnson, E.M.; Warnock, D.W.; Luker, J.; Porter, S. R.; Scully, C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 1995, 35: 103-114.
152. Bertoloni, G.; Sacchetto, R.; Jori, G.; Vernon, D.J.; Brown, S.B. Protoporphyrin photosensitization of *Enterococcus hirae* and *Candida albicans* cells. *The Life Sci.* 1993, 5: 267-275.
153. Bertoloni, G.; Zambotto, F.; Conventi, L.; Reddi, E.; Jori, G. Role of specific cellular targets in the hematoporphyrin- sensitized photoinactivation of microbial cells. *Photochem Photobiol.* 1987, 46: 695-698.
154. Carré, V.; Gaud, O.; Sylvain, I.; Bourdon, O.; Spiro, M.; Blais, J.; Granet, R.; Krausz, P.; Guilloton, M. Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photo-induced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Photochem Photobiol B.* 1999, 48: 57-62.
155. Hamblin, M.R.; O'Donnell, D.A.; Murthy, N.; Contag, C.H.; Hasan, T. Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging. *Photochem Photobiol.* 2002, 75: 51-57.

156. Reddi, E.; Ceccon, M.; Valduga, G.; Jori, G.; Bommer, J.C.; Elisei, F.; Latterini, L.; Mazzucato, U. Photophysical properties and antibacterial activity of *meso*-substituted cationic porphyrins. *Photochem Photobiol.* 2002, 75: 462-470.
157. Sol, V.; Branland, P.; Chaleix, V.; Granet, R.; Guilloton, M.; Lamarche, F.; Verneuil, B.; Krausz, P. Amino porphyrins as photoinhibitors of gram-positive and -negative bacteria. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004, 14: 4207-4211.
158. Lazzeri, D.; Rovera, M.; Pascual, L.; Durantini, E.N. Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using *meso*-substituted cationic porphyrinderivatives with asymmetric charge distribution. *Photochem Photobiol.* 2004, 80: 286-293.
159. Trannoy, L.L.; Terpstra, F.G.; de Korte, D.; Lagerberg, J.W.M.; Verhoeven, A.J.; Brand, A.; van Engelenburg, F.A.C. Differential sensitivities of pathogens in red cell concentrates to tri-P(4)-photoinactivation. *Vox Sang.* 2006, 91: 111-118.
160. Zupan, K.; Egyeki, M.; Toth, K.; Fekete, A.; Herenyi, L.; Modos, K.; Csik, G. Comparison of the efficiency and the specificity of DNA-bound and free cationic porphyrin in photodynamic virus inactivation. *J Photochem Photobiol B.* 2008, 90: 105-112.
161. Casteel, M.J.; Jayaraj, K.; Gold, A.; Ball, L.M.; Sobsey, M.D. Photoinactivation of hepatitis A virus by synthetic porphyrins. *Photochem Photobiol.* 2004, 80: 294-300.
162. Rovaldi, C.R.; Pievsky, A.; Sole, N.A.; Friden, P.M.; Rothstein, D.M.; Spacciapoli, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000, 44: 3364-3367.
163. Soukos, N.S.; Ximenez-Fyvie, L.A.; Hamblin, M.R.; Socransky, S.S.; Hasan, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998, 42: 2595-2601.
164. Amor, T.B.; Bortolotto, L.; Jori, G. Porphyrins and related compounds as photoactivatable insecticides. 2. Phototoxic activity of *meso*-substituted porphyrins. *Photochem Photobiol.* 1998, 68: 314-318.
165. Bristow, C.A.; Hudson, R.; Paget, T.A.; Boyle, R.W. Potential of cationicporphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. *Photodiag Photodyn Ther.* 2006, 3: 162-167.
166. Kassab, K.; Amor, T.B.; Jori, G.; Coppellotti, O. Photosensitization of *Colpodainflata* cysts by *meso*-substituted cationic porphyrins. *Photochem Photobiol Sci.* 2002, 1: 560-564.
167. Kornguth, S.E.; Kalianke, T.; Robins, H.I.; Cohen, J.D.; Turski, P. Preferential binding of radiolabeled poly-L-lysine to C6 and U87 MG glioblastomas compared to endothelial cells *in vitro*. *Cancer Res.* 1989, 49: 6390-6395.

168. Kessel, D. Correlation between subcellular localization and photodynamic efficacy. *J Porphyr Phthalocya.* 2004, 8: 1009-1014.
169. Kessel, D.; Woodburn, K.; Henderson, B.W.; Chang, C.K. Sites of photodamage *in vivo* and *in vitro* by a cationic porphyrin. *Photochem Photobiol.* 1995, 62: 875-881.
170. Kessel, D.; Luo, Y.; Deng, Y.; Chang, C.K. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1997, 65: 422-426.
171. Kessel, D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 2002, 1: 837-840.
172. Salet, C.; Moreno, G. New trends in photobiology. Photosensitization of mitochondria. molecular and cellular aspects. *J Photochem Photobiol B.* 1990, 5: 133-150.
173. Kessel, D. Sites of photodamage by the iminium salt of a copper octaethylbenzochlorin. *Photochem Photobiol.* 1993, 58: 623-626.
174. Kessel, D.; Luguya, R.; Vicente, M.G.H. Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distribution. *Photochem Photobiol.* 2003, 78: 431-435.
175. Sibrian-Vazquez, M.; Nesterova, I.V.; Jensen, T.J.; Vicente, M.G.H. Mitochondria-targeting by guanidine- and biguanidine-porphyrin photosensitizers. *Bioconjugate Chem.* 2008, 19: 705-713.
176. Ricchelli, F.; Franchi, L.; Miotto, G.; Borsetto, L.; Gobbo, S.; Nikolov, P.; Bommer, J. C.; Reddi, E. Meso-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of human fibrosarcoma cells via lysosomal targeting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005, 37: 306-319.
177. Sibrian-Vazquez, M.; Jensen, T.J.; Fronczek, F.R.; Hammer, R.P.; Vicente, M.G.H. Synthesis and characterization of positively charged porphyrin-peptide conjugates. *Bioconjugate Chem.* 2005, 16: 852-863.
178. Sibrian-Vazquez, M.; Jensen, T.J.; Hammer, R.P.; Vicente, M.G.H. Peptidemediated cell transport of water-soluble porphyrin conjugates. *J Med Chem.* 2006, 49: 1364-1372.
179. Villanueva, A. The cationic meso-substituted porphyrins: an interesting group of photosensitizers. *J Photochem Photobiol B.* 1993, 18: 295-298.
180. Huang, L.; Terakawa, M.; Zhiyentayev, T.; Huang, Y.Y.; Sawayama, Y.; Jahnke, A.; Tegos, G.P.; Wharton, T.; Hamblin, M.R. Innovative cationic fullerenes as broad-spectrum light-activated antimicrobials. *Nanomedicine.* 2010, 6: 442-452.
181. Nikaido, H. Permability of the lipid domains of bacterial membranes, In: R. C. Aloia, C. V.C. Curatin, L.M. Gordon, editors, *Membrane transport and information storage*, New York, USA: Alan R. Liss, 1990, p. 165-190.

182. Malik, Z.; Ladan, H.; Nitzan, Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1992, 14: 261-266.
183. Donnelly, R.F.; McCarron, P.A.; Tunney, M.M. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008, 163: 1-12.
184. Paardekopper, M.; van Gompel, A.E.; van Steveninck, J.; van de Broek, J. The effect of photodynamic treatment of yeast with the sensitiser chloroaluminium phthalocyanine on various cellular parameters. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1995, 62: 561-567.
185. Osterloh, J.; Vicente, M.G.H. Mechanisms of porphyrinoid localization in tumors. *J Porphyr Phthalocya.* 2002, 6: 305-324.
186. Engelmann, F.M.; Rocha, S.V.O.; Toma, H.E.; Araki, K.; Baptista, M.S. Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. *Int J Pharmacol.* 2007, 329: 12-18.
187. Jensen, T.J.; Vicente, M.G.H.; Luguya, R.; Norton, J.; Fronczek, F.R.; Smith, K.M. Effect of overall charge and charge distribution on cellular uptake, distribution and phototoxicity of cationic porphyrins in HEp2 cells. *J Photochem Photobiol B.* 2010, 100: 100-111.
188. Mosinger, J.; Janošková, M.; Lang, K.; Kubát, P. Light-induced aggregation of cationic porphyrins. *J Photochem Photobiol A.* 2006, 181: 283-289.
189. Caminos, D.A.; Durantini, E.N. Synthesis of asymmetrically meso-substituted porphyrins bearing amino groups as potential cationic photodynamic agents. *J Porphyrin Phthalocyanine.* 2005, 9: 334-342.
190. Spesia, M.B.; Rovera, M.; Pascual, L.; Durantini, E.N.A. New antibacterial approach using photodynamic inactivation. *Chem Educator.* 2005, 10: 1-4.
191. Harrigan, W.F.; McCance, M.E. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*, Academic Press, London, 1986.
192. Pincus, D.H.; Coleman, D.C.; Pruitt, W.R.; Padhye, A.A.; Salkin, I.F.; Geimer, M.; Bassel, A.; Sullivan, D.J.; Clarke, M.; Hearn, V. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J Clin Microbiol.* 1999, 37: 3533-3539.
193. Milanesio, M.E.; Alvarez, M.G.; Bertolotti, S.G.; Durantini, E.N. Photophysical characterization and photodynamic activity of metallo 5-(4-(trimethylammonium)phenyl)-10,15,20-tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)porphyrin in homogeneous and biomimetic media. *Photochem Photobiol Sci.* 2008, 7: 963-972.

194. Wilkinson, F.; Helman, W.P.; Ross, A.B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J Phys Chem Ref Data*. 1995, 24: 663-1021.
195. Caminos, D.A.; Durantini, E.N. DNA interaction and photocleavage properties of porphyrins containing cationic substituents at the periphery position. *J Photochem Photobiol A*. 2008, 198: 274-281.
196. Pasternack, R.F.; Gibs, E.J.; Villafranca, J.J. Interactions of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry*. 1983, 22: 2406-2414.
197. McGhee, J.D.; von Hippel, P.H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J Mol Biol*. 1974, 86: 469-489.
198. Lambrechts, S.A.G.; Aalders, M.C.G.; Van Marle, J. Mechanistic Study of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* by a Cationic Porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005, 49: 2026-2034.
199. S-Divon, M.; Nitzan, Y.; Malik, Z. Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-meso(*N*-methylpyridyl)porphine. *Photochem Photobiol Sci*. 2004, 3: 423-429.
200. Bolondi, A.; Gaggino, P.O. Técnicas generales para Microscopía Electrónica y Bioquímica Aplicada. Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias, 1995.
201. Bancroft, J.D.; Stevens, A. Theory and practice of histological techniques. Bancroft and Stevens Eds. 1996.
202. Jurado, S.B.; Petruccelli, M.A. Aplicaciones de la microscopía electrónica de transmisión en el diagnóstico microbiológico. *Analecta veterinaria*. 2005, 25: 18-24.
203. Merchat, M.; Bertoloni, G.; Giacomini, P.; Villanueva, A.; Jori, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 1996, 32: 153-157.
204. Merchat, M.; Spikes, G.; Bertoloni, G.; Jori, J. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 1996, 35: 149-157.
205. Valduga, G.; Breda, B.; Giacometti, G.M.; Jori, G.; Reddi, E. Photosensitization of wild and mutant strains of *Escherichia coli* by meso-tetra(*N*-methyl-4-pyridyl)porphine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999, 256: 84-88.

206. Milanesio, M.E.; Álvarez, M.G.; Silber, J.J.; Rivarola, V.; Durantini, E.N. Photodynamic activity of monocationic and non-charged methoxyphenyl porphyrin derivatives in homogeneous and biological media. *Photochem Photobiol Sci.* 2003, 2: 926-933.
207. Kalyanasundaram, K.; Neumann-Spallar, M. Photophysical and redox properties of water-soluble porphyrins in aqueous media. *J Phys Chem.* 1982, 86: 5163-5169.
208. Danièle, P.; Alain, G.; Jean-Baptiste, V.; Kraljic, I.; Sissoëff, I.; Guillé, E. Photocleavage of DNA in the presence of synthetic water-soluble porphyrin. *Photochem Photobiol.* 1986, 44: 717-724.
209. Verlhac, J.B.; Gaudemer, A.; Kraljic, I. Water soluble porphyrins and metalloporphyrins as photosensitizers in aerated aqueous solutions. I. Detection and determination of quantum yield of formation of singlet oxygen. *Nouv J Chim.* 1984, 8: 401-406.
210. Demidova, T.; Hamblin, M. Effects of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005, 6: 2329-2335.
211. Gilfillan, G.D.; Sullivan, D.J.; Haynes, K.; Parkinson, T.; Coleman, D.C.; Gow, N.A.R. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiol-Sgm.* 1998, 144: 829-838.
212. Sobel, J.D.; Muller, G.; Buckley, H.R. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of *Candidal vaginitis*. *Infect Immun.* 1984, 44: 576-580.
213. Cutler, J.E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 1991, 45: 187-218.
214. Spesia, M.B.; Rovera, M.; Durantini, E.N. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mitis* by cationic zinc(II) phthalocyanines in media with blood derivatives. *Eur J Med Chem.* 2010, 45: 2198-2205.
215. Chabrier-Roselló, Y.; Foster, T.H.; Pérez-Nazario, N.; Mitra, S.; Haidaris, C. G. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrins-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agent Chemother.* 2005, 49: 4288-4295.
216. Caminos, D.A.; Spesia, M.B.; Durantini, E.N. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy) phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups. *Photochem Photobiol Sci.* 2006, 5: 56-65.
217. Schlothauer, J.; Hackbarth, S.; Röder, B. A new benchmark for time-resolved detection of singlet oxygen luminescence - revealing the evolution of lifetime in living cells with low dose illumination. *Laser Phys. Lett.* 2008, 1-6.

218. Cormick, M.P.; Quiroga, E.D.; Bertolotti, S.G.; Alvarez, M.G.; Durantini, E.N. Mechanistic insight of the photodynamic effect induced by tri- and tetra-cationic porphyrins on *Candida albicans* cells. *Photochem Photobiol Sci.* 2011, 10: 1556-1561.
219. Goldstein, S.; Czapski, G. Mannitol as an OH \cdot scavenger in aqueous solution and in biological systems. *Int J Radiat Biol.* 1984, 46: 725-729.
220. Klotz, L-O.; Kröncke, K-D.; Sies, H. Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem Photobiol Sci.* 2003, 2: 88-94.
221. Maisch, T.; Bosl, C.; Szeimies, R.-M.; Lehn, N.; Abels, C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005, 49: 1542-1552.
222. Baker, A.; Kanofsky, J.R. Direct observation of singlet oxygen phosphorescence at 1270 nm from L1210 leukemia cells exposed to polyporphyrin and light. *Arch Biochim Biophys.* 1991, 286: 70-75.
223. Oelckers, S.; Sczegan, M.; Hanke, T.; Röder, B. Time-Resolved detection of singlet oxygen luminescence in red cell ghost suspensions. *J Photochem Photobiol B.* 1997, 39: 219-223.
224. Quiroga, E.D.; Alvarez, M.G.; Durantini, E.N. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic action of 5,10,15,20-tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrin in different media. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010, 60: 123-131.
225. Orenstein, A.; Klein, D.; Kopolovic, J.; Winkler, E.; Malik, Z.; Keller, N.; Nitzan, Y. The use of porphyrins for eradication of *Staphylococcus aureus* in burn wound infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998, 19: 307-314.
226. Wood, S.; Nattress, B.; Kirkham, J.; Shore, R.; Brookes, S.; Griffiths, J.; Robinson, C. An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 1999, 50: 1-7.
227. Kreitner, M.; Wagner, K.H.; Alth, G.; Ebermann, R.; Foiszy, H.; Elmadfa, I. Haematoporphyrin- and sodium chlorophyllin-induced phototoxicity towards bacteria and yeasts-a new approach for safe foods. *Food Control.* 2001, 12: 529-533.
228. Kessel, D.; Oleinick, N.L. Chapter 1 Initiation of autophagy by photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* 2009, 453: 1-16.
229. Bertoloni, G.; Reddi, E; Gatta, M.; Burlini, C.; Jori, G. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 1989, 135: 957-966.

230. Wright, A.; Bubb, W.A.; Hawkins, C.L.; Davies, M.J. Singlet oxygen mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochem Photobiol.* 2002, 76: 35-6.
231. Miki, T.; Yu, L.; Yu, C.A. Hematoporphyrin-promoted photoinactivation of mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase: selective destruction of the histidine ligands of the iron-sulfur cluster and protective effect of ubiquinone. *Biochemistry.* 1991, 30: 230-238.
232. Castano, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2005, 2: 1-23.
233. Kubát, P.; Lang, K.; Anzenbacher Jr. P.; Jursíková, K.; Král, V.; Ehrenberg, B. Interaction of novel cationic meso-tetraphenylporphyrins in the ground and excited states with DNA and nucleotides. *J Chem Soc Perkin Trans 1.* 2000, 6: 933-941.
234. Fiel, R.J.; Muitton, B. Binding of meso-tetra (4-*N*-methylpyridyl) porphine to DNA. *Nucl Acids Res.* 1980, 8: 2835-2842.
235. Kelly, J.M.; Murphy, M.J.; McConnell, D.J.; OhUigin, C. A comparative study of the interaction of 5,10,15,20-tetrakis (*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrin and its zinc complex with DNA using fluorescence spectroscopy and topoisomerisation. *Nucl Acids Res.* 1985, 13: 167-184.
236. Vergeldt, F.J.; Koehorst, R.B.M.; van Hoek, A.; Schaafsma, T.J. Intramolecular interactions in the ground and excited state of tetrakis(*N*-methylpyridyl)porphyrins. *J Phys Chem.* 1995, 99: 4397-4405.
237. Mukundan, N.E.; Petho, G.; Dixon, D.W.; Kim, M.S.; Marzilli, L.G. Interactions of an electron-rich tetracationic tentacle porphyrin with calf thymus DNA. *Inorg Chem.* 1994, 33: 4676-4687.
238. Quiroga, E.D.; Cormick, M.P.; Pons, P.; Alvarez, M.G.; Durantini, E.N. Mechanistic aspects of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* induced by cationic porphyrin derivatives. *Eur J Med Chem.* 2012, 58: 332-339.
239. Novaira, M.; Cormick, M.P.; Durantini, E.N. Spectroscopic and time-resolved fluorescence emission properties of a cationic and an anionic porphyrin in biomimetic media and *Candida albicans* cells. *J Photochem Photobiol A.* 2012, 246: 67-74.
240. Mora, S.J.; Milanesio, M.E.; Durantini, E.N. Spectroscopic and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimethylaminopropoxy)phenyl]porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *J Photochem Photobiol A.* 2013, 270: 75-84.

241. Bonnett, R.; Martínez, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 2001, 57: 9513-9547.
242. Di Poto, A.; Sbarra, M.S.; Provenza, G.; Visai, L.; Speziale, P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials*. 2009, 30: 3158-3166.
243. Cormick, M.P.; Rovera, M.; Durantini, E.N. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a novel Zn(II) phthalocyanine substituted by fluconazole groups. *J Photochem Photobiol A*. 2008, 194: 220-229.

