

DI PALMA, MARIA ALBANA

Instituto Nazionale di Studio e Ricerche per l'Incarcerazione

75069

2016

75069



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



Doctorado en Ciencias Biológicas

*INACTIVACIÓN FOTODINÁMICA DE
LEVADURAS SENSIBILIZADAS POR
FTALOCIANINAS CATIONICAS*

Lic. María Albana Di Palma

2016

AÑO: 2016

MF
Clasif.
T - 1014

75069

Dirección de tesis:

Director:

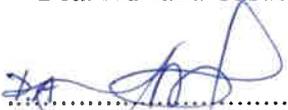

.....
Dra. María G. Álvarez

Co-director:


.....
Dr. Edgardo N. Durantini

Jurado de tesis:


.....
Dra. Adriana Casas


.....
Dra. Mariana Combina


.....
Dra. María Elisa Lombardo

Doctorando:


.....
Lic. María Albana Di Palma

Río Cuarto, 15 de marzo de 2016

Quiero dedicar mi TESIS a la memoria de mi querida Tía Elsa, quien me acompañó física y espiritualmente a lo largo de mi vida y AGRADECER INMENSAMENTE:

-A la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET) y el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MINCyT) por brindarme los recursos necesarios para llevar adelante mis estudios de postgrado

-A los jurados de tesis (Dras. Elisa Lombardo, Mariana Combina y Adriana Casas) por sus correcciones, sugerencias y críticas constructivas... Gracias por el tiempo dedicado a la corrección de este trabajo

-A mis directores Dres. María Gabriela Álvarez y Edgardo N. Durantini, por haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender junto a ellos, por estar siempre presentes y predispuestos a brindar ayuda

-A Gaby por ser más que una directora, una amiga que me supo aconsejar no solo en lo académico sino también en lo personal

-A mis padres y hermana, por acompañarme incondicionalmente a lo largo de estos 5 años, por su inmensa confianza, por darme fuerzas para seguir adelante y poder llegar a esta meta

-A mis amigos y hermanos de la vida (Paty, Gladys, Kari, Noemí, Manuel, Dany, Guty, Erick, Eliana, Mary, Mariel, Alfonsina, Marcelo y Paola), por su gran compañía y los buenos momentos compartidos, por todos sus consejos y por acompañarme y sobre todo aguantar mis locuras

-A mis compañeros y AMIGOS de trabajo, por su colaboración y por hacerme sentir cómoda en el Gran Becario desde el primer día. Fue un inmenso placer trabajar junto a Ustedes, compartir mates y charlas

-En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta Tesis Doctoral, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad

INDICE

3.1. Generalidades.....	35
3.2. Estructura celular	35
3.3. Microorganismos eucariotas	36
3.3.1. Pared celular de los hongos.....	37
3.4. Levaduras	38
3.4.1. Generalidades del género <i>Candida</i>	39
3.4.2. Generalidades de la especie <i>Candida albicans</i>	39
3.5. Enfermedades infecciosas	42
3.5.1. Infecciones fúngicas.....	43
3.5.2. Clasificación de las micosis	43
3.6. Agentes antifúngicos.....	44
3.6.1. Breve reseña histórica sobre los agentes antifúngicos.....	45
3.6.2. Mecanismo de acción de los azoles antifúngicos.....	47
3.6.3. Resistencia a los antifúngicos	47
3.7. Tratamiento alternativo: fotosensibilización.....	49
3.7.1. Inactivación fotodinámica.....	50
3.7.2. Mecanismo de acción.....	54
3.7.3. Ftalocianinas	55
3.7.3.1. Características espectroscópicas y fotoquímicas	56

3.8. Principios generales de la fotosensibilización de los hongos.....	57
5.1. Generales.....	65
5.2. Específicos.....	65
6.1. Materiales.....	69
6.1.1. Equipamientos generales y reactivos.....	69
6.1.2. Fotosensibilizadores.....	69
6.2. Métodos.....	70
6.2.1. Sistemas de irradiación.....	70
6.2.2. Caracterización de la cepa fúngica.....	71
6.2.3. Estudios <i>in vitro</i>	72
6.2.3.1. Inactivación fotodinámica de células de <i>C. albicans</i>	72
6.2.3.2. Unión celular <i>in vitro</i> a las células de <i>C. albicans</i>	72
6.2.3.3. Efecto del fotosensibilizador sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i>	74
6.2.4. Unión celular de ZnPPc ⁴⁺	74
6.2.4.1. Unión del fotosensibilizador a las células de <i>C. albicans</i> y aplicación de lavados sobre las células tratadas.....	74
6.2.4.2. Unión del fotosensibilizador frente a distintas densidades celulares.....	75
6.2.4.3. Unión celular a distintas concentraciones del fotosensibilizador.....	75
6.2.4.4. Unión a distintas temperaturas y en presencia de inhibidores metabólicos.....	75
6.2.5. Inactivación fotodinámica de células de <i>C. albicans</i> con ZnPPc ⁴⁺ como FS.....	76
6.2.5.1. IFD frente a distintas densidades celulares.....	76

6.2.5.2. IFD frente a distintas concentraciones y tiempos de irradiación	76
6.2.5.3. Ensayo de citotoxicidad	76
6.2.5.4. IFD de células de <i>C. albicans</i> sobre superficies	77
6.2.5.4.1. Unión de ZnPPc ⁴⁺ en solución e inactivación fotosensibilizada de células de <i>C. albicans</i> sobre agar.....	77
6.2.5.4.2. Inactivación fotosensibilizada de <i>C. albicans</i> sobre agar impregnado con ZnPPc ⁴⁺	77
6.2.5.4.3. Fotosensibilización de <i>C. albicans</i> creciendo en colonias sobre agar	78
6.2.5.4.4. IFD inducida por ZnPPc ⁴⁺ <i>in vitro</i> utilizando <i>C. albicans</i> creciendo como pseudohifa	78
6.2.6. Controles	79
6.2.7. Estudio de los estados excitados de ZnPPc ⁴⁺ y su interacción con las células de <i>C. albicans</i>	79
6.2.7.1. Determinación de la formación del FS en estado excitado triplete en las células de <i>C. albicans</i>	79
6.2.7.2. Determinación de ¹ O ₂ en las células	81
6.2.8. Estudios mecanísticos de la inactivación fotodinámica	83
6.2.8.1. Determinación de la producción de ¹ O ₂ en medio homogéneo.....	83
6.2.8.2. Determinación indirecta de la producción de ¹ O ₂ en medio celular	84
6.2.8.3. Determinación de la producción del anión superóxido (O ₂ ⁻) en medio celular.....	84
6.2.9. Sitios de acción del fotosensibilizador	85
6.2.9.1. Estudios de la localización intracelular del fotosensibilizador	85

6.2.9.2. Efectos de la inactivación fotodinámica sobre el ADN	85
6.2.9.3. Fotoinactivación de <i>C. albicans</i> y extracción de ADN genómico	86
6.2.9.4. Efecto de la inactivación fotodinámica sobre la estructura celular	86
6.2.9.5. Fotodaño en la envoltura celular	87
6.3. Análisis Estadístico	88
7.1. Fotosensibilizadores	91
7.2. Estudios espectroscópicos y fotodinámicos	91
7.2.1. Características espectroscópicas y fotodinámicas de las ftalocianinas	91
7.3. Estudios <i>in vitro</i> en <i>C. albicans</i>	98
7.3.1. Inactivación fotodinámica <i>in vitro</i>	98
7.3.2. Unión <i>in vitro</i> a las células de <i>C. albicans</i>	102
7.3.3. Efecto fotosensibilizador sobre la curva de crecimiento	104
7.3.4. Unión celular de ZnPPc ⁴⁺ en presencia de lavados	107
7.3.5. Unión celular <i>in vitro</i> a distintas densidades celulares de <i>C. albicans</i>	108
7.3.6. Unión celular a distintas concentraciones de ZnPPc ⁴⁺	110
7.3.7. Unión celular a distintas temperaturas y en presencia de inhibidores metabólicos .	111
7.4. Inactivación fotodinámica <i>in vitro</i> empleando ZnPPc ⁴⁺ como FS	113
7.4.1. Inactivación fotodinámica de suspensiones celulares de <i>C. albicans</i> en PBS	113
7.4.2. Inactivación fotodinámica a distintas concentraciones de ZnPPc ⁴⁺	114
7.4.3. IFD bajo distintas densidades celulares.....	115
7.4.4. IFD en presencia de lavados.....	117

7.4.5. IFD bajo distintos tiempos de incubación.....	117
7.4.6. Citotoxicidad.....	118
7.4.7. Estudios en medios sólidos	120
7.4.7.1. Fotoinactivación de células de <i>C. albicans</i> sobre superficies.....	120
7.4.7.2. Fotosensibilización de células de <i>C. albicans</i> creciendo en colonias	123
7.4.8. Inactivación fotosensibilizada sobre pseudohifas de <i>C. albicans</i>	124
7.5. Mecanismo de acción.....	126
7.5.1. Formación de estado excitado triplete de ZnPPc ⁴⁺ en las células de <i>C. albicans</i>	126
7.5.2. Producción de oxígeno singlete en las células de <i>C. albicans</i>	133
7.5.3. Efecto del medio y del agregado de desactivantes de ROS	135
7.5.4. Determinación de la producción de ¹ O ₂ mediante moléculas prueba.....	137
7.5.5. Fotoinactivación de <i>C. albicans</i> en presencia de derivados de antraceno	141
7.5.6. Determinación de la producción de ¹ O ₂ en suspensiones celulares en PBS.....	142
7.5.7. Determinación del radical anión superóxido (O ₂ ⁻).....	145
7.6. Sitio de acción.....	150
7.6.1. Estudios de la localización intracelular del fotosensibilizador	150
7.6.2. Efectos de la inactivación fotodinámica sobre el ADN	151
7.6.2.1. Efecto de la IFD sobre el ADN genómico de <i>C. albicans</i>	151
7.6.3 Efecto de la inactivación fotodinámica en la estructura celular interna.....	153
7.6.3.1. Microscopía electrónica de transmisión.....	153
7.6.4. Fotodaño en la envoltura celular	155

7.6.4.1. Microscopía electrónica de barrido	155
CONCLUSIONES	159
GLOSARIO DE MOLÉCULAS	173
REFERENCIAS	179

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características espectroscópicas de las ftalocianinas, Φ_F y Φ_Δ en DMF	98
Tabla 2. Ensayos de citotoxicidad	119
Tabla 3. Representación en porcentajes de viabilidad celular <i>C. albicans</i> generada por acción fotodinámica	121
Tabla 4. Fotodescomposición de DMA y ADMA bajo distintas condiciones de tratamientos en PBS	140



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación estructural entre células procariotas (A) y eucariotas (B).....	35
Figura 2. Estructura y componentes de la pared celular fúngica.....	38
Figura 3. Mecanismos de patogenicidad <i>C. albicans</i>	41
Figura 4. Invasión de <i>Candida albicans</i> en su forma levaduriforme y filamentosa. Las flechas blancas indican las hifas generadas durante el proceso infectivo.....	42
Figura 5. Evolución histórica de los fármacos antifúngicos.....	46
Figura 6. Inactivación fotodinámica de células fúngicas (ilustrativo)....	51
Figura 7. Esquema que representa los diferentes rangos de profundidad de penetración en correspondencia con la longitud de onda de la radiación aplicada sobre la piel	52
Figura 8. Infecciones que podrían combatirse mediante la IFD.....	53
Figura 9. Diagrama de Jablonsky. Eficiencia en la IFD sobre múltiples células microbianas.....	53
Figura 10. Procesos fotoquímicos involucrados en el efecto fotodinámico y sus mecanismos.	55
Figura 11. Espectro de absorción de las ftalocianinas.....	57
Figura 12. Diferentes arreglos de irradiación utilizados para las distintas metodologías empleadas:.....	70
Figura 13. Curva de calibración de ZnPPc ⁴⁺ en SDS al 2 % ($\lambda_{exc} = 670\text{nm}$, $\lambda_{em} = 684\text{ nm}$).	73
Figura 14. Curva de calibración de FN ₃ ZnPc ³⁺ en 2% p/v SDS ($\lambda_{exc} = 670\text{ nm}$, $\lambda_{em} = 684\text{ nm}$)	74

Figura 15. Representación esquemática de LFF.....	80
Figura 16. Representación de una señal transitoria típica obtenida por LFF.....	81
Figura 17. Representación del equipamiento utilizado para la aplicación de TRPD.	82
Figura 18. Señal típica del decaimiento de la fosforescencia de $^1\text{O}_2$ a 1270 nm en D_2O	82
Figura 19. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de la ftalocianina ZnPPc^{4+} en DMF.....	93
Figura 20. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de AZnPc (), AZnPc^+ (- - -) en DMF ($\lambda_{\text{exc}} = 612\text{nm}$).	94
Figura 21. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (- - -),	97
Figura 22. Curva de supervivencia de <i>C. albicans</i> (10^6 UFC/mL) incubada con diferentes concentraciones (5 y 10 μM) de ZnPPc^{4+} (►), ZnAmPc^{4+} (▲), AZnPc (■) y AZnPc^+ (●) por 30 min a 37°C en oscuridad y expuesta a luz visible por 30 min. Control (▼). Los valores representan la media±desviación estándar.....	99
Figura 23. Curva de supervivencia de <i>C. albicans</i> (10^6 UFC/mL) incubada con 10 μM de $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (●), $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (▲) y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (▼) durante 30 min a 37°C en oscuridad y expuesta a luz visible por distintos tiempos (15 y 30 min). Control (■). Los valores representan la media±desviación estándar.....	100
Figura 24. Curva de supervivencia de <i>C. albicans</i> (10^6 UFC/mL) incubada con 1 (●), 5 (▲) y 10 (▼) μM de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ durante 30 min a	

37°C en oscuridad y expuesta a luz visible por distintos tiempos (15 y 30 min). Control (■). Los valores representan la media±desviación estándar.

.....101

Figura 25. Curva de supervivencia de *C. albicans* (10^6 UFC/mL) incubada con $1 \mu\text{M}$ de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (●) por 30 min a 37°C en oscuridad y expuesta a luz visible a distintos tiempos. Control (■). Los valores representan la media ± desviación estándar.....102

Figura 26. Cantidad de ZnPPc^{4+} recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con $5 \mu\text{M}$ (■) y $10 \mu\text{M}$ (▼) del sensibilizador por 15, 30 y 60 min a 37°C. Cantidad de ZnAmPc^{4+} recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con $10 \mu\text{M}$ (►). Los valores representan la media±desviación estándar.....103

Figura 27. Cantidad de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con $1 \mu\text{M}$ a 37°C. Los valores representan la media ± desviación estándar.....104

Figura 28. Curva de retardo del crecimiento de *C. albicans* incubadas con $5 \mu\text{M}$ (▼), $10 \mu\text{M}$ (▲) y $20 \mu\text{M}$ (■) de ZnPPc^{4+} expuestas a diferentes tiempos de irradiación con luz visible en CS a 37°C. Cultivos controles (●), cultivos de células tratadas con $5 \mu\text{M}$ (▼), $10 \mu\text{M}$ (▲) y $20 \mu\text{M}$ (■) en oscuridad, células sin sensibilizador pero irradiadas (◆) ($\lambda_{\text{abs}}=550 \text{ nm}$). Los valores representan la media±desviación estándar.

.....105

Figura 29. Curva de retardo del crecimiento de *C. albicans* incubadas con $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (►), $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (◄) $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (►) $10 \mu\text{M}$ expuestas a diferentes tiempos de irradiación en CS a 37 °C. Cultivos control (■);

control iluminado (■) y células tratadas con TN_3ZnPc^{3+} (▼), AN_3ZnPc^{3+} (▼) y FN_3ZnPc^{3+} (◄) mantenidas en oscuridad. Los valores representan la media \pm desviación estándar.106

Figura 30. Cantidad de $ZnPPc^{4+}$ recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con 5 μM sin lavar (■), 1 lavado (●) y 2 lavados (▲) y 10 μM sin lavar (▼), 1 lavado (◆) y 2 lavados (◄) del sensibilizador por 30 min a 37°C y diferentes etapas de lavados. Los valores representan la media \pm desviación estándar.108

Figura 31. Unión de $ZnPPc^{4+}$ a las células bajo diferentes densidades celulares y concentraciones 5 μM (●) y109

Figura 32. Cantidad de $ZnPPc^{4+}$ recuperada de células de *C. albicans* $\sim 10^7$ UFC/mL 5 μM (▲) y 10 μM (■) y $\sim 10^8$ UFC/mL tratadas con 5 μM (▼) y 10 μM (●) de sensibilizador por 15 y 30 min a 37°C. Los valores representan la media \pm desviación estándar.....110

Figura 33. Unión de $ZnPPc^{4+}$ a las células de *C. albicans* en PBS ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratado con diferentes concentraciones de ftalocianina por 30 min en oscuridad a 37 °C.111

Figura 34. Unión de $ZnPPc^{4+}$ a suspensiones celulares de *C. albicans* en PBS ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con 5 μM de ftalocianina por diferentes tiempos de incubación y temperaturas 4°C (●) y 37°C (■). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados (* p <0,05 con respecto a una incubación de 2,5 min para ambas temperaturas).112

Figura 35. Unión de $ZnPPc^{4+}$ a las células de *C. albicans* en PBS ($\sim 10^6$ UFC/mL). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres

experimentos separados (* p <0,05 con respecto a los valores obtenidos al incubar las células durante 30 min con azida y DNF previo al FS)... 112

Figura 36. Curva de inactivación celular de *C. albicans*: (10^6 UFC/mL) incubada con ZnPPc⁴⁺ 5 μ M (●) por 1 min a 37°C en oscuridad y expuesta a diferentes tiempos de iluminación. Tratamiento control (■).
..... 114

Figura 37. Curva de inactivación celular de *C. albicans*: (10^6 UFC/mL) incubada con diferentes concentraciones de ZnPPc⁴⁺ 1 (■), 2,5 (●), 5 (▲) y 10 μ M (▼) por 30 min a 37°C en oscuridad y expuesta a diferentes tiempos de iluminación. Control de irradiación (◆). Los valores representan la media \pm desviación estándar..... 115

Figura 38. Curva de supervivencia de *C. albicans* con diferentes densidades celulares incubadas con 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ durante 30 min a 37 ° C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante 30 min (30 mW/cm²). Cultivos controles sin tratar (o). Cultivos controles tratados (●). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados (* p <0,05, en comparación con las células no tratadas). 116

Figura 39. Supervivencia de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubadas con ZnPPc⁴⁺ en oscuridad por 30 min a 37 °C y expuestas a la luz visible por 30 min. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados (* p <0,05 en comparación con los valores para IFD sin lavado). 117

Figura 40. Supervivencia de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubadas con ZnPPc⁴⁺ en oscuridad a 37 °C y expuestas a la luz visible por 30 min. Los

valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados (* p <0,05 en comparación con los valores para IFD a 2,5 min de incubación).....118

Figura 41. Efecto de la citotoxicidad de las células Vero incubadas con ZnPPc⁴⁺ a distintas concentraciones de y expuestas a la luz visible por 15 min. Los valores representan la media \pm desviación estándar de los tres experimentos por separado. Control (■) Células Vero irradiadas (●). ..119

Figura 42. Inactivación de células de *C. albicans* sobre AS. La suspensión celular de $\sim 10^6$ UFC/mL en PBS fue incubada con ZnPPc⁴⁺ (10 μ M) por 30 min a 37°C en oscuridad, las células se sembraron sobre agar e irradiaron con luz visible a distintos tiempos (■). Control no tratado e irradiado (●). Los valores representan la media \pm desviación estándar.121

Figura 43. 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 ZnPPc⁴⁺ (5,5; 11; y 22 nmol). A: iluminadas 30 min. B: oscuridad.122

Figura 44. Crecimiento de colonias de *C. albicans* en CS tratadas con 11 nmol de ZnPPc⁴⁺ e irradiadas con luz visible (30 mW/cm²) por 3 h. A: tratamiento con ZnPPc⁴⁺, B: controles.....124

Figura 45. Tubos germinales en *C. albicans* en suero humano. Tamaño 100 X.....125

Figura 46. Inactivación de pseudohifas de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubadas con 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ en oscuridad por 30 min a 37 °C y

expuesta a luz visible por 5, 15 y 30 min (90 mW/cm^2). Tratamiento control (■), IFD en suero (●), IFD en PBS (▲).	125
Figura 47. Espectro de absorción de las ftalocianinas ZnPPc ⁴⁺ (---), ZnPyPz (...) y ZnPc () en DMSO.	127
Figura 48. Espectro de especies transitorias a distintos tiempos después del pulso de excitación de LFF. A) ZnPPc ⁴⁺ B) ZnPyPz y C) ZnPc. $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ en DMSO y atmósfera de Ar.	129
Figura 49. Decaimiento de la absorción para A) ZnPPc ⁴⁺ B) ZnPyPz C) ZnPc a 475 nm en DMSO y atmósfera de Ar.	130
Figura 50. Espectro de especies transitorias a distintos tiempos después del pulso de excitación de LFF (400-600 nm). A) Suspensiones celulares ($\sim 1 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$) de <i>C. albicans</i> en DMSO + ZnPPc ⁴⁺ . B) ZnPPc ⁴⁺ + DMSO (atmósfera de Ar).	131
Figura 51. Espectro de especies transitorias a distintos tiempos después del pulso de excitación de LFF (400-600 nm). A) Suspensiones celulares ($\sim 1 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$) de <i>C. albicans</i> en DMSO + ZnPc, B) ZnPc + DMSO en atmósfera de Ar.	132
Figura 52. Espectro de especies transitorias a distintos tiempos después del pulso de excitación de LFF (en el rango 400-600 nm) en presencia y ausencia de suspensiones celulares ($\sim 1 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$) de <i>C. albicans</i> en para ZnPyPz en DMSO y atmósfera de Ar.	133
Figura 53. A) Decaimiento de emisión de ¹ O ₂ sensibilizado por ZnPPc ⁴⁺ y B) ZnPc en DMSO a diferentes energías del láser en presencia de <i>C. albicans</i> ($\sim 1 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$).	134

Figura 54. Supervivencia de levaduras *C. albicans* sensibilizada por ZnPPc⁴⁺ (2,5 μM) en diferentes condiciones e irradiadas con luz visible por 30 min (30 mW/cm²), 1) control sin tratar, 2) control ZnPPc⁴⁺ oscuridad, 3) control sin ZnPPc⁴⁺ e irradiado, 4) Cultivo tratado con ZnPPc⁴⁺ y 30 min de irradiación 5) control con argón e irradiado, 6) IFD en atmósfera de argón, 7) control con azida (100 mM) e irradiado, 8) IFD y azida (100 mM), 9) control con D₂O e irradiado, 10) IFD en D₂O, 11) control con manitol (100 mM) e irradiado, 12) IFD y manitol (100 mM). Los valores representan la media ± la desviación estándar de tres experimentos por separado.136

Figura 55. Descomposición de A) DMA y B) ABMM fotosensibilizada por ZnPPc⁴⁺ e irradiado con luz de 590-800 nm en PBS ($\lambda_{exc}=378$ nm).138

Figura 56. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de A) DMA en PBS (10 μM) (●) y DMA en PBS más azida (■) y B) ABMM en PBS (10 μM) (●) y ABMM en PBS más azida (■) fotosensibilizada por ZnPPc⁴⁺ en PBS. Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos por separado.....140

Figura 57. Curva de supervivencia de *C. albicans* (~10⁶ UFC/mL) incubadas con: ZnPPc⁴⁺ 5 μM por 10 min (■), DMA 10 μM (▲) por 30 min, lavadas y tratadas con ZnPPc⁴⁺ 5 μM por 10 min, ABMM 10 μM (▼) por 30 min, lavadas y tratadas con de ZnPPc⁴⁺ 5 μM por 10 min, DMA 10 μM (△) por 30 min y lavadas, ABMM 10 μM (▽) por 30 min, lavadas y expuestas a la luz visible por diferentes tiempos de irradiación. Control de irradiación (●).141

Figura 58. Descomposición de A) DMA B) ABMM fotosensibilizado por ZnPPc ⁴⁺ en presencia de células de <i>C. albicans</i> (~1x10 ⁶ UFC/mL) en PBS e irradiado con luz de 590-800 nm.	144
Figura 59. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de A) DMA y B) ABMM (10 μM) fotosensibilizada por ZnPPc ⁴⁺ en presencia de células de <i>C. albicans</i> (~1x10 ⁶ UFC/mL) en PBS. Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos por separado.....	145
Figura 60. A) Reducción de NBT+NADH. B) Reducción de NBT+NADH+ZnPPc ⁴⁺ a diformazán, por ZnPPc ⁴⁺ (1 μM) en DMF...	147
Figura 61. Reducción de NBT a diformazán, fotosensibilizado por ZnPPc ⁴⁺ 1 μM en DMF.	147
Figura 62. A) Reducción de NBT + NADH + cél. B) Reducción de NBT + NADH + ZnPPc ⁴⁺ + cél a diformazán, fotosensibilizado por ZnPPc ⁴⁺ 5 μM en medio celular.....	149
Figura 63. Reducción de NBT a diformazán, fotosensibilizado por ZnPPc ⁴⁺ 5 μM en suspensión celular (1x10 ⁶ UFC/mL) de <i>C. albicans</i> en PBS. NADH + ZnPPc ⁴⁺ (■); NBT + ZnPPc ⁴⁺ (●); ZnPPc ⁴⁺ + NADH + NBT (▲) y NADH + NBT (▼).	149
Figura 64. Localización de ZnPPc ⁴⁺ 5 μM en células de <i>C. albicans</i> . A) Controles en campo claro	151
Figura 65. Localización de ZnPPc ⁴⁺ 5μM en células de <i>C. albicans</i> . A) Controles en campo claro. B) fluorescencia de ZnPPc ⁴⁺ (roja). (C) Ho (azul). (D) colocalización,	151

Figura 66. 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 ($\sim 10^7$ UFC/mL). 3) Cultivo control irradiado 15 min sin ZnPPc⁴⁺. 4) Cultivo control irradiado 30 min sin ZnPPc⁴⁺. 5) Cultivo control oscuridad incubado con ZnPPc⁴⁺ 30 min. 6) Cultivo tratado con 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ e irradiado 15 min. 7) Cultivo tratado con 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ e irradiado 30 min.153

Figura 67. Microscopía electrónica de transmisión. A) Células de *C. albicans* control. Aumento 21560 X. B) Células de *C. albicans* irradiadas en ausencia de ZnPPc⁴⁺. Aumento 21560 X. C) *C. albicans* en presencia ZnPPc⁴⁺ 5 μ M mantenidas en la oscuridad. Aumento 13000 X. D) Células de *C. albicans* en presencia ZnPPc⁴⁺ 5 μ M mantenidas en la oscuridad 30 min e irradiadas durante 15 min. Aumento 16700 X. E) Células de *C. albicans* en presencia ZnPPc⁴⁺ 5 μ M mantenidas en la oscuridad 30 min e irradiadas durante 30 min. Aumento 16700 X.155

Figura 68. Microscopía electrónica de barrido de cultivos de células de *C. albicans* ($\sim 10^7$ UFC/mL). A) Células de *C. albicans* control. B) Suspensiones de *C. albicans* tratadas con 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ en oscuridad. C) Suspensiones de *C. albicans* irradiadas con luz visible. D) Suspensiones de *C. albicans* tratadas con ZnPPc⁴⁺ e irradiados por 15 min. E) Suspensiones de *C. albicans* tratadas con ZnPPc⁴⁺ e irradiados por 30 min. Aumento 5000 X.156

En la actualidad existen varias alternativas para poder combatir a los microorganismos, una de las metodologías de gran interés en las últimas décadas es la inactivación fotodinámica (IFD) que combina la acción de la luz visible de una determinada longitud de onda en presencia de un fotosensibilizador apropiado y oxígeno para desencadenar la muerte celular. La mayoría de los fotosensibilizadores utilizados clínicamente o investigados están basados en núcleos tetrapirrólicos incluyendo porfirinas, clorinas, bacterioclorina y ftalocianinas debido a su baja toxicidad en ausencia de luz.

La IFD de microorganismos ha sido propuesta como una modalidad alternativa para el tratamiento de levaduras patógenas resistentes a antibióticos. Con tal motivo, en este trabajo se diseñaron y sintetizaron nuevos agentes fotosensibilizadores derivados de ftalocianinas ($ZnPPc^{4+}$, $ZnAmPc^{4+}$, AN_3ZnPc^{+3} , TN_3ZnPc^{+3} , FN_3ZnPc^{+3} , $AZnPc^+$, $AZnPc$) como posibles agentes fototerapéuticos para la inactivación *in vitro* de *Candida albicans*. En solución, estos agentes presentan propiedades espectroscópicas y fotodinámicas apropiadas para ser utilizados como fotosensibilizadores. Sus valores de rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) y rendimiento cuántico de producción de oxígeno molecular singlete (Φ_Δ) son adecuados para su localización y cuantificación en un medio biológico.

Estos compuestos derivados de ftalocianinas, fueron evaluados bajo distintas condiciones, y su mayor eficiencia fue debida a la presencia de cargas y a la posición de las mismas, siendo los fotosensibilizadores $ZnPPc^{4+}$ y el FN_3ZnPc^{3+} los más efectivos frente a *C. albicans*.

FN_3ZnPc^{3+} es un fotosensibilizador anfifílico, formado por tres centros catiónicos y uno lipofílico, derivado de perfluorobenceno. Presenta características espectroscópicas y fotodinámicas apropiadas en solución y es muy eficiente en medio biológico para combatir *C. albicans*. Debido a distintos inconvenientes presentados en su síntesis, no fue posible continuar con sus estudios.

$ZnPPc^{4+}$ posee 4 cargas positivas unidas a su macrociclo a través de enlaces éter y su diseño fue fundamentado en obtener mayor movilidad de sus cargas y así generar una mejor interacción con la estructura celular sobre la que actúa en el microorganismo, presentando en la región central un átomo de zinc el cual favorece la formación del estado excitado triplete. $ZnPPc^{4+}$ generó una cinética de unión muy rápida a cortos tiempos de incubación (<5 min) dependiente de la concentración y del tiempo de

incubación. Presentó valores apropiados de unión aún en presencia de lavados. Fue capaz de generar una adecuada IFD, la cual fue fuertemente dependiente de la concentración del fotosensibilizador, del tiempo de irradiación, de la dosis de luz utilizada y de la densidad celular del cultivo a tratar. Además, esta ftalocianina fue efectiva para la inactivación de *C. albicans* en medios sólidos, en el retardo del crecimiento y al evaluar la eficiencia de la IFD en presencia de pseudohifas.

El mecanismo fotodinámico inducido por esta ftalocianina durante la inactivación fue principalmente de tipo II, mediante la participación del oxígeno molecular singlete ($^1\text{O}_2$) como principal especie reactiva, sin embargo no se descarta, aunque en menor medida, el aporte del mecanismo tipo I.

Estudios de microscopía de fluorescencia revelaron que ZnPPc^{4+} se localiza a nivel de envoltura celular, ejerciendo todo su efecto desde la membrana y/o pared celular.

Estudios a nivel morfológico mostraron daños en la envoltura celular. De modo que, la alteración de esta estructura podría ser una causa importante en la inactivación de *C. albicans*. Es por esto que ZnPPc^{4+} es efectiva para ser aplicada como fotosensibilizador en solución o sobre medio sólido. En conclusión, la presencia de cargas positivas aisladas del macrociclo tetrapirrólico por enlaces éteres permite una mejor movilización de las cargas, una unión celular más estable y una notable actividad fotoinactivante, permiten postular a ZnPPc^{4+} como un fotosensibilizador promisorios, en la aplicación de la IFD para la erradicación de infecciones por levaduras.

ABSTRACT

Nowadays, there are several alternatives to fight the microorganisms. One of those alternatives to conventional treatments is photodynamic inactivation (PDI). PDI is a therapy that has been used in recent decades, wherein the microbial species are killed by the action of visible light of a specific wavelength in the presence of a suitable photosensitizer and oxygen.

PDI of microorganisms has been proposed as an alternative modality for treatment of antibiotic-resistant pathogenic yeasts. In this work, new derivatives of phthalocyanine photosensitizers (ZnPPc^{4+} , ZnAmPc^{4+} , $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{+3}$, $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{+3}$, $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{+3}$, AZnPc^+ , AZnPc) were designed and synthesized as possible phototherapeutic agents for *in vitro* inactivation of *Candida albicans*. In solution, these agents have appropriate photodynamic spectroscopic properties. Their values of fluorescence quantum yield (Φ_F) and quantum yield of oxygen (Φ_Δ) are suitable for their location and quantification in a biological environment.

These compounds were evaluated under diverse conditions and the photosensitizer ZnPPc^{4+} has been the most effective against *C. albicans*. This molecule has 4 positive charges attached to the phthalocyanine macrocycle through ether linkages. Its design was based on further movement of the charges and generates better interaction with the cell structure of the organism. In the central region, it has a zinc atom which favors the formation of the triplet excited state and produces increased inactivation in the presence of light for photodynamic effect provided by the sensitizer.

Interaction between cells and phthalocyanines was appropriate for those that presented loads and in turn, this interaction was dependent on the number of loads and their position. The photosensitizer ZnPPc^{4+} generates very fast kinetics binding in short lapses of incubation time (<5 min) and, furthermore, it is concentration dependent and not easy to remove after several washing steps. Photodynamic inactivation studies indicate that the inactivation ZnPPc^{4+} is strongly dependent on the concentration, the irradiation time, the dose of light used and the cell density. This efficiency in PDI was also proved by studies in solid medium, was observed in growth retardation and in the evaluation of its efficiency in the presence of pseudohyphae.

Photodynamic mechanism induced by this phthalocyanine during inactivation was mainly type II, through the participation of singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) as a main reactive species. However, it is not excluded, although to a lesser extent, the contribution of mechanism type I.

Fluorescence microscopy studies revealed that ZnPPc⁴⁺ is localized in the cell envelope level, exerting its full effect from its external structure (membrane and/or cell wall).

Morphological studies showed damage to the cell envelope. Thus, disruption of this structure would be a major cause for the inactivation of *C. albicans*. That is why ZnPPc⁴⁺ is effective to be applied as photosensitizer in solution or on solid media. The presence of positive charges of the tetrapyrrole macrocycle allows a better mobilization of these, a more stable binding and remarkable photoinactivated yeast eradication.

INTRODUCCIÓN

3.1. Generalidades

Los microorganismos desempeñan un papel central tanto en las actividades humanas como en el entramado del conjunto de la vida sobre la tierra. Aunque son las formas más pequeñas de vida, constituyen en conjunto la mayor biomasa sobre el planeta y realizan muchos procesos químicos que son necesarios para otros organismos. Dado que afectan a todas las formas de vida en la tierra, podemos considerar al estudio de los mismos como la base de todas las ciencias biológicas [1].

3.2. Estructura celular

Las células microbianas son capaces de vivir aisladas en la naturaleza y pueden llevar a cabo sus procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción de modo independiente de otras células. Representan la unidad fundamental de la vida, contienen una gran variedad de estructuras químicas y componentes subcelulares. Los estudios de la organización interna de las células pusieron de manifiesto la existencia de dos tipos básicos: procariota y eucariota (Figura 1) [2].

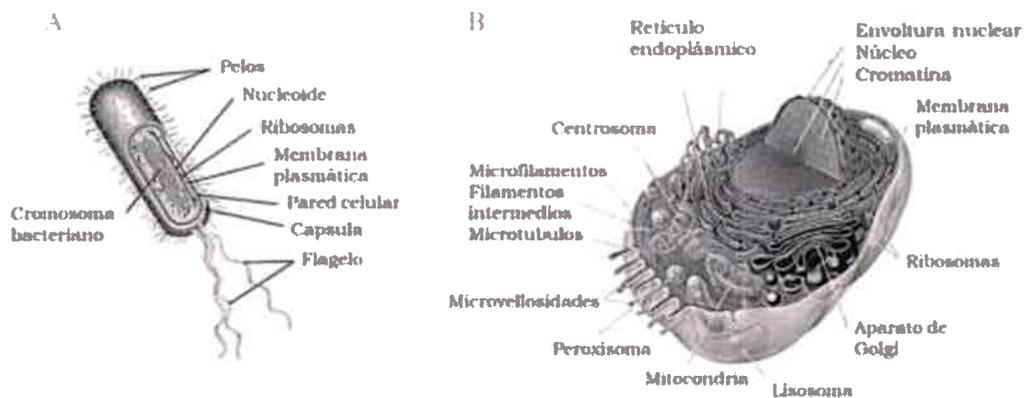


Figura 1. Comparación estructural entre células procariotas (A) y eucariotas (B).

Ambos tipos celulares se encuentran rodeados por una membrana, llamada membrana citoplasmática, la cual forma un compartimento necesario para mantener en correcta proporción los constituyentes internos de la célula y protegerlos de fuerzas externas. Dicha membrana es semipermeable y gracias a ello, las células se consideran estructuras abiertas y dinámicas. Las células eucariotas, a diferencia de las procariotas, contienen normalmente, además del núcleo, otras estructuras internas rodeadas por membrana, como mitocondrias y cloroplastos y poseen

también un citoesqueleto, el cual posee varias funciones claves: provee la estructura celular y actúa como andamiaje para la fijación de varias organelas, es responsable de la habilidad que poseen las células para poder movilizarse y es requerido para la división apropiada de las células. Independientemente de su morfología, las células se encuentran organizadas estructuralmente por una mezcla de cuatro componentes químicos, denominados macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos). La composición química exacta y la disposición de las macromoléculas en los diferentes tipos de células es lo que diferencia a unas de otras, es por ello que podemos decir que todas las células tienen mucho en común, pero que cada tipo es único desde el punto de vista químico.

3.3. Microorganismos eucariotas

Características generales de los hongos

Dentro del dominio Eucarya o Eucariota, perteneciente al Reino Fungi, se encuentran las *algas, hongos y protozoos*. El estudio de los mismos incluye a varias ramas de la biología, en particular, la micología es la ciencia que se ocupa del estudio de los hongos y su importancia se deduce fácilmente de la amplitud y diversidad de este tipo de seres vivos que cuentan con aproximadamente 100.000 especies, entre las cuales hay tanto benéficas como perjudiciales para el entorno humano, en el área de la salud y la producción. Un número reducido son considerados patógenos para animales y plantas [3]. Estos organismos contribuyen a la descomposición de la materia orgánica y participan en los ciclos biológicos. Presentan diferentes formas, desde microorganismos unicelulares de forma redonda u ovalada como las levaduras (colonias lisas) hasta pluricelulares como los hongos filamentosos o mohos. Poseen la habilidad de, no sólo afectar al hombre, sino también a las plantas y a los animales. No presentan diferenciación tisular, poseen un núcleo que contiene varios cromosomas, su membrana citoplasmática es una estructura que reviste gran importancia ya que allí se encuentran las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular, presenta invaginaciones (que se observan como surcos de 200 a 300 nm de longitud, por 35 a 40 nm de espesor) [4,5] y posee una doble capa lipídica. Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y de carbohidratos, aunque estos últimos en menor proporción [6,7].

Los hongos son muy eficientes en censar el entorno en el cual se encuentran y en responder a las señales que promueven su supervivencia. Habitan y se desarrollan mejor en ambientes húmedos, oscuros y ligeramente ácidos (pH= 5) [8].

3.3.1. Pared celular de los hongos

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que da forma a la célula, controla su permeabilidad y la protege de los cambios osmóticos. El número de capas y su morfología varían y esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular en que se encuentran, la forma de crecimiento (como levadura o micelio), la cepa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación [9]. Está compuesta fundamentalmente por polisacáridos y por diversas proteínas. Entre los polisacáridos se destacan la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida que se esquematiza en la Figura 2 [10].

La pared celular constituye una estructura esencial ya que allí se encuentran enzimas extracelulares y su capacidad antifagocítica. Su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica [11]. Además de estas funciones importantes, constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella las adhesinas y un gran número de receptores que tras su activación desencadenan una cascada compleja de señales en el interior de la célula. A su vez, es el primer sitio de interacción con el hospedador, jugando un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica [12-14]. Algunos componentes de la pared son muy inmunogénicos y estimulan un gran número de respuestas celulares y humorales durante la infección. Componentes como los β -glucanos y los mananos, así como los anticuerpos dirigidos contra ellos son de utilidad diagnóstica al detectarse en pacientes con infección fúngica invasora [15].

A diferencia de las bacterias (procariotas), los hongos (eucariotas) presentan variaciones estructurales claras con relación a éstas; sin embargo, por otra parte, presentan muchas similitudes a nivel celular con los animales, plantas y el hombre; de aquí la dificultad para ser combatidos por la mayoría de los tratamientos utilizados convencionalmente. Al igual que las plantas y los animales, contienen en su membrana celular esteroides. Los animales, poseen colesterol, las plantas, entre otros esteroides, presentan β -sitosterol, mientras los hongos sintetizan ergosterol. Esta diferencia en el contenido de esteroides es el blanco de acción de los

antifúngicos. De los tres, el ergosterol es el único que puede transformarse a su peróxido, a través de una reacción llamada foto-oxigenación, en presencia de luz visible y luego este, a otras especies químicas radicalarias. Esto genera la destrucción selectiva de la membrana celular, a través de una especie de envejecimiento acelerado y selectivo, provocado por esta transformación química. Dicha foto-oxigenación se lleva a cabo internamente en la membrana celular de los hongos y genera un cambio en su permeabilidad. Es por ello que la membrana del hongo es el blanco de acción primario de los agentes quimioterapéuticos antimicóticos, que actúan, ya sea fijando ergosterol o bloqueando su biosíntesis. Por lo tanto, las estrategias que alteran o bloquean su biosíntesis afectan la permeabilidad de la membrana celular y la actividad de las enzimas enlazadas a dicha estructura, lo que conduce a la inhibición del crecimiento y posteriormente, a la muerte celular [16].

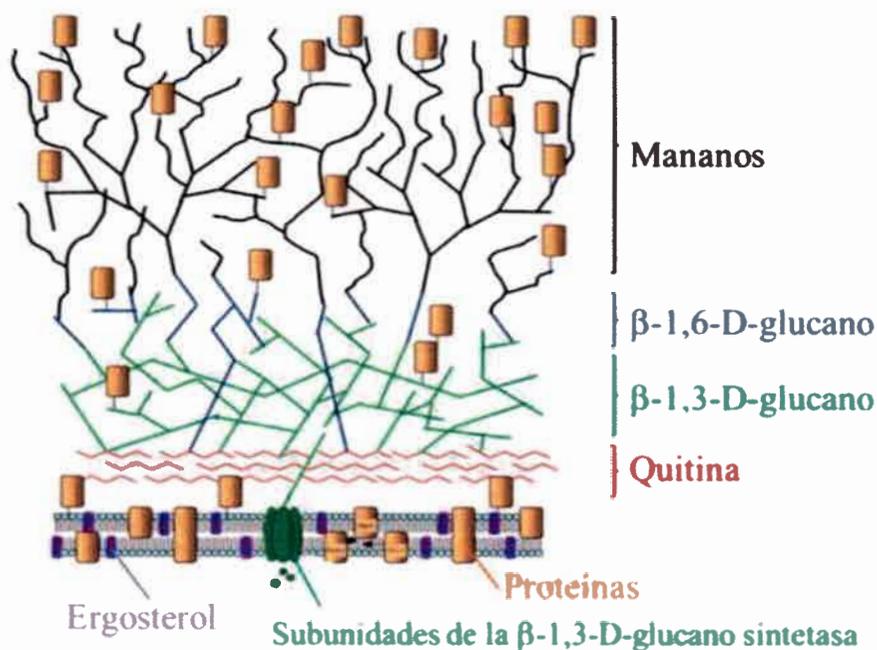


Figura 2. Estructura y componentes de la pared celular fúngica

3.4. Levaduras

Son microorganismos eucariotas y representan la forma unicelular de un hongo. Consta de células ovales o esféricas; se reproducen asexualmente por fisión binaria o por brotes de células hijas (gemación). 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. Durante el proceso de gemación, se origina una yema pequeña que aumenta de tamaño

gradualmente y se separa de la célula madre. Este proceso de división implica la producción de material celular nuevo [3].

3.4.1. Generalidades del género *Candida*

Comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de reproducción en forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular [17]. 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. guillermondi*, *C. parakrusei*, *C. zeylanoides*, *C. stellatoidea* y *C. brumptii* [18].

Unas pocas especies de *Candida* residen como organismos comensales de modo inofensivo dentro de la flora microbiana normal en aproximadamente la mitad de la población mundial. Son oportunistas que se encuentran como comensales en la cavidad bucal, el intestino, la vagina, en la piel del hombre y de ciertos animales, no obstante la capacidad de infección por *Candida* disminuye debido al equilibrio biológico existente con la flora comensal bacteriana. Como tal, las especies de *Candida* son los hongos patógenos más comunes en humanos, causando varias enfermedades desde infecciones de la mucosa superficial hasta desórdenes sistémicos mortales [19-21].

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 temperaturas que oscilan entre 20°C y 38°C. El crecimiento de las colonias se puede detectar entre las 48 y 72 h después de la siembra y los subcultivos pueden crecer más rápidamente. 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 [3].

3.4.2. Generalidades de la especie *Candida albicans*

C. albicans presenta la siguiente clasificación taxonómica: **Reino:** Hongo, **División:** Deuteromycota, **Clase:** Blastomycetes, **Familia:** Cryptococcaceae, **Género:** *Candida*, **Especies:** *albicans* [22].

C. albicans representa un pequeño grupo de hongos, con una gran importancia en micología clínica, debido a que posee la capacidad de generar un crecimiento levaduriforme como así también filamentoso. Esta dualidad fenotípica de la forma celular es conocida como dimorfismo la cual consiste en una interconversión reversible, controlada ambientalmente, de las formas L (levadura) ↔ M (micelio). Generalmente, la forma parasítica presenta un crecimiento levaduriforme a 37°C y la forma saprofítica es filamentosa a 25°C. La morfogénesis fúngica es la adaptación a condiciones ambientales alternativas, es un cambio en el desarrollo de la forma de vida, no es cíclico y es reversible [23]. El dimorfismo como así también la adhesión, la formación de biofilms, la presencia de fosfolipasas, proteasas y elastasas, la competencia con bacterias y la supervivencia en el hospedador (termotolerancia, nutrientes, pH, osmolaridad), entre otros, constituyen factores de virulencia. En la Figura 3 puede visualizarse los mecanismos de patogenicidad de *C. albicans*. Las células pueden adherirse a las superficies celulares a través de la expresión de adhesinas, que al entrar en contacto con las células huésped provocan la transición de la levadura a hifa y generan un crecimiento dirigido a través del tigmotropismo. La invasión permite que el hongo ingrese a la célula huésped a través de una endocitosis inducida. Un segundo mecanismo de invasión incluye la adherencia, fuerzas físicas y secreción de hidrolasas fúngicas para facilitar la penetración activa de los hongos en las células huésped, rompiendo las barreras. La unión de las células de levadura a superficies abióticas (por ejemplo, catéteres) o bióticas (células huésped) pueden dar lugar a la formación de biopelículas con células de levadura en la parte inferior y células filamentosas en la parte superior. La plasticidad fenotípica (conmutación) se ha propuesto para influir en la antigenicidad y la formación de biopartículas de *C. albicans*. Además de estos factores de virulencia, varios rasgos de aptitud (o adaptativos) influyen en la patogenicidad del hongo. Incluyen una respuesta al estrés mediada por proteínas de choque térmico (H_{SP} de sus siglas en inglés); auto-inducción de la formación de hifas través de la captación de aminoácidos, la excreción de amoníaco (NH₃) y la alcalinización extracelular; flexibilidad metabólica y la absorción de diferentes elementos como el carbono (C) y nitrógeno (N) y la absorción trazas de metales esenciales, por ejemplo, hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu) y manganeso (Mn) [24].

C. albicans es un patógeno oportunista, en su mayoría confinado al tracto gastrointestinal, genitourinario y a la piel. Puede causar infecciones en los tejidos mucosos y también es capaz de invadir sistémicamente [25,26]. Su incidencia tanto en infecciones superficiales como invasivas están en continuo crecimiento en todo el mundo debido al incremento en el número

de pacientes inmunocomprometidos, así como la emergencia de cepas resistentes a los tratamientos antimicóticos actuales [27]. Es un organismo comensal que vive normalmente sin causar daño, sin embargo, esta levadura puede crecer de manera incontrolada causando infecciones que van de leves a mortales.

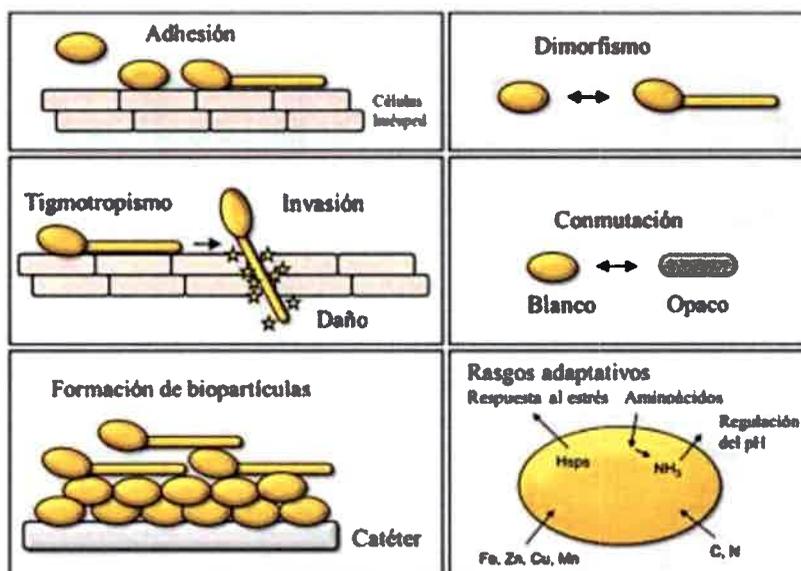


Figura 3. Mecanismos de patogenicidad *C. albicans*.

En general, *C. albicans* no está presente de manera prolongada en la piel sana, excepto en la región perianal [18]. Normalmente estos hongos no causan patología en condiciones normales, ya que existe un balance entre los mecanismos de defensa del hospedador y el potencial invasivo por parte de las levaduras [28]. Frente al tratamiento con antibióticos a largo plazo, se ve comprometido el sistema inmune local y las barreras de defensas, permitiendo que estos hongos puedan llegar a ser patógenos y derivar en el establecimiento de una candidiasis, la cual se puede manifestar de manera superficial o invasiva [29].

La interacción entre *C. albicans* y su hospedador es dinámica y compleja. Este patógeno exhibe estrategias multifacéticas para su crecimiento, proliferación y supervivencia en el hospedador [30]. En tejidos infectados, suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 3 a 5 micras (μm), con paredes finas y también en su forma filamentososa de longitud variable (Figura 4) [31]. Esta transición de levadura a la morfología filamentososa es importante ya que de esta manera se produce la invasión a los tejidos.

Las formas filamentosas son sinónimo de cambio del estado de comensalismo al de parasitismo. Los hechos patogénicos en la infección por *Candida* consisten en la

transformación de un microorganismo comensal en patógeno y la mayor susceptibilidad del huésped a la infección por dicho patógeno. La colonización es la primera fase del proceso y consiste en la adherencia de *Candida* a las superficies mucocutáneas.

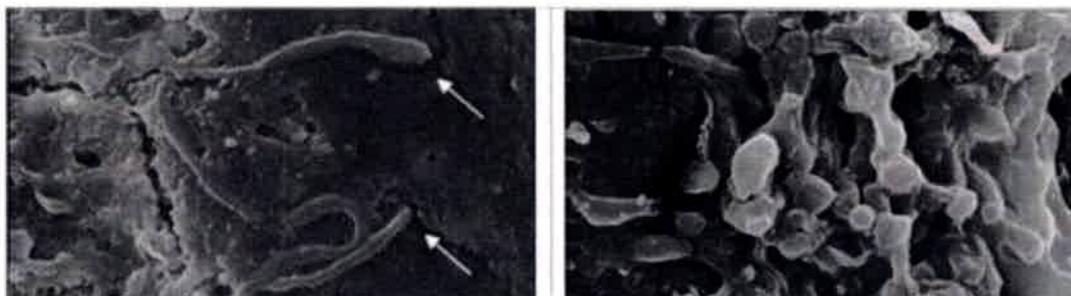


Figura 4. Invasión de *Candida albicans* en su forma levaduriforme y filamentosa. Las flechas blancas indican las hifas generadas durante el proceso infeccioso.

A continuación, se produce la invasión de las mucosas y la producción de respuesta inflamatoria por parte del huésped. Cuando alguno de estos mecanismos está alterado, se produce predisposición a la invasión fúngica. Entre los mecanismos de defensa frente a la infección por *Candida* está el mantenimiento de la integridad mucocutánea, los mecanismos de inmunidad celular, el ritmo adecuado de secreción y composición normal de la saliva, factores de inmunidad local en mucosas e interacciones de la flora microbiana. La especie *C. albicans* es la más común en patología humana y es responsable de más de la mitad de los casos de candidiasis en pacientes hospitalizados [32].

3.5. Enfermedades infecciosas

Uno de los mayores problemas encontrados actualmente en el manejo de las enfermedades infecciosas es el amplio incremento en la resistencia a los antibióticos entre las diferentes especies microbianas [33]. Las enfermedades infecciosas han estado inseparablemente unidas al ser humano a lo largo de la historia, pese a los avances de la ciencia en este campo. Actualmente, son responsables de más de la cuarta parte de las muertes a nivel mundial, especialmente en individuos de edad avanzada o inmunocomprometidos. A pesar de la existencia de tratamientos con antibióticos y vacunas, las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad [34,35].

Los microorganismos (bacterias, hongos, virus y algunos parásitos) pueden generar resistencia a los antimicrobianos tales como antibióticos, fungicidas, antivirales entre otros, de

tal forma que los tratamientos convencionales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten, lo que incrementa el riesgo de propagación. La evolución de las cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se ven expuestos a fármacos antimicrobianos, es por ello que las prácticas inapropiadas para el control de las infecciones propician la propagación de la resistencia. El incremento de dicha resistencia, unido al resurgimiento de enfermedades que se creían controladas o a la aparición de enfermedades nuevas supone una preocupación de primer orden. A su vez, los intercambios poblacionales debidos a las inmigraciones, han modificado las fronteras de determinadas enfermedades y la virulencia de microorganismos habitualmente poco o nada patógenos se ha visto favorecida por un porcentaje considerable de sujetos con inmunosupresión [36].

3.5.1. Infecciones fúngicas

Hasta los años 60 las infecciones fúngicas prevalentes eran las micosis superficiales y las micosis endémicas. Sin embargo, el uso de drogas inmunosupresoras en pacientes trasplantados y el implante de catéteres, trajo aparejado un incremento notable en la frecuencia y gravedad de infecciones fúngicas. Las micosis invasivas representan una amenaza que crece exponencialmente para la salud humana debido a la combinación de un diagnóstico lento y la existencia de pocas clases de fármacos antifúngicos disponibles y efectivos [37]. El uso extensivo e inadecuado de los mismos condujo gradualmente al incremento en la resistencia de los microorganismos de manera generalizada.

En las infecciones fúngicas o micosis hay que considerar dos factores principales: la virulencia del hongo causal y el estado del hospedador. Se llaman hongos patógenos primarios a los que tienen mayor capacidad infectiva y que no dependen del estado del hospedador para penetrar en los tejidos y desencadenar un proceso infeccioso y una respuesta inmunológica. Los hongos que solo pueden ocasionar infecciones en sujetos debilitados y/o inmunodeprimidos, produciendo las llamadas *micosis oportunistas* se denominan hongos oportunistas.

3.5.2. Clasificación de las micosis

Una forma habitual de clasificación de las micosis, tanto sea en el hospedador inmunocompetente como en el inmunodeprimido, es en función de su localización anatómica. Estas 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 en la piel y las 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 interactuar con plantas, animales o seres humanos de múltiples maneras, estableciendo relaciones simbióticas, comensales, latentes o patógenas [38]. Pueden ser específicos, como en el caso de los dermatofitos, causando solo micosis superficiales, o bien ser polivalentes provocando micosis superficiales, micosis profundas localizadas o micosis sistémicas. La levadura *C. albicans* es un ejemplo de esta situación, puesto que puede originar micosis en uñas o la afectación superficial de la mucosa oral; micosis profundas localizadas (absceso, artritis, nefritis) o micosis multisistémicas o diseminadas (septicemia) [39]. Estas patologías provocadas por el hongo generan un aumento en su incidencia asociado a estados de inmunosupresión, enfermedades respiratorias, de la piel, inflamatorias intestinales e invasivas y candidiasis vaginal recurrente.

3.6. Agentes antifúngicos

Agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del hospedador.

Evitar la proliferación de enfermedades fúngicas sigue siendo una tarea ardua para el siglo XXI, es por ello que continúa el desarrollo de antifúngicos nuevos cada vez más potentes. En la síntesis de estos fármacos es muy importante tener en cuenta la relación entre su estructura y función, ya que sobre la base de ello se garantiza la muerte del hongo sin provocar graves daños al organismo hospedador.

Estos fármacos actúan bloqueando el crecimiento del hongo, o bien provocándole la muerte celular mediante distintos mecanismos [40]:

- inhibición de la mitosis
- inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
- inhibición de la síntesis de proteínas

- inhibición de la respiración
- inhibición del metabolismo del fosfato
- inhibición de la síntesis del ergosterol
- disrupción de la membrana plasmática
- inhibición de la síntesis de la pared celular

Existen una gran variedad de sustancias que se utilizan como antimicóticas, clasificándose en función de su estructura química, su sitio de acción (pared celular, membrana citoplasmática o núcleo), su origen sintético (químico o biológico) o su espectro de acción (amplio o restringido). Estos fármacos pueden tener una acción fungistática, si inhiben el crecimiento del hongo y/o fungicida, si provocan la muerte celular [41].

Nuevos agentes antifúngicos han contribuido recientemente al desarrollo de terapias efectivas, sin embargo, una dosis inadecuada puede contribuir a fallas en el tratamiento y a la emergencia de cepas resistentes [42].

3.6.1. Breve reseña histórica sobre los agentes antifúngicos

La síntesis de los fármacos antifúngicos comenzó en el siglo XX y desde entonces no ha cesado el diseño de nuevas moléculas para combatir las infecciones fúngicas invasoras (IFI), las cuales han aumentado sustancialmente en las últimas décadas en relación con la aparición de la epidemia del SIDA, el uso de quimioterapia intensiva en pacientes oncohematológicos, el uso de fármacos antirrechazo en pacientes receptores de trasplantes y la mayor utilización de dispositivos intravasculares [43,44].

A principio de la década de los años cincuenta fueron sintetizados por primera vez los antifúngicos tópicos y sistémicos para el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales, cutáneas o mucosas [45]. A lo largo de los años (Figura 5) se han ido desarrollando fármacos de administración oral, parenteral o tópica con el fin de mejorar su eficacia, su espectro de acción, su tolerabilidad y el tiempo del tratamiento [41].

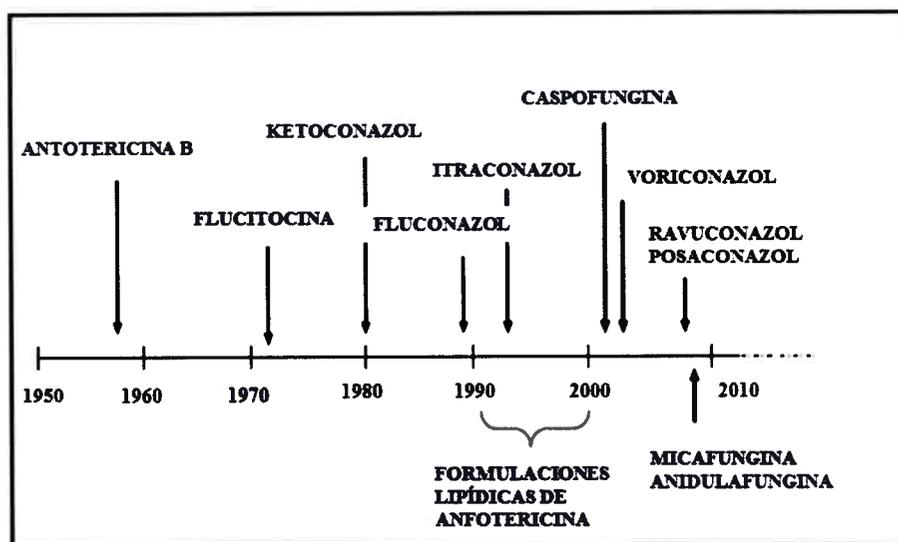


Figura 5. Evolución histórica de los fármacos antifúngicos.

La anfotericina B ha sido tradicionalmente considerada como uno de los antifúngicos de elección en las IFI. Es reconocida su acción fungicida y la posibilidad de administrarlo por vía parenteral. Actualmente, se sigue utilizando en varias micosis endémicas e IFI. Sin embargo, sus efectos secundarios, así como la necesidad por encontrar nuevas moléculas que pudieran emplearse con mayor seguridad tanto por vía intravenosa como por vía oral, hicieron que en 1979 y 1980 se descubrieran los primeros antifúngicos imidazólicos de uso sistémico, el miconazol y el ketoconazol [46,47]. Esto marcó el inicio de una nueva época en el manejo de las infecciones fúngicas. Actualmente, por sus efectos secundarios e interacciones medicamentosas, son reservados para uso tópico. Su posterior modificación química permitió crear la familia de los triazoles en la década de los años noventa, de los cuales, el fluconazol (FLU) y el itraconazol (ITR) fueron la primera generación (Figura 5). Esta nueva familia mantenía el mecanismo de acción, pero tenía un menor efecto sobre los esteroides humanos. Estos medicamentos se han utilizado de manera amplia por su excelente espectro en candidiasis y otras infecciones fúngicas sistémicas, así como por su seguridad y fácil administración [46,47]. Sin embargo, carecían de actividad contra la mayoría de los mohos, patógenos emergentes y de incidencia creciente en los últimos años. Esto hizo que se desarrollara una nueva generación de triazoles, con un mayor espectro de actividad contra mohos y especies de *Candida* resistentes al fluconazol [48], estos son el voriconazol (VOR) y el posaconazol (PSC) aprobados en el 2002 y en el 2006 respectivamente y más recientemente, otros compuestos como ravuconazol e isavuconazol [47].

3.6.2. Mecanismo de acción de los azoles antifúngicos

Los azoles actúan en la inhibición de la enzima dependiente de citocromo P450 lanosterol-14-alfa-demetilasa. Esta enzima forma parte del camino biosintético de esteroides catalizando la conversión de lanosterol a ergosterol, componente vital de la membrana celular de los hongos. A su vez, el bloqueo de esta enzima trae como consecuencia la acumulación de precursores tóxicos (metilesteroides). El resultado es la disrupción de la estructura y normal funcionamiento de la membrana celular, la detención del crecimiento, de la replicación y de la morfogénesis. La alteración en la síntesis de ergosterol causa un daño significativo en la membrana celular al provocar el aumento de la permeabilidad, lo que lleva a la lisis y muerte celular. Sin embargo, a pesar de este mecanismo de acción, los azoles son considerados como fungistáticos a las concentraciones alcanzadas en el ámbito clínico [49]. Como el mecanismo de acción lo ejercen sobre una enzima dependiente del citocromo P450, los azoles pueden inducir cambios en la farmacocinética de otros medicamentos y tener múltiples interacciones medicamentosas e inducir hepatotoxicidad. La inhibición de esta enzima conlleva también a la disminución en la síntesis de testosterona y otros esteroides en mamíferos. Estos efectos fueron especialmente reportados en el tratamiento con ketoconazol, pero no con los triazoles, los cuales tienen menos inhibición hormonal, mejor distribución corporal, menos efectos secundarios gastrointestinales y menos hepatotoxicidad. Los triazoles son medicamentos de concentración y tiempo dependientes y además poseen un efecto posantifúngico prolongado [47].

Durante la última década, se ha presentado un rápido desarrollo de nuevos antifúngicos, esto debido a que las IFI también han venido en ascenso, y problemas como la aparición de nuevos agentes etiológicos, la resistencia a medicamentos, tanto intrínseca como adquirida, son cada vez más comunes. Por esto, la terapia antifúngica cada día es más compleja y es importante conocerla y entenderla para poder brindar un tratamiento más objetivo a los pacientes. Los triazoles hacen parte fundamental del armamento terapéutico antifúngico y el FLU ha sido el más estudiado y ampliamente utilizado, y a la fecha, es el que cuenta con mejor evidencia sobre las características farmacocinéticas y farmacodinámicas [47].

3.6.3. Resistencia a los antifúngicos

Los antifúngicos, al igual que los antibióticos, tienen su principal inconveniente en la resistencia que generan los microorganismos frente a dichos fármacos [50]. La resistencia

antifúngica se da cuando el hongo no es inhibido por el fármaco o solo es inhibido por una concentración de fármaco superior a la que es necesaria para inhibir a los miembros de su misma cepa silvestre. Existen tres tipos de resistencia a los antifúngicos [41]:

- *Resistencia intrínseca*: cuando ningún miembro de una especie es sensible a un antifúngico.

- *Resistencia adquirida primaria*: cuando una cepa de una especie que es sensible al antifúngico tiene una resistencia natural al mismo sin haber estado en contacto con él.

- *Resistencia adquirida secundaria*: cuando una cepa sensible al antifúngico adquiere resistencia al mismo tras haber estado en contacto con él.

Los mecanismos mediante los cuales los hongos pueden generar resistencia a los antifúngicos pueden ser [51]:

- *Destrucción o inactivación del fármaco*: degradación del antifúngico mediante enzimas que lo hidrolizan o bien lo modifican, produciendo una inactivación o disminución de la actividad del fármaco.

- *Alteración de los sistemas de transporte celulares*: este mecanismo puede provocar: a) una modificación de la permeabilidad de la pared mediante mutaciones genéticas que codifican para proteínas de membrana encargadas de regular la entrada del fármaco, resultando una disminución de fármaco internalizado, o bien b) la generación de bombas de eflujo, que se dan cuando se expresan los genes que codifican para proteínas de membrana que regulan la expulsión del fármaco fuera de la célula una vez que ha sido incorporado por el microorganismo.

- *Modificación del blanco de acción*: la actividad del fármaco depende de su afinidad con el sitio de acción, así que esta resistencia se da cuando dicho sitio (metabólico o estructural) se modifica, o disminuye su expresión por mutaciones genéticas y el fármaco no puede realizar su función. De este modo, si no existe la unión para la cual el antifúngico está diseñado pues este pierde su utilidad y eficacia.

- *Disminución de la activación del fármaco*: algunos fármacos son administrados como profármacos y necesitan ser activados por el microorganismo mediante enzimas. Esta resistencia se da cuando la enzima encargada de esta función deja de tener afinidad por el fármaco o bien deja de expresarse.

Mediante alguno de estos mecanismos disminuye la eficacia del tratamiento para erradicar la infección fúngica debido a que la acción del fármaco se ve interrumpida por estas vías de defensa del microorganismo.

Mediante estudios *in vitro* es posible evaluar la eficiencia de distintas técnicas antifúngicas contra especies patógenas para lograr erradicar las micosis. Cuando las infecciones se vuelven resistentes a los medicamentos de primera línea es preciso utilizar otras estrategias para poder combatirlos.

3.7. Tratamiento alternativo: fotosensibilización

La cura de algunas enfermedades por medio de la luz se conoce desde la antigüedad; consistían en prácticas que combinaban la acción de la luz sobre el cuerpo del paciente, sin administrar ningún fármaco fotosensibilizador externo [52]. A finales del siglo XVIII los médicos abordaron científicamente el estudio de los efectos beneficiosos de la exposición solar para el tratamiento de diversas enfermedades.

Las primeras investigaciones científicas sobre fotoquimioterapia fueron los estudios experimentales reportado por Raab hace aproximadamente 100 años, sobre la toxicidad de colorantes de acridina frente al protozario de vida libre *Paramecium caudatum* [52]. Estos trabajos pusieron de relieve la existencia del fenómeno de la fotosensibilización, es decir, la producción de daño celular inducido por la acción combinada de luz y ciertas sustancias fluorescentes. En 1904, von Tappeiner y Jodlbauer relacionaron la fotosensibilización con la presencia de oxígeno y llamaron a este fenómeno "acción fotodinámica" [53].

La inactivación fotodinámica (IFD) surgió hace más de 100 años pero no prosperó debido a la aparición de los antibióticos, ya que se creía que mediante estos compuestos se iba a solucionar la problemática de las infecciones bacterianas. Los primeros estudios de IFD se realizaron en 1970 e involucraron el tratamiento clínico de lesiones virales. Esta práctica finalizó cuando una publicación presentada en *New England Journal of Medicine* indicó que el procedimiento era inefectivo, incluso se pensó que el tratamiento podría desencadenar algún tipo de cáncer [54]. A lo largo de estos años se ha desarrollado la terapia fotodinámica (TFD) [55,56] como una alternativa a la cirugía de carcinomas, teniendo como límite la capacidad de penetración en la piel, motivo por el cual la hace inefectiva en el tratamiento de tumores invasivos. La TFD es una técnica terapéutica que mediante irradiación con luz visible sobre el tejido a tratar produce la excitación de un fotosensibilizador (FS), endógeno o exógeno, que en presencia de oxígeno molecular produce la muerte celular. Después de la absorción de luz, el FS excitado puede retornar a su estado fundamental mediante colisiones con el oxígeno, generando especies reactivas del oxígeno (ROS) como el (1O_2). Esta cascada de reacciones fotoquímicas actúan directamente sobre las células produciendo daño tisular, o bien de forma

indirecta sobre el sistema produciendo daño vascular, la desestabilización de la matriz extracelular o un proceso inflamatorio. Los procesos por los cuales se da la muerte celular son la apoptosis, si el FS ha sido acumulado en la mitocondria, o bien la necrosis, si el FS ha sido acumulado en la membrana plasmática. Estos procesos fotocitotóxicos ocurren en función de las propiedades físico-químicas del FS y su distribución intracelular [53].

A 100 años de su descubrimiento los avances en el campo de la IFD, conocida también como terapia fotodinámica antimicrobiana, fotosensibilización letal, desinfección fotoactivada (PAD) o quimioterapia fotodinámica antimicrobiana (PACT), han sido más bien lentos. En la actualidad, con el creciente incremento de la resistencia de bacterias y hongos a los antibióticos y antifúngicos en el mundo entero, se ha renovado el interés en las terapias antimicrobianas alternativas y es en este momento cronológico en el que se retoma la IFD como técnica antimicrobiana. Desde entonces, ha ido incrementando el interés por el desarrollo de tratamientos de infecciones locales, enfatizando sobre el tipo de fotosensibilizador a utilizar y su estructura [54].

La IFD conceptualmente no difiere de la TFD del cáncer, ya que tiene como fundamento fotooxidar las biomoléculas indispensables para la integridad celular. Sin embargo, existen diferencias entre estas dos técnicas: los tipos de FS utilizados y los blancos de acción. La IFD es una modalidad que se utiliza para el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos patógenos, como por ejemplo los dermatofitos y algunas especies de levaduras, como las del género *Candida* [57].

3.7.1. Inactivación fotodinámica

Una de las metodologías de gran interés en las últimas décadas es la IFD que proporciona una alternativa a los fármacos antifúngicos utilizados en los tratamientos clásicos actuales. La IFD combina la acción de la luz y un agente FS en presencia de oxígeno para desencadenar la acción antifúngica. Ha sido propuesta como una modalidad alternativa para combatir microorganismos patógenos, como así también para controlar las enfermedades causadas por hongos [58,59]. Una de las grandes ventajas es que posee selectividad dual, ya que el efecto fotodinámico se produce cuando el sensibilizador y la luz se encuentran simultáneamente en el mismo sitio de acción. La IFD aprovecha con fines terapéuticos las reacciones fotoquímicas originadas de la interacción del agente FS, la luz y el oxígeno. Está basada en la administración de un FS, sobre un foco localizado de infección, el cual es acumulado preferencialmente en la célula microbiana. Este procedimiento consta de dos fases; la primera consiste en la

fotosensibilización de las células, la cual puede lograrse administrando agentes exógenos por vía tópica (ftalocianinas, porfirinas, etc.) y la segunda fase involucra la activación del FS en presencia de oxígeno, mediante luz de longitud de onda adecuada dirigida contra el blanco terapéutico produciendo específicamente daños en la célula que, consecuentemente, inactiva a los microorganismos (Figura 6) [60].

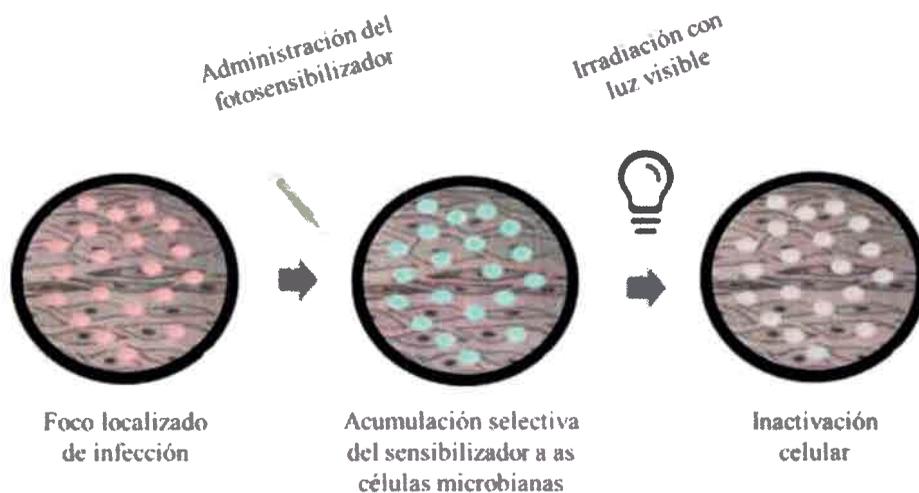


Figura 6. Inactivación fotodinámica de células fúngicas (ilustrativo)

La exposición a la luz visible origina especies reactivas, las cuales generan una cascada de eventos bioquímicos que conducen a la muerte celular. La efectividad del tratamiento fotodinámico depende de las características y cualidades físico-químicas del FS los cuales no deben ser tóxicos en la oscuridad y en presencia de luz visible deben evitar efectos de genotoxicidad y mutagenicidad. A continuación se muestran los requisitos más importantes que debe caracterizar a un FS idóneo para IFD:

- 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) (Figura 7) para lograr una adecuada penetración de la luz en los tejidos.
- Energía del estado triplete apropiada ($E_T > 95$ kJ/mol) para poder transferir eficientemente la energía al estado fundamental del oxígeno [61].
- Estado excitado triplete con un tiempo de vida largo para producir oxígeno molecular singlete (1O_2) eficientemente ($\tau_T > 1$ μ s) [52,83].

- Toxicidad mínima en la oscuridad.
- Rápida eliminación del tejido sano [62,63].

Estas características fotofísicas varían no sólo con los sustituyentes de los FS sintetizados, sino también con la formación de complejos con metales, tales como paladio, zinc, cobre y cadmio [64,65].

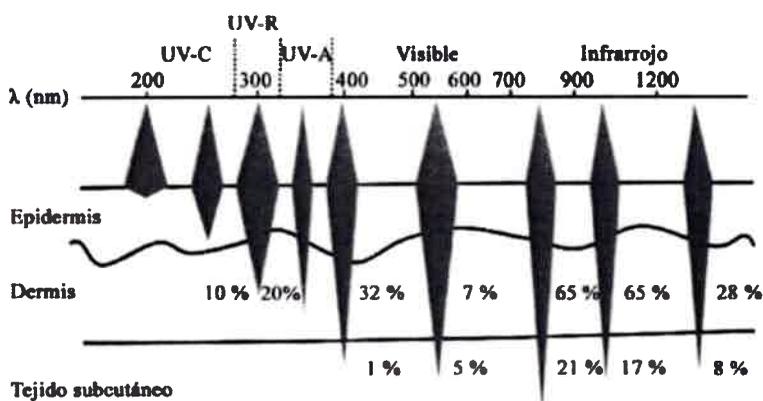


Figura 7. Esquema que representa los diferentes rangos de profundidad de penetración en correspondencia con la longitud de onda de la radiación aplicada sobre la piel [66].

Mediante IFD pueden ser tratadas clínicamente un amplio espectro de infecciones localizadas (Figura 8) [67].

Los estudios fotodinámicos *in vitro* se realizan en modelos que mimetizan el microambiente de la posible infección clínica, encontrándose ensayos en modelos celulares o proteicos [68], modelos en sangre [69,70], modelos en piel [71]. Sin embargo, los modelos *in vivo* se asemejan más a la infección real, realizándose ensayos en modelos animales donde se simulan infecciones en heridas [72], infecciones bucales o dentales [73], leishmaniasis [74], infecciones por micobacterias [75], otitis [76] u osteomielitis [77].

Los FS antimicrobianos deben ser capaces de inactivar o provocar la muerte celular de múltiples clases de células microbianas a concentraciones relativamente bajas, con tiempos de irradiación cortos y presentar una selectividad elevada hacia las células microbianas [78]. La IFD presenta muchas características favorables para el tratamiento de infecciones originadas por microorganismos patógenos e incluye un espectro de acción muy amplio (Figura 9).

Muchos efectos biológicos útiles pueden ser obtenidos aplicando como fotosensibilizadores herbicidas [79,80], insecticidas [81,82], antibacterianos, antimicóticos y

antivirales [83,84]. Los mismos se utilizan para la esterilización de agua, fluidos biológicos y sangre contaminada con microorganismos patógenos [,86].

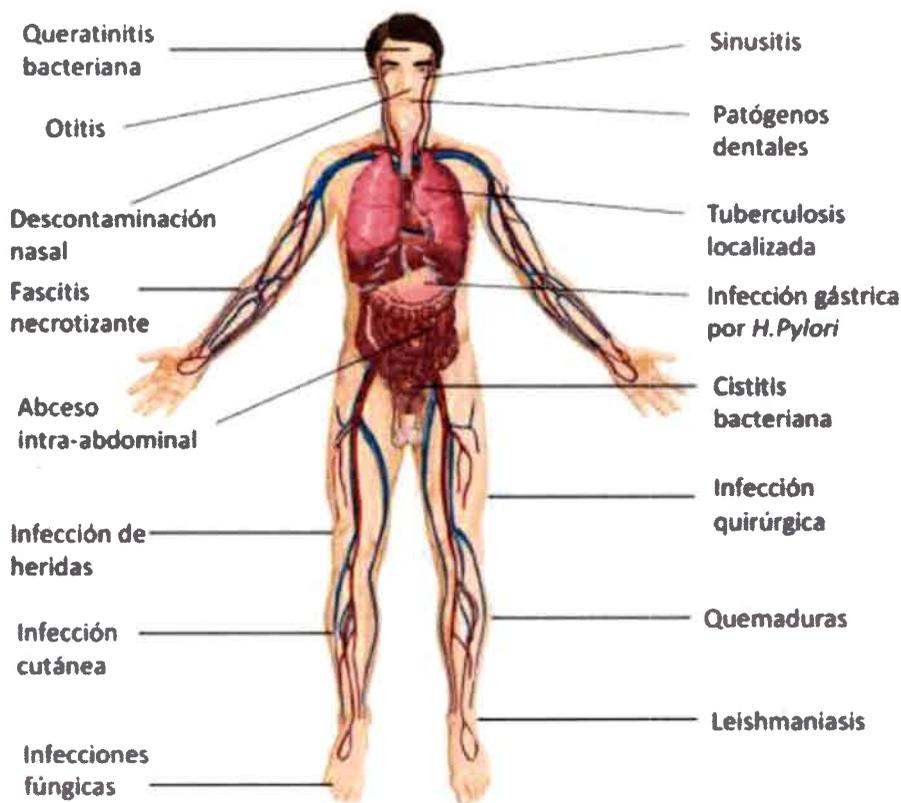


Figura 8. Infecciones que podrían combatirse mediante la IFD.

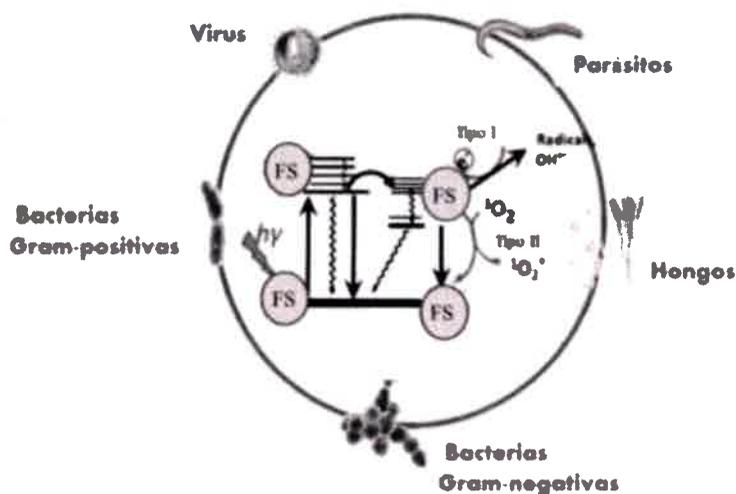


Figura 9. Diagrama de Jablonsky. Eficiencia en la IFD sobre múltiples células microbianas.

3.7.2. Mecanismo de acción

Para que una molécula actúe como un FS eficiente, debe poseer la habilidad de absorber la luz visible, producir estado excitado triplete y luego transferir su energía eficientemente al oxígeno molecular.

La absorción de un fotón es capaz de excitar al FS hacia un estado excitado singlete y desde allí convertirse a su estado excitado triplete con un tiempo de vida más largo. Desde allí puede reaccionar con moléculas de oxígeno produciendo ROS o interactuar con otras biomoléculas produciendo radicales libres a través de dos caminos complementarios.

El proceso por el cual la combinación de un FS, la luz y el oxígeno resulta en un daño biomolecular se ilustra en la Figura 10. Básicamente dos mecanismos pueden ocurrir después de la fotoactivación del FS, los cuales son considerados los principales implicados en el fotodaño celular [83,87]. En ambas reacciones el FS en estado basal $^1\text{FS}_0$ es excitado por la absorción de luz a un estado excitado singlete de mayor energía $^1\text{FS}_1^*$ o $^1\text{FS}_2^*$, seguido de un entrecruzamiento de sistema (ICS) a un estado excitado triplete $^3\text{FS}_1^*$ desde $^1\text{FS}_1^*$. La energía del FS excitado puede ser disipada por procesos radiativos de fluorescencia (F) desde $^1\text{FS}^*$ o fosforescencia (P) desde $^3\text{FS}^*$ o por un decaimiento térmico (IC) desde cualquiera de los dos estados. El estado $^3\text{FS}^*$ puede reaccionar con un sustrato (RH), tal como una biomolécula, formando radicales libres a través de una transferencia de electrones o protones; mecanismo tipo I, (Figura 10). La mayoría de estos radicales reacciona instantáneamente con oxígeno para generar una compleja mezcla de ROS, tales como el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Por otro lado, en las reacciones correspondiente al mecanismo tipo II la energía de $^3\text{FS}^*$ es transferida al oxígeno molecular en estado basal ($^3\text{O}_2$) para formar $^1\text{O}_2$ (Figura 10). Estas especies reactivas son capaces de oxidar a biomoléculas tales como aminoácidos, nucleótidos y lípidos insaturados induciendo a la muerte celular [88]. Los efectos funcionales de los fotosensibilizadores incluyen la inactivación de enzimas, proteínas y la peroxidación de lípidos conduciendo a la lisis de la membrana, los lisosomas y las mitocondrias [89].

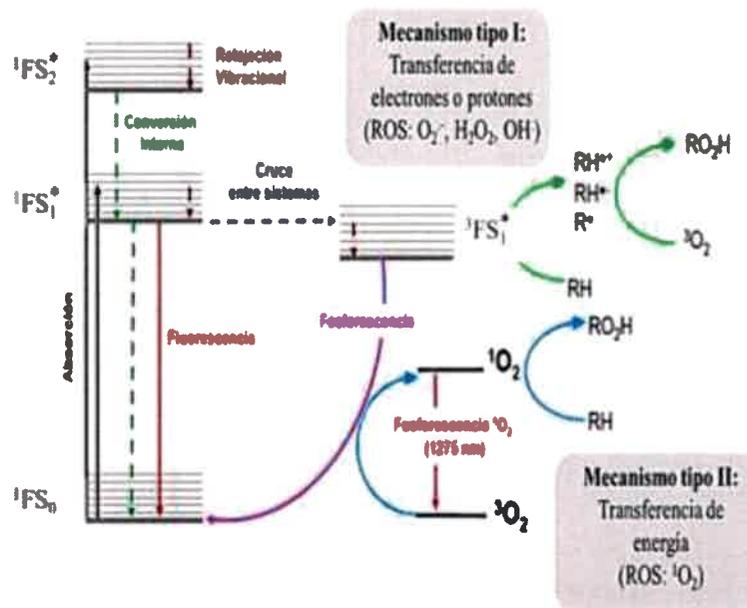


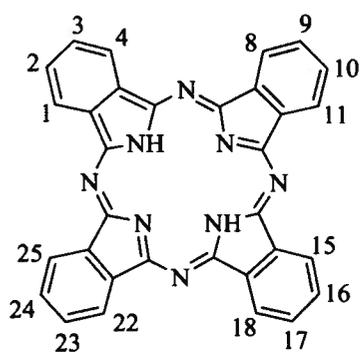
Figura 10. Procesos fotoquímicos involucrados en el efecto fotodinámico y sus mecanismos.

Ambos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente y la relación entre ambos procesos depende principalmente del FS, del sustrato y de la naturaleza del medio [90]. Sin embargo, en condiciones aeróbicas es aceptado que el ¹O₂ es la principal especie responsable de la inactivación celular [91,92].

Se ha observado que el mecanismo tipo II juega un rol importante en los procesos de IFD en *Escherichia coli* mediante porfirinas catiónicas [93], en la fotoinactivación de *Streptococcus mitis* inducida por una ftalocianina catiónica [94], en la fotoinactivación de bacteriófagos por fotosensibilizadores catiónicos [95]. En levaduras, la muerte celular de *C. albicans* con porfirinas y ftalocianinas catiónicas, esta mediada principalmente por ¹O₂ [96,97]. Además, otras ROS pueden estar involucradas en los fotoproductos responsables de la toxicidad [98,99].

3.7.3. Ftalocianinas

Una familia de fotosensibilizadores muy interesante son las ftalocianinas. Estos compuestos son tetrabenzotetraazaporfirinas, es decir que las cuatro unidades de isoindol se encuentran unidos entre sí por nitrógenos azometino para formar un macrociclo altamente simétrico con 18 electrones π aromáticos (Esquema 1).



A



B

Esquema 1. Representación e imágenes en tres dimensiones del macrociclo de una ftalocianina.

A) Frente, B) Perfil

3.7.3.1. Características espectroscópicas y fotoquímicas

El espectro de absorción de estos compuestos está caracterizado por dos regiones, una banda en la zona de 350 nm (banda *Soret*) y otra banda muy intensa (banda *Q*, $\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) entre los 600-700 nm, en la región denominada ventana fototerapéutica (Figura 11).

Las ftalocianinas presentan emisión de fluorescencia en la región roja del espectro visible con rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de $\sim 0,2$ [89]. La importancia de estos compuestos como agentes fototerapéuticos deriva de su alto rendimiento de $^1\text{O}_2$, además son estables y de baja toxicidad [100]. Los efectos más importantes para esta aplicación medicinal, es lograr una selectividad alta del fotosensibilizador por los microbios, para no causar daño al organismo hospedador, sumado a una efectividad o eficiencia elevada, para evitar el resurgimiento de la infección por parte de unos pocos microorganismos sobrevivientes [101].

Derivados de ftalocianinas y porfirinas han sido investigados para las aplicaciones de IFD en tratamientos y control de levaduras [102]. Así, el interés en este campo y la necesidad de encontrar nuevas moléculas con mejores características para la IFD es debido a la amplia variedad de aplicaciones terapéuticas.

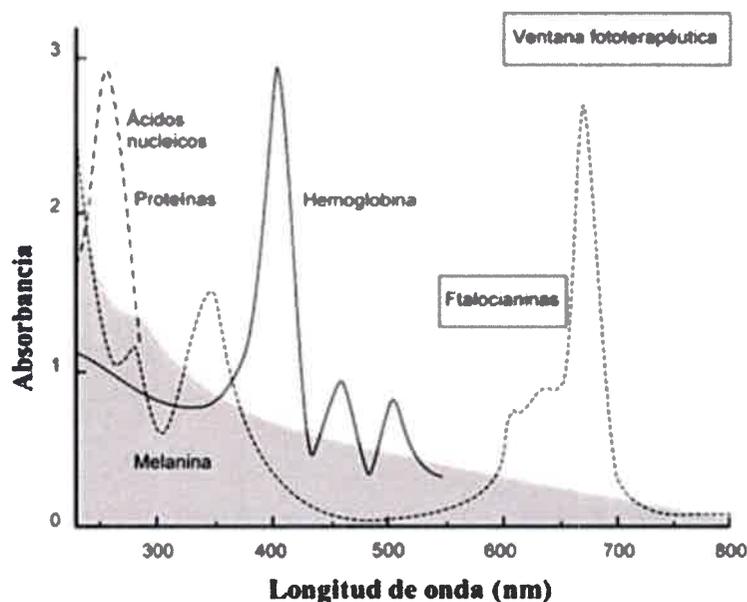


Figura 11. Espectro de absorción de las ftalocianinas

La eficiencia del proceso de fotoinactivación es marcadamente más pronunciada cuando se usan agentes que mejoren la penetración en el interior celular. Las ftalocianinas catiónicas generan un efecto fotodinámico más efectivo que sus contrapartes aniónicas o neutras. Estudios llevados a cabo en distintos microorganismos indicaron que las ftalocianinas zinc (II) tetrakis (3-metilpiridiloxi) ftalocianina (ZnPcMe), zinc (II) tetrakis (4-sulfofenoxi) ftalocianina (ZnPcS) poseen distintos efectos frente a la IFD, siendo el FS catiónico ZnPcMe el que generó una mayor inactivación [103]. Es importante destacar que las ftalocianinas son estables, de baja toxicidad y poseen un alto rendimiento en la producción de $^1\text{O}_2$ [104].

3.8. Principios generales de la fotosensibilización de los hongos

Actualmente se conoce que los fotosensibilizadores catiónicos son más eficientes que sus contrapartes neutras o aniónicas en la IFD de las células microbianas [105] y el proceso de fotoinactivación es marcadamente más pronunciada cuando se utilizan agentes que mejoren la penetración del sensibilizador en el interior de la célula. Estudios anteriores han demostrado que las ftalocianinas catiónicas son fotosensibilizadores eficaces contra los hongos [105].

La región del espectro visible usado para activar el fotosensibilizador 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 sensibilizadores 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 sensibilizadores 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 [106].

HIPOTESIS DE TRABAJO

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

OBJETIVOS

5.1. Generales

Estudiar nuevos agentes fotosensibilizadores derivados de ftalocianinas para la inactivación fotodinámica de levaduras.

5.2. Específicos

- a) Determinar las características espectroscópicas de absorción y de fluorescencia de las ftalocianinas en solución.
- b) Establecer las condiciones óptimas de cultivo de la levadura *C. albicans*, en medios líquidos como suspensiones celulares y sobre superficies creciendo como colonias.
- c) Determinar la unión de los FS (ZnPPc^{4+} , ZnAmPc^{4+} , AZnPc , AZnPc^+ , $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$) a las células de *C. albicans* bajo distintas condiciones: densidades celulares, tiempos de incubación, lavados, concentraciones, temperaturas y presencia de inhibidores metabólicos.
- d) Evaluar el efecto de una mínima incubación y de la dosis de irradiación en la IFD de la levadura.
- f) Estudiar la IFD de *C. albicans* bajo diferentes condiciones: densidades celulares, lavados, concentraciones, sobre superficies, analizando el efecto del retardo del crecimiento y su eficiencia *in vitro* utilizando *C. albicans* creciendo como pseudohifa.
- g) Estudiar la formación de estado excitado triplete en solución y en presencia de células de *C. albicans*.
- h) Establecer el mecanismo principal de acción fotodinámico en la IFD.
- i) Determinar la producción de $^1\text{O}_2$ y de radical anión superóxido (O_2^-) en las células de *C. albicans* fotosensibilizadas por ZnPPc^{4+} en presencia de moléculas prueba.
- j) Analizar mediante microscopía confocal de fluorescencia la distribución intracelular de ZnPPc^{4+} .
- k) Analizar por electroforesis la integridad del ADN en las células de *C. albicans* fotoinactivadas con ZnPPc^{4+} .
- l) Evaluar mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) el daño a los componentes celulares de *C. albicans* causado por el tratamiento fotodinámico.

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. Se trabajó a una temperatura de $25,0 \pm 0,5$ °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 radiómetro (Radiometer Laser Mate-Q, Coherent) (Santa Clara, CA, EEUU). Los estudios de microscopía en campo claro fueron realizados con un microscopio (Axiostar plus Carl Zeiss) (Jena, Alemania). En los ensayos biológicos fueron utilizados caldo Sabouraud (CS, Britania, Buenos Aires, ARG), agar-agar (Britania, Buenos Aires, Argentina) y cajas de Petri (10 y 5 cm de diámetro) descartables. Los medios de cultivos fueron esterilizados en autoclave (All America 25x-2, Manitowoc, EEUU) a 20 psi ~ 115 - 121 °C durante 20 min.

Azida sódica, manitol y agua deuterada (D_2O) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Missouri, EEUU) y dodecilsulfato de sodio (SDS) en Cicarelli (Santa Fe, Argentina).

6.1.2. Fotosensibilizadores

De acuerdo al procedimiento de síntesis utilizado, el macrociclo de las ftalocianinas fue obtenido como una mezcla de los correspondientes regioisómeros. La ftalocianina $ZnPPc^{4+}$ (yoduro de zinc(II)2,9,16,23-tetrakis[4-(*N*-metilpiridiloxi)]ftalocianina), fue sintetizada mediante la reacción de ciclotetramerización a partir de 4-[4-piridiloxi]ftalonitrilo [104]. El compuesto $ZnAmPc^{4+}$ (yoduro de zinc(II)2,9,16,23-tetrakis[4-(*N,N,N*-trimetilamino)]ftalocianina) fue obtenido a partir de 4-(amino)ftalonitrilo, siguiendo el procedimiento establecido previamente [104]. $AZnPc$ (Zinc(II) 2-[4-piridiloxi]ftalocianina) fue obtenida mediante la reacción de expansión del anillo de cloruro de boro(III)subftalocianina con 4-[4-piridiloxi]ftalonitrilo. $AZnPc^+$ (yoduro de Zinc(II)2-[4-(*N*-metilpiridiloxi)]ftalocianina) fue obtenida mediante la metilación exhaustiva de $AZnPc$ con yoduro de metilo [107]. Las ftalocianinas, AN_3ZnPc^{3+} (zinc(II) 2-[2-(1-adamantil)etoxi]-9(10),16(17),23(24)-

tris(*N,N,N*-trimetilamonio)ftalocianina), TN_3ZnPc^{3+} (zinc(II) 2,3-[2'-tert-butyl-1',3'-butadienil]-9(10),16(17),23(24)-tris(*N,N,N*-trimetilamonio) ftalocianina) y FN_3ZnPc^{3+} (zinc(II) 1,2,3,4-[tetrafluoro]-9(10),16(17),23(24)-tris(*N,N,N*-trimetilamonio)ftalocianina), fueron sintetizadas a partir de la reacción de expansión del anillo de cloro [2,9,16(17)-trinitrosubftalocianinato] boro(III) con el correspondiente ftalonitrilo, seguido por la reducción de los grupos nitro con NaS_2 y metilación exhaustiva con $(CH_3)_2SO_4$ [108]. $ZnPc$ (zinc(II)ftalocianina) fue adquirida en Aldrich. $ZnPyPz$ (zinc(II)tetrametiltetrapiridino2,3-b:2',3'-g:2'',3''-l:2''',3'''-q]porfirazinio) fue obtenida siguiendo la metodología previamente descrita [109].

Las soluciones de los FS fueron realizadas a partir de una solución stock (~ 0,5 mM) por dilución de la muestra sólida en 2 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF). Las concentraciones de estas soluciones fueron determinadas por espectroscopia, teniendo en cuenta el valor del coeficiente de absorbtividad molar (ϵ).

6.2. Métodos

6.2.1. Sistemas de irradiación

La irradiación fue realizada con un proyector de diapositivas Novamat 130 AF equipado con una lámpara de halógeno de 150 W dispuesto en diferentes configuraciones, según el experimento, como se puede observar en la Figura 12.

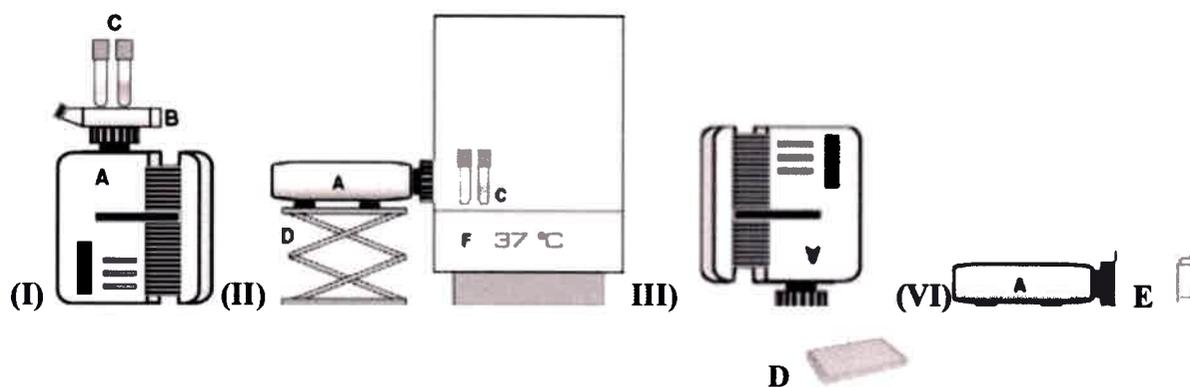


Figura 12. Diferentes arreglos de irradiación utilizados para las distintas metodologías empleadas: I) Fotosensibilización de suspensiones de *C. albicans* en PBS. (II) efecto sobre el crecimiento III) Sitios de acción de $ZnPPc^{4+}$. VI) Mecanismo de acción fotodinámico. A: proyector. B: filtro de agua. C: muestras. D: policubeta. E: celda de cuarzo para espectroscopia

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 [110]. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento fue de 30 mW/cm². El efecto fotosensibilizador durante la curva de crecimiento fue realizado con el arreglo II, el cual permite mantener la temperatura de incubación. Los posibles sitios de acción del fotosensibilizador y el efecto del mismo sobre la estructura intracelular y el daño estructural fueron realizados con el arreglo III, donde fueron utilizadas policubetas (multiwell) Deltalab constituidas por 96 pocillos estériles, para poder utilizar una densidad celular mayor ya que este arreglo permite que la luz llegue mejor hacia todas las células. El arreglo VI fue utilizado para determinar la producción de ¹O₂ y O₂⁻.

6.2.2. Caracterización de la cepa fúngica

Una 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 [111]. La primera caracterización del cultivo fue basada sobre las características de las colonias (pigmentación y forma), su modo de reproducción vegetativa, la formación de hifas o 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, France), el cual es un sistema estandarizado para la identificación de levaduras que se basa en la asimilación de carbohidratos [112]. 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. 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 ~10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC)/mL.

Un alícuota (1 mL) del cultivo fue aseptícamente transferida a 3 mL de PBS. Las células fueron centrifugadas (3000 revoluciones por minuto (rpm) por 15 min) y resuspendidas en 4 mL de PBS (~ 1x10⁷ UFC)/mL). A partir de ésta suspensión de ~10⁷ UFC/mL, las células fueron diluidas apropiadamente en PBS, correspondiendo a ~ 1x10⁶ UFC/mL. En todos los experimentos, 2 mL de la suspensión celular se transfirió a

tubos tipo Pyrex (13x100 mm) y se adicionó el FS a partir de una solución stock del sensibilizador (~ 0,5 mM) en DMF. Para evaluar la viabilidad celular de *C. albicans*, fueron realizadas diluciones seriadas y alícuotas de 100 μ L 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/mL.

6.2.3. Estudios *in vitro*

Los estudios realizados con las distintas ftalocianinas permitieron determinar la eficiencia de cada una de ellas frente a la IFD de *C. albicans* aplicando distintas metodologías, que llevaron a la identificación de los FS mas efectivos para una adecuada fotosensibilización.

6.2.3.1. Inactivación fotodinámica de células de *C. albicans*

Suspensiones celulares de *C. albicans* (2 mL, ~ 1×10^6 UFC/mL) en PBS fueron incubadas con 5 y 10 μ M de ZnPPc⁴⁺, ZnAmPc⁴⁺, AZnPc y AZnPc⁺ durante 30 min en la oscuridad a 37°C. Luego, los cultivos fueron expuestos por 30 min a luz visible. Por otro lado, para determinar la eficiencia de los FS tricatiónicos, las suspensiones celulares de *C. albicans* (2 mL, ~ 1×10^6 UFC/mL) en PBS fueron incubadas con 10 μ M de AN₃ZnPc³⁺, FN₃ZnPc³⁺ y TN₃ZnPc³⁺ durante 30 min en la oscuridad a 37°C. Luego, los cultivos fueron expuestos por diferentes intervalos de tiempo (15 y 30 min) a luz visible. Por último, los cultivos celulares fueron incubados con FN₃ZnPc³⁺ bajo distintas concentraciones (1, 5 y 10 μ M) durante 30 min en la oscuridad a 37°C y luego expuestos a la luz visible durante 15 y 30 min. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento fue de 30 mW/cm² en el intervalo de 600 a 700 nm.

6.2.3.2. Unión celular *in vitro* a las células de *C. albicans*

Suspensiones de *C. albicans* (2 mL, ~ 10^6 UFC/mL) en PBS fueron incubadas en la oscuridad a 37°C con ZnPPc⁴⁺ 5 y 10 μ M y ZnAmPc⁴⁺ (10 μ M) a diferentes tiempos (15, 30 y 60 min). Los cultivos fueron centrifugados (3000 rpm por 15 min) y resuspendidos en 2 mL de solución acuosa de dodecilsulfato sódico (SDS) al 2 % p/v. La concentración del sensibilizador en el sobrenadante fue medida por

espectrofluorometría ($\lambda_{exc}=670\text{nm}$, $\lambda_{em} =684\text{nm}$). Los valores de fluorescencia obtenidos de cada muestra fueron referidos al número total de células contadas en la suspensión. Para ZnPPc^{4+} , la concentración del sensibilizador en la muestra fue estimada por comparación con una curva de calibración obtenida con soluciones estándar del sensibilizador en SDS al 2 %, Figura 13 (pendiente= $2,91 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$).

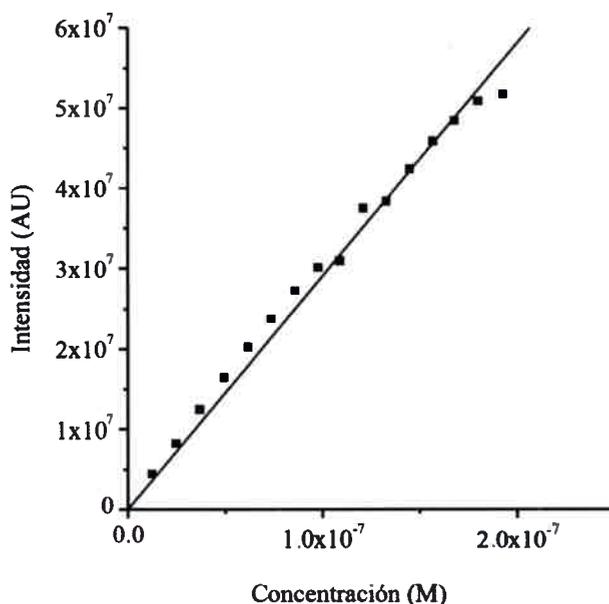


Figura 13. Curva de calibración de ZnPPc^{4+} en SDS al 2 % ($\lambda_{exc} = 670\text{nm}$, $\lambda_{em} = 684 \text{ nm}$).

Suspensiones celulares de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas en la oscuridad a 37°C con $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ a distintas concentraciones (1, 5 y $10 \mu\text{M}$) del FS a diferentes tiempos (2,5; 5; 15 y 30 min). Los cultivos fueron centrifugados (3000 rpm por 15 min) y resuspendidos en 2 mL de solución acuosa de SDS al 2% p/v. La concentración del sensibilizador en el sobrenadante fue medida por espectrofluorometría ($\lambda_{exc}=670\text{nm}$, $\lambda_{em} =684\text{nm}$). Los valores de fluorescencia obtenidos de cada muestra fueron referidos al número total de células contadas en la suspensión. La concentración del sensibilizador en la muestra fue estimada por comparación con una curva de calibración obtenida con soluciones estándar del sensibilizador en SDS al 2% Figura 14 (pendiente: $2,7 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$).

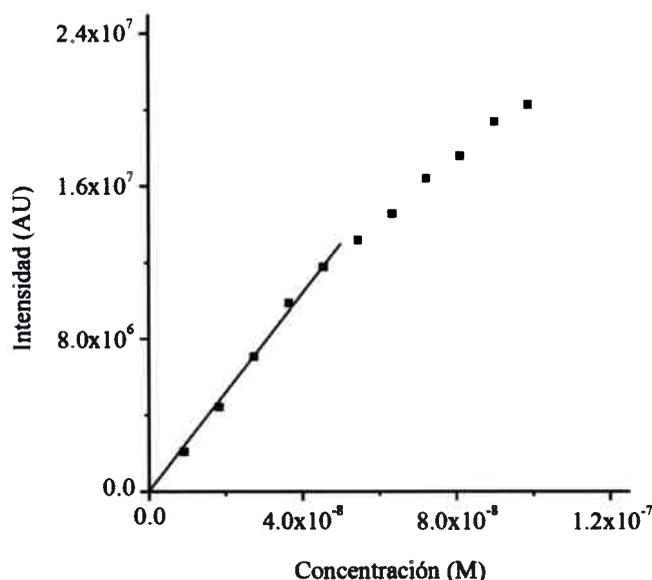


Figura 14. Curva de calibración de FN₃ZnPc³⁺ en 2% p/v SDS ($\lambda_{exc} = 670 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 684 \text{ nm}$)

6.2.3.3. Efecto del fotosensibilizador sobre 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 medio fresco Sabouraud. La suspensión fue homogenizada y alícuotas de 2 mL fueron incubadas a 37 °C con ZnPPc⁴⁺ a concentraciones de 5, 10 y 20 μM y AN₃ZnPc³⁺, FN₃ZnPc³⁺ y TN₃ZnPc³⁺ a una concentración de 10 μM a 37°C. El crecimiento de los cultivo fue medido por turbidez leyendo absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro Tuner SP-830. Luego, los cultivos fueron expuestos por diferentes intervalos de tiempo a luz visible. El dispositivo utilizado fue descrito en la Figura 12 II.

6.2.4. Unión celular de ZnPPc⁴⁺

6.2.4.1. Unión del fotosensibilizador a las células de *C. albicans* y aplicación de lavados sobre las células tratadas

Suspensiones de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas en la oscuridad a 37°C con ZnPPc⁴⁺ 5 y 10 μM a diferentes tiempos (15, 30 y 60 min). Los cultivos fueron centrifugados (3000 rpm por 15 min) y resuspendidos en 2 mL de SDS

al 2 %. También se determinó la unión del fotosensibilizador en cultivos a los que se les realizó 1 y 2 lavados. Cada lavado consistió en la centrifugación (3000 rpm por 15 min) del cultivo y la resuspensión del pellet en 2 mL de PBS. Luego, fueron incubadas durante la noche a 4°C y sonicadas durante 30 min.

6.2.4.2. Unión del fotosensibilizador frente a distintas densidades celulares

Suspensiones de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^7$ y 10^8 UFC/mL) en PBS fueron incubadas en la oscuridad a 37°C con ZnPPc⁴⁺ 5 y 10 μ M a diferentes tiempos (15 y 30 min). Los cultivos fueron centrifugados (3000 rpm por 15 min) y resuspendidos en 2 mL de solución acuosa de SDS al 2 %. La concentración del sensibilizador en el sobrenadante fue medida por espectrofluorometría (λ_{exc} =670nm, λ_{em} =684nm). Los valores de fluorescencia obtenidos de cada muestra fueron referidos al número total de células contadas en la suspensión.

6.2.4.3. Unión celular a distintas concentraciones del fotosensibilizador

Suspensiones celulares de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas en la oscuridad a 37°C con 1, 5 y 10 μ M del fotosensibilizador a diferentes tiempos (2,5; 5; 15 y 30 min). Los cultivos fueron centrifugados (3000 rpm por 15 min) y resuspendidos en 2 mL de solución acuosa al 2% de SDS donde se cuantifica el FS.

6.2.4.4. Unión a distintas temperaturas y en presencia de inhibidores metabólicos

La unión del fotosensibilizador fue determinado a distintas temperaturas (4 y 37°C) Para realizar los estudios a 4°C fue utilizado una baño termostatizado. Las suspensiones celulares fueron incubadas durante 30 min a esta temperatura previo a determinar su unión celular. Por otro lado la presencia de azida sódica y 2,4-dinitrofenol (2,4 DNF) fue realizada para determinar el tipo de transporte involucrado.

Azida sódica (10 mM) y el 2,4 DNF (10 mM) fueron añadidos a las suspensiones de levaduras desde una solución stock 2,0 M en agua y 1,0 M en DMF respectivamente. Esta concentración de azida no fue tóxica para las células. Las suspensiones celulares fueron incubadas con 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ por 30 min a 37 °C en la oscuridad y luego fue agregada la azida sódica y el 2,4 DNF por 30 min. Por otro lado, las células fueron

incubadas con azida sódica y 2,4 DNF por diferentes tiempos (30, 60 y 120 min) antes del agregado de 5 μM ZnPPc⁴⁺. La concentración del sensibilizador en el sobrenadante fue medida por espectrofluorometría ($\lambda_{\text{exc}}=670\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=684\text{nm}$). Los valores de fluorescencia obtenidos de cada muestra fueron referidos al número total de células contadas en la suspensión.

6.2.5. Inactivación fotodinámica de células de *C. albicans* con ZnPPc⁴⁺ como FS

6.2.5.1. IFD frente a distintas densidades celulares

Suspensiones de células de *C. albicans* (2 mL, $\sim 1 \times 10^6 \sim 10^7$ y $\sim 10^8$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas con ZnPPc⁴⁺ (5 y 10 μM) durante 30 min en la oscuridad a 37°C. Luego los cultivos fueron expuestos a 30 min de iluminación. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento fue de 30 mW/cm² a 670 nm. El dispositivo utilizado fue descrito en la Figura 12 I.

6.2.5.2. IFD frente a distintas concentraciones y tiempos de irradiación

Suspensiones celulares de *C. albicans* (2 mL, $\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas con 1, 5 y 10 μM de ZnPPc⁴⁺ durante 30 min en la oscuridad a 37°C. Luego, los cultivos fueron expuestos por diferentes intervalos de tiempo (2,5; 5; 15 y 30 min) a luz visible. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento fue de 30 mW/cm² a 670 nm. El dispositivo utilizado fue descrito en la Figura 12 I.

6.2.5.3. Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de ZnPPc⁴⁺ fue evaluada *in vitro* usando células epiteliales de riñón de mono verde Africano Chlorocebus, (Vero) en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) cultivadas a 37 °C en atmósfera aeróbica al 5% de CO₂ suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomycin y 0,292 mg/mL de glutamina. Los tratamientos fueron realizados utilizando policubetas (multiwell) constituidas por 24 pocillos, sembrados con 500 μL de suspensión de células (2×10^4 células). Después de 24 h de incubación se agregaron 6,5 μL de diferentes diluciones de ZnPPc⁴⁺ en DMSO para obtener concentraciones finales en el rango de 2,76 a 44,16 mM.

Las células expuestas a la luz visible durante 15 minutos a temperatura ambiente (células tratadas e iluminadas), junto a los controles en la oscuridad (células tratadas mantenidas en oscuridad), fueron incubadas durante 24 h a 37°C en oscuridad. Las células no tratadas fueron tomadas como control y se les asignó un 100% de viabilidad. Posteriormente, las células fueron lavadas y se les adicionó 500 µL de medio RPMI y 25 µL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Fueron incubadas durante 90 min a 37°C, luego fue eliminado el medio con MTT y las células fueron lisadas con 500 µL de DMSO. Finalizada esta incubación fue determinada su viabilidad celular en un lector de placas (Spectra Count™ BS 10001) a 540 nm. Todos los ensayos con MTT fueron realizados por triplicado. Fue definido como concentración citotóxica 50 (CC₅₀) aquella para la cual se obtiene un porcentaje de muerte igual al 50%.

6.2.5.4. IFD de células de C. albicans sobre superficies

6.2.5.4.1. Unión de ZnPPc⁴⁺ en solución e inactivación fotosensibilizada de células de C. albicans sobre agar

Suspensiones de *C. albicans* (2 mL, ~ 10⁶ UFC/mL) en PBS fueron incubadas 30 min en oscuridad a 37°C con 10 µM (11 nmoles) de ZnPPc⁴⁺. Las células fueron diluidas 1/1000 en PBS y 100 µl 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 12 III. Después de 48 h de incubación a 37°C se cuantificó las UFC/mL. Además, la viabilidad celular de *C. albicans* fue determinada para cultivos tratados con 10 µM de ZnPPc⁴⁺ a diferentes tiempos de irradiación.

6.2.5.4.2. Inactivación fotosensibilizada de C. albicans sobre agar impregnado con ZnPPc⁴⁺

Diferentes cantidades de ZnPPc⁴⁺ (5; 11; y 22 nmol) fueron depositadas en ciertas regiones en las placas con AS (5 cm 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 12 III) e incubadas por 48 h a 37°C en oscuridad.

6.2.5.4.3. Fotosensibilización de *C. albicans* creciendo en colonias sobre agar

Suspensiones de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron sembradas en placas de 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. ZnPPc⁴⁺ (11 nmol), de una solución stock 0,5 mM en agua, fue agregada a las colonias. Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad por 30 min a 37°C, para permitir la unión del sensibilizador a las células de *C. albicans*. Posteriormente fueron irradiadas con luz visible desde un proyector (el dispositivo utilizado fue descrito en la Figura 12 III), 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. Experimentos de control fueron realizados en ausencia y en presencia de sensibilizador en oscuridad, como así también controles iluminados sin ftalocianina.

6.2.5.4.4. IFD inducida por ZnPPc⁴⁺ in vitro utilizando *C. albicans* creciendo como pseudohifa

Para obtener la filamentización en suero de *C. albicans*, suspensiones celulares fueron llevadas a una densidad de $\sim 10^6$ UFC/mL en suero humano y permanecieron en este medio durante 2 h. En este período de tiempo las células cambiaron su forma de crecimiento de levadura a pseudohifa. Esta fase es característica de *C. albicans* y juega un rol importante en la patogenicidad y virulencia de esta especie. Luego fueron realizados dos procedimientos: a) en primer lugar las células creciendo como pseudohifas en suero humano fueron tratadas con ZnPPc⁴⁺ (5 μ M) durante 30 min en la oscuridad e irradiadas en este medio por diferentes tiempos (5, 15 y 30 min); b) las células creciendo como pseudohifas en suero humano fueron centrifugadas (3000 rpm por 15 min) y resuspendidas en PBS, luego tratados con ZnPPc⁴⁺ (5 μ M) durante 30 min en la oscuridad e irradiadas en PBS por diferentes tiempos. Las suspensiones

celulares fueron sembradas para realizar recuento de UFC/mL y también se realizó el recuento con cámara de Neubauer.

6.2.6. *Controles*

Todos los experimentos de control para determinar la eficiencia del fotosensibilizador en la IFD fueron realizados en ausencia y en presencia de sensibilizador en oscuridad, como así también controles iluminados sin fotosensibilizador y un doble control sin sensibilizador ni irradiación. Las suspensiones celulares de control y las tratadas fueron diluidas en forma consecutiva con PBS y cada dilución fue sembrada por duplicado en placas de AS, para contar las UFC/mL luego de 48 h de incubación a 37°C. Cada experimento fue repetido separadamente tres veces.

6.2.7. *Estudio de los estados excitados de ZnPPc⁴⁺ y su interacción con las células de C. albicans*

6.2.7.1. *Determinación de la formación del FS en estado excitado triplete en las células de C. albicans*

Suspensiones celulares de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^7$ UFC/mL) en CS fueron centrifugadas y resuspendidas en dimetilsulfóxido (DMSO) durante 10 min. Luego fueron nuevamente centrifugadas y resuspendidas en DMSO previo al tratamiento.

Las medidas de la producción del FS en estado excitado triplete $^3\text{FS}^*$ fueron realizadas por la técnica de *láser flash fotolisis* (LFF), el equipamiento utilizado se muestra en la Figura 15. En cada celda fue adicionado DMSO y ZnPPc⁴⁺ hasta alcanzar una absorbancia de 0,30 a 352 nm, luego fue burbujeada con argón durante 30 min para eliminar el oxígeno presente en el medio y fueron realizadas las medidas correspondientes analizando los espectros en el rango entre los 300-800 nm con burbujeo constante. A continuación, fue adicionada la suspensión celular (50 μL) y fue medida la producción de triplete $^3\text{FS}_1^*$ en las células en el rango entre 400-600 nm, con burbujeo constante de argón. Fueron analizadas dos ftalocianinas de referencia, una tetracatiónica ZnPyPz y una neutra ZnPc, para obtener los tiempos de vida del triplete en solución y en las células.

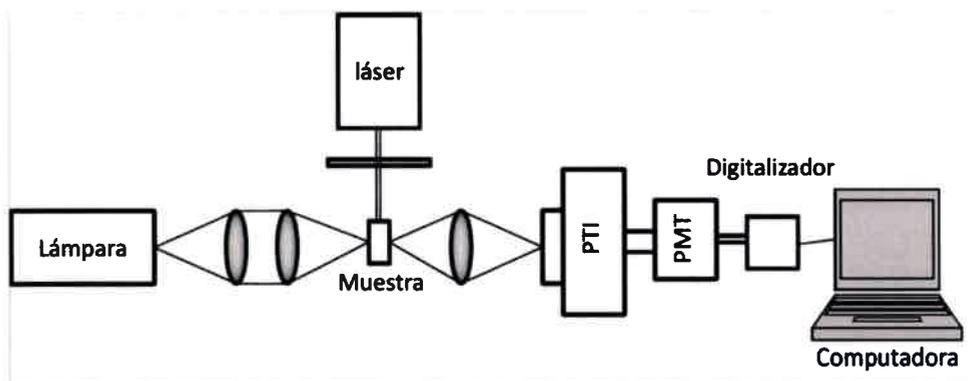


Figura 15. Representación esquemática de LFF.

En la técnica de LFF, la muestra fue irradiada con un pulso de luz de alta intensidad (10^{20} fotones) para poblar el estado triplete vía entrecruzamiento de sistema desde el primer estado excitado singlete. Las moléculas en el estado triplete (u otros estados excitados) fueron detectadas por una segunda fuente de luz (haz analizador) mediante absorción (promoción a niveles tripletes de energía superior), antes de volver al estado fundamental. El cambio de la densidad óptica debido a las especies transitorias fue monitoreado en función del tiempo a una longitud de onda en particular, seleccionada con un monocromador colocado en el camino óptico de la luz de prueba entre la muestra y el detector. Los cambios temporales de absorción fueron detectados por un fotodetector de rápida respuesta. Dichos detectores generan una señal eléctrica proporcional a la transmitancia de la especie transitoria de la muestra que fue digitalizada y procesada para convertirla en señales de absorbancia. La conversión de la señal eléctrica a valores de absorbancia fue realizada de acuerdo a la ley de Lambert y Beer, de manera que la relación entre la absorbancia y transmitancia (I_t/I_0) a una dada longitud de onda está dada por la siguiente expresión: $A_t = -\log \frac{I_t}{I_0}$. Luego, la absorbancia de una especie transitoria en función de la longitud de onda y a un dado tiempo, fue calculada mediante la siguiente ecuación: $A_\lambda = -\log \frac{I_t}{I_0} = \epsilon_\lambda b c$ donde I_t es la intensidad de luz transmitida (mV), I_0 es la intensidad de luz incidente (mV), ϵ_λ es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} cm^{-1}$), b es el paso óptico del haz analizador a través de la muestra (cm) y c es la concentración molar de la especie transitoria.

En la Figura 16 se muestra una representación de una señal transitoria típica obtenido por LFF. Los espectros de absorción del FS en ausencia y presencia de células, fueron obtenidos registrando el cambio de absorbancia a un tiempo fijo, en función de la

longitud de onda. Por último fueron analizadas mediante el programa Labview 5.1. El tiempo de vida del $^3\text{FS}^*$ fue determinado a partir del ajuste monoexponencial de los datos experimentales.

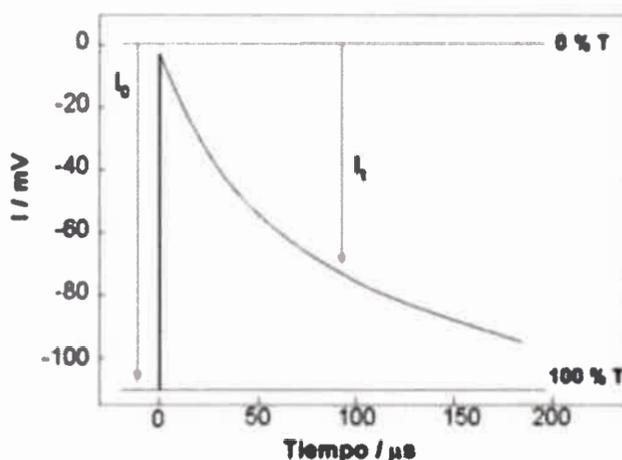


Figura 16. Representación de una señal transitoria típica obtenida por LFF.

6.2.7.2. Determinación de $^1\text{O}_2$ en las células

Dado que la molécula de $^1\text{O}_2$ se encuentra en un estado excitado desde el cual puede emitir luz, las medidas dinámicas para la determinación de las constantes de desactivación global de $^1\text{O}_2$ (k_t) por los sustratos, fueron realizados por detección de la *fosforescencia resuelta en el tiempo* de $^1\text{O}_2$ a 1270 nm (TRPD) [113]. La radiación fosforescente emitida atraviesa diferentes filtros y fue detectada, en ángulo recto, con un diodo de germanio amplificado, Judson J16/85p. El detector fue acoplado a un osciloscopio digital Agilent Technologies DSO 6012 A. La señal luego fue transferida a través de una interfase a una computadora personal para llevar a cabo el procesamiento. En general deben aplicarse 10-15 disparos para promediar y lograr una buena relación señal / ruido, a partir de la cual fue determinado el tiempo de vida de $^1\text{O}_2$ por un ajuste monoexponencial [114]. En la Figura 17 se muestra un esquema del equipamiento utilizado y en la Figura 18 podemos ver una señal típica del decaimiento de la fosforescencia de $^1\text{O}_2$ a 1270 nm.

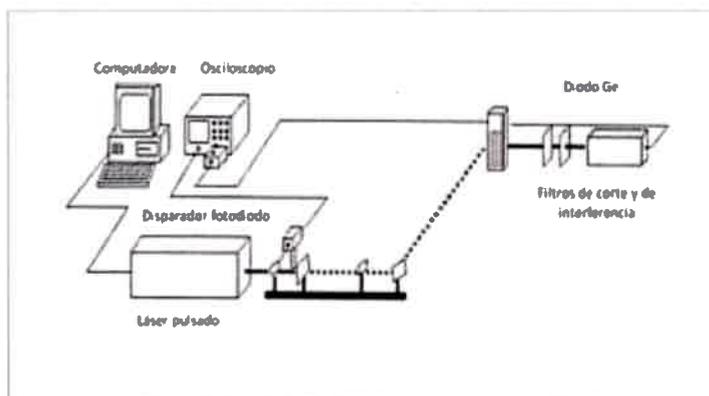


Figura 17. Representación del equipamiento utilizado para la aplicación de TRPD.

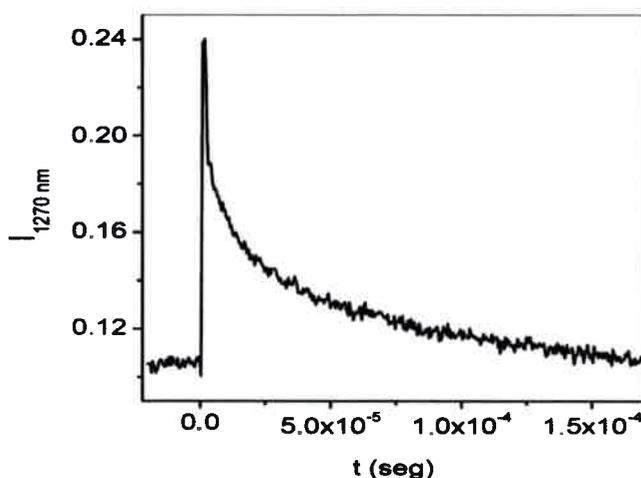


Figura 18. Señal típica del decaimiento de la fosforescencia de $^1\text{O}_2$ a 1270 nm en D_2O .

Dicho decaimiento fue ajustado por la ecuación $I = I_0 \exp(-t/\tau_0)$, donde I_0 representa la intensidad de la luz incidente o intensidad de la señal, τ_0 el tiempo de vida de $^1\text{O}_2$ en ausencia de células y t el tiempo. El ajuste de las trazas del decaimiento a través de la ecuación I , permite obtener el valor del tiempo de vida de $^1\text{O}_2$. Generalmente los puntos iniciales de la señal de decaimiento están perturbados por falsas señales provenientes de la fuente de excitación o por fluorescencia residual del sensibilizador. En consecuencia el análisis de las trazas de decaimiento fue realizado a partir de 8-10 μs . Fue utilizado el programa MicrocalTM OriginTM versión 7.5 para aproximar los decaimientos, el cual lleva a cabo un ajuste por cuadrados mínimos no lineales. Estos decaimientos no requieren métodos de deconvolución debido a que tanto

el ancho del pulso del láser como el tiempo de respuesta del sistema de detección (4-5 μ s) no interfieren en la medida de tiempos de vida de $^1\text{O}_2$.

6.2.8. Estudios mecanísticos de la inactivación fotodinámica

Células de *C. albicans* resuspendidas en PBS ($\sim 10^6$ UFC/mL) fueron tratadas de modo separado con azida sódica (100 mM) y manitol (100 mM) como agentes atrapadores de $^1\text{O}_2$, por 30 min a 37°C. Luego fueron incubadas con 2,5 y 5 μ M del fotosensibilizador por otros 30 min a 37°C en la oscuridad e irradiadas por 30 min con luz visible.

Por otro lado, suspensiones de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron centrifugadas (3000 rpm por 15 min) y resuspendidas en 2 mL de agua deuterada (D_2O); posteriormente fueron incubadas con la ftalocianina (2,5 μ M) a 37°C en la oscuridad e irradiadas por 30 min con luz visible.

Los estudios en condiciones anóxicas fueron realizados burbujando argón, a través de una aguja, en la suspensión celular ($\sim 10^6$ UFC/mL en PBS) en tubos Pyrex (13x100 mm) por 20 min, antes de la irradiación y manteniendo la atmósfera de argón durante el tratamiento de IFD (30 min de irradiación).

Los experimentos control fueron los siguientes: 1- control sin tratar (sin la presencia del sensibilizador y sin irradiar); 2- control oscuridad (presencia de sensibilizador); 3- control irradiado (sin el sensibilizador); 4- control con 100 mM de azida sódica e irradiado; 5- control con 100 mM de manitol e irradiado, 6- control con D_2O e irradiado; 7- control con atmósfera de argón e irradiado.

6.2.8.1. Determinación de la producción de $^1\text{O}_2$ en medio homogéneo

La producción de $^1\text{O}_2$ por ZnPPc^{4+} fue analizada por un método indirecto en presencia de los sustratos 9,10-dimetilantraceno (DMA) y 2,2-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de sodio (ABMM). La preparación de ABMM fue realizada como fue descrita previamente en la literatura [115] y el DMA fue obtenido de Sigma-Aldrich. Soluciones de 2 mL de DMA y ABMM (10 μ M) en presencia del sensibilizador fueron irradiadas con luz visible de 590-800 nm utilizando un filtro OG590. Este intervalo de longitudes de onda permite la excitación ZnPPc^{4+} evitando la absorción por los sustratos ABMM o DMA. Las cinéticas de fotooxidación de DMA y

ABMM fueron estudiadas siguiendo la disminución de la intensidad de fluorescencia (I) a 403 nm, excitando a $\lambda_{exc}=378$ nm. Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) fueron obtenidas por el ajuste lineal de $\ln I_0/I$ vs tiempo [115].

6.2.8.2. Determinación indirecta de la producción de 1O_2 en medio celular

Suspensiones celulares de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas con 10 μ M de DMA y ABMM durante 30 min, centrifugadas y resuspendidas en PBS. Luego dicha suspensión celular fue incubada con 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ durante 10 min en oscuridad a 37°C. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas, resuspendidas en PBS e irradiadas con luz visible de 590-800 nm utilizando un filtro OG590 con el arreglo IV de la Figura 12. Las cinéticas de fotooxidación de DMA y ABMM fueron estudiadas como fue descripta anteriormente en medio homogéneo (6.2.8.1) [115]. Los tratamientos controles fueron realizados en oscuridad sin ZnPPc⁴⁺ e irradiados sin ZnPPc⁴⁺. Las muestras con suspensiones celulares fueron incubadas con DMA y ABMM, centrifugadas, en algunos casos previos a la adición del fotosensibilizador y en otros casos luego de la incubación del mismo y resuspendidas en PBS. Los lavados fueron realizados para eliminar todo lo que no se unió efectivamente a las células.

Por otro lado fue agregado al cultivo celular azida sódica para determinar la desactivación por *quenching* físico de 1O_2 . Los cultivos celulares fueron incubados con DMA o ABMM, centrifugados, resuspendidos en PBS, luego fue adicionado 5 μ M de ZnPPc⁴⁺, centrifugado y resuspendido en PBS y por último fueron incubados 10 min con 0,1 M de azida sódica e irradiadas con luz visible.

6.2.8.3. Determinación de la producción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en medio celular

La producción de $O_2^{\cdot-}$ por la ftalocianina ZnPPc⁴⁺ fue estudiada por un método indirecto en presencia de azul de nitrotetrazolio clorado (NBT) a través de la producción de formazán en presencia de luz visible [116]. Fue preparada una solución stock de NBT 0,8 mM en agua. Suspensiones celulares de *C. albicans* (2 mL, $\sim 10^6$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas con 0,2 mM de NBT durante 30 min, luego fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS. Posteriormente fue adicionado 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ durante 10 min y los cultivos irradiados con luz visible con el arreglo IV de la Figura 12. La

formación de diformazan fue observada mediante el aumento en la absorbancia a $\lambda = 560$ nm [116].

Los controles fueron realizados en ausencia de ZnPPc⁴⁺ e irradiados sin ZnPPc⁴⁺. Por otro lado fue adicionado 0,5 mM de β -NADH como biomolécula externa para detectar la formación de radicales libres, en este caso en particular, O₂^{·-}. Por último fue medida la producción de O₂^{·-} en solución adicionando en la misma celda DMF, NBT, NADH y ZnPPc⁴⁺.

6.2.9. Sitios de acción del fotosensibilizador

6.2.9.1. Estudios de la localización intracelular del fotosensibilizador

La distribución intracelular del agente fue analizada mediante microscopía confocal de fluorescencia, evaluando la emisión roja de la ftalocianina. Las suspensiones celulares de *C. albicans* (2 mL, $\sim 1 \times 10^7$ UFC/mL) en PBS fueron incubadas con 5 μ M del sensibilizador a 37°C durante 10 min en la oscuridad. Todas las muestras fueron excitadas a una $\lambda_{exc} = 405$ nm y la emisión fue analizada en el canal azul de 430-470 nm y en el rojo de 575-638 nm. La sonda fluorescente utilizada para la tinción de núcleo, fue el fluorocromo Hoescht 33258 (Ho, Sigma, Missouri, EEUU) utilizada a partir de una solución acuosa de 1 mg/mL.

6.2.9.2. Efectos de la inactivación fotodinámica sobre el ADN

Purificación y electroforesis de ADN

La extracción y purificación del ADN cromosomal fue realizado siguiendo el procedimiento establecido en el equipo de extracción *Wizard Genomic DNA Purification Kit* de Promega. Las corridas electroforéticas fueron realizadas 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 V/cm) aplicado, proveniente de una fuente de energía PS251 (Sigma-Aldrich, Techware EEUU). 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 $< 60^\circ\text{C}$, fue adicionado 1 μ 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, Winsconsin, EEUU), obteniéndose fragmentos de entre 125 a 23.130 pb y a una concentración de 0,5 µg/µL. Los geles de electroforesis fueron observados y fotografiados sobre un transiluminador UV (Labnet, EEUU).

6.2.9.3. Fotoinactivación de *C. albicans* y extracción de ADN genómico

Las células de levadura fueron sometidas al tratamiento fotodinámico y luego fue realizada la extracción y la purificación del ADN cromosomal, 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 ultracentrifuga 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.

6.2.9.4. Efecto de la inactivación fotodinámica sobre la estructura celular

6.2.9.4.1. Microscopía electrónica de transmisión

El daño producido por la IFD con el fotosensibilizador ZnPPc⁴⁺ en la estructura celular microbiana fue analizada mediante cambios morfológicos utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM) [117].

Suspensiones celulares de *C. albicans* (6 mL, ~ 1x10⁷ UFC/mL) en PBS fueron homogenizadas y alícuotas de 2 mL fueron incubadas en 5 µM del sensibilizador a 37 °C por 30 min en la oscuridad e irradiadas durante 15 y 30 min con luz visible (30 mW/cm²), usando el dispositivo III de la Figura 12. Experimentos control fueron realizados en presencia del fotosensibilizador sin iluminación y sin ftalocianina e irradiados. Luego, fue tomada una alícuota para realizar las diluciones correspondientes y fueron sembradas en placas con agar sabouroud (AS), para determinar las UFC. Los cultivos de *C. albicans* fueron incubados a 37°C durante 48 h. Luego, 1,5 mL de dichos cultivos fueron colocados en eppendorfs estériles e incubados durante un período

mínimo de 2 h a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron centrifugadas y resuspendidas con los fijadores formaldehído (4%) y glutaraldehído (2%) con volúmenes iguales (500 μL) en tampón cacodilato 0,1 M. Así fueron enviados al servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Allí, 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 se completó con 3 pasajes, de 15 min cada uno, en acetona al 100%. La inclusión fue realizada en la resina epóxica araldita en estado líquido, la cual polimeriza a 60°C, durante 24-48 h [118,119]. 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 fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión Leo 906E con una cámara MegaView III (Zeiss, Alemania) [120].

6.2.9.5. Fotodaño en la envoltura celular

6.2.9.5.1. 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 tratadas con 5 μM de ZnPPc⁴⁺. Luego fueron incubadas por 30 min en oscuridad y luego se irradiaron durante 15 y 30 min con luz visible utilizando el dispositivo III de la Figura 12. Experimentos control fueron realizados en presencia de sensibilizador sin iluminación y un doble control sin ftalocianina e irradiación. Luego, a 500 μL de cada muestra fueron agregados 500 μL de glutaraldehído al 2% y 500 μL de formaldehído al 4%. Posteriormente los cultivos fueron fijados durante 2 h a temperatura ambiente y centrifugados (2 min a 13.000 rpm). Luego el sobrenadante fue 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 microscopio Philips SEM 505, Holanda, que cuenta con un programa para la obtención de imágenes digitales (Digitalizador de Imagen Soft Imaging Sistem ADDA II (SIS)).

6.3. Análisis Estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos separadamente tres veces. Fue utilizada la prueba t-Student o Test-T para establecer diferencias significativas entre 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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Fotosensibilizadores

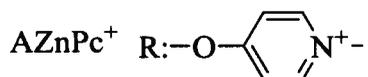
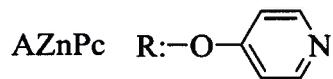
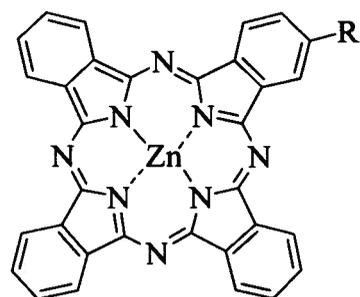
Los fotosensibilizadores derivados de ftalocianinas presentan propiedades fotofísicas interesantes para ser usados en IFD [121]. Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que las ftalocianinas son agentes fototerapéuticos efectivos para la erradicación de bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras [69]. En las ftalocianinas catiónicas, este efecto va acompañado por una unión efectiva a las células microbianas y un incremento consecuente en la IFD.

En este trabajo fue analizada la eficiencia de distintas ftalocianinas cuya síntesis fue presentada en la sección de materiales y métodos. Estos FS difieren en la presencia/ausencia de cargas y dentro de los catiónicos en la cantidad y la posición de las mismas. Algunos de ellos fueron evaluados y comparados con $ZnPPc^{4+}$ debido a que este fotosensibilizador fue el más efectivo para erradicar *C. albicans* utilizando la menor concentración y el menor tiempo de irradiación.

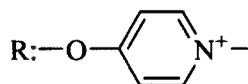
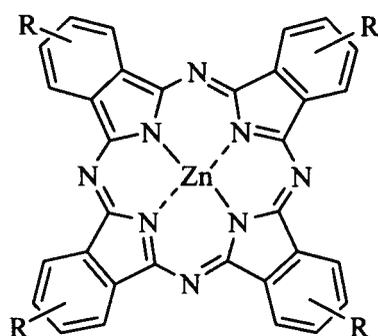
7.2. Estudios espectroscópicos y fotodinámicos

7.2.1. Características espectroscópicas y fotodinámicas de las ftalocianinas

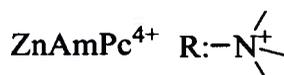
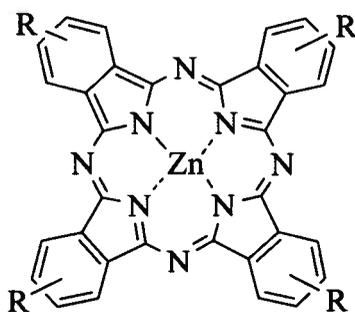
El grupo 4-(*N*-metilpiridiloxi) en las ftalocianinas $AZnPc^+$, $AZnPc$ (Esquema 2), $ZnPPc^{4+}$ (Esquema 3) y $ZnAmPc^{4+}$ (Esquema 4), permite formar centros catiónicos en la periferia del macrociclo, separados del anillo principal por enlaces éter. Este espaciador se sabe que favorece la movilidad de las cargas y puede mejorar la interacción y su unión a las células fúngicas [89].



Esquema 2. Estructura molecular de AZnPc⁺ y AZnPc



Esquema 3. Estructura molecular de ZnPPc⁴⁺



Esquema 4. Estructura molecular de ZnAmPc⁴⁺

La ftalocianina tetracatiónica $ZnPPc^{4+}$ posee características espectroscópicas con una banda de absorción alrededor de 350 nm denominada banda *Soret* y una muy intensa denominada banda *Q*, ($\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en la región roja del espectro visible a ~ 670 nm (Figura 19) (ventana fototerapéutica). Además, presenta emisión de fluorescencia a 675 nm con un rendimiento cuántico (Φ_F) de 0,22 en DMF (Figura 19). La actividad fotodinámica inducida por $ZnPPc^{4+}$ mostró una producción de 1O_2 de 0,59 en solución de DMF [104].

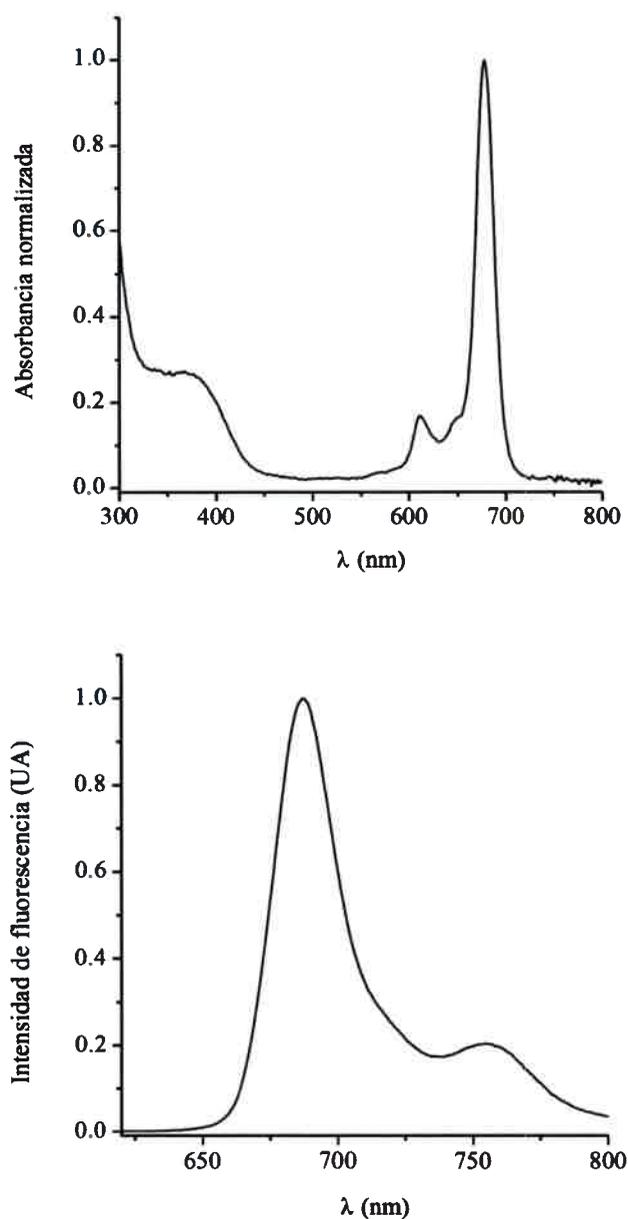


Figura 19. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de la ftalocianina $ZnPPc^{4+}$ en DMF

Las ftalocianinas $AZnPc^+$ y $AZnPc$ presentan espectros de absorción y fluorescencia similares (Figura 20). Los mismos muestran una típica banda *Soret* en ~ 350 nm y las bandas Q, una más pequeña a ~ 600 nm y otra intensa a ~ 670 nm, características de las zinc(II)ftalocianinas [89]. Los espectros de emisión de fluorescencia para $AZnPc^+$ y $AZnPc$ muestran una banda intensa centrada en ~ 686 nm y una banda de menor intensidad a los ~ 740 nm.

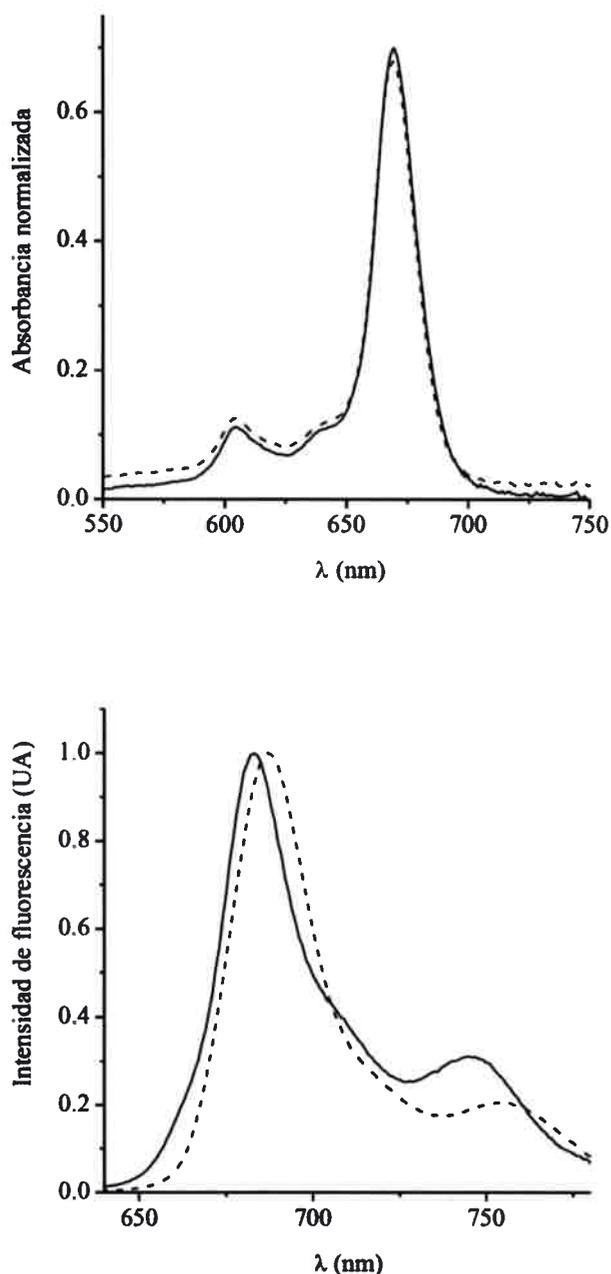
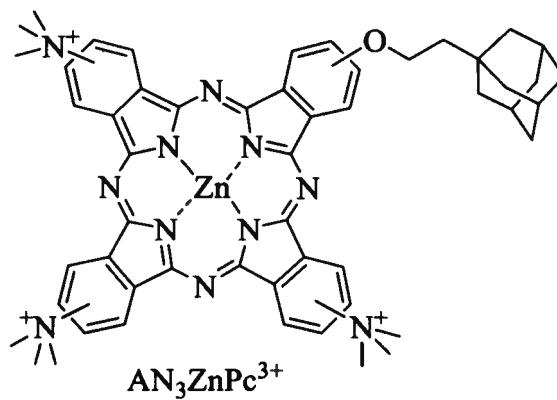


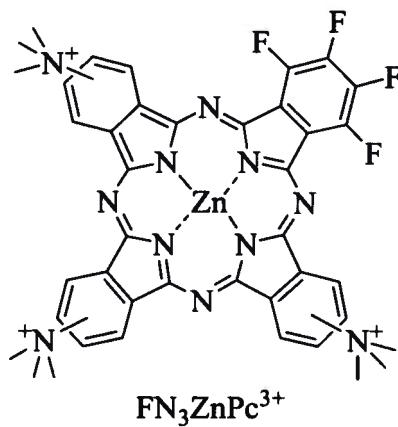
Figura 20: Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de $AZnPc$ (—), $AZnPc^+$ (- - -) en DMF ($\lambda_{exc} = 612$ nm).

Las propiedades de agentes fotosensibilizadores tricatiónicos derivados de ftalocianinas fueron estudiadas en solución. La formación de macrociclos asimétricamente sustituidos en la periferia permite la combinación de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos en una molécula sensibilizadora, produciendo un eje de polaridad intramolecular [122]. Este efecto puede producir una mejor unión y acumulación en los compartimentos subcelulares, lo cual es un prerrequisito para un tratamiento fotodinámico efectivo. Estructuras derivadas de ftalocianinas caracterizadas por una sustitución asimétrica en la periferia del macrociclo son las del tipo A_3B , conteniendo tres grupos idénticos A que difieren de B. La combinación de estos grupos permite obtener fotosensibilizadores anfifílicos, formados por tres centros catiónicos y uno lipofílico, derivado de adamantano (AN_3ZnPc^{3+}) que puede visualizarse en el Esquema 5, perfluorobenceno (FN_3ZnPc^{3+}) en el Esquema 6 y tert-butilnaftaleno (TN_3ZnPc^{3+}) en el Esquema 7.

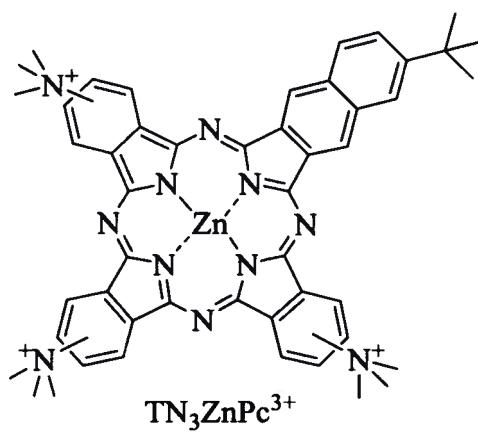
Los espectros de absorción y fluorescencia en DMF de AN_3ZnPc^{3+} , FN_3ZnPc^{3+} y TN_3ZnPc^{3+} pueden verse en la Figura 21. Estos FS presentan espectros similares de absorción con un importante ensanchamiento de la banda Q. Esto puede deberse a que están parcialmente agregados en DMF. Los espectros de emisión de fluorescencia presentan una banda centrada en ~ 731 nm, ~ 722 nm y 688 nm para AN_3ZnPc^{3+} , TN_3ZnPc^{3+} y FN_3ZnPc^{3+} , respectivamente (Figura 21). En el caso de TN_3ZnPc^{3+} el corrimiento batocrómico se debe a la extensión de la conjugación del sistema π , además, puede observarse un desdoblamiento de la banda Q. En estudios previos, la división de la banda Q en híbridos de ftalocianinas y naftalocianinas fue asignada a la baja simetría de las moléculas [123]. Los resultados concuerdan con aquellos reportados previamente para zinc(II) ftalocianinas similares en medios homogéneos [124].



Esquema 5. Estructura molecular de $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$



Esquema 6. Estructura molecular de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$



Esquema 7. Estructura molecular de $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$

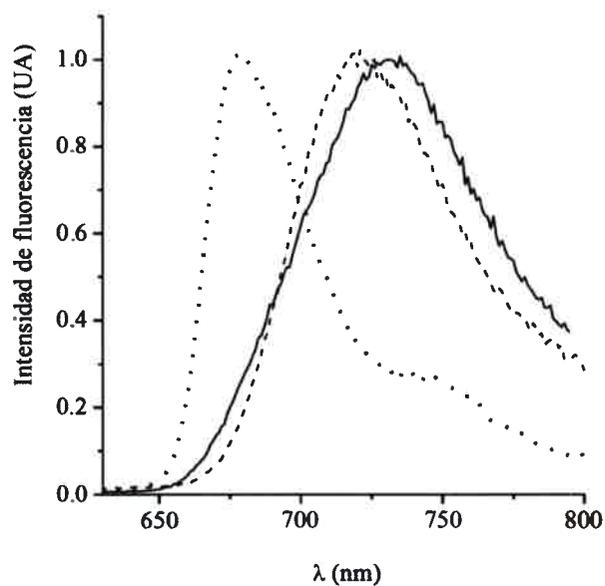
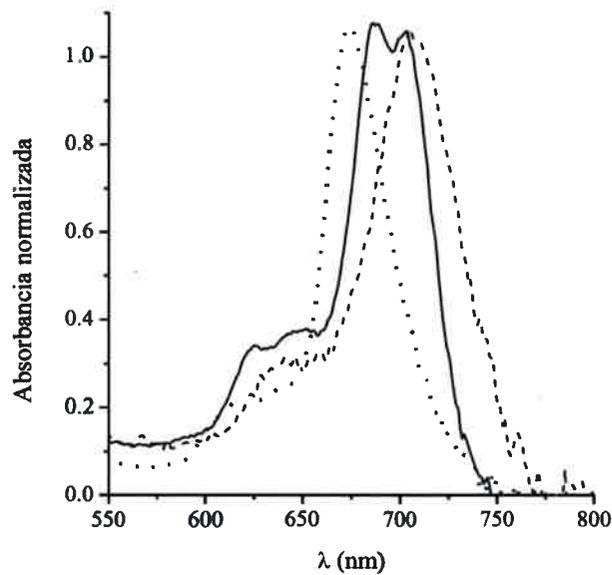


Figura 21. Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (---), $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (—), $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (···) en DMF ($\lambda_{\text{exc}} = 610 \text{ nm}$).

Las propiedades espectroscópicas y fotodinámicas de las ftalocianinas se resumen en la Tabla 1. Como puede observarse, los valores de los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) son apropiados para la detección y la cuantificación de los FS en un medio biológico. Por otro lado, los valores de rendimiento cuántico de producción de

$^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) fueron adecuados para la IFD. Esta propiedad es muy importante porque las reacciones producidas por $^1\text{O}_2$ pueden ser la causa principal del daño celular y la principal especie citotóxica en condiciones aeróbicas [125,126]. Si bien el $^1\text{O}_2$ posee un tiempo de vida corto, de aproximadamente 10^{-6} s, la presencia de $^1\text{O}_2$ resulta citotóxico e induce daño celular irreversible [127].

Los valores de Φ_Δ pueden cambiar significativamente de acuerdo al medio, disminuyendo cuando el sensibilizador está parcialmente agregado. Además, el microambiente biológico puede inducir modificaciones importantes en las propiedades fotofísicas de las ftalocianinas en solución. En consecuencia, hay limitaciones para predecir la eficiencia fotodinámica en sistemas biológicos sobre la base de investigaciones fotofísicas en soluciones homogéneas.

Tabla 1. Características espectroscópicas de las ftalocianinas, Φ_F y Φ_Δ en DMF

Ftalocianina	$\lambda_{\max}(\text{Abs})$ 684 nm	$\lambda_{\max}(\text{Em})$ 675 nm	ε ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Φ_F	Φ_Δ
ZnPPc⁴⁺	680	686	$1,1 \times 10^5$	$0,22 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,05$
AZnPc⁺	669	683	$1,9 \times 10^5$	$0,32 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,02$
AZnPc	669	678	$2,1 \times 10^5$	$0,31 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,03$
ZnAmPc⁴⁺	680	686	$1,0 \times 10^5$	$0,18 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,04$
AN₃ZnPc³⁺	705	731	$1,15 \times 10^5$	$0,26 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,04$
TN₃ZnPc³⁺	686	722	$1,02 \times 10^5$	$0,20 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,05$
FN₃ZnPc³⁺	675	688	$1,20 \times 10^5$	$0,25 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,05$

7.3. Estudios *in vitro* en *C. albicans*

7.3.1. Inactivación fotodinámica *in vitro*

En los estudios de IFD, los experimentos control demostraron que la viabilidad de *C. albicans* no fue afectada solo con iluminación sin el fotosensibilizador o por incubación en la oscuridad con el fotosensibilizador. Esto indicó que la mortalidad

celular obtenida luego de la irradiación de los cultivos tratados con las ftalocianinas fue debido al efecto fotosensibilizador del agente, producto de la luz visible.

La eficiencia de las ftalocianinas frente a la IFD fue evaluada en suspensiones celulares de *C. albicans* (10^6 UFC/mL) tratadas con diferentes concentraciones de los sensibilizadores ZnPPc⁴⁺, ZnAmPc⁴⁺, AZnPc⁺ y AZnPC (5 y 10 μ M) por 30 min a 37°C en oscuridad y posteriormente irradiadas por 30 min con luz visible (Figura 22). Al comparar el efecto generado por ambas ftalocianinas tetracatiónicas, fue posible observar que ZnPPc⁴⁺ generó una IFD sobre las células de *C. albicans* de ~ 5 log con ambas concentraciones, mientras que para ZnAmPc⁴⁺ la muerte generada fue solo de $\sim 1,5$ log a la máxima concentración analizada (10 μ M). Por otro lado la viabilidad de *C. albicans* luego de la irradiación de 30 min en presencia de AZnPc⁺ y AZnPC no fue afectada frente a las concentraciones de las ftalocianinas usadas en el tratamiento, observándose valores de IFD de $\sim 0,5$ log (Figura 22).

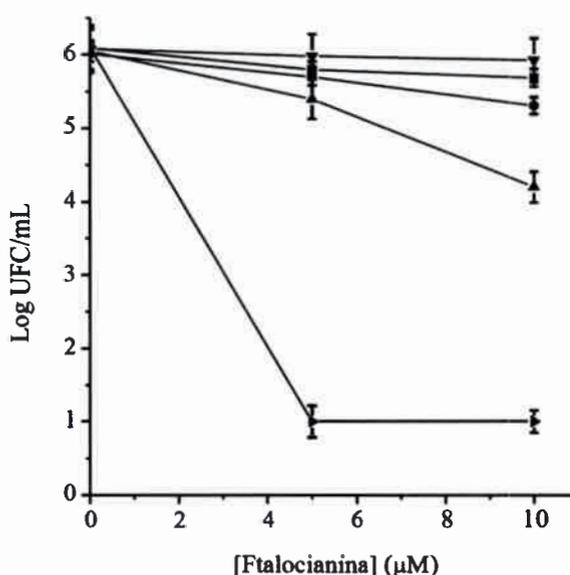


Figura 22. Curva de supervivencia de *C. albicans* (10^6 UFC/mL) incubada con diferentes concentraciones (5 y 10 μ M) de ZnPPc⁴⁺ (►), ZnAmPc⁴⁺ (▲), AZnPc (■) y AZnPc⁺ (●) por 30 min a 37°C en oscuridad y expuesta a luz visible por 30 min. Control (▼). Los valores representan la media \pm desviación estándar.

Por este motivo, estos fotosensibilizadores (AZnPc⁺, AZnPC y ZnAmPc⁴⁺) no fueron utilizados para futuros estudios frente a *C. albicans*.

Luego fue evaluada la IFD de *C. albicans* en suspensión celular en PBS tratadas con 10 μM de los sensibilizadores tricatiónicos $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ por 30 min a 37°C en oscuridad e irradiadas a distintos tiempos (15 y 30 min) con luz visible (Figura 23). La viabilidad de *C. albicans* en presencia de 10 μM de $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y con 30 min de irradiación produjo una IFD de ~ 2 y $\sim 2,5$ log respectivamente (Figura 23). Si bien presentan valores espectroscópicos y fotodinámicos apropiados en solución (Tabla 1), con una elevada eficiencia en la producción de $^1\text{O}_2$, este estudio mostró como el medio biológico puede influir significativamente en las propiedades de los sensibilizadores, siendo por ejemplo, su tendencia a agregarse en medio biológico, una unión débil de los FS a las células, entre otros factores, que pueden afectar la IFD de los microorganismos. Sin embargo, como fue posible observar también en la Figura 23, un comportamiento diferente mostró que el fotosensibilizador tricatiónico $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ generó una disminución de ~ 5 log a los 15 min de irradiación.

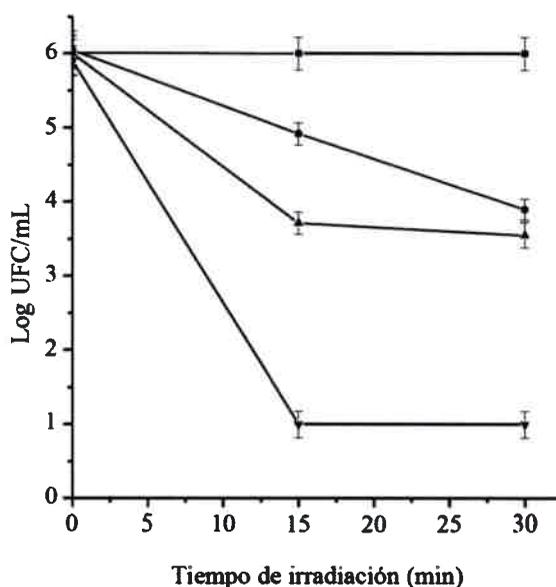


Figura 23. Curva de supervivencia de *C. albicans* (10^6 UFC/mL) incubada con 10 μM de $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (●), $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (▲) y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (▼) durante 30 min a 37°C en oscuridad y expuesta a luz visible por distintos tiempos (15 y 30 min). Control (■). Los valores representan la media \pm desviación estándar

Debido a los apropiados valores de IFD observados con $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ a 10 μM fue evaluada la IFD variando las concentraciones por debajo de la máxima analizada (1, 5 y

10 μM) e irradiando con luz visible durante 15 y 30 min, para determinar si podrían lograrse mejores resultados. Como puede observarse en la Figura 24, $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ poseen una elevada eficiencia en la IFD con la mínima concentración analizada (1 μM) y sólo 15 min de irradiación afectando la viabilidad celular en $\sim 4,5$ log. Luego de determinar su elevada eficiencia en la IFD de *C. albicans* con 30 min de incubación previa a la irradiación con 1 μM , fue evaluada la misma bajo distintos tiempos de irradiación 5, 15 y 30 min con luz visible (Figura 25). La IFD fue incrementando conforme aumentaba el tiempo de irradiación. Cuando el cultivo fue tratado con 1 μM e irradiado con 30 min, la viabilidad celular disminuyó $> 5,5$ log (Figura 25), valor similar al obtenido con ZnPc^{4+} con 10 μM y 15 min de irradiación (Figura 22).

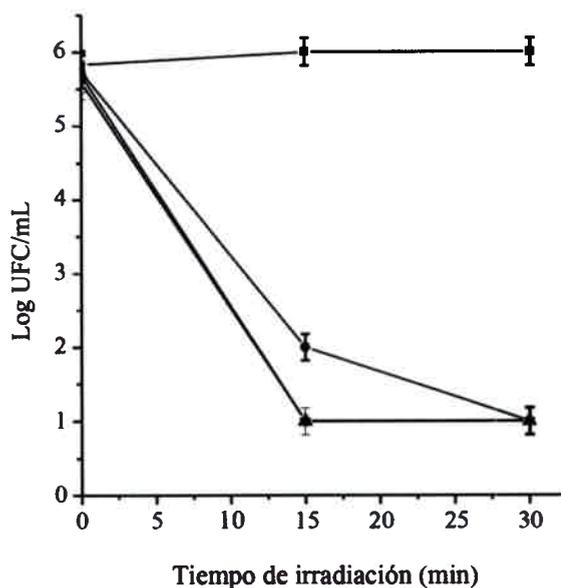


Figura 24. Curva de supervivencia de *C. albicans* (10^6 UFC/mL) incubada con 1 (●), 5 (▲) y 10 (▼) μM de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ durante 30 min a 37°C en oscuridad y expuesta a luz visible por distintos tiempos (15 y 30 min). Control (■). Los valores representan la media \pm desviación estándar.

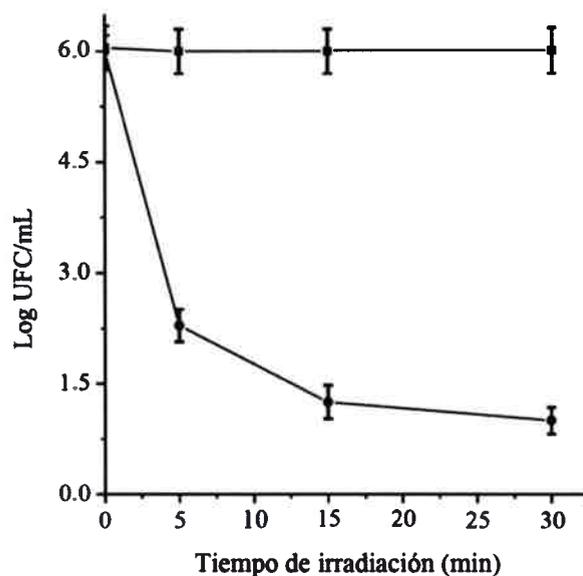


Figura 25. Curva de supervivencia de *C. albicans* (10^6 UFC/mL) incubada con $1 \mu\text{M}$ de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (●) por 30 min a 37°C en oscuridad y expuesta a luz visible a distintos tiempos. Control (■). Los valores representan la media \pm desviación estándar.

Estos resultados indican que la viabilidad de *C. albicans* luego de la irradiación con 30 min en presencia de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ fue dependiente de la concentración de la ftalocianina usada en el tratamiento, del tiempo de incubación previo y del tiempo de irradiación. Bajo estas condiciones, la concentración del fotosensibilizador fue acompañada por un incremento en la eficiencia de la IFD. Estos resultados indican que la inactivación celular a cortos tiempos de irradiación (5 min) y con la menor concentración utilizada en el tratamiento ($1 \mu\text{M}$), produjo una IFD que representan un valor del 99,9%.

7.3.2. Unión in vitro a las células de *C. albicans*

En los estudios de unión celular fue posible analizar las cinéticas para algunos de los FS estudiados. En el caso del sensibilizador ZnPc^{4+} fue posible observar que generó una cinética de unión muy rápida a las células de *C. albicans* a cortos tiempos de incubación y fue dependiente de la concentración (Figura 26) alcanzando un valor máximo de unión a las células de $\sim 1,77 \text{ nmoles}/10^6$ células para $5 \mu\text{M}$ y un valor de $\sim 4,46 \text{ nmoles}/10^6$ células para $10 \mu\text{M}$ a los 15 min.

Un comportamiento similar fue observado para *Escherichia coli* y *Streptococcus mitis* en presencia de 2 μM de ZnPPc^{4+} observándose una unión máxima a las células a los 5 min de incubación con valores de ~ 0.80 nmoles/ 10^6 células [69].

Por otro lado, al comparar ambos FS tetracatiónicos, fue observada una diferencia muy marcada en las cinéticas de unión de los sensibilizadores ZnPPc^{4+} y ZnAmPc^{4+} frente a la misma concentración evaluada (10 μM) en las células de *C. albicans*. Para ZnPPc^{4+} se alcanza una unión elevada a tiempos cortos (15 min) $\sim 4,46$ nmoles/ 10^6 células, mientras que para ZnAmPc^{4+} la unión fue solo de $\sim 0,13$ mol/ 10^6 células, esto probablemente fue debido a su fuerte tendencia a agregarse (Figura 26).

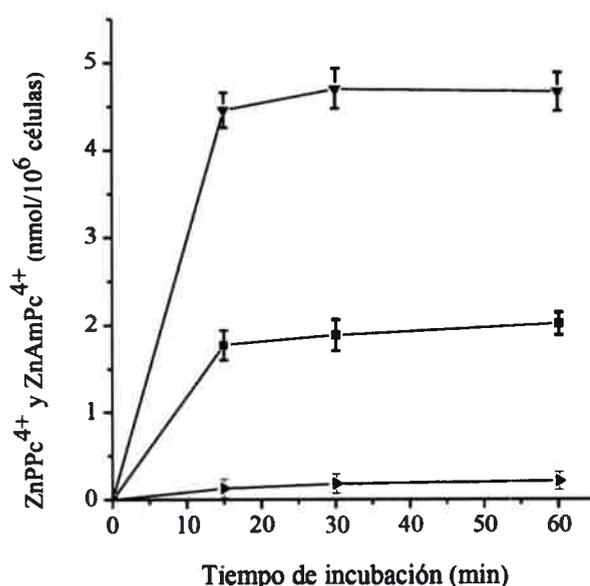


Figura 26. Cantidad de ZnPPc^{4+} recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con 5 μM (■) y 10 μM (▼) del sensibilizador por 15, 30 y 60 min a 37°C. Cantidad de ZnAmPc^{4+} recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con 10 μM (►). Los valores representan la media \pm desviación estándar.

Para el sensibilizador $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ fue evaluada su capacidad para unirse a células de *C. albicans* analizada en suspensión celular de $\sim 10^6$ UFC/mL en PBS (Figura 27). De esta manera, los cultivos fueron incubados con una concentración de 1 μM de la ftalocianina por diferentes tiempos (2,5; 5; 15 y 30 min) a 37°C en oscuridad. Fue utilizada la menor concentración debido a los resultados que fueron observados en la Figura 25. La concentración intracelular del fotosensibilizador fue determinada por

espectroscopia de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 665 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 675 \text{ nm}$). La unión de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ a las células presentó una cinética de unión muy rápida a tiempos cortos de incubación (2,5 min) alcanzando un valor máximo de $\sim 0,95 \text{ nmoles}/10^6 \text{ células}$.

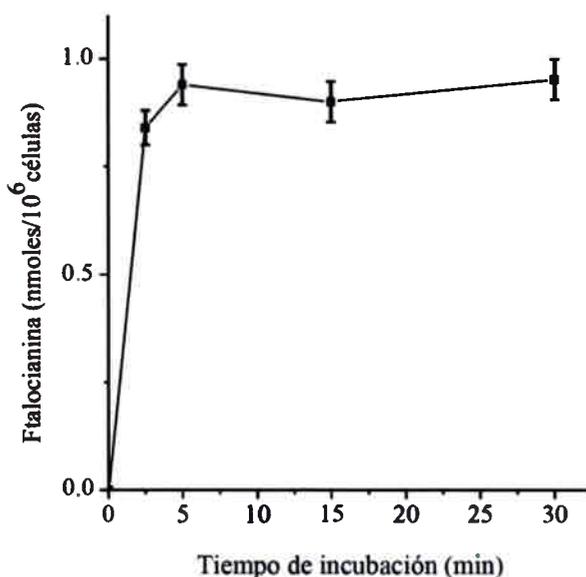


Figura 27. Cantidad de $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6 \text{ UFC/mL}$) tratadas con $1 \mu\text{M}$ a 37°C . Los valores representan la media \pm desviación estándar.

En todos los estudios de unión es importante remarcar que al incrementar el tiempo de incubación, no fue posible observar un incremento apreciable en la cantidad de FS unido a células de *C. albicans*, ya que tienden a saturarse a tiempos cortos de incubación.

Las cinéticas de unión celular solo fueron analizadas para los sensibilizadores presentados anteriormente (ZnPPc^{4+} , ZnAmPc^{4+} y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$) debido a que fueron los que generaron mejores valores de IFD. Estos resultados son concordantes con lo observado en la Figura 22 ya que la inactivación celular baja de ZnAmPc^{4+} puede deberse a la nula o muy leve unión dentro del microorganismo generada probablemente por su tendencia a agregarse.

7.3.3. Efecto fotosensibilizador sobre la curva de crecimiento

El retardo en el crecimiento de cultivos de *C. albicans* sensibilizados con ZnPPc^{4+} fue llevado a cabo en CS. Estos experimentos fueron realizados para asegurar que la

IFD en células es todavía posible cuando los cultivos no están en condiciones de inanición o bajo el efecto del lavado con buffer fosfato. Así, 5; 10 y 20 μM del sensibilizador fueron agregados a cultivos frescos de *C. albicans* alcanzando la fase lag de crecimiento e irradiados con luz visible a 37°C. Como podemos observar en la Figura 28, el crecimiento de *C. albicans* fue retardado cuando fue tratado con la ftalocianina e irradiado. Este retardo fue dependiente de la concentración de ZnPPc^{4+} . 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. Transcurridas aproximadamente 12 h, acercándonos al final de la serie de mediciones, fue posible apreciar el inicio de la fase estacionaria de acuerdo a lo indicado por la medición de turbidez del cultivo a 650 nm. Por otra parte, células de *C. albicans* expuestas a la ftalocianina en la oscuridad o no tratadas con el sensibilizador pero iluminadas no mostraron un retardo en el crecimiento comparado con los controles. Por lo tanto, los datos ilustran que el retardo del crecimiento observado es debido al efecto de la IFD del sensibilizador sobre las células.

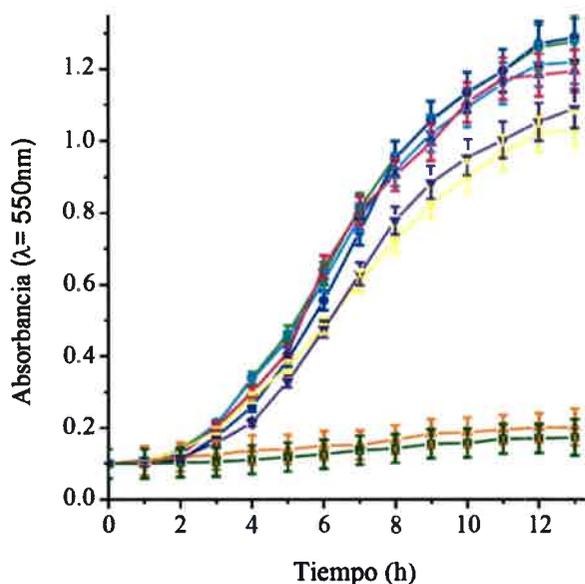


Figura 28. Curva de retardo del crecimiento de *C. albicans* incubadas con 5 μM (▼), 10 μM (▲) y 20 μM (■) de ZnPPc^{4+} expuestas a diferentes tiempos de irradiación con luz visible en CS a 37°C. Cultivos controles (●), cultivos de células tratadas con 5 μM (▼), 10 μM (▲) y 20 μM (■) en oscuridad, células sin sensibilizador pero irradiadas (◆) ($\lambda_{\text{abs}}=550\text{nm}$). Los valores representan la media±desviación estándar.

Por otro lado fue evaluado el retardo en el crecimiento de cultivos de *C. albicans* sensibilizados con $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ el cual fue llevado a cabo en CS. Así, 10 μM de los sensibilizadores fueron agregados a cultivos frescos de *C. albicans* alcanzando la fase de latencia y luego se irradiaron con luz visible a 37°C. Como se puede observar en la Figura 29, el crecimiento de *C. albicans* fue retardado cuando los cultivos fueron tratados con las ftalocianinas $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ e iluminados. La curva de crecimiento tuvo una fase de latencia durante las primeras 3 h y una fase de crecimiento exponencial luego de este tiempo.

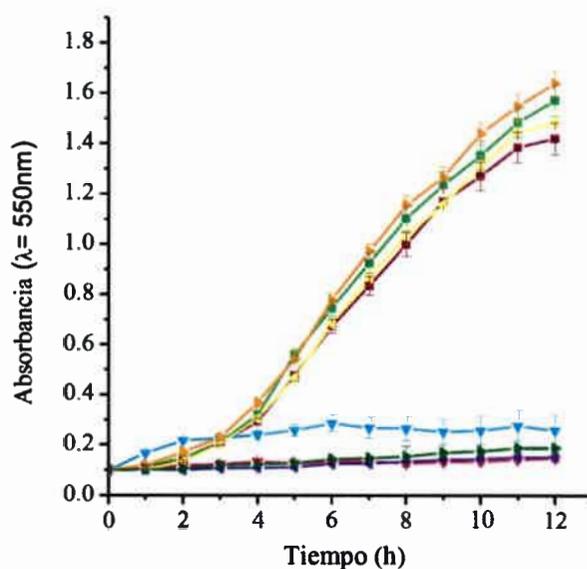


Figura 29. Curva de retardo del crecimiento de *C. albicans* incubadas con $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (▲), $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (◀) $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (▶) 10 μM expuestas a diferentes tiempos de irradiación en CS a 37 °C. Cultivos control (■); control iluminado (■) y células tratadas con $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (▼), $\text{AN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (▽) y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ (◀) mantenidas en oscuridad. Los valores representan la media \pm desviación estándar.

Transcurridas aproximadamente 12 h, acercándonos al final de la serie de mediciones, fue posible observar el inicio de la fase estacionaria de acuerdo a lo indicado por la medición de turbidez del cultivo a 650 nm. Por otra parte, células de *C. albicans* expuestas a las ftalocianinas en la oscuridad o no tratadas con el sensibilizador pero iluminadas no mostraron un retardo en el crecimiento comparado con los controles, a excepción de $\text{TN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ que bajo estas condiciones resultó tóxica en la oscuridad. Por lo tanto, los datos ilustran que el retardo del crecimiento observado para las tres

ftalocianinas fue debido al efecto de la IFD del sensibilizador sobre las células. Un efecto similar fue observado con las porfirinas tetracatiónicas TMPyP⁴⁺ y TMAP⁴⁺ en *C. albicans* [105,128] y con la ftalocianina ZnPPc⁴⁺ en *E. coli* [129].

Luego de realizar distintos estudios para evaluar la eficiencia de las ftalocianinas presentadas en esta tesis, frente a la levadura *C. albicans*, fue posible observar que si bien todas presentan características espectroscópicas y fotodinámicas apropiadas en solución (Tabla 1), no todas ellas fueron eficientes en un medio biológico. Los FS más apropiado fueron ZnPPc⁴⁺ y FN₃ZnPc³⁺ bajo las distintas condiciones evaluadas. Debido a diferentes inconvenientes presentados en el proceso de síntesis, no fue posible continuar los estudios con FN₃ZnPc³⁺, pero es importante remarcar que este FS posee una alta eficiencia frente a la inactivación de *C. albicans* y sería interesante en un futuro continuar la investigación con este potente fotosensibilizador. Luego de analizar la elevada eficiencia de ZnPPc⁴⁺ en un medio biológico, los estudios fueron direccionados hacia un análisis más detallado de su eficiencia, tanto en su unión y su IFD bajo distintas condiciones como así también determinando el mecanismo fotodinámico involucrado que conduce a la IFD de *C. albicans*.

7.3.4. Unión celular de ZnPPc⁴⁺ en presencia de lavados

La unión celular de la ftalocianina ZnPPc⁴⁺ en suspensión celular de $\sim 10^6$ UFC/mL en PBS en cultivos de *C. albicans* incubados con 5 y 10 μ M por diferentes tiempos (15, 30 y 60 min) a 37°C en la oscuridad fue analizada con una y dos etapas de lavado (Figura 30).

Cuando las células fueron sometidas a los lavados para eliminar el exceso de FS contenido en el sobrenadante, la cantidad de ZnPPc⁴⁺ unida a las células disminuye después del primer lavado y luego permanece constante. Estos resultados indican que al menos una fracción de la ftalocianina ZnPPc⁴⁺ fue unida fuertemente a la célula, debido a que no fue posible eliminarla aún después de dos etapas de lavados. Sin embargo, el efecto de la pérdida inicial podría disminuir la capacidad de inactivación por parte del sensibilizador. Para 5 μ M fue posible observar una disminución mayor en la unión con respecto a lo observado a 10 μ M, sin embargo para ambas concentraciones estas disminuciones no fueron muy marcadas con respecto a las suspensiones sin lavados. Esto estaría indicando que el sensibilizador fue capaz de unirse fuertemente a la

membrana de las células o fue incorporado intracelularmente, haciendo que sea difícil removerlo.

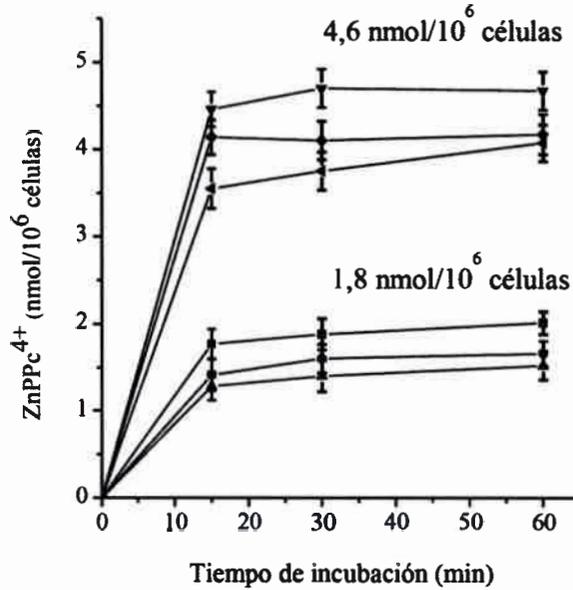


Figura 30. Cantidad de ZnPPc⁴⁺ recuperada de células de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) tratadas con 5 μ M sin lavar (■), 1 lavado (●) y 2 lavados (▲) y 10 μ M sin lavar (▼), 1 lavado (◆) y 2 lavados (◄) del sensibilizador por 30 min a 37°C y diferentes etapas de lavados. Los valores representan la media \pm desviación estándar.

7.3.5. Unión celular *in vitro* a distintas densidades celulares de *C. albicans*

En la Figura 31 fue posible evaluar la eficiencia en la unión de ZnPPc⁴⁺ a diferentes concentraciones (5 y 10 μ M) y distintas densidades celulares en PBS con un tiempo de incubación de 30 min. Como es posible observar, al incrementar la densidad celular para ambas concentraciones de ZnPPc⁴⁺ la unión del sensibilizador a las células disminuye. Este efecto es debido a que posee una mayor cantidad de células sobre los cuales actuar. Por este motivo la proporción ftalocianina/célula disminuye.

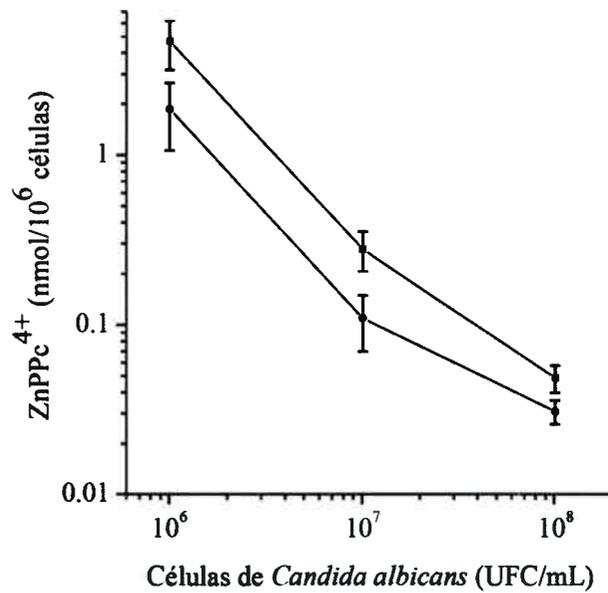


Figura 31. Unión de ZnPPc⁴⁺ a las células bajo diferentes densidades celulares y concentraciones 5 μM (●) y 10 μM (■) incubados por 30 min.

La unión de ZnPPc⁴⁺ a las células utilizando una densidad celular de ~ 10⁷ y ~ 10⁸ UFC/mL fue estudiada a distintos tiempos de incubación (15 y 30 min) en presencia de 5-10 μM del fotosensibilizador (Figura 32). Los resultados indican que la cantidad de ZnPPc⁴⁺ unida a *C. albicans* no cambia entre 15 y 30 min de incubación. Por lo tanto, este fotosensibilizador se une rápidamente a las células aún en presencia de densidades celulares mayores a 10⁶ UFC/mL.

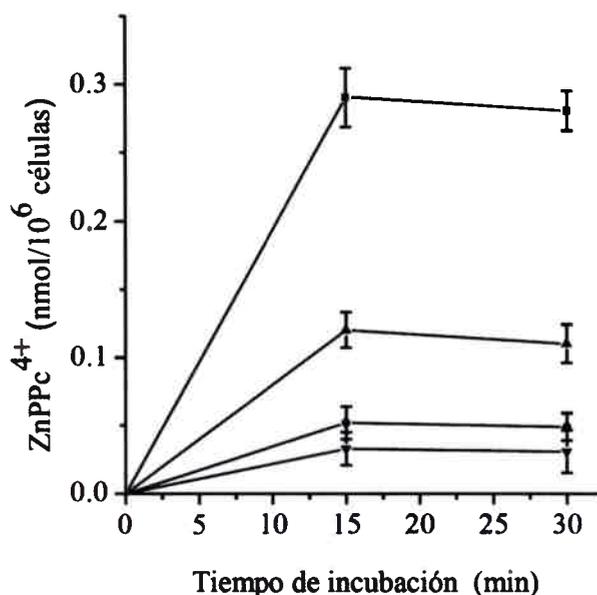


Figura 32. Cantidad de ZnPPc⁴⁺ recuperada de células de *C. albicans* ~ 10⁷ UFC/mL 5 μM (▲) y 10 μM (■) y ~ 10⁸ UFC/mL tratadas con 5 μM (▼) y 10 μM (●) de sensibilizador por 15 y 30 min a 37°C. Los valores representan la media±desviación estándar.

7.3.6. Unión celular a distintas concentraciones de ZnPPc⁴⁺

Para evaluar el efecto de la concentración de ZnPPc⁴⁺ unido a las células de *C. albicans*, fue analizado lo que ocurría a una densidad celular de ~ 10⁶ UFC/mL en PBS. Las concentraciones evaluadas fueron 1-10 μM de la ftalocianina a 30 min a 37°C en oscuridad. Como puede observarse en la Figura 33, la incorporación fue lineal en el rango de concentraciones utilizadas (1, 5 y 10 μM) dando valores de ~ 0,35; 1,88 y 4,5 nmol/10⁶ células, respectivamente [97].

La tendencia observada con ZnPPc⁴⁺ fue similar al comportamiento previamente encontrado en *C. albicans* utilizando 5 μM de 5,10,15,20-tetrakis(N-metil-4-piridil)porfirina (TMPyP⁴⁺) y 5-(4-trifluorfenil)-10,5,20-tris(4-acetamidofenil)porfirina (TFAP³⁺), las cuales producen una unión similar de ~ 1,70 nmol/10⁶ células con 15 min de incubación [105]. Mientras que en trabajos previos con 10 μM del sensibilizador neutro, formado por una Zn(II) ftalocianina sustituida por cuatro unidades de fluconazol en la periferia del macrociclo (ZnPcF), la unión fue de ~ 0.17 nmoles/10⁶ células con 30 min de incubación [112]. Esto demuestra que la presencia de cargas en la macroestructura de los fotosensibilizadores es fundamental para generar una eficaz unión del sensibilizador a las células y consecuentemente generar una eficaz IFD.

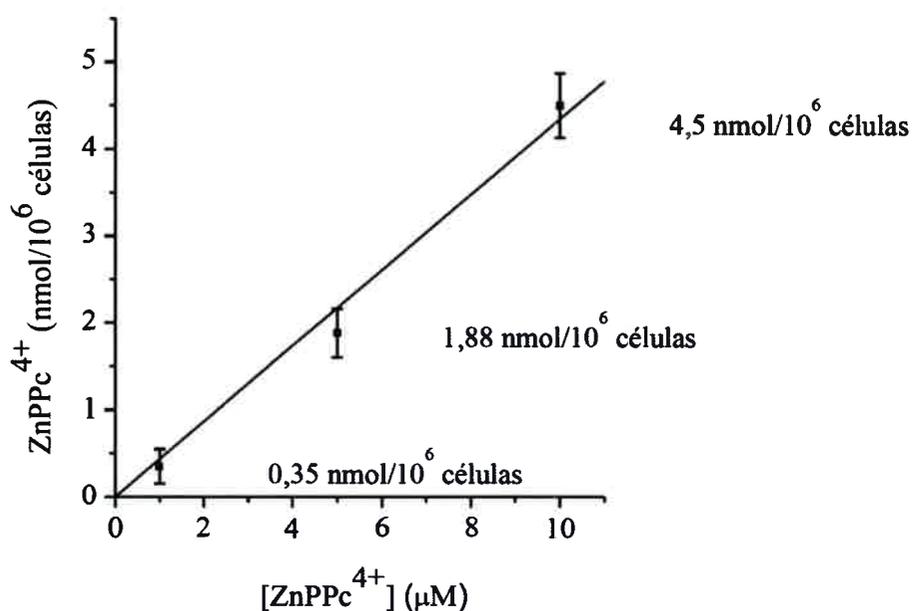


Figura 33. Unión de ZnPPc⁴⁺ a las células de *C. albicans* en PBS (~10⁶ UFC/mL) tratado con diferentes concentraciones de ftalocianina por 30 min en oscuridad a 37 °C.

7.3.7. Unión celular a distintas temperaturas y en presencia de inhibidores metabólicos

El efecto de la temperatura en la unión celular de ZnPPc⁴⁺ fue analizado a 4 y 37°C. Como fue posible observar en la Figura 34 la unión de ZnPPc⁴⁺ fue significativamente dependiente de la temperatura [97]. Sin embargo, la diferencia en la unión de ZnPPc⁴⁺ a *C. albicans* fue ~ 10 %. Este hecho podría ser atribuido a la pérdida de la fluidez de la membrana producto de las bajas temperaturas (4°C), disminuyendo la unión del FS a las células. La temperatura juega un papel importante en la fluidez de la membrana, ya que al aumentar la temperatura, la fluidez se incrementa y la membrana se hace hiperfluida; al disminuir la temperatura, la fluidez decae haciéndose más viscosa y la actividad de la misma se ve limitada [130].

Por otro lado, fue analizado el efecto de azida sódica y 2,4 DNF en la unión de ZnPPc⁴⁺ a las células. Azida sódica fue utilizada como inhibidor del complejo IV o citocromo c oxidasa y el DNF como un desacoplante de la fosforilación oxidativa en la cadena de transporte de electrones [131, 132] (Figura 35).

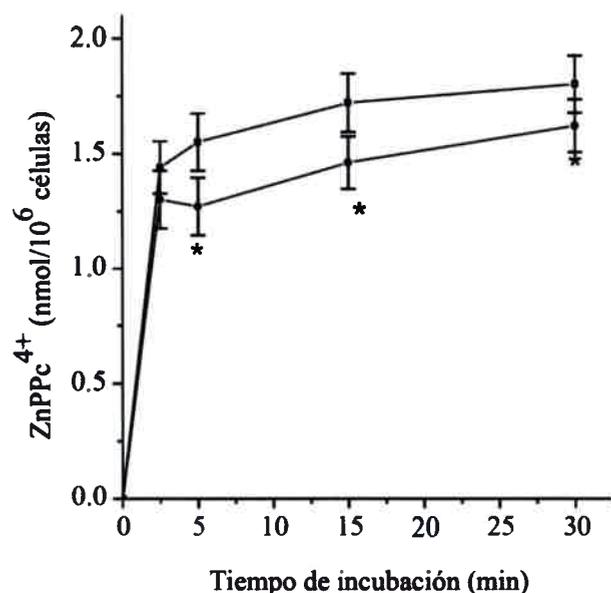


Figura 34. Unión de ZnPPc⁴⁺ a suspensiones celulares de *C. albicans* en PBS (~10⁶ UFC/mL) tratadas con 5 μM de ftalocianina por diferentes tiempos de incubación y temperaturas 4°C (●) y 37°C (■). Los valores representan la media ± desviación estándar de tres experimentos separados (* p <0,05 con respecto a una incubación de 2,5 min para ambas temperaturas).

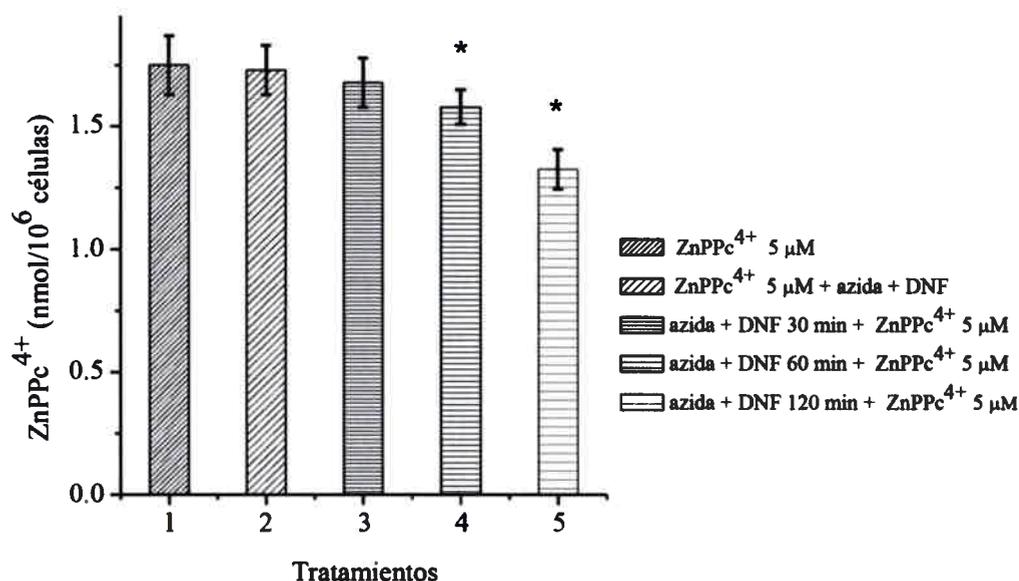


Figura 35. Unión de ZnPPc⁴⁺ a las células de *C. albicans* en PBS (~10⁶ UFC/mL). Los valores representan la media ± desviación estándar de tres experimentos separados (* p <0,05 con respecto a los valores obtenidos al incubar las células durante 30 min con azida y DNF previo al FS).

Como se puede observar en la Figura 35, la unión celular con 5 μM de ZnPPc⁴⁺ durante 30 min de incubación y el posterior agregado de 10 mM de azida y de 2,4 DNF

durante 30 min (columna 2) en la oscuridad a 37°C fue similar a la encontrada con 5 μM de ZnPPc^{4+} solamente. Luego cuando las células fueron tratadas previamente con 10 mM de azida y de 2,4 DNF por distintos tiempos (30, 60 y 120 min) y luego fue agregado 5 μM de ZnPPc^{4+} durante 30 min en la oscuridad a 37°C, la cantidad de ZnPPc^{4+} unida a las células disminuyó a 1,3 y 1,0 nmol/ 10^6 células con 60 y 120 min respectivamente, Figura 35 (columna 4 y 5). La unión de ZnPPc^{4+} fue poco afectada por la presencia de azida y DNF principalmente cuando las células de *C. albicans* fueron preincubadas con estos compuestos por 60 min previo al tratamiento con la ftalocianina (Figura 35 columna 4). Como fue reportado en estudios previos, las células tratadas con azida previo a la incubación o durante la incubación con fotofrina, presentaron una fluorescencia equivalente a las células que fueron incubadas en ausencia de azida [133]. Sin embargo, la cantidad de ZnPPc^{4+} unida a las células fue significativamente afectada cuando las suspensiones celulares fueron incubadas por un tiempo prolongado (120 min) con azida y DNF antes del tratamiento con la ftalocianina (Figura 35 columna 5). Este efecto podría estar indicando que frente a la presencia de estos inhibidores, la configuración de la membrana citoplasmática y los posibles sitios de unión que el FS poseen en condiciones normales, se ven afectados, lo que dificultaría su unión a las células e [134].

7.4. Inactivación fotodinámica *in vitro* empleando ZnPPc^{4+} como FS

7.4.1. Inactivación fotodinámica de suspensiones celulares de *C. albicans* en PBS

Con la finalidad de poder determinar si ZnPPc^{4+} es capaz de generar una eficiente IFD a tiempos cortos de incubación, efectuando su acción con el mínimo tiempo de contacto con las células, suspensiones celulares de *C. albicans* fueron evaluadas en PBS ($\sim 10^6$ UFC/mL) utilizando 5 μM de ZnPPc^{4+} luego de 1 min de incubación en la oscuridad e irradiando durante 5; 15 y 30 min. Los experimentos control demostraron que la viabilidad celular no fue afectada y que las células fueron inactivadas cuando los cultivos tratados con ZnPPc^{4+} fueron expuestos a la luz visible. Un tiempo de irradiación de solo 5 min fue suficiente para producir una disminución en la supervivencia celular de ~ 3 log con 5 μM del fotosensibilizador (Figura 36). La IFD fue incrementando conforme aumenta el tiempo de irradiación. A partir de estos resultados podemos determinar que la actividad de ZnPPc^{4+} fue efectiva a cortos

tiempos de incubación (1 min), indicando una vez más, la rápida unión de ZnPPc⁴⁺ a las células.

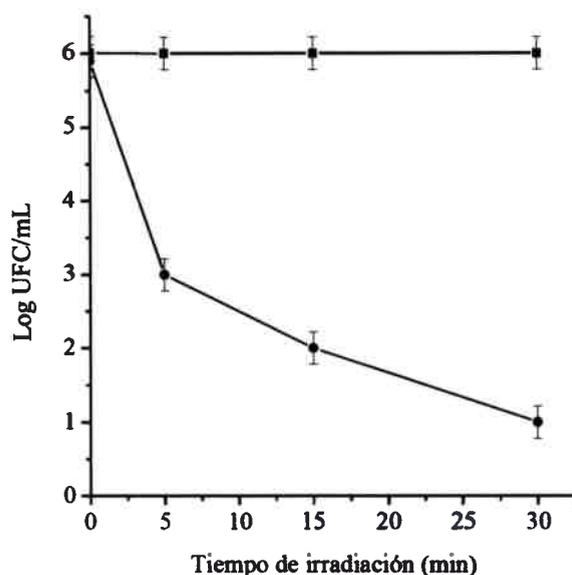


Figura 36. Curva de inactivación celular de *C. albicans*: (10^6 UFC/mL) incubada con ZnPPc⁴⁺ 5 µM (●) por 1 min a 37°C en oscuridad y expuesta a diferentes tiempos de iluminación. Tratamiento control (■).

7.4.2. Inactivación fotodinámica a distintas concentraciones de ZnPPc⁴⁺

La fotoactivación en suspensiones celulares de *C. albicans* fue evaluada en PBS ($\sim 10^6$ UFC/mL) usando diferentes concentraciones del mismo (1; 2,5, 5 y 10 µM) y distintos períodos de irradiación (15 y 30 min). Un tiempo de irradiación de 15 min fue suficiente para producir una disminución en la supervivencia celular de $\sim 4,5$ y 5 log con 5 y 10 µM del fotosensibilizador respectivamente. Con un tiempo de irradiación de 15 min fue posible observar una clara dependencia entre la fotoactivación y la concentración de ZnPPc⁴⁺ utilizada (1-10 µM). Luego de 30 min de irradiación (54 J cm^{-2}), la IFD sobre *C. albicans* fue efectiva incluso a bajas concentraciones (1 µM) produciendo una fotoactivación de ~ 4 log en la supervivencia celular (Figura 37).

Por otro lado, el incremento en la concentración de la ftalocianina de 5 a 10 µM no influyó en la fotoactivación, ya que hubo una disminución de la supervivencia celular de ~ 5 log con 30 min de irradiación para ambas concentraciones. Estos resultados representan un valor del 99,999 % de inactivación celular.

La presencia de cargas en el fotosensibilizador ZnPPc⁴⁺ produjo una mayor IFD sobre *C. albicans* en comparación con los valores previamente observados para la ftalocianina neutra ZnPcF bajo las mismas condiciones empleadas (10 μM) [112], demostrando que la presencia de cargas en el macrociclo de la ftalocianina es fundamental para generar una unión más efectiva del fotosensibilizador a las células y conducir a una mayor IFD sobre *C. albicans*.

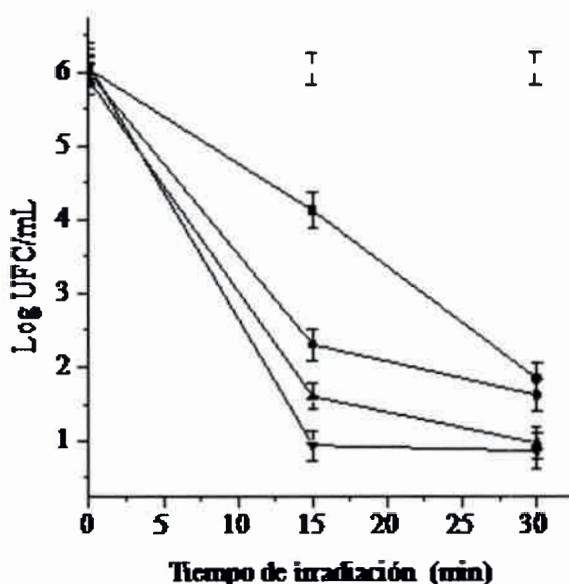


Figura 37. Curva de inactivación celular de *C. albicans*: (10^6 UFC/mL) incubada con diferentes concentraciones de ZnPPc⁴⁺ 1 (■), 2,5 (●), 5 (▲) y 10 μM (▼) por 30 min a 37°C en oscuridad y expuesta a diferentes tiempos de iluminación. Control de irradiación (♦). Los valores representan la media±desviación estándar.

La eficiencia en la actividad fotodinámica de esta ftalocianina es dependiente de la dosis de luz irradiada, aumentando su fotoinactivación con el tiempo de irradiación con luz visible y de la concentración utilizada.

7.4.3. IFD bajo distintas densidades celulares

Si bien, los cultivos de $\sim 10^6$ UFC/mL son eficientemente fotoinactivados con 5 μM de sensibilizador ZnPPc⁴⁺, cuando la densidad celular incrementa ($\sim 10^7$ UFC/mL) no fue posible observar una disminución importante en la viabilidad de *C. albicans*, al tratar los cultivos bajo las mismas condiciones. La inactivación celular fue de 5 y 3 log

en cultivos de 10^6 y 10^7 UFC/mL respectivamente, mientras que la supervivencia celular prácticamente no fue afectada con una densidad de 10^8 UFC/mL (Figura 38) [97].

Al incrementar la densidad celular, la eficiencia de la IFD decrece significativamente, debido a una elevada dependencia entre la interacción del sensibilizador y la unión de este a las células. Como consecuencia la mayor parte de $ZnPPc^{4+}$, en la etapa de incubación se une a las células, y cuando el número celular incrementa, la cantidad de fotosensibilizador distribuido en cada célula disminuye. Por lo tanto, la proporción ftalocianina/célula es menor y este comportamiento va acompañado de una disminución considerada en la IFD de las levaduras al aumentar la densidad celular de 10^6 UFC/mL a 10^8 UFC/mL.

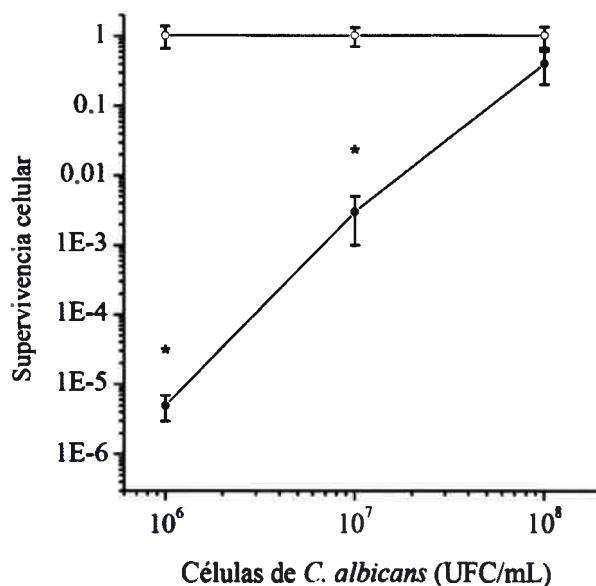


Figura 38. Curva de supervivencia de *C. albicans* con diferentes densidades celulares incubadas con 5 μ M de $ZnPPc^{4+}$ durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante 30 min (30 mW/cm^2). Cultivos controles sin tratar (○). Cultivos controles tratados (●). Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados (* $p < 0,05$, en comparación con las células no tratadas).

7.4.4. IFD en presencia de lavados

La inactivación celular de ZnPPc⁴⁺ (5 μM) sobre *C. albicans* fue evaluada después de realizar una y dos etapas de lavados, para eliminar todo el FS que no fue unido eficazmente a las células. Como se puede observar en la Figura 39, la inactivación celular disminuye después de los lavados debido a que se pierde parte de la ftalocianina unida débilmente a las células. Estos resultados indican una vez más que ZnPPc⁴⁺ se encuentra fuertemente unido a las células y es difícil removerlo incluso luego de dos etapas de lavado, obteniéndose buenos valores de IFD. Bajo estas condiciones, el efecto fotodinámico asociado a la unión de ZnPPc⁴⁺, a una concentración de 5 μM disminuyó en ~ 1 log con respecto a las células no lavadas.

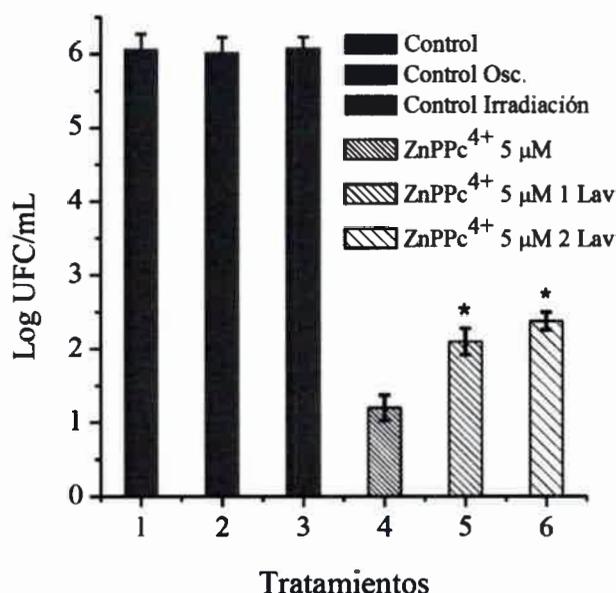


Figura 39. Supervivencia de *C. albicans* (~10⁶ UFC/mL) incubadas con ZnPPc⁴⁺ en oscuridad por 30 min a 37 °C y expuestas a la luz visible por 30 min. Los valores representan la media ± desviación estándar de tres experimentos separados (* p <0,05 en comparación con los valores para IFD sin lavado).

7.4.5. IFD bajo distintos tiempos de incubación

Por otro lado, resulta interesante analizar el efecto de la IFD en la supervivencia celular de *C. albicans* bajo distintos tiempos de incubación (2,5; 15 y 30 min), previos a la irradiación con el FS (Figura 40). Los cultivos celulares fueron incubados con 5 μM

de ZnPPc⁴⁺ en la oscuridad a 37°C e irradiados por 30 min. La Figura 40 muestra una menor IFD al incubar las células durante solo 2,5 min; sin embargo, la fotoinactivación disminuyó ~ 0,5 log con 15 y 30 min de incubación previa. Estos resultados respaldan los obtenidos en la unión del sensibilizador a las células, indicando una vez más, la rápida cinética de unión a las células e indican una unión celular muy similar bajo los distintos tiempos de incubación. Es importante remarcar que con solo 2.5 min de incubación de ZnPPc⁴⁺ fue suficiente para afectar la supervivencia celular de *C. albicans* en >4 log.

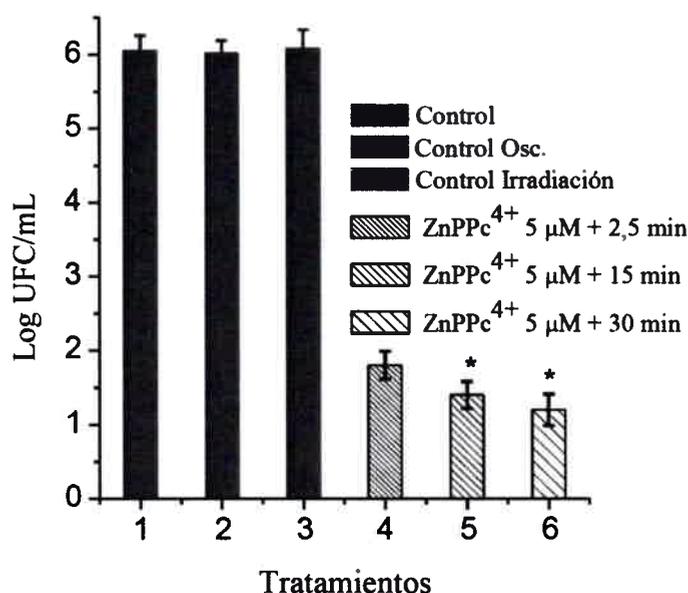


Figura 40. Supervivencia de *C. albicans* (~10⁶ UFC/mL) incubadas con ZnPPc⁴⁺ en oscuridad a 37 °C y expuestas a la luz visible por 30 min. Los valores representan la media ± desviación estándar de tres experimentos separados (* p <0,05 en comparación con los valores para IFD a 2,5 min de incubación).

7.4.6. Citotoxicidad

La citotoxicidad de ZnPPc⁴⁺ fue evaluada *in vitro* utilizando células Vero cultivadas a 37°C en RPMI. En la Tabla 2, pueden observarse los valores correspondientes a las distintas concentraciones de ZnPPc⁴⁺ analizadas con sus respectivos logaritmos, en función de los valores correspondientes a la viabilidad celular luego de la irradiación con luz visible. A partir de la Figura 41 surgen concentraciones 50% citotóxicas (CC₅₀) de alrededor de 190,58 mM para las células mantenidas en la oscuridad (24 h) y 15,55 ± 0,55 mM para las células irradiadas (15 min) y posteriormente mantenidas en la oscuridad (24 h). Los controles corresponden al

100 % de la viabilidad celular luego de 24 h, mientras que en presencia de ZnPPc⁴⁺ e irradiadas por 15 min es posible observar que la viabilidad disminuye conforme aumenta la concentración, observándose una disminución de ~ 80 % a la máxima concentración analizada. A partir de estos resultados, se puede observar que las concentraciones analizadas superan ampliamente la dosis mínima terapéutica que podría ser utilizada en el ámbito clínico para el tratamiento de *C. albicans*, avalando su aplicación como antifúngico.

Tabla 2. Ensayos de citotoxicidad

(ZnPPc ⁴⁺ mM)	Log (ZnPPc ⁴⁺)	Viabilidad (%)	
		Oscuridad	Luz + Oscuridad
0		100	100
2,760	0,441	100	100
5,521	0,742	100	100
11,041	1,043	100	70,69
22,082	1,344	90,66	34,77
44,164	1,645	75,17	17,82

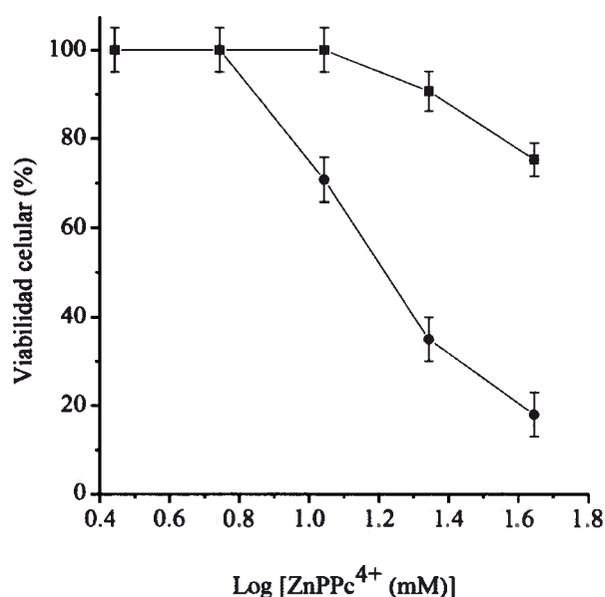


Figura 41. Efecto de la citotoxicidad de las células Vero incubadas con ZnPPc⁴⁺ a distintas concentraciones de y expuestas a la luz visible por 15 min. Los valores representan la media±desviación estándar de los tres experimentos por separado. Control (■) Células Vero irradiadas (●).

7.4.7. Estudios en medios sólidos

7.4.7.1. 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 [135,136]. Además, el tratamiento fotodinámico fue propuesto como una nueva posibilidad para proteger alimentos del deterioro microbiano [137]. Por esto la actividad fotodinámica de ZnPPc⁴⁺ fue evaluada en células de *C. albicans* inmovilizadas sobre AS.

La unión del sensibilizador en las células fue realizada de dos modos. En primer lugar, las suspensiones celulares de *C. albicans* en PBS fueron incubadas con ZnPPc⁴⁺ (10 µM) por 30 min a 37°C en oscuridad. Luego, las células fueron sembradas en placas y estas fueron incubadas por 30 min a 37°C en oscuridad. En este experimento el sensibilizador fue incorporado en solución y después las células fueron localizadas sobre superficies de agar. Luego, las placas fueron iluminadas por 30 min con luz visible. La actividad fotodinámica de ZnPPc⁴⁺ fue evaluada bajo estas condiciones a diferentes tiempos de irradiación como lo observado en la Figura 42. Los resultados indicaron que no hubo formación de colonias para células tratadas con 10 µM de ZnPPc⁴⁺ e irradiadas. Los porcentajes de viabilidad celular producida por acción fotodinámica fueron presentados en la Tabla 3.

Los controles presentaron un 100 % en la supervivencia celular, mientras que frente a la acción de ZnPPc⁴⁺ (10 µM) iluminado por 30 min fue posible observar solo un 1,5 % en la supervivencia celular. Bajo estas condiciones la viabilidad celular disminuyó rápidamente a los 10 min de irradiación y la formación de colonias no se detectó después de 30 min. Resultados similares fueron observados la porfirina tetracatiónica TMPyP (1; 2,5 y 5 µM) donde no fue detectado la formación de colonias en cultivos celulares tratados con una concentración de 5 µM y 30 min de irradiación con luz visible [128].

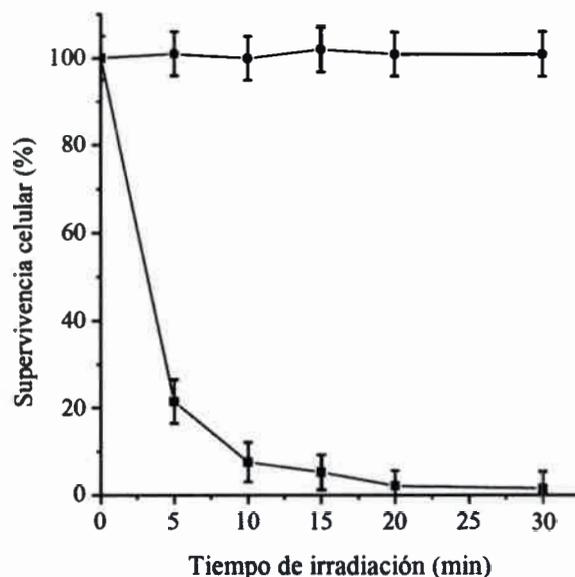


Figura 42. Inactivación de células de *C. albicans* sobre AS. La suspensión celular de $\sim 10^6$ UFC/mL en PBS fue incubada con ZnPPc⁴⁺ (10 μ M) por 30 min a 37°C en oscuridad, las células se sembraron sobre agar e irradiaron con luz visible a distintos tiempos (■). Control no tratado e irradiado (●). Los valores representan la media \pm desviación estándar.

Tabla 3. Representación en porcentajes de viabilidad celular *C. albicans* generada por acción fotodinámica

Tratamientos	N° de colonias	Viabilidad celular (%)
Control	65	100
ZnPPc⁴⁺ en la osc	65	100
Control de iluminación	60,5	93
ZnPPc⁴⁺ más iluminación 5 min	10,5	16
ZnPPc⁴⁺ más iluminación 10 min	5	7,6
ZnPPc⁴⁺ más iluminación 15 min	5	7,6
ZnPPc⁴⁺ más iluminación 20 min	2	3
ZnPPc⁴⁺ más iluminación 30 min	1	1,5

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 la superficie de CS conteniendo ZnPPc⁴⁺ impregnada en pequeñas áreas. Así, diferentes cantidades de

ZnPPc⁴⁺ (5,5; 11; y 22 nmol) fueron distribuidas homogéneamente como se muestra en la Figura 43. 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, período durante el cual se llevó a cabo la interacción de ZnPPc⁴⁺ con las células. Posteriormente las placas fueron irradiadas con luz visible por 30 min e incubadas por 48 h a 37°C en oscuridad. Como puede observarse no hubo crecimiento celular de *C. albicans* en las áreas tratadas con ZnPPc⁴⁺ (Figura 43 A), aunque de acuerdo a la cantidad de sensibilizador depositada fue el tamaño del halo de inhibición producido. Así, un área muy pequeña fue obtenida para 5,5 nmol y el cambio comenzó a observarse a los 11 nmoles siendo máxima la inhibición del crecimiento celular para los 22 nmol de ZnPPc⁴⁺. En contraste, la modificación del “césped” celular no fue observada para los controles tratados con DMF y mantenidos en oscuridad (Figura 43 B). Por lo tanto, podemos visualizar que la acción fotodinámica inducida por ZnPPc⁴⁺ conduce a la muerte celular sobre una superficie de agar.

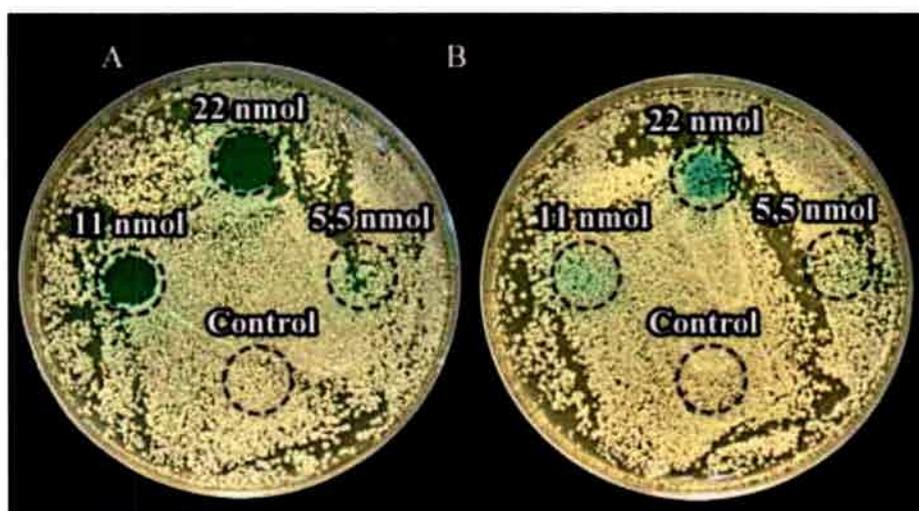


Figura 43. Inactivación de células de *C. albicans* sobre agar Sabouraud irradiadas con luz visible por 30 min. Los círculos indican las áreas con diferentes cantidades de ZnPPc⁴⁺ (5,5; 11; y 22 nmol). A: iluminadas 30 min. B: oscuridad.

Resultados similares fueron reportados para la porfirina tetracatiónica TMPyP⁴⁺ (5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina) utilizando distintas cantidades de la misma (2.2, 4.5, 6.7 y 9.0 nmol) en *C. albicans*, donde fue posible

observar que el tamaño del halo de inhibición producido fue incrementando con la cantidad de sensibilizador depositada [128].

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

La actividad fotodinámica de ZnPPc⁴⁺ fue evaluada en colonias de *C. albicans* sobre AS. Así, una dilución apropiada de una suspensión celular de *C. albicans* en PBS fue sembrada en placas de AS para obtener colonias pequeñas (~ 1 mm de diámetro) que se encuentren bien separadas unas de otras. Los cultivos se incubaron toda la noche a 37°C y fueron tratadas con 11 nmol de ZnPPc⁴⁺, la cual fue distribuida homogéneamente sobre las colonias. Luego, las placas fueron irradiadas con luz visible por 3 h y se incubaron a 37°C en oscuridad. Los resultados para ZnPPc⁴⁺ se muestran en la Figura 44. El retardo en el crecimiento de las colonias de *C. albicans* sobre CS fue evidenciado claramente para las colonias tratadas con ZnPPc⁴⁺ (Figura 44 A) con respecto al control en oscuridad o al control sin sensibilizador (Figura 44 B). Un incremento comparable en el tamaño de la colonia fue obtenido en ambos experimentos controles. Así, el área de las colonias de los controles fue incrementada ~ 6 veces después de toda una noche (24 h) y 18 veces en una segunda incubación nocturna (48 h) a 37°C. En contraste no fue observado un crecimiento en las colonias tratadas aún después de 48 h de incubación. Por lo tanto, el retardo del crecimiento observado después de la irradiación de los cultivos tratados con ZnPPc⁴⁺ es debido al efecto de fotosensibilización del agente.

Un efecto similar fue observado con las porfirinas catiónicas TFAP³⁺ (yoduro de 5-(4-trifluorfenil)-10,5,20-tris(4-trimetilamoniofenil)porfirina) y TMAP⁴⁺ (5,10,15,20-tetra(4-trimetilamoniofenil)porfirina p-tosilato) y al tratar las colonias con diferentes cantidades (2.2–8.8 nmol) [105] y con TMPyP 9.0 nmol [128] en *C. albicans*, donde no fue evidenciado un incremento en el tamaño de las colonias tratadas, indicando que el retardo de crecimiento obtenido luego de la irradiación de los cultivos fue debido al efecto de la fotosensibilización del agente producido por la luz visible.

Por otro lado, experimentos comparables fueron realizados con colonias pero exponiendo las placas de cultivos directamente a la luz solar del mediodía (50 mW/cm²) por 3 h. Durante la irradiación, la temperatura de los cultivos fue alrededor de 35°C. Esto indica que la inactivación térmica de las levaduras no ocurrió bajo estas condiciones, como lo demostraron los experimentos controles. De manera similar a lo

observado utilizando la luz artificial de un proyector, no se encontró un aumento en el tamaño de las colonias tratadas con el FS e irradiadas con luz natural (resultados no mostrados).

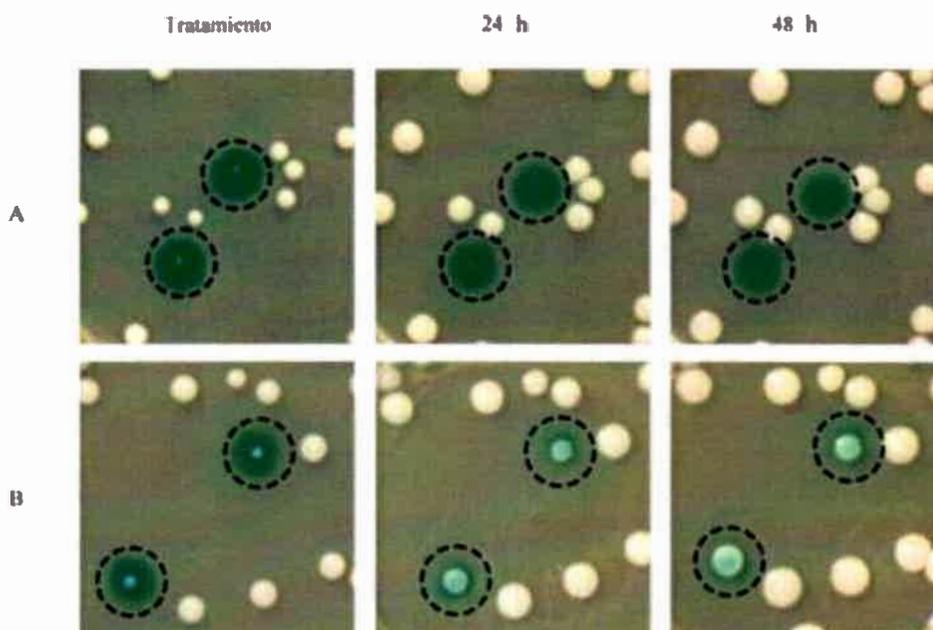


Figura 44. Crecimiento de colonias de *C. albicans* en CS tratadas con 11 nmol de ZnPPc⁴⁺ e irradiadas con luz visible (30 mW/cm²) por 3 h. A: tratamiento con ZnPPc⁴⁺. B: controles.

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

Dentro de los factores de virulencia de *C. albicans*, una importante característica morfológica, es su capacidad para producir tubos germinativos. Estos pueden obtenerse cuando la levadura es incubada en suero humano a una temperatura de 37°C durante 2 h, generando una filamentización en suero. Esta etapa es la primera 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 [24].

Una suspensión de células de *C. albicans* creciendo en forma de pseudohifa fue posible obtenerla luego de la incubación de las levaduras durante 2 h en suero humano. Esto fue evidenciado mediante el análisis de las muestras bajo el microscopio óptico, observándose proyecciones, desde las células, denominadas tubos germinales (Figura 45).

La aplicación de la IFD sobre los filamentos en suero fue realizada utilizando 5 μM de ZnPPc^{4+} . Bajo estas condiciones (5, 15 y 30 min de irradiación), la supervivencia de *C. albicans* no fue afectada, ya que no hubo diferencias significativas con el grupo control (Figura 46). En estudios previos de IFD realizados con fotosensibilizadores catiónicos sobre *E. coli* fue observado 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 [69].



Figura 45. Tubos germinales en *C. albicans* en suero humano. Tamaño 100 X.

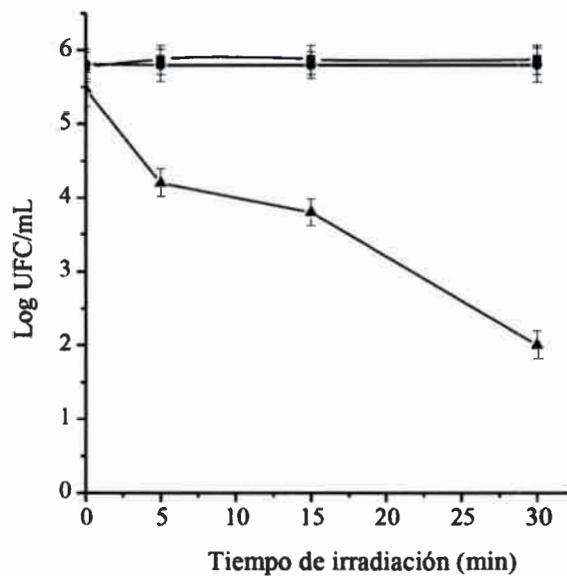


Figura 46. Inactivación de pseudohifas de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubadas con 5 μM de ZnPPc^{4+} en oscuridad por 30 min a 37 °C y expuesta a luz visible por 5, 15 y 30 min (90 mW/cm^2). Tratamiento control (■), IFD en suero (●), IFD en PBS (▲).

Por otro lado, en las células filamentosas resuspendidas en PBS y tratadas con 5 μM de ZnPPc^{4+} fue observada una pérdida de la supervivencia celular de ~ 2 log para 5 y 15 min de irradiación. Con un aumento en el tiempo de irradiación de 30 min fue posible alcanzar una disminución en la viabilidad celular de ~ 4 log (Figura 46). Así, en estas condiciones si bien fue posible alcanzar una fotoinactivación significativa de *C. albicans* creciendo como pseudohifa, no fue posible observar el mismo efecto que frente a las levaduras en suspensión celular.

Estudios realizados *in vivo* para evaluar la patogenicidad de *C. albicans* en un modelo de ratón, en presencia del fotosensibilizador azul de metileno (0.05 mM) indicó que la IFD fue capaz de reducir el crecimiento y la habilidad de *C. albicans* para formar tubos germinales en una infección sistémica [138].

7.5. Mecanismo de acción

7.5.1. Formación de estado excitado triplete de ZnPPc^{4+} en las células de *C. albicans*

La formación de estado excitado triplete de ZnPPc^{4+} fue estudiada en solución de DMSO. Este solvente fue seleccionado debido a que permite solubilizar a los sensibilizadores de manera no agregada. En estas condiciones el fotosensibilizador fue capaz de unirse eficazmente a las células, con valores similares a los observados para ZnPPc^{4+} en PBS y fue utilizado como un medio para mantener una dispersión celular. Los estudios fueron realizados en ausencia y en presencia de suspensiones celulares de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL). Los resultados para ZnPPc^{4+} fueron comparados con dos ftalocianinas de referencia, una tetracatiónica ZnPyPz y una sin cargas ZnPc . Los espectros de absorción de las ftalocianinas en DMSO pueden visualizarse en la Figura 47. En este medio, las tres ftalocianinas se encuentran disueltas como monómeros y los espectros de absorción fueron ajustados a una absorbancia de 0,3 a la longitud de onda de excitación del láser ($\lambda=355$ nm).

El estado triplete de la ftalocianina puede reaccionar con $^3\text{O}_2$ por un proceso de transferencia de energía conduciendo a la formación de $^1\text{O}_2$, el cual es considerado una de las principales especies citotóxicas involucradas en el daño celular. La posible interacción del estado triplete excitado del sensibilizador ($^3\text{FS}^*$) con los sustratos fue estudiado mediante LFF a 355 nm. Esta es una técnica de resolución temporal que permite el estudio espectroscópico y cinético de especies de corta vida (del orden de los mili o microsegundos), también llamadas especies transitorias, las cuales son generadas

por el empleo de luz pulsada, pudiéndose obtener espectros y decaimientos de dichas especies [139,140].

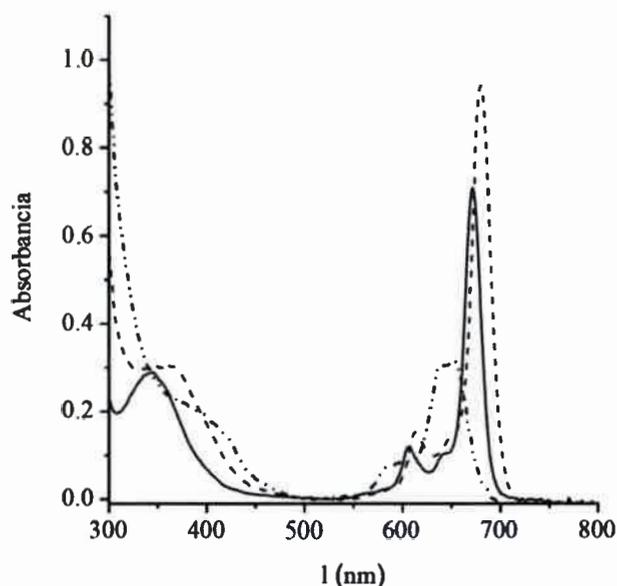
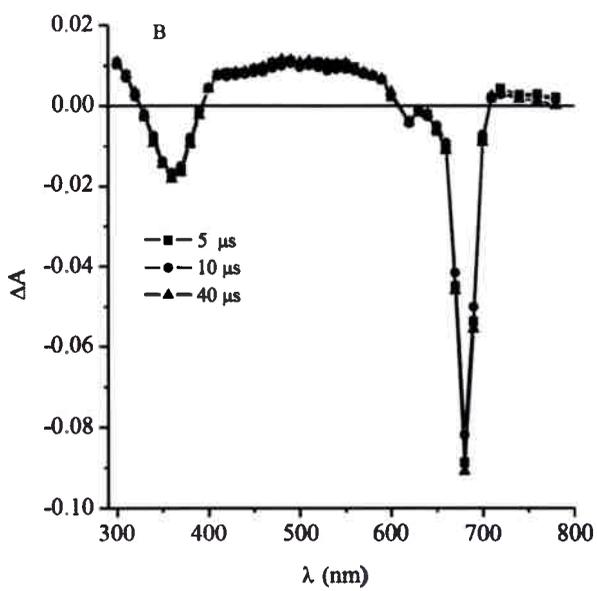
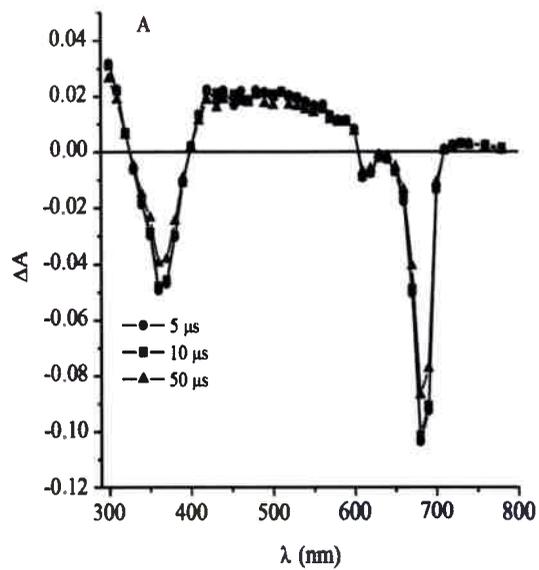


Figura 47. Espectro de absorción de las ftalocianinas ZnPPc⁴⁺ (---), ZnPyPz (...) y ZnPc (—) en DMSO.

Las especies transitorias del estado triplete generadas mediante la excitación de la muestra por un pulso láser, pueden ser observadas mediante cambios en las características de absorción de luz, los cuales son detectados por un espectrofotómetro convencional con una fuente de luz continua. La formación de triplete en ausencia de células para ZnPPc⁴⁺, ZnPyPz y ZnPc, fue presentada en la Figura 48 los cuales fueron medidos en DMSO por LFF cada 10 nm en el rango entre 300-800 nm.

Los espectros de absorción para las tres ftalocianinas indicaron la presencia de especies transitorias, que decaen monoexponencialmente con los tiempos de vida del estado triplete de 180, 360 y 120 μ s para ZnPPc⁴⁺, ZnPyPz y ZnPc, respectivamente (Figura 49). Resultados similares fueron obtenidos previamente para una ftalocianina catiónica en DMF y agua [141].



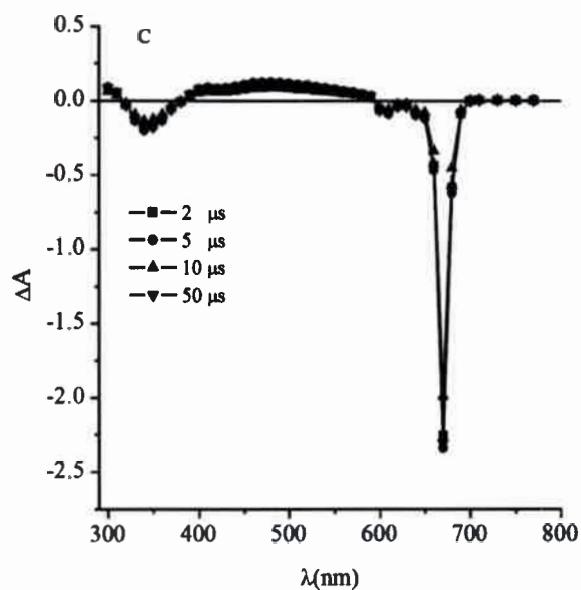
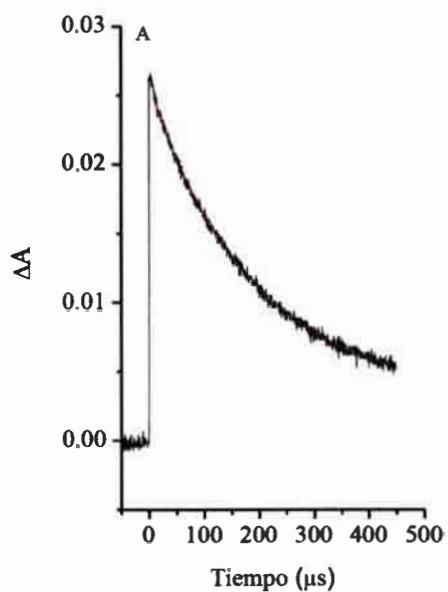


Figura 48. Espectro de especies transitorias a distintos tiempos después del pulso de excitación de LFF.
 A) ZnPPc⁴⁺ B) ZnPyPz y C) ZnPc. $\lambda_{exc}=355$ nm en DMSO y atmósfera de Ar.



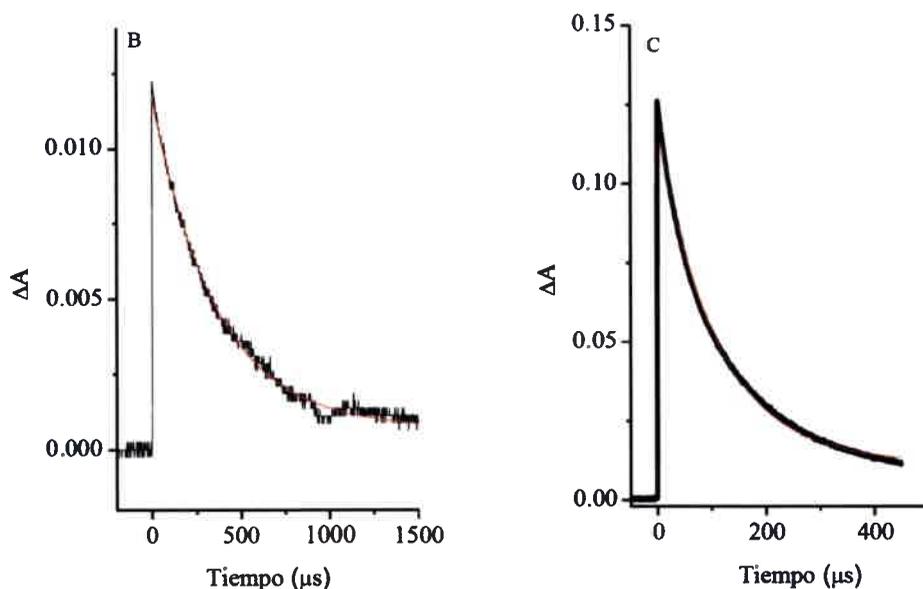


Figura 49. Decaimiento de la absorción para A) ZnPPc⁴⁺ B) ZnPyPz C) ZnPc a 475 nm en DMSO y atmósfera de Ar.

La formación de triplete en suspensiones celulares de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) fueron presentados en las figuras Figura 50, Figura 51 y Figura 52 para ZnPPc⁴⁺, ZnPc y ZnPyPz respectivamente. Estos fueron analizados cada 10 nm en el rango entre 400-600 nm donde absorbe el triplete.

Los espectros para ZnPPc⁴⁺ indicarían una menor producción de triplete en presencia de las células comparado con la ftalocianina en solución, considerando que la absorción a 352 nm no cambió y que el ϵ del triplete es el mismo en ambos medios (Figura 50). Además, el tiempo de vida del estado triplete aumenta en el entorno celular. Para ZnPc, la formación de triplete no fue alterada en presencia o ausencia de la suspensión celular, probablemente este hecho fue generado por una interacción baja con las células de *C. albicans* debido a su ausencia de cargas. En el caso de la ftalocianina ZnPyPz en presencia de células, no fue posible observar la generación triplete. Estos resultados muestran una posible localización diferente de estos fotosensibilizadores en las células.

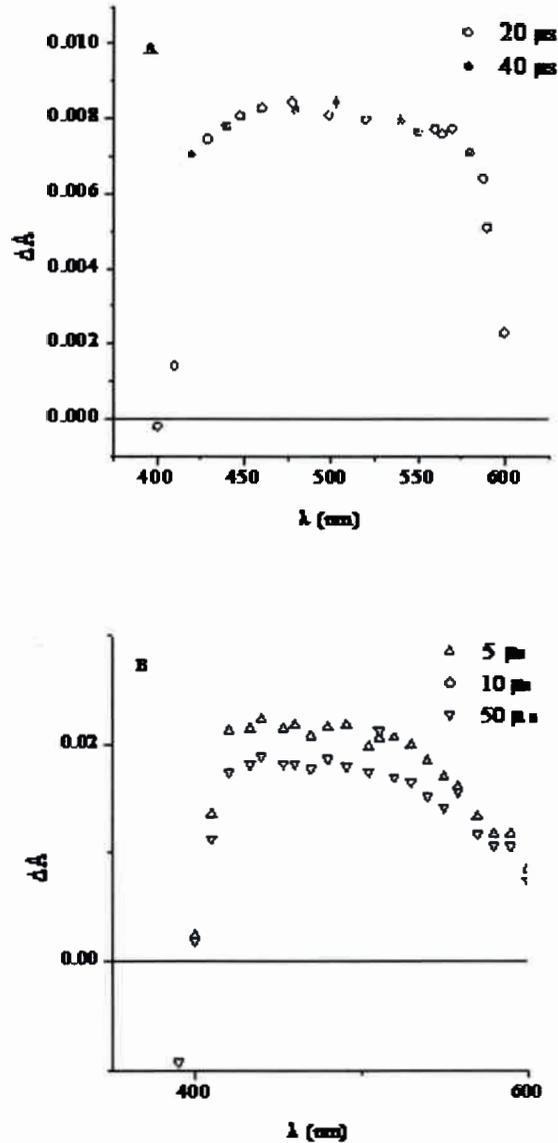


Figura 50. Espectro de especies transitorias a distintos tiempos después del pulso de excitación de LFF (400-600 nm). A) Suspensiones celulares ($\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL) de *C. albicans* en DMSO + ZnPPc⁴⁺. B) ZnPPc⁴⁺ + DMSO (atmósfera de Ar).

ZnPPc⁴⁺ generó menor producción de triplete en las células en comparación con ZnPc, esto probablemente fue debido a que ZnPPc⁴⁺ podría encontrarse más unida que ZnPc a las células. En sistemas homogéneos es muy difícil reproducir las condiciones de los sistemas biológicos. Por lo tanto, el comportamiento en solución no es siempre el esperado en medios celulares. Tanto para ZnPPc⁴⁺ y ZnPc en presencia de suspensiones celulares fue posible la formación del estado triplete, pero en menor medida a lo

ocurrido en solución, quizás debido a la menor exposición o disponibilidad del FS al unirse a las células.

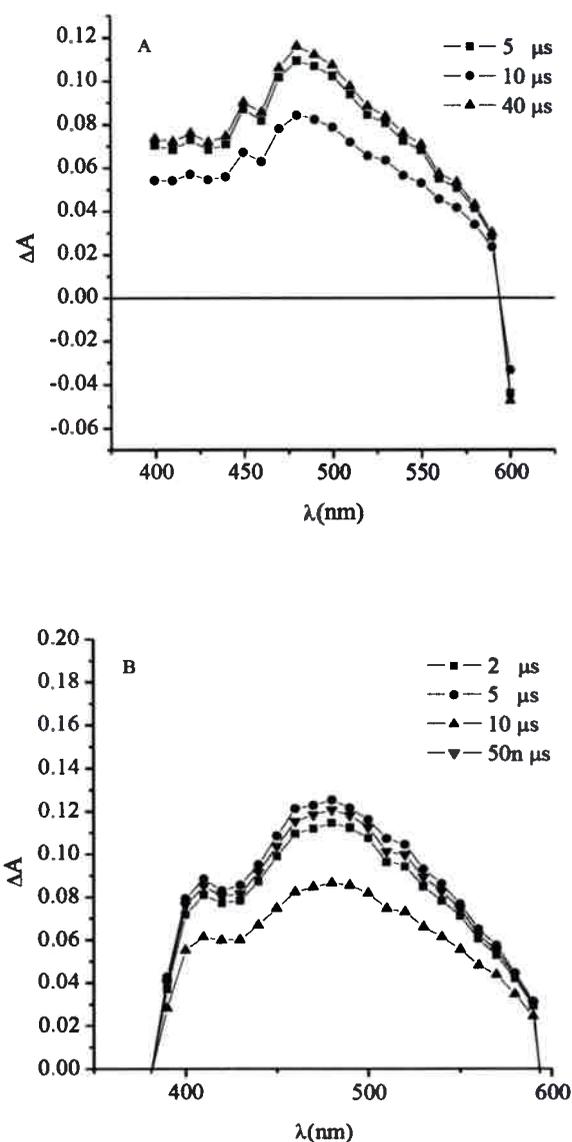


Figura 51. Espectro de especies transitorias a distintos tiempos después del pulso de excitación de LFF (400-600 nm). A) Suspensiones celulares ($\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL) de *C. albicans* en DMSO + ZnPc, B) ZnPc + DMSO en atmósfera de Ar.

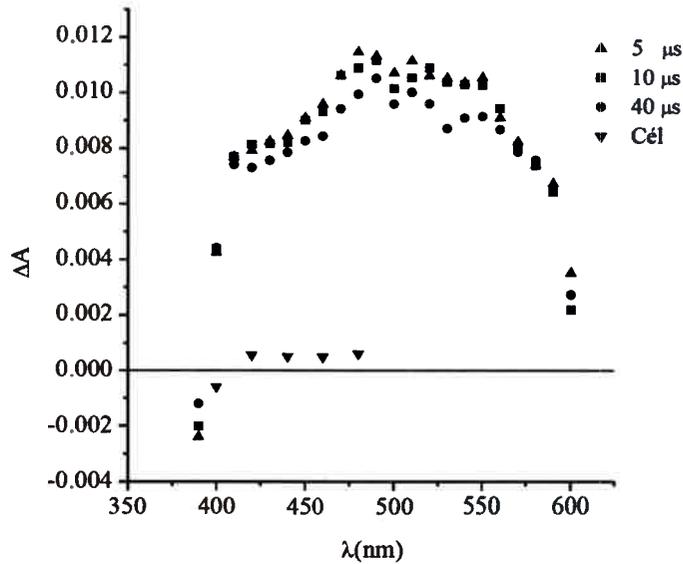


Figura 52. Espectro de especies transitorias a distintos tiempos después del pulso de excitación de LFF (en el rango 400-600 nm) en presencia y ausencia de suspensiones celulares ($\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL) de *C. albicans* en para ZnPyPz en DMSO y atmósfera de Ar.

Resultados opuestos fueron encontrados en un estudio realizado con ZnPc en DMSO en el cual fue analizada la producción de triplete al comparar lo que ocurre en liposomas (en presencia de colesterol y cardiolipinas) y en solución homogénea. Como consecuencia de la unión del sensibilizador, la producción de estado triplete incrementó en la suspensión que contenía liposomas en comparación con una solución homogénea. Este aumento fue atribuido a la presencia de colesterol y cardiolipina en los liposomas resultando en una reducción progresiva de la disponibilidad del sensibilizador a la fase acuosa [142].

7.5.2. Producción de oxígeno singlete en las células de *C. albicans*

La señal de emisión de $^1\text{O}_2$ a ~ 1270 nm fue obtenida después de la excitación con láser de una solución de ZnPPc $^{4+}$ y ZnPc en presencia y ausencia de células en DMSO. El decaimiento exponencial de primer orden para ambas ftalocianinas fue presentado en la Figura 53, donde fue posible visualizar un cambio pequeño en la producción de $^1\text{O}_2$ dentro de las células en comparación a lo que ocurre en solución. El tiempo de vida de $^1\text{O}_2$ para ZnPPc $^{4+}$ fue de 8,30 μs en DMSO y este valor cambia a 8,17 y 7,11 μs después del agregado de 50 μl y 100 μl de suspensión celular. Además, después de un tiempo de

incubación de 10 min no fue observado un cambio significativo en el tiempo de vida, indicando que el FS se une muy rápidamente a las células. Por otro lado, este valor no cambia para ZnPc ya que al ser un FS neutro, posee una baja interacción con las células.

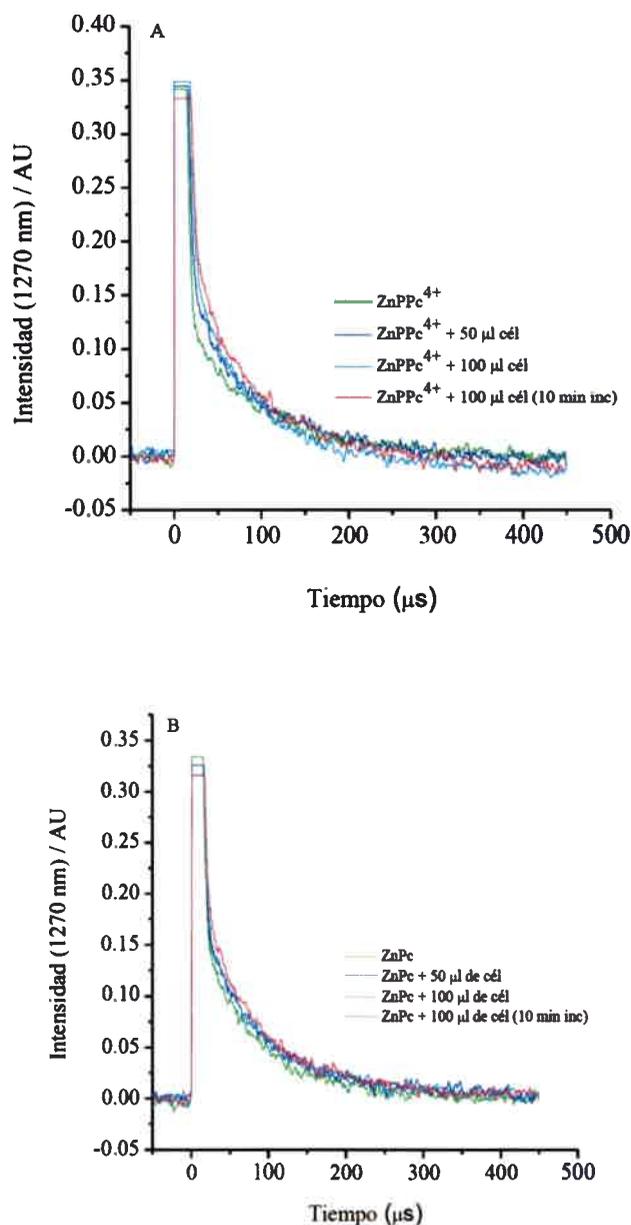


Figura 53. A) Decaimiento de emisión de $^1\text{O}_2$ sensibilizado por ZnPPc⁴⁺ y B) ZnPc en DMSO a diferentes energías del láser en presencia de *C. albicans* ($\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL).

Estos resultados concuerdan con los observados por Nonell y col. en el cual la porfirina tetracatiónica 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metil-4-piridil)porfirina (TMPyP), luego de la exposición a la luz visible, fue capaz de generar $^1\text{O}_2$ tanto dentro como fuera de

las células de *E. coli* [143]. Además, recientemente Ogilby y col. han podido detectar por primera vez la emisión infrarroja débil a 1280 nm característica del $^1\text{O}_2$ en el interior de neuronas, mediante la aplicación de técnicas de imagen directa en presencia del fotosensibilizador TMPyP [144].

El mecanismo de fotosensibilización y el daño celular están influidos profundamente por el entorno en el que se encuentre el FS. Esto cobra importancia cuando se considera la naturaleza reductora del interior celular. El ambiente puede producir procesos de transferencia de carga en vez de procesos de transferencia de energía.

7.5.3. Efecto del medio y del agregado de desactivantes de ROS

En los sistemas celulares resulta interesante analizar el mecanismo de acción fotodinámica que conduce a la inactivación celular. Por ello, fue estudiada la sobrevivencia de *C. albicans* sensibilizada por ZnPPc^{4+} en presencia de diferentes compuestos y condiciones que permiten diferenciar el aporte de los procesos tipo I y tipo II al daño celular. La fotoinactivación de *C. albicans* en suspensión celular fue comparada en presencia de azida sódica (100 mM), soluble en agua con capacidad para desactivar $^1\text{O}_2$ por *quenching* físico; manitol (100 mM), utilizado como agente para interrumpir la propagación de radicales; D_2O , en la cual el $^1\text{O}_2$ tiene un tiempo de vida (τ_A) más largo (68 μs) que en H_2O (4,2 μs), por lo tanto las reacciones que involucren el $^1\text{O}_2$ serán más rápidas en D_2O que en medio acuoso y por último atmósfera de argón que brinda condiciones anóxicas [145].

Con la finalidad de poder visualizar el efecto de ambos mecanismos, se utilizó una concentración adecuada de ZnPPc^{4+} . Después de 30 min de irradiación con luz visible (54 J cm^{-2}) de los cultivos de *C. albicans* en presencia de 2,5 μM de ZnPPc^{4+} y 100 mM de azida sódica la sobrevivencia celular no fue alterada cuando se comparó con el control (Figura 54) [125]. Si bien estos experimentos no permiten distinguir entre ambos mecanismos, indican que la presencia de especies reactivas de oxígeno es indispensable en el proceso de inactivación celular. Los resultados indican que la presencia de 100 mM de manitol en la suspensión celular no produce una marcada protección en la inactivación de *C. albicans*. Por lo tanto, no habría una contribución significativa del mecanismo tipo I en la inactivación fotodinámica de dicha levadura sensibilizada por esta ftalocianina.

Para el sensibilizador ZnPPc⁴⁺ fue posible observar un incremento en la inactivación celular de *C. albicans* en presencia D₂O. En consecuencia, el ¹O₂ presenta un rol predominante en la fotocitotoxicidad de levaduras, indicando de esta manera que el proceso tipo II es el principal mecanismo de acción.

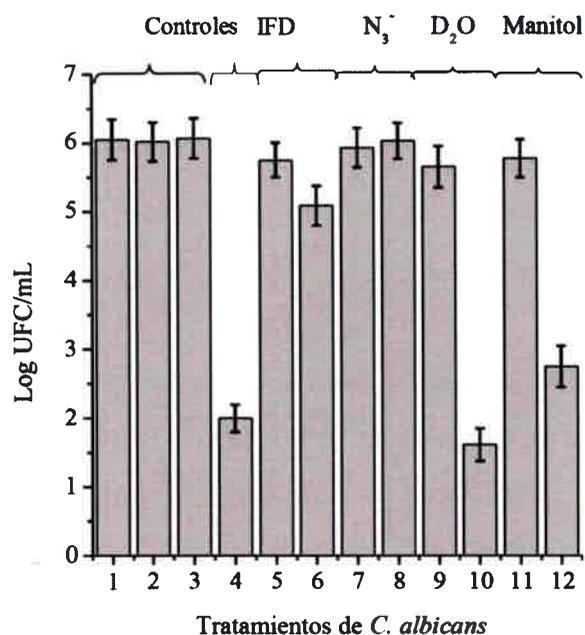
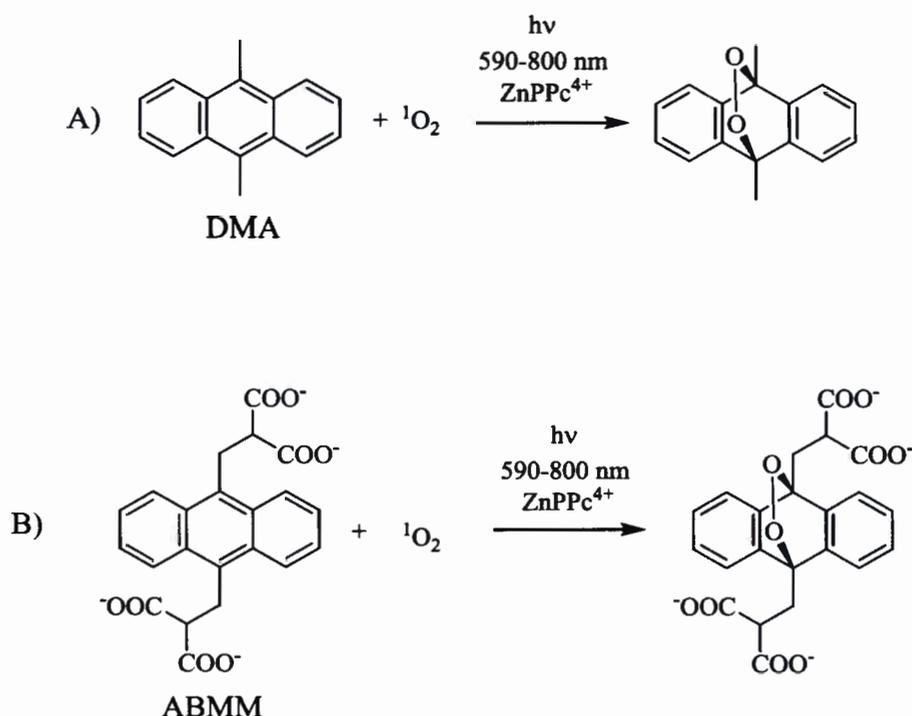


Figura 54. Supervivencia de levaduras *C. albicans* sensibilizada por ZnPPc⁴⁺ (2,5 μM) en diferentes condiciones e irradiadas con luz visible por 30 min (30 mW/cm²), 1) control sin tratar, 2) control ZnPPc⁴⁺ oscuridad, 3) control sin ZnPPc⁴⁺ e irradiado, 4) Cultivo tratado con ZnPPc⁴⁺ y 30 min de irradiación 5) control con argón e irradiado, 6) IFD en atmósfera de argón, 7) control con azida (100 mM) e irradiado, 8) IFD y azida (100 mM), 9) control con D₂O e irradiado, 10) IFD en D₂O, 11) control con manitol (100 mM) e irradiado, 12) IFD y manitol (100 mM). Los valores representan la media ± la desviación estándar de tres experimentos por separado.

Por último podemos decir que esta ftalocianina exhibe una actividad fotosensibilizadora causando una disminución en la supervivencia celular de ~ 4 log cuando los cultivos son tratados con 2,5 μM de sensibilizador y 30 min de irradiación. Sin embargo, cuando los cultivos son irradiados en presencia de argón no se observa inactivación celular (Figura 54). Por lo tanto, la viabilidad de *C. albicans* luego de la irradiación fue dependiente de la presencia de oxígeno para lograr un efecto fotodinámico efectivo.

7.5.4. Determinación de la producción de $^1\text{O}_2$ mediante moléculas prueba

La producción de $^1\text{O}_2$ por ZnPPc^{4+} fue estudiada en presencia de los sustratos DMA y ABMM en PBS. Estas moléculas reaccionan específicamente con el $^1\text{O}_2$, dando lugar a la formación de un endoperóxido en su estructura, formado a expensas de la oxidación de los dobles enlaces en el anillo central. Estos sustratos desactivan $^1\text{O}_2$ exclusivamente por una reacción química (Esquema 8) [115].



Esquema 8. A) Reacción del DMA y B) ABMM con $^1\text{O}_2$.

La descomposición de DMA y ABMM fotosensibilizada por ZnPPc^{4+} fue estudiada en PBS, irradiando la solución en condiciones aeróbicas (Figura 55). En la oscuridad, no fueron observados cambios en los espectros de absorción de DMA y ABMM en presencia del sensibilizador. Sin embargo, cuando ZnPPc^{4+} fue irradiada con longitudes de onda entre 590-800 nm, la fotooxidación fue seguida espectrofotométricamente por la desaparición de las bandas de emisión de fluorescencia características del DMA y ABMM a λ_{em} de 403 nm. A partir de los gráficos de la Figura 56 fueron calculados los valores de k_{obs} para cada sustrato. Los resultados fueron presentados en la Tabla 4 experimentos 1 y 7 para DMA y

ABMM, respectivamente. Como puede observarse, la reacción de descomposición para DMA fue dos órdenes de magnitud más rápida que ABMM. Esta diferencia fue debida principalmente a la interacción electrostática entre las cargas negativas del ABMM y las cargas positivas de ZnPPc^{4+} . Este efecto disminuye la producción de $^1\text{O}_2$ por el fotosensibilizador [115].

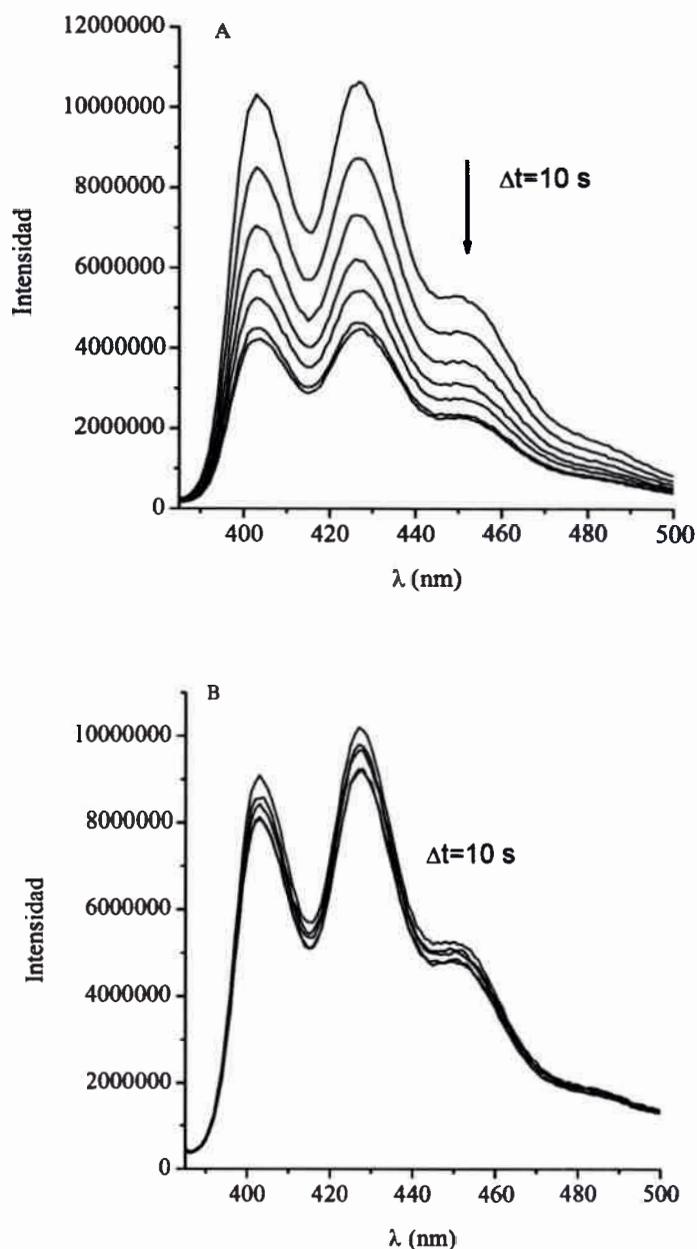
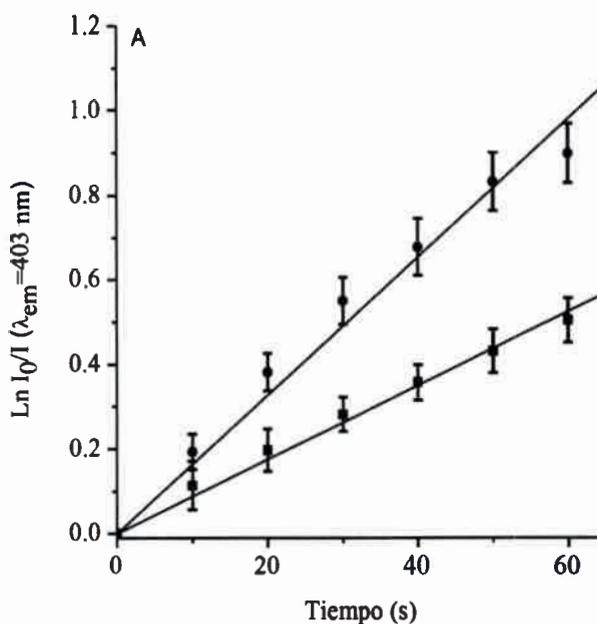


Figura 55. Descomposición de A) DMA y B) ABMM fotosensibilizada por ZnPPc^{4+} e irradiado con luz de 590-800 nm en PBS ($\lambda_{\text{exc}}=378$ nm).

La descomposición de DMA fotosensibilizada por ZnPPc⁴⁺ fue estudiada en DMF. En la oscuridad, no fueron observados cambios en los espectros de absorción del DMA en presencia del sensibilizador. Sin embargo, cuando la ftalocianina fue irradiada con luz monocromática, la fotooxidación fue seguida espectroscópicamente por la desaparición de las bandas características del DMA a λ_{max} de 378 nm. La absorción de la ftalocianina permaneció constante durante el proceso de irradiación, indicando que el FS fue estable bajo esas condiciones experimentales [104]. Además, ZnPPc⁴⁺ presentó una eficiencia elevada en la producción de ¹O₂ (Φ_{Δ} =0,59).

El ión azida (N₃⁻) es soluble en agua y posee capacidad para quenchar al ¹O₂ por desactivación física, con una constante de velocidad de *quenching* $k_q = 5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ [126]. La presencia de 100 mM de N₃⁻ en el PBS produjo una protección considerable en la descomposición de DMA (Tabla 4 experimentos 2), evidenciándose la formación de ¹O₂. En efecto fue menor en ABMM debido a la baja actividad fotodinámica de la ftalocianina en estas condiciones (Tabla 4, experimentos 8).



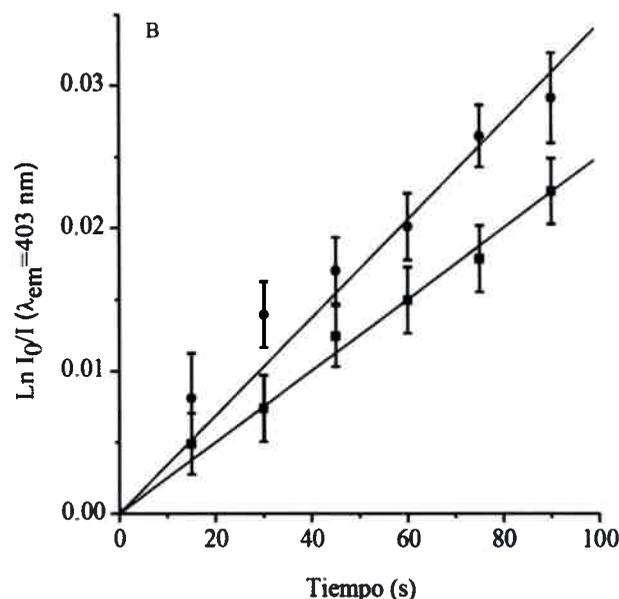


Figura 56. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de A) DMA en PBS (10 μM) (●) y DMA en PBS más azida (■) y B) ABMM en PBS (10 μM) (●) y ABMM en PBS más azida (■) fotosensibilizada por ZnPPc^{4+} en PBS. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos por separado.

Tabla 4. Fotodescomposición de DMA y ADMA bajo distintas condiciones de tratamientos en PBS

Exp.	Sustrato	Condiciones	k_{obs} (s^{-1})
1	DMA	DMA + ZnPPc^{4+} PBS	$(1,63 \pm 0,07) \times 10^{-2}$
2	DMA	DMA + ZnPPc^{4+} + azida PBS	$(8,7 \pm 0,2) \times 10^{-3}$
3	DMA	DMA + células 30 min osc + 1 lav	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
4	DMA	DMA + células 30 min osc + 1 lav / ZnPPc^{4+} 10 min osc	$(1,77 \pm 0,08) \times 10^{-2}$
5	DMA	DMA + células 30 min osc + 1 lav / ZnPPc^{4+} 10 min osc + 1 lav	$(1,73 \pm 0,08) \times 10^{-2}$
6	DMA	DMA + células 30 min osc. 1 lav / ZnPPc^{4+} + azida 10 min osc	$(8,0 \pm 0,5) \times 10^{-4}$
7	ADMA	ADMA + ZnPPc^{4+} PBS	$(3,4 \pm 0,2) \times 10^{-4}$
8	ADMA	ADMA + ZnPPc^{4+} + azida PBS	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-4}$
9	ADMA	ADMA + células 30 min osc + 1 lav	$(6,0 \pm 0,5) \times 10^{-4}$
10	ADMA	ADMA + células 30 min osc + 1 lav / ZnPPc^{4+} 10 min osc	$(5,5 \pm 0,2) \times 10^{-3}$
11	ADMA	ADMA + células 30 min osc + 1 lav / ZnPPc^{4+} 10 min osc + 1 lav	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
12	ADMA	ADMA + células 30 min osc + 1 lav / ZnPPc^{4+} + azida 10 min osc	$(9,0 \pm 0,5) \times 10^{-4}$

7.5.5. Fotoinactivación de *C. albicans* en presencia de derivados de antraceno

Para evaluar los posibles efectos inducidos por DMA y ABMM en la IFD de *C. albicans* por ZnPPc^{4+} , las suspensiones celulares fueron tratadas con $10\ \mu\text{M}$ de ambos antracenos. Luego, las células fueron lavadas e irradiadas. A su vez, los ensayos fueron analizados al incubar ZnPPc^{4+} $5\ \mu\text{M}$ y sin derivados de antraceno (Figura 57). Las suspensiones celulares no mostraron toxicidad al ser expuestas a DMA o ABMM después de 30 min de irradiación. Por otra parte, la presencia de estos antracenos no afectó significativamente la IFD mediada por ZnPPc^{4+} , la cual generó una inactivación de ~ 5 log en las células de *C. albicans* después de 30 min de irradiación ($54\ \text{J}/\text{cm}^2$) [125].

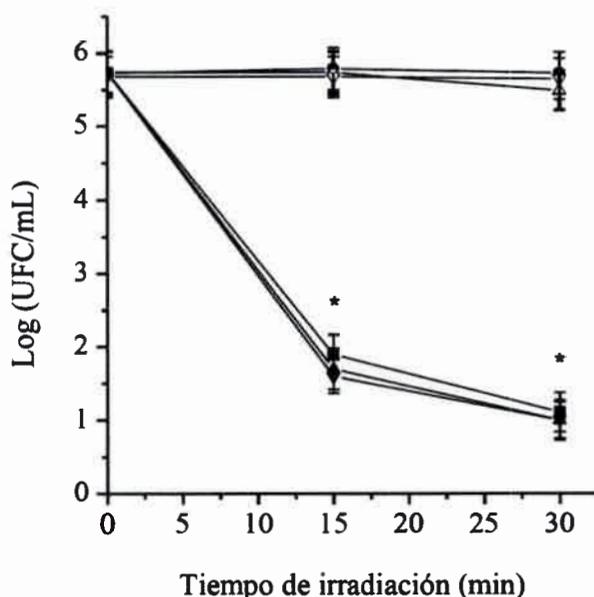


Figura 57. Curva de supervivencia de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) incubadas con: ZnPPc^{4+} $5\ \mu\text{M}$ por 10 min (■), DMA $10\ \mu\text{M}$ (▲) por 30 min, lavadas y tratadas con ZnPPc^{4+} $5\ \mu\text{M}$ por 10 min, ABMM $10\ \mu\text{M}$ (▼) por 30 min, lavadas y tratadas con ZnPPc^{4+} $5\ \mu\text{M}$ por 10 min, DMA $10\ \mu\text{M}$ (Δ) por 30 min y lavadas, ABMM $10\ \mu\text{M}$ (▽) por 30 min, lavadas y expuestas a la luz visible por diferentes tiempos de irradiación. Control de irradiación (●).

Luego de las distintas etapas de lavado, fue posible observar solo una menor diferencia en la fotoinactivación de *C. albicans* [125]. Sin embargo, la fotooxidación de ABMM disminuye después de una etapa de lavado. Este sustrato soluble en agua puede

involucrar una interacción electrostática con ZnPPc^{4+} , facilitando la eliminación del fotosensibilizador después de una etapa de lavado. A su vez, el ión azida fue usado para determinar la presencia de $^1\text{O}_2$, previniendo los fotoprocesos generados a través del mecanismo tipo II [146,147]. La fotooxidación de ambos antracenos disminuye en presencia del ion N_3^- en las células. Esta desactivación de $^1\text{O}_2$ por *quenching* físico disminuye la formación del endoperóxido en las células.

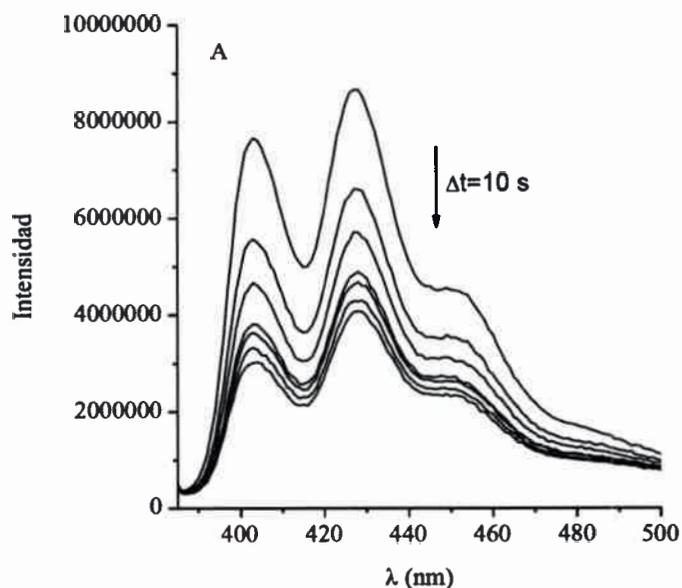
7.5.6. Determinación de la producción de $^1\text{O}_2$ en suspensiones celulares en PBS

Suspensiones celulares de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) fueron incubadas con 10 μM de DMA y ABMM durante 30 min, luego fue adicionado, en algunos estudios, 5 μM de ZnPPc^{4+} durante 10 min y en otros 5 μM de ZnPPc^{4+} más azida sódica 100 mM. Finalmente fueron irradiadas con luz 590-800 nm durante 10 s por un total de 60 s. Las cinéticas de fotooxidación de DMA y ABMM fueron estudiadas siguiendo la disminución en la emisión de fluorescencia a $\lambda_{em}=403$ nm después de la irradiación usando una dosis de luz entre 0 y 1.8 J cm^{-2} (Figura 58). Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) fueron obtenidas por el ajuste lineal de $\ln I_0/I$ vs tiempo obteniéndose distintos valores de k_{obs} presentes en la Tabla 4 (Figura 59). A partir de los valores de k_{obs} fue posible observar que en presencia de ZnPPc^{4+} la fotodescomposición de DMA y ABMM aumenta considerablemente (~ 10 veces) con respecto a la ausencia del fotosensibilizador (Tabla 4, experimentos 3 y 4, experimentos 9 y 10). Además, la descomposición de DMA fue más rápida que ABMM, posiblemente debido a la interacción del sustrato aniónico con el fotosensibilizador (Tabla 4, experimentos 4 y 10).

Por otro lado, después de una etapa de lavado para eliminar la ftalocianina que no fue unida completamente a las células, fue posible observar que el valor de k_{obs} para DMA fue constante (Tabla 4, experimentos 4 y 5), indicando que la unión entre ZnPPc^{4+} y *C. albicans* fue muy fuerte y que el DMA está censando la producción de $^1\text{O}_2$ en el entorno celular. Sin embargo, la fotooxidación de ABMM disminuye después de una etapa de lavado (Tabla 4, experimentos 10 y 11). Este efecto podría atribuirse a una eliminación facilitada del fotosensibilizador con el lavado debido a la interacción con ABMM. Estudios de la unión celular en estos tratamientos indicaron una disminución del 20% en

presencia de este sustrato ABMM después de una etapa de lavado con respecto a las células sin tratar con ABMM o tratadas con DMA.

De manera similar al medio homogéneo, fue adicionada azida sódica (100 mM) para comprobar la presencia de $^1\text{O}_2$. Para ambos sustratos, los valores k_{obs} (Tabla 4, experimentos 4 y 6, experimentos 10 y 12) disminuyen en presencia del desactivaste. Este efecto fue generado probablemente por el hecho de que ZnPPc^{4+} y azida se encuentren en el mismo sitio celular (o cercanos uno de otro) generando una desactivación por *quenching* físico de $^1\text{O}_2$ y por lo tanto una formación menor del endoperóxido cuando estos agentes fueron aplicados al cultivo celular. Estos resultados coinciden con los estudios previos del mecanismo de acción fotodinámico, donde fue determinado que el $^1\text{O}_2$ es la principal especie citotóxica que conduce a la inactivación celular.



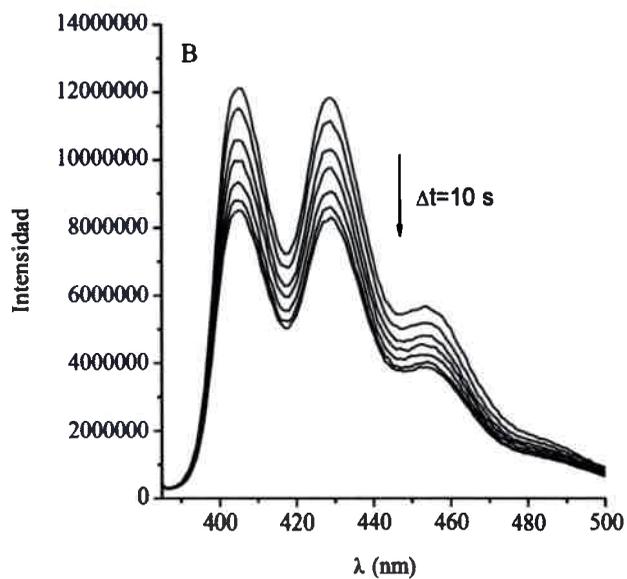
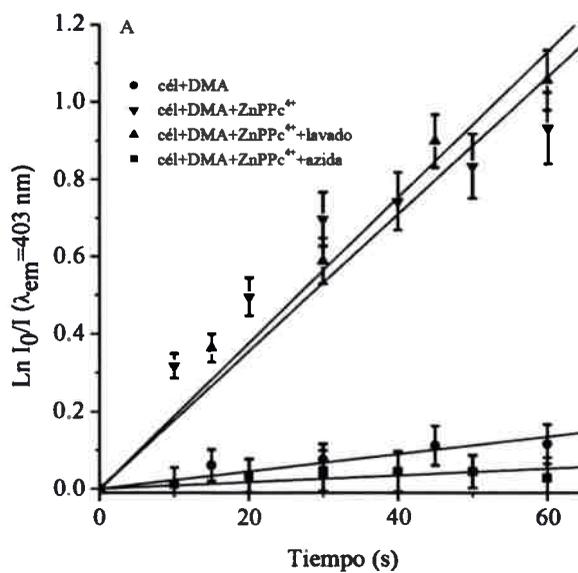


Figura 58. Descomposición de A) DMA B) ABMM fotosensibilizado por ZnPPc^{4+} en presencia de células de *C. albicans* ($\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL) en PBS e irradiado con luz de 590-800 nm.



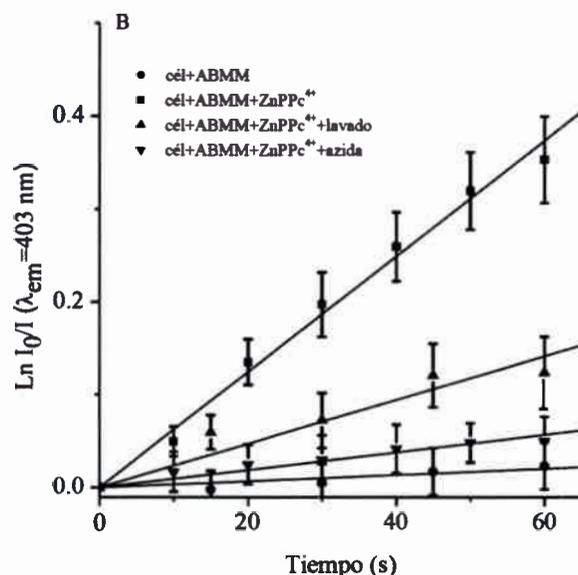
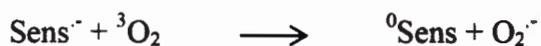
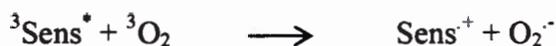
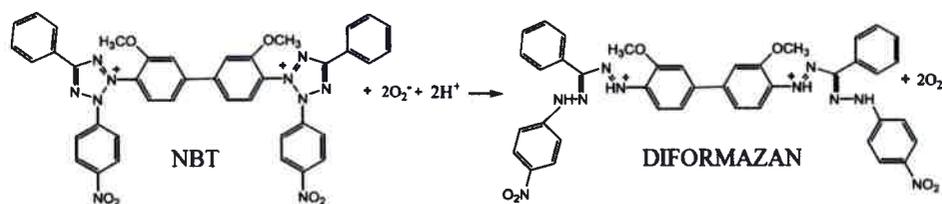


Figura 59. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de A) DMA y B) ABMM (10 μM) fotosensibilizada por ZnPPc⁴⁺ en presencia de células de *C. albicans* (~1x10⁶ UFC/mL) en PBS. Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos por separado.

7.5.7. Determinación del radical anión superóxido (O₂⁻)

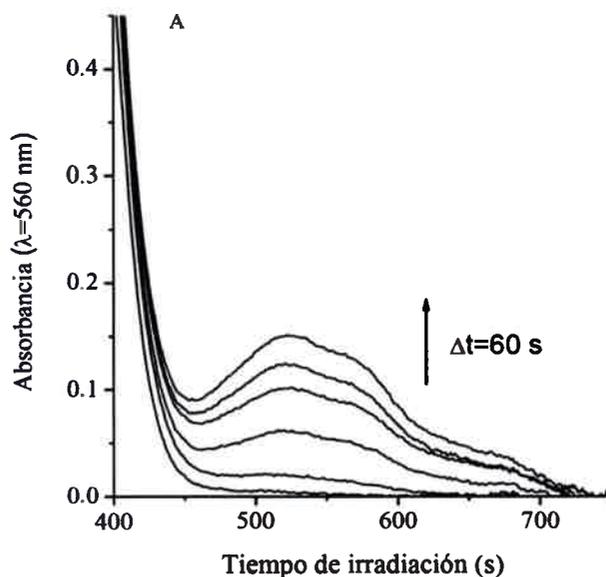
El método empleado para la detección de O₂⁻ fue realizado a través de la descomposición de NBT que se reduce a diformazan [116]. Una vez generado O₂⁻ (Esquema 9) luego de la excitación del fotosensibilizador en presencia de NADH, este reacciona con NBT y genera formazán. Las muestras fueron estudiadas al aplicar distintos tiempos de irradiación con luz de 590-800 nm (0-9.0 J cm⁻²) cada 60 s para detectar la formación de diformazan mediante el aumento de la absorbancia a 560 nm [125].





Esquema 9. Reacción del $O_2^{\cdot -}$ con NBT, donde BioH indica un sustrato de origen biológico como NADH.

En primer lugar fue estudiada la formación de $O_2^{\cdot -}$ en solución de DMF (Figura 60). Los resultados indican que para NBT en presencia de $ZnPPc^{4+}$ y en ausencia de NADH no fue observada la formación de diformazan después de la irradiación (Figura 60 A), sin embargo, en presencia de NADH fue observada la descomposición de NBT (Figura 60 B). Luego de agregar el FS, fue observado un cambio en la generación de diformazan. Sin embargo, este cambio no fue demasiado amplio en comparación con otros sistemas donde se produce el de $O_2^{\cdot -}$ [125].



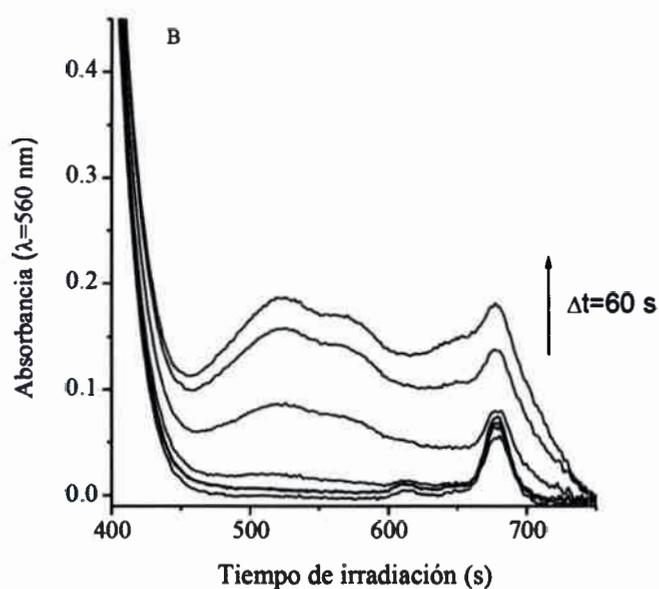


Figura 60. A) Reducción de NBT+NADH. B) Reducción de NBT+NADH+ZnPPc⁴⁺ a diformazán, por ZnPPc⁴⁺ (1 μM) en DMF.

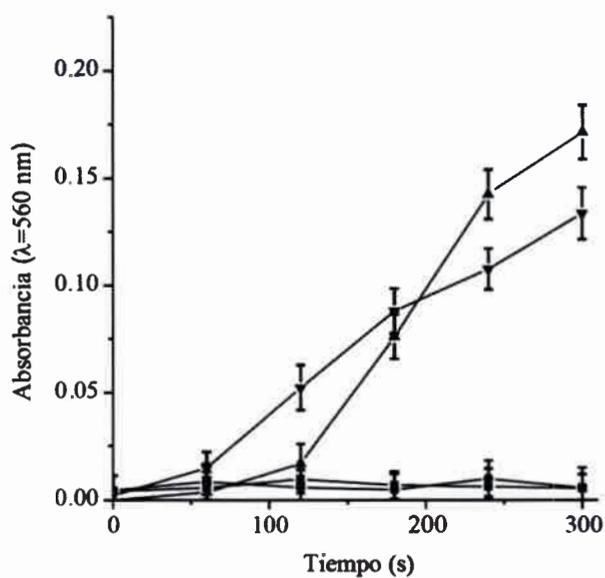
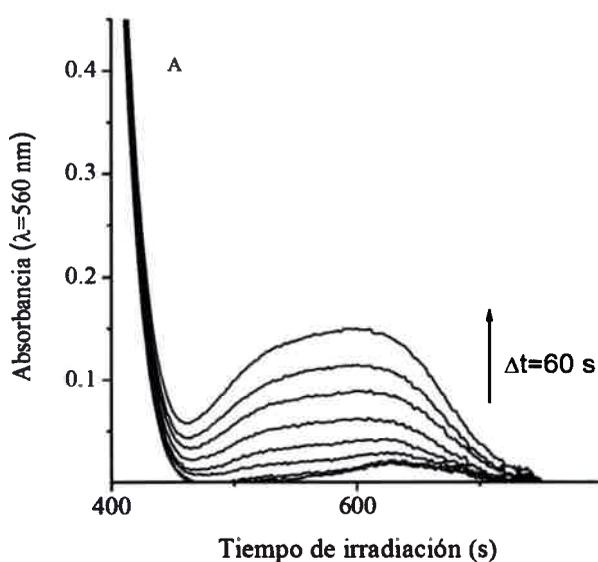


Figura 61. Reducción de NBT a diformazán, fotosensibilizado por ZnPPc⁴⁺ 1 μM en DMF. NADH + ZnPPc⁴⁺ + NBT (▲); NADH + NBT (▼); ZnPPc⁴⁺ (■) y NBT (●).

Por otro lado, suspensiones celulares de *C. albicans* ($\sim 10^6$ UFC/mL) fueron tratadas con 0,2 mM de NBT e incubadas por 30 min a 37°C en la oscuridad, luego fue adicionado 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ y las muestras fueron incubadas por otros 10 min. En las suspensiones celulares fue adicionado β -NADH 0,5 mM como biomolécula externa para poder determinar la presencia del radical O₂^{·-}, indicando que fue posible generar una mínima cantidad de esta especie reactiva en las células luego de la excitación del fotosensibilizador con luz visible (0–12,7 J cm⁻²) (Figura 62). La reducción de NBT fotosensibilizado por ZnPPc⁴⁺ 5 μ M en suspensión celular fue determinada mediante el aumento en la absorción a 560 nm debido a la formación de formazán (Figura 63). La presencia de NADH fue fundamental para la formación de O₂^{·-}. Sin embargo, en ausencia del mismo y en el medio celular no fue detectada la formación de formazán. Estos resultados concuerdan con los presentados anteriormente, donde fue determinado que la principal vía de IFD era el mecanismo tipo II y luego de los estudios realizados en presencia de DMA y ABMM puede corroborarse que este mecanismo es el principal. A su vez por los estudios realizados en presencia de NBT, no se descarta el aporte, aunque en menor medida, de reacciones correspondientes al mecanismo tipo I [125].



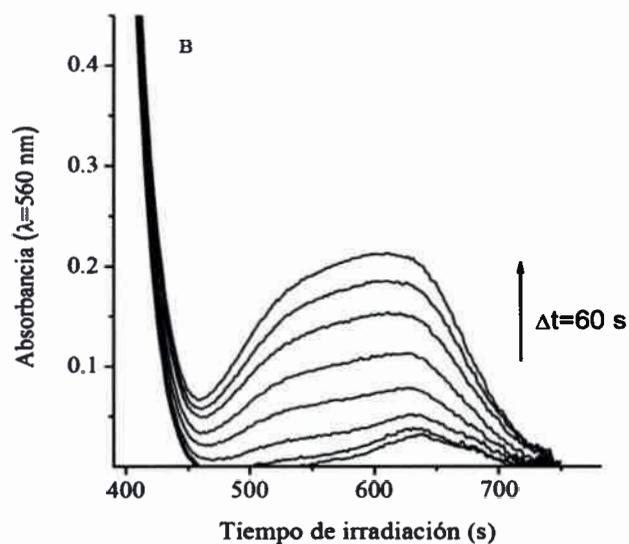


Figura 62. A) Reducción de NBT + NADH + cél. B) Reducción de NBT + NADH + ZnPPc⁴⁺ + célula diformazán, fotosensibilizado por ZnPPc⁴⁺ 5 μM en medio celular.

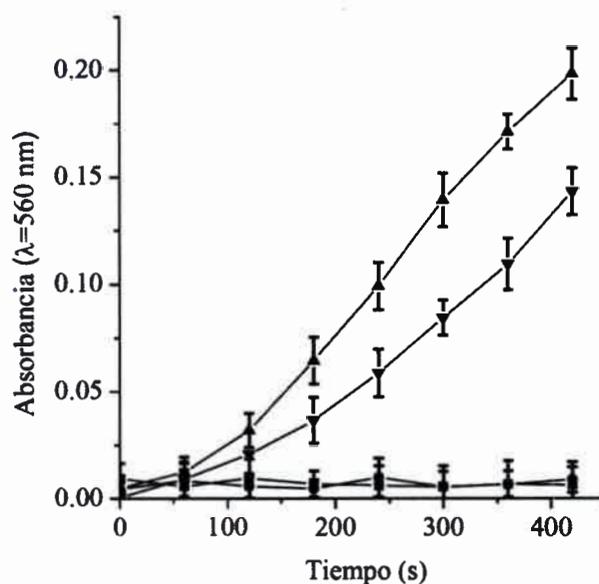


Figura 63. Reducción de NBT a diformazán, fotosensibilizado por ZnPPc⁴⁺ 5 μM en suspensión celular (1×10^6 UFC/mL) de *C. albicans* en PBS. NADH + ZnPPc⁴⁺ (■); NBT + ZnPPc⁴⁺ (●); ZnPPc⁴⁺ + NADH + NBT (▲) y NADH + NBT (▼).

7.6. Sitio de acción

7.6.1. Estudios de la localización intracelular del fotosensibilizador

El análisis de las suspensiones de *C. albicans* $\sim 10^7$ UFC/mL tratadas con ZnPPc⁴⁺ por 30 min de incubación fue realizado mediante microscopía confocal de fluorescencia. Esta técnica permitió estudiar la distribución de ZnPPc⁴⁺ a nivel celular. Como puede observarse en la Figura 64 y Figura 65 A, la fluorescencia roja correspondiente a ZnPPc⁴⁺ fue localizada a nivel de envoltura celular y aparentemente no hay ingreso del sensibilizador al interior celular. Para poder corroborar esta hipótesis, fue agregada una sonda fluorescente específica de núcleo, Ho 33258, la cual fue utilizada para visualizar si ZnPPc⁴⁺ podría llegar a localizarse a nivel nuclear y descartar o confirmar la posible localización de la ftalocianina en la envoltura celular [102]. En la Figura 65 B fueron observados los cultivos controles para el fluorocromo Ho 33258 mostrando una fluorescencia intensa en la región correspondiente al núcleo celular, presentando una marcación de color azul. Luego, la localización intracelular del FS fue estudiada al incubar las células por 10 min con ZnPPc⁴⁺ 5 μ M y posteriormente fue adicionado el marcador Ho 33258 (Figura 65 C). Como lo indica la figura, fue posible visualizar el área correspondiente a la región nuclear, la cual fue marcada en color azul y el área correspondiente a la localización de ZnPPc⁴⁺ en color rojo. Al realizar la colocalización (Figura 65 D) fue posible determinar que el marcador y el FS no presentaron superposición de las imágenes, indicando que el FS no ingresa dentro de la célula sino que permanece a nivel de envoltura celular y confirma los resultados observados en la Figura 64 y Figura 65 B. Resultados similares fueron obtenidos con la porfirina catiónica 5-fenil-10,15,20-tris(*N*-metil-4-piridil)porfirina clorada (TriP) al incubar las células de *C. albicans* con una concentración de 25 μ M en PBS al 10% durante 30 min en la oscuridad. Algunas células mostraron fluorescencia completa, con la excepción de un gran orgánulo circular y otras células no mostraron fluorescencia en la zona citoplasmática, pero sí a nivel de la envoltura celular. Esos patrones de distribución fueron observados después de sólo 1 min de incubación en la oscuridad [102].

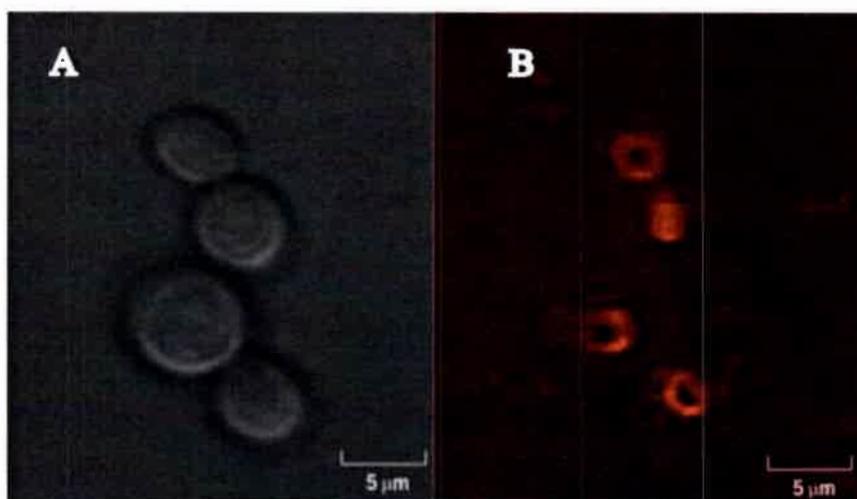


Figura 64. Localización de ZnPPc⁴⁺ 5 μM en células de *C. albicans*. A) Controles en campo claro B) fluorescencia de ZnPPc⁴⁺ (roja).

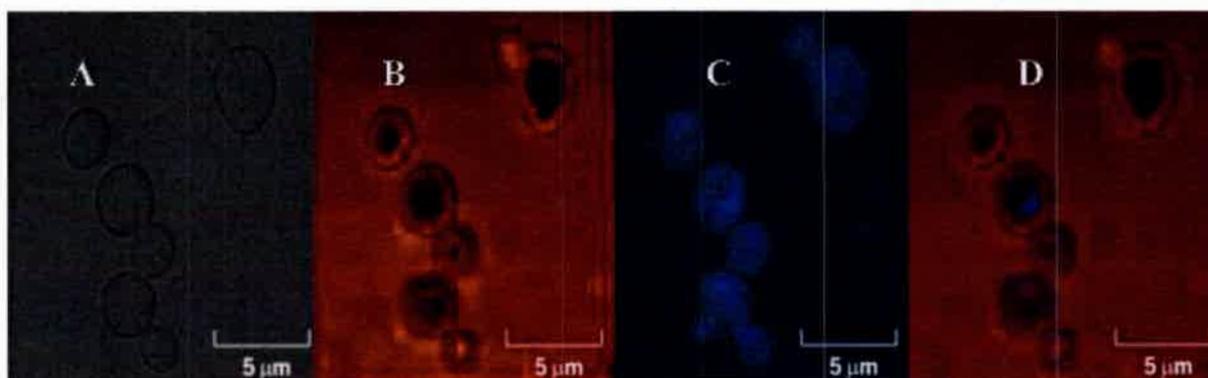


Figura 65. Localización de ZnPPc⁴⁺ 5 μM en células de *C. albicans*. A) Controles en campo claro. B) fluorescencia de ZnPPc⁴⁺ (roja). (C) Ho (azul). (D) colocalización.

7.6.2. Efectos de la inactivación fotodinámica sobre el ADN

7.6.2.1. Efecto de la IFD sobre el ADN genómico de *C. albicans*

En estudios previos fue demostrado que ZnPPc⁴⁺ interacciona fuertemente con el ADN de timo bovino. La banda *Soret* de esta ftalocianina no mostró variaciones significativas con el agregado de ADN, mientras que la banda *Q* manifestó cambios, permitiendo la cuantificación de la unión ADN-ftalocianina en metanol. Este solvente fue utilizado debido a que permite solubilizar al sensibilizador de manera no agregada. Las perturbaciones espectrales sobre el agregado de ADN fueron debidas a la asociación

de la ZnPPc^{4+} con la matriz del ADN. Esta interacción fue caracterizada por un hipocromismo (~80%), indicando que la estructura de ZnPPc^{4+} no fue afectada por la interacción con el ADN, debido a que los grupos catiónicos están separados del cromóforo por un puente éter. La constante de unión aparente para ZnPPc^{4+} fue calculada, obteniéndose valores de $K_{\text{ADN}}=4,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ [129]. Por lo tanto, la actividad fotodinámica de ZnPPc^{4+} fue analizada *in vitro* para observar la posible fotodegradación del ADN genómico en las células de *C. albicans* (~ 10^7 UFC/mL). Para ello, los cultivos fueron tratados con 5 μM 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 66, el ADN de las células tratadas no sufrió ningún tipo de fragmentación por la acción fotosensibilizante de la ftalocianina. ZnPPc^{4+} , este FS no produce un cambio significativo en las bandas del ADN, obteniéndose una sola banda tanto en la muestra sometida a IFD (Figura 66, columnas 6 y 7) como en el control sin tratar con ZnPPc^{4+} e irradiado (Figura 66, columnas 3 y 4).

Estos resultados concuerdan con los encontrados para ZnPPc^{4+} en *E. coli*, la cual no produce un cambio significativo en las bandas del ADN, aún después de 4 h de irradiación [129] y con los estudios realizados con porfirinas, las cuales no causaron ningún clivaje significativo en el ADN genómico aún después de los 30 min de exposición a la luz visible [148]. A partir de estos resultados, podemos considerar que el ADN genómico no está involucrado en el proceso de fotodaño celular o que el efecto de la inactivación produjo pequeñas alteraciones que no fueron suficientes para producir una ruptura de las hebras de ADN.

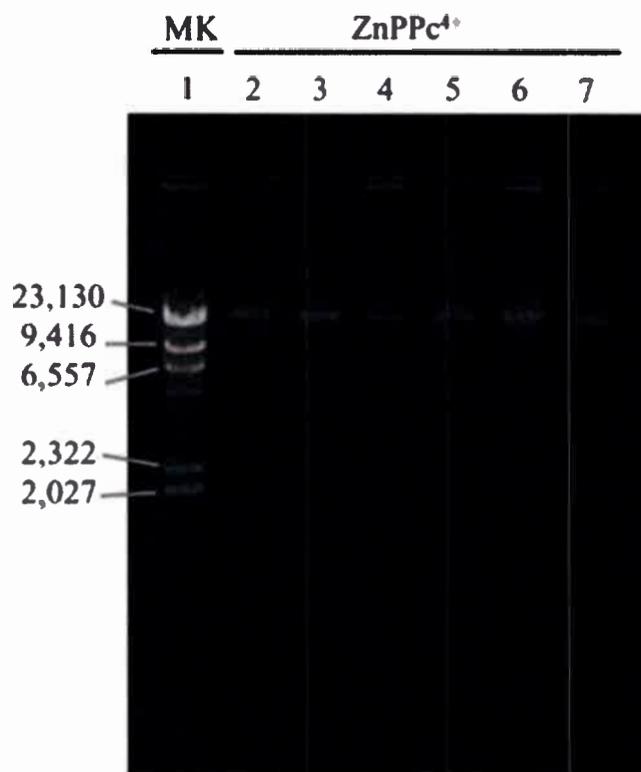


Figura 66. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico extraído de células de *C. albicans*. 1) Marcador de peso molecular: Lamda-Hind III. 2) Cultivo control ($\sim 10^7$ UFC/mL). 3) Cultivo control irradiado 15 min sin ZnPPc⁴⁺. 4) Cultivo control irradiado 30 min sin ZnPPc⁴⁺. 5) Cultivo control oscuridad incubado con ZnPPc⁴⁺ 30 min. 6) Cultivo tratado con 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ e irradiado 15 min. 7) Cultivo tratado con 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ e irradiado 30 min.

7.6.3 Efecto de la inactivación fotodinámica en la estructura celular interna

7.6.3.1. Microscopía electrónica de transmisión

Para caracterizar los daños fotodinámicos producidos sobre los componentes celulares se utilizó TEM. Las alteraciones que puedan generarse sobre la integridad celular de los microorganismos fúngicos se ven reducidos por la presencia de una pared celular que le proporciona a la célula una estructura y la protege del medio. Por lo tanto, la eficiencia del proceso fotosensible es más pronunciado por los agentes que mejoran su penetración en el interior celular [148]. Mediante estudios en TEM fue evaluado el daño provocado por el proceso IFD, en la envoltura celular interna. En las células ($\sim 10^7$ UFC/mL) incubadas con 5 μ M de ZnPPc⁴⁺ e irradiadas por 15 y 30 min fue posible alcanzar una reducción de la viabilidad celular de $\sim 4,5$ log. Mientras que en las células incubadas con el FS en oscuridad no fue observada una disminución de la viabilidad,

por lo que bajo estas condiciones la dosis de ftalocianina utilizada no fue tóxica y el tratamiento fue eficiente, de forma similar que en suspensiones celulares $\sim 10^6$ UFC/mL.

Mediante el análisis de TEM, fue posible observar que las células de *C. albicans* presentan una forma oval característica de las levaduras. En los tratamientos controles la integridad celular a nivel citoplasmático y la pared celular permanecieron intactas (Figura 67 A, B y C), mientras que en las células bajo tratamiento fotodinámico fue posible observar la pérdida de la forma esférica, característica de *C. albicans*, la aparición de irregularidades en la envoltura celular, el volumen citoplasmático disminuido y la membrana celular con invaginaciones que llevan a una desorganización estructural notable dentro del citoplasma (Figura 67 D y E). Estos resultados se asemejan a los encontrados por Quiroga y col. en células de *C. albicans* bajo tratamiento fotodinámico en presencia de porfirinas catiónicas [148].

El efecto fotodinámico puede conducir a una pérdida de la funcionalidad e integridad de la envoltura celular, lo cual lleva a la inactivación de las células de *C. albicans*. Un efecto similar fue observado anteriormente para porfirinas catiónicas que produjeron modificaciones en la ultraestructura celular y alteraciones en las barreras celulares inducidas por acción fotodinámica sobre las células de *C. albicans* [148]. Estos resultados se asemejan a los encontrados por Lambrechts y col. [102], 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. Por otro lado, en estudios previos observados con ZnPPc⁴⁺ en la ultraestructura de *E. coli* fue posible observar cambios estructurales e irregularidades en las barreras celulares a lo largo de la bacteria luego del tratamiento de IFD [129]. En conclusión los cambios observados por TEM corroboran que la ftalocianina fotoactivada puede potencialmente interferir con las funciones de la membrana y la pared celular.

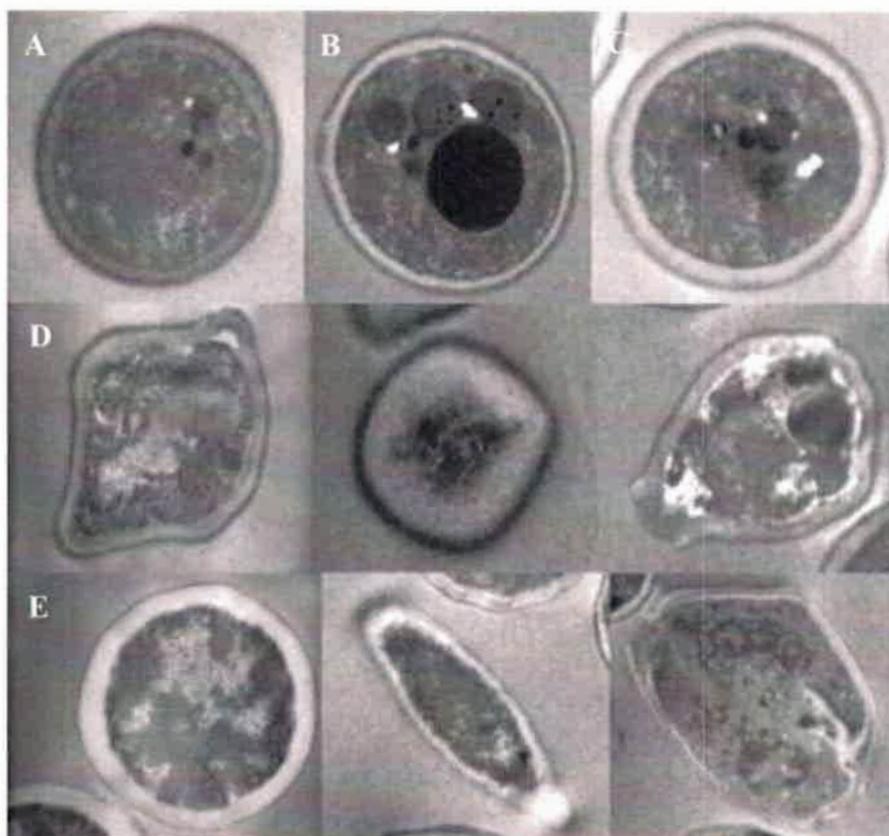


Figura 67. Microscopía electrónica de transmisión. A) Células de *C. albicans* control. Aumento 21560 X. B) Células de *C. albicans* irradiadas en ausencia de ZnPPc⁴⁺. Aumento 21560 X. C) *C. albicans* en presencia ZnPPc⁴⁺ 5 μM mantenidas en la oscuridad. Aumento 13000 X. D) Células de *C. albicans* en presencia ZnPPc⁴⁺ 5 μM mantenidas en la oscuridad 30 min e irradiadas durante 15 min. Aumento 16700 X. E) Células de *C. albicans* en presencia ZnPPc⁴⁺ 5 μM mantenidas en la oscuridad 30 min e irradiadas durante 30 min. Aumento 16700 X.

7.6.4. Fotodaño en la envoltura celular

7.6.4.1. Microscopía electrónica de barrido

Para estudiar el daño sobre la envoltura celular fue utilizada la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), donde las células de *C. albicans* (~ 10⁷ UFC/mL) fueron tratadas con 5 μM del sensibilizador ZnPPc⁴⁺ e irradiadas con luz visible por 15 y 30 min (Figura 68). Los cultivos controles (Figura 68 A, B y C) no presentaron alteraciones en la envoltura de las células, tanto en las células no tratadas e irradiadas, como en las células incubadas con el sensibilizador y mantenidas en la oscuridad. Como puede observarse en la Figura 68 D y E, bajo tratamiento fotodinámico se producen alteraciones en la envoltura celular de las células de *C.*

albicans durante el proceso fotodinámico. Las células tratadas fotodinámicamente con ZnPPc⁴⁺ durante 15 y 30 min presentan irregularidades en la envoltura celular, tales como: porosidades, grietas, arrugas y deformaciones.

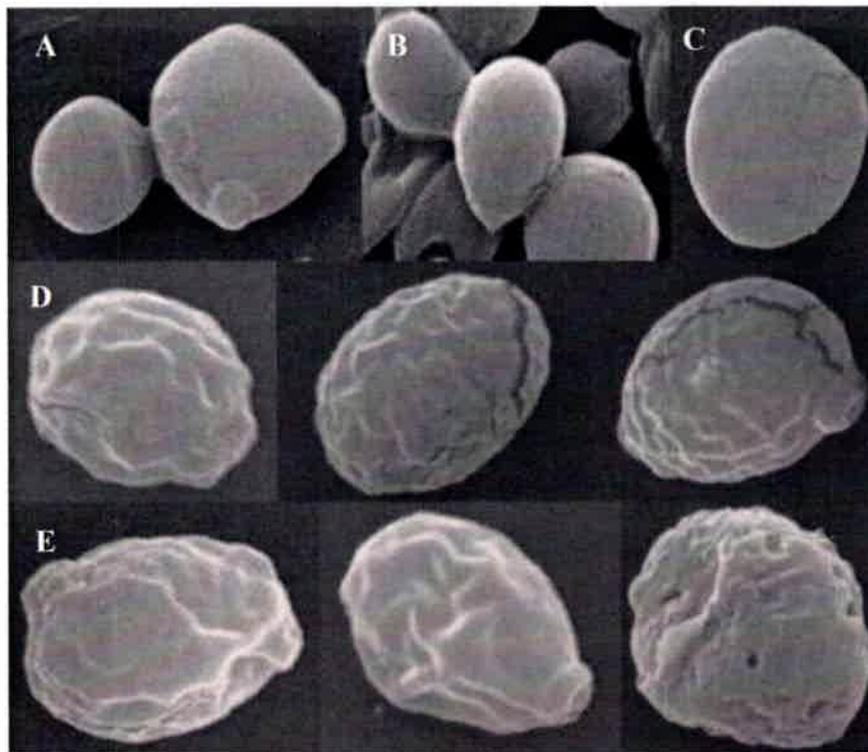


Figura 68. Microscopía electrónica de barrido de cultivos de células de *C. albicans* ($\sim 10^7$ UFC/mL). A) Células de *C. albicans* control. B) Suspensiones de *C. albicans* tratadas con $5 \mu\text{M}$ de ZnPPc⁴⁺ en oscuridad. C) Suspensiones de *C. albicans* irradiadas con luz visible. D) Suspensiones de *C. albicans* tratadas con ZnPPc⁴⁺ e irradiados por 15 min. E) Suspensiones de *C. albicans* tratadas con ZnPPc⁴⁺ e irradiados por 30 min. Aumento 5000 X.

Resultados similares fueron encontrados en las células de *E. coli* bajo el tratamiento IFD con ZnPPc⁴⁺ a los 30 min de irradiación [129]. Estas modificaciones fueron atribuidas a la presencia de la molécula a nivel superficial, ya sea en la pared celular de esta levadura como así también a nivel de membrana citoplasmática. Los cambios estructurales demostrados por SEM sugieren que este sensibilizador fotoactivado estaría interfiriendo potencialmente con las funciones de las envolturas. Las reacciones de oxidación que involucran al ¹O₂ podrían ser las responsables de los efectos ocasionados sobre los sitios de biosíntesis de membrana, estimulando la

acumulación de macromoléculas y conduciendo a la disrupción de la estructura del sistema de membrana. Este proceso podría alterar la capacidad de multiplicarse y consecuentemente afectar la viabilidad celular.

CONCLUSIONES

A lo largo del desarrollo de la tesis fueron evaluadas distintas ftalocianinas, para poder determinar la eficiencia de cada una de ellas frente a *C. albicans*. Estas presentan diferencias en cuanto al número de cargas y a la posición de las mismas. Fueron analizadas dos ftalocianinas tetracatiónicas ZnAmPc⁴⁺, ZnPPc⁴⁺, tres tricatiónicas AN₃ZnPc³⁺, FN₃ZnPc³⁺, TN₃ZnPc³⁺, una monocatiónica AZnPc⁺ y una neutra AZnPc.

Estos agentes presentan absorción de luz en la región visible del espectro y rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) apropiados para su localización y cuantificación intracelular. A su vez, estas ftalocianinas poseen elevada producción de ¹O₂ en solución, lo cual es esencial para una inactivación celular eficaz.

Los estudios de unión celular de los agentes fotosensibilizadores ZnPPc⁴⁺ y FN₃ZnPc³⁺, indicaron que la cantidad de ftalocianina unida a las células alcanzó valores apropiados para llevar a cabo el efecto fototóxico. Ambos presentan cinéticas de unión muy rápidas a cortos tiempos de incubación (5 min) y un incremento en el fotodaño de *C. albicans* al aumentar la concentración de los mismos y el tiempo de irradiación. La unión del sensibilizador ZnPPc⁴⁺ a las células fue efectiva a tiempos cortos de incubación, sin modificarse al prolongar el tiempo. Su unión fue lineal en el rango de las concentraciones utilizadas 1-10 μ M indicando que no se produce saturación del sensibilizador dentro de las células. Además, disminuye al incrementar la densidad celular y con las distintas etapas de lavado, indicando que se une fuertemente a las células y es difícil eliminarlo. Por otro lado, el fotosensibilizador tetracatiónico ZnAmPc⁴⁺ fue unido a las células muy débilmente quizás debido a la fuerte tendencia a agregarse.

Luego de varios estudios realizados con los distintos FS, en particular, ZnPPc⁴⁺, fue evaluado para inactivar células de *C. albicans* tanto en suspensión de PBS como en medio nutritivo líquido o sólido, debido a su elevada eficiencia en la IFD bajo las distintas condiciones analizadas. Los estudios en medios sólidos fueron realizados para poder determinar la eficiencia de ZnPPc⁴⁺ en la IFD y simular así su capacidad para erradicar microorganismos que podrían encontrarse creciendo en un foco localizado de infección, así como el tratamiento de las superficies que deben permanecer asépticas. ZnPPc⁴⁺ presentó valores apropiados de inactivación tanto para tratar las células en suspensión como en medio sólido.

La fotoinactivación producida por ZnPPc⁴⁺ fue analizada usando diferentes concentraciones y tiempos de irradiación. Estudios *in vitro* muestran que un incremento

en el fotodaño celular fue obtenido aumentando la concentración del sensibilizador en un rango de 1-10 μM en la suspensión celular de *C. albicans* en PBS. Una concentración de 5 μM de ZnPPc^{4+} es eficiente para fotoinactivar microorganismos disminuyendo la supervivencia celular en $\sim 4,5$ log después de 15 min de irradiación. A su vez al aumentar el tiempo de exposición de la luz a 30 min, la inactivación fue de ~ 5 log. Esto indica que el tiempo de irradiación tuvo influencia en la inactivación, aumentando proporcionalmente con el tiempo de irradiación. Un incremento en el fotodaño celular fue obtenido aumentando la concentración de sensibilizador a 10 μM , obteniéndose una inactivación de *C. albicans* de $\sim 99,999$ % tanto a 15 como a 30 min de irradiación, sin embargo con una concentración de 1 μM y 30 min de irradiación fue posible obtener una disminución en la viabilidad celular de ~ 4 log. Esto indica que la eficiencia en la actividad fotodinámica de esta ftalocianina catiónica fue dependiente de las concentraciones, los tiempos de irradiación y de las dosis de luz utilizadas. Un comportamiento opuesto fue observado utilizando ZnAmPc^{4+} el cual solo produce una disminución de la supervivencia celular de $\sim 1,5$ log. Estos resultados permitieron visualizar que ZnAmPc^{4+} produce un leve efecto fotodinámico sobre *C. albicans*, confirmando una vez más su débil unión a las células, debido quizás a su fuerte tendencia a agregarse en un medio biológico.

Por otro lado, AZnPc y AZnPc^+ , si bien presentan valores apropiados de Φ_{Δ} , en medio homogéneo, no generan una IFD eficiente sobre *C. albicans*. Esto debido a que los fotosensibilizadores cuando son neutros o presentan una sola carga no son efectivos para inactivar microorganismos en comparación con sensibilizadores que presentan más de una carga, ya que su interacción con las células disminuye. De aquí la importancia de la presencia de cargas y la posición de las mismas en los fotosensibilizadores.

Por otra parte, la IFD de ZnPPc^{4+} en células de *C. albicans* disminuye considerablemente al mismo tiempo que la densidad celular aumenta. Este efecto es producido principalmente por la distribución del sensibilizador entre un mayor número de células totales en la suspensión. Así, la cantidad de sensibilizador por célula es menor a densidades altas y consecuentemente este efecto produce un menor efecto fotodinámico. Además, la aplicación de una o dos etapas de lavado, disminuye el efecto fotodinámico, con respecto a la suspensión sin lavados, pero esta disminución no es muy marcada con respecto a la suspensión celular sin lavados. Esto indica que ZnPPc^{4+}

se une fuertemente a las células y es difícil eliminarla aún con los lavados, lo cual indica que este fotosensibilizador es efectivo para ser aplicado en IFD de *C. albicans*.

En medio sólido, una fotoinactivación alta fue encontrada en las células tratadas con ZnPPc⁴⁺ en solución e irradiadas sobre AS. Después de 30 min de irradiación, no se detectó formación de colonias en los cultivos incubados con 10 µM. También, la capacidad de inactivación de ZnPPc⁴⁺ se mantuvo alta para las células inmovilizadas sobre superficies de agar conteniendo áreas esparcidas con diferentes cantidades de fotosensibilizador.

El crecimiento celular en colonias conduce 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 este agente fue analizada en células de *C. albicans* creciendo en colonias inmovilizadas sobre superficies de AS. Los experimentos con pequeñas colonias mostraron que el crecimiento de las levaduras fue suprimido y que la erradicación completa de *C. albicans* fue posible usando 22 nmol de ZnPPc⁴⁺ y 3 h de irradiación con luz visible. Además, la capacidad fotocitotóxica del sensibilizador permanece alta para las colonias irradiadas con luz solar natural. Es por ello que esta ftalocianina podría ser usada para prevenir el crecimiento de levaduras sobre superficies que deben mantenerse estériles.

Mediante el cultivo de células de *C. albicans* en suero humano, estos organismos cambiaron de una forma de crecimiento levaduriforme a una de pseudohifa, la forma más patógena de este organismo. El tratamiento fotodinámico con ZnPPc⁴⁺ de estos filamentos en suero no tuvo efecto sobre la viabilidad celular, debido probablemente a una interacción mayor entre la ftalocianina y los componentes del suero, que con las células. Por otro lado, fue posible obtener mayores valores de inactivación luego de la irradiación con luz visible al aplicar el mismo tratamiento de *C. albicans* como pseudohifa, en un medio acuoso de PBS. Este efecto posiblemente fue debido a la ausencia de suero, aunque la pérdida de supervivencia alcanzada no fue como lo encontrado anteriormente para las levaduras en suspensión de PBS.

Otra manera de evaluar el fotodaño inducido por ZnPPc⁴⁺, fue mediante estudios en el retardo del crecimiento, debido a que bajo estas condiciones las células no se encuentran bajo estado de inanición y poseen todas las condiciones óptimas de crecimiento. Fue posible observar una rápida inactivación de cultivos de *C. albicans* por la actividad fotodinámica a una concentración de 10 y 20 µM. Sin embargo, a la

máxima concentración utilizada (20 μM), fue observado que el fotosensibilizador puede resultar algo tóxico en la oscuridad. La inactivación celular también se dio en un ambiente óptimo de crecimiento, lo que provocó el retardo de la curva de crecimiento. Mientras tanto el efecto de la luz y el fotosensibilizador por separados no causaron cambios apreciables en la supervivencia de las células. A su vez fue evaluado el fotodaño inducido por $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$ en el retardo del crecimiento, indicando una rápida inactivación de cultivos de *C. albicans* por la actividad fotodinámica a una concentración de 10 μM , mientras que esta fue normal para todos los cultivos controles. En base a estos estudios, las ftalocianinas ZnPpc^{4+} y $\text{FN}_3\text{ZnPc}^{3+}$, son efectivas para ser aplicada en el tratamiento de *C. albicans*, presentando potenciales aplicaciones como agentes fototerapéuticos para la inactivación fúngica.

En todo sistema biológico resulta interesante poder determinar el tipo de mecanismo que está involucrado y que conduce a la muerte celular. El mecanismo de acción fotodinámica depende del fotosensibilizador utilizado, del tratamiento fotodinámico y del tipo de célula microbiana. La actividad fotoinactivante producida por la ftalocianina ZnPpc^{4+} a una concentración de 2,5 μM fue realizada en suspensiones celulares de *C. albicans* en diferentes condiciones. La presencia del ión N_3^- , manitol y condiciones anaeróbicas (atmósfera de argón) producen una disminución del fotodaño, mientras que en presencia de D_2O se incrementa la inactivación celular. Por lo tanto, la presencia de oxígeno es indispensable para lograr una erradicación efectiva de los microorganismos. Además, la presencia de D_2O permite que la fotoinactivación sea más pronunciada que en solución acuosa, haciendo evidente la presencia de $^1\text{O}_2$. Sin embargo, el fotodaño celular es también protegido levemente por la acción del manitol y fue posible detectar O_2^- en presencia de NADH, indicando aunque en menor medida, la presencia de reacciones del tipo I. Los estudios en presencia de DMA y ABMM luego de la activación de ZnPpc^{4+} , sumado a la producción de tripletes en presencia de células, indican que existe un aporte significativo del mecanismo tipo II en la eficiente inactivación fotodinámica de *C. albicans*.

El estudio del ADN extraído de las levaduras sometidas al proceso de IFD reveló que el material genético no se daña durante el tratamiento; a pesar de la gran afinidad entre esta biomolécula y ZnPpc^{4+} . 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.

Mediante microscopía confocal de fluorescencia fue posible determinar la localización celular de ZnPPc⁴⁺, la cual fue observada a nivel de envoltura celular. Por otro lado, mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido, fue posible determinar la forma oval levaduriforme característica de *C. albicans* y evaluar el daño en la estructura celular interna y en la envoltura celular respectivamente en las muestras tratadas con ZnPPc⁴⁺ e irradiadas. En los cultivos controles no se evidenciaron cambios pero sí en los tratados, conduciendo a la pérdida de la funcionalidad y la consecuente inactivación celular.

En base a estos estudios y a las diferencias estructurales entre los distintos sensibilizadores analizados a lo largo de este trabajo de tesis, fue posible observar que las diferencias entre ellos se ven reflejadas en el grado de unión e inactivación que generan sobre las células de *C. albicans*. Sobre la base de su diferencia estructural, la ftalocianina tetracatiónica ZnPPc⁴⁺ es efectiva para ser aplicada en el tratamiento de *C. albicans* y el proceso de inactivación es llevado a cabo, principalmente, por la producción de ¹O₂. La presencia de cargas y la posición de las mismas le confieren movilidad y le permite una mejor interacción con el medio biológico.

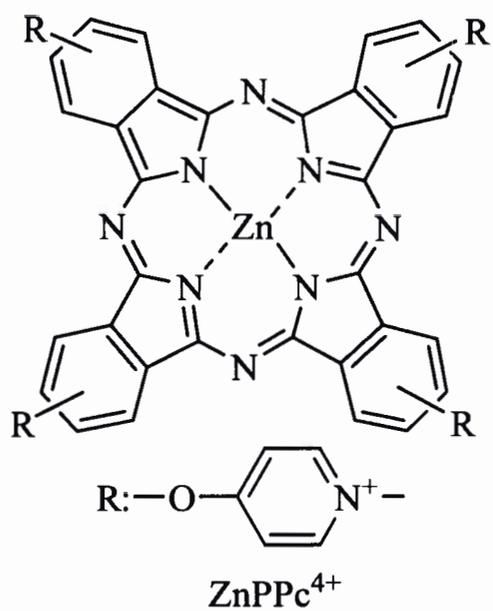
GLOSARIO DE ABREVIATURAS

EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
AS	agar Sabouraud
D₂O	agua deuterada
ABMM	2,2-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de sodio
NBT	azul de nitrotetrazolio clorado
CS	caldo Sabouraud
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
K_{obs}	constante de velocidad observada
ON	cultivo overnight
IC	decaimiento térmico
DMA	9,10-dimetilantraceno
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
SDS	dodecilsulfato de sodio
ISC	entrecruzamiento de sistema
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ROS	especies reactivas del oxígeno

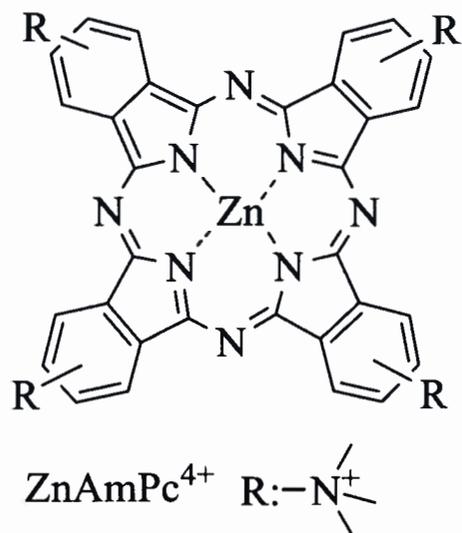
F	fluorescencia
FLU	fluconazol
P	fosforescencia
FS	fotosensibilizador
⁰FS	fotosensibilizador en estado basal
¹FS*	fotosensibilizador en estado excitado singlete
³FS*	fotosensibilizador en estado excitado triplete
TRPD	fosforescencia resuelta en el tiempo
IFD	inactivación fotodinámica
IFI	infecciones fúngicas invasoras
LFF	láser flash fotólisis
λ_{em}	longitud de onda de emisión de fluorescencia
λ_{exc}	longitud de onda de excitación de fluorescencia
λ_{irr}	longitud de onda de irradiación
λ_{max}	longitud de onda de un máximo de absorción
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	microscopía electrónica de barrido

TEM	microscopía electrónica de transmisión
$^1\text{O}_2$	oxígeno molecular singlete
$^3\text{O}_2$	oxígeno molecular triplete
p.b.	pares de bases
H_2O_2	peróxido de hidrógeno
O_2^-	radical anión superóxido
OH^\cdot	radical hidroxilo
Φ_F	rendimiento cuántico de fluorescencia
Φ_Δ	rendimiento cuántico de oxígeno singlete
rpm	revoluciones por minuto
PBS	solución amortiguadora de fosfato salino
BrEt	solución de bromuro de etidio
τ_T	tiempo de vida del estado triplete
TBE	tris-borato EDTA
TE	tris-EDTA
UFC	unidades formadoras de colonias

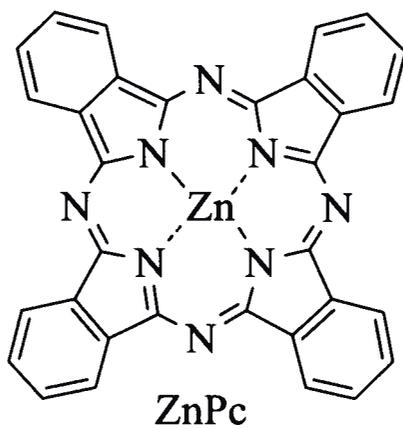
GLOSARIO DE MOLÉCULAS



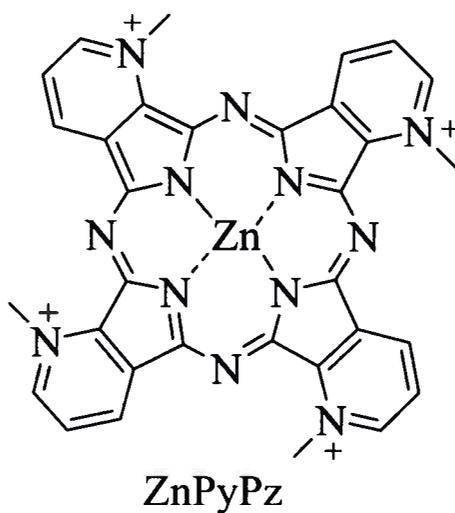
yoduro de zinc(II)2,9,16,23-tetrakis[4-(*N*-metilpiridiloxi)]ftalocianina



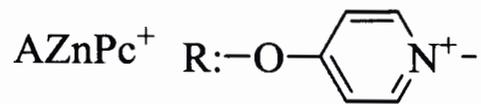
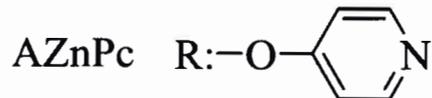
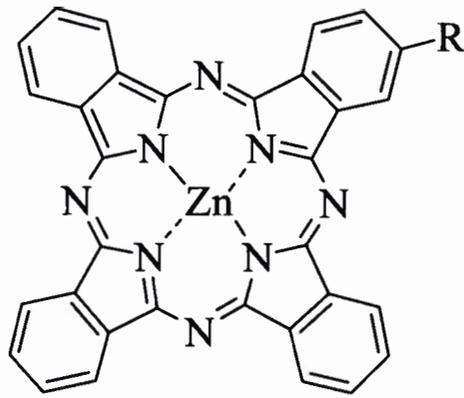
yoduro de zinc(II)2,9,16,23-tetrakis[4-(*N,N,N*-trimetilamino)]ftalocianina



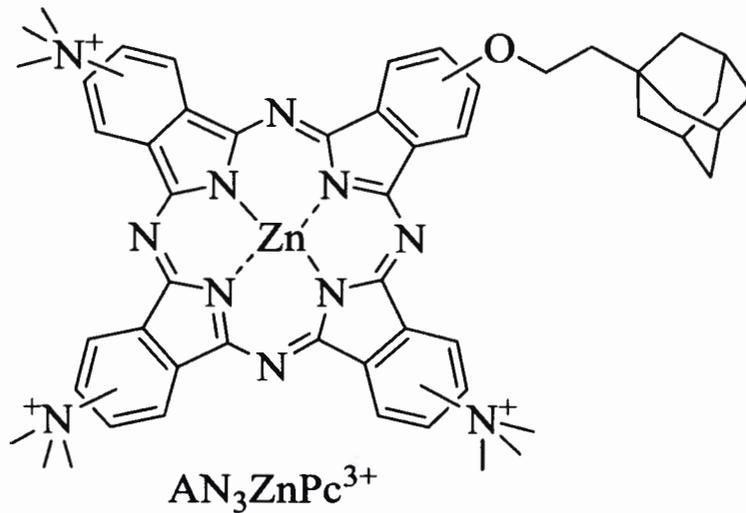
zinc(II)ftalocianina



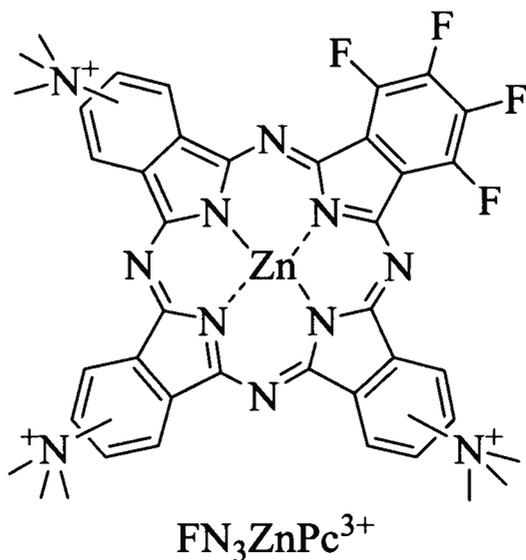
zinc(II)tetrametiltetrapiridino2,3-b:2',3'-g:2'',3''-l:2''',3'''-q]porfirazinio



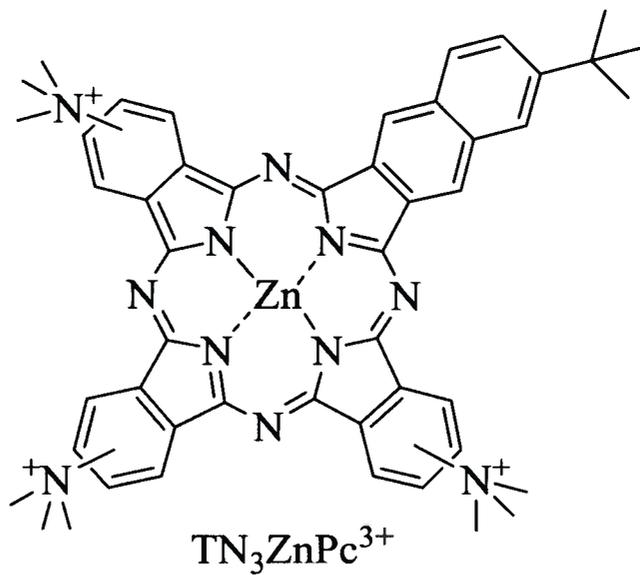
zinc(II) 2-[4-piridiloxi]ftalocianina
yoduro de Zinc(II)2-[4-(N-metilpiridiloxi]ftalocianina



zinc(II) 2-[2-(1-adamantil)etoxi]-9(10),16(17),23(24)-tris(N,N,N-trimetilamonio)ftalocianina



zinc(II) 1,2,3,4-[tetrafluoro]-9(10),16(17),23(24)-tris(*N,N,N*-trimetilamonio)ftalocianina



zinc(II) 2,3-[2'-tert-butil-1',3'-butadienil]-9(10),16(17),23(24)-tris(*N,N,N*-trimetilamonio) ftalocianina

REFERENCIAS

- [1] Madigan, MT, Martinko, JM (2009). Brock-Biología de los
- [2] Campbell, NA, Reece, JB, Taylor, MR, Simon, EJ. (2005). Biología: Conceptos y Conexiones. 7th Editon (Ed. Pearson, Benjamin Cummings) Publisher. Páginas: 98 y 100.
- [3] Webb, BC, Thomas, CJ, Willcox, MDP, Harry, DWS, Knox, KW. (1998). *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust. Dent. J.*, 43: 45-50.
- [4] Preusser, H, Roster, H. (1979). Freeze-fracture studies of the plasmalemma of *Candida albicans* after treatment with econazole-nitrate. *Sabouraudia*, 17: 389-398.
- [5] Pesti, M, Novak, EK, Ferenczy, L, Svoboda, A. (1981). Freeze fracture electron microscopical investigation of *Candida albicans* cells sensitive and resistant to nystatin. *Sabouraudia*, 19: 17-26.
- [6] Marriott, MS. (1975). Isolation and chemical characterization of plasma membranes from the yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, 86: 115-132.
- [7] Hubbard, MJ, Surait, R, Sullivan, PA, Shepherd, MG. (1986). The isolation of plasma membrane and characterization of the plasma membrane ATPase from the yeast *Candida albicans*. *Eur. J. Biochem.*, 154: 375-381.
- [8] Graham, L, Graham, JM, Wilcox, LW. (2006). Fungi and Lichens. *Plant Biology*

- [9] Pardi, G, Cardozo, EI. (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta odontol Venez.* v. 40 n.1 Caracas.
- [10] Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Leioa, Vizcaya. Rev Iberoam Micol.;* 25: 78-82.
- [11] Heitman, J. (2005). Cell biology. A fungal Achilles' heel. *Science*, 309: 2175-2176.
- [12] Chaffin, WL, López-Ribot, JL, Casanova, M, Gozalbo, D, Martínez, JP. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 130-180.
- [13] Nimrichter, L, Rodrigues, ML, Rodrigues, EG, Travassos, LR. (2005). The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect.*, 7: 789-798.
- [14] Pontón, J, Omaetxebarria, MJ, Elguezabal, N, Alvarez, M, Moragues, MD (2001). Immunoreactivity of the fungal cell wall. *Med. Mycol.*, 39 (Supl. 1): 101-110.
- [15] Pazos, C, Moragues, MD, Quindós, G, Pontón, J, Palacio, A. (2006). Diagnostic potential of detection of (1-3)- β -D-glucan and antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Rev. Iberoam. Micol.;* 23: 209-215.

- [16] Trigos, Á. y Ortega-Regules, A. (2002). Selective destrtuction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol. *Mycologia*, 94: 563-568.
- [17] Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* v.25 n.1 Caracas.
- [18] Myoken, Y (2009). Clinical pathogenesis of candidemia caused by non-albicans *Candida* species. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.*,50(4):225-8.
- [19] Fidel, PL. (2006). *Candida*–host interactions in HIV-disease: relationships in oropharyngeal candidiasis. *Adv. Dent. Res.*, 19: 80-84.
- [20] Bliss, JM, Bigelow, CE, Foster, TH, Haidaris CG. (2004). Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48: 2000-2006.
- [21] Munin, E, Giroldo, LG, Alves, LP, Costa, MS. (2007). Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 88: 16-20.
- [22] Madigan, MT, Martinko, JM, Parker, J. (2003). Brock. Biology of Microorganisms, Pearson Education, New Jersey.
- [23] Nemecek JC, Wüthrich M, Klein BS. (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science.*,312(5773):583-8.
- [24] Mayer, FL, Wilson, D, Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Landes Biosci.*, 4:2, 119-128.
- [25] Lilic, D, Haynes, K. (2007). *Candida*. In: Brown GD, Netea MG, eds. Immunology of fungal infections. *Dordrecht: Springer.*, 359–380.

- [26] Criseo, G, Scordino, F and Romeo, O. (2015) Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *J. Microbiol. Methods.*, 111: 50-56.
- [27] Romani, L (2008) Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med. Mycol.*, 46: 515–529.
- [28] Sykes, LM, Coogan, MM. (1997). Yeast counts as a measure of host resistance in dental patients. *J of the D A S A.*, 52: 19-23.
- [29] Shepherd, MG. (1986). The pathogenesis and host defense mechanisms of oral candidiosis. *NZ Dent J.*, 82: 78-82.
- [30] Tsai, PW, Chen, YT, Hsu, PC and Lan, CY. (2013) Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: a mini review. *BioMedicine.*, 3, 51-64.
- [31] Velazco, G, Ortiz, R, Arellano, L, Bustillos, L, y González, A. (2009). Evidencia microscópica de la presencia de *Candida albicans* en bases protésicas retiradas de la cavidad bucal. *Revista Cubana de Estomatología.*, 46: 2.
- [32] Pulido Cortijo, G, Camacho Espejo, A, Criado, J, Rivero Román, A. (2006). Infecciones por hongos levaduriformes: *Candida* sp. y *Cryptococcus* sp. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.*, 9: 3693–3701.
- [33] Van Duijn, P.J., Dautzenberg, M.J., Oostdijk, E.A. (2011). Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs. *Curr. Opin. Crit. Care.*, 17: 658-665.

- [34] Kraus, CN. (2008). Low hanging fruit in infectious disease drug development. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11:434-8; PMID:18822387.
- [35] Vicente, M, Hodgson, J, Massidda, O, Tonjum, T, Henriques-Normark, B, Ron EZ. (2006). The fallacies of hope: will we discover new antibiotics to combat pathogenic bacteria in time? *FEMS Microbiol Rev.*, 30: 841-52.
- [36] Armiñanzas Castillo, C, Parra Blanco, JA, González Rico, C, y Guzmán Gómez, L. (2014). Estrategias diagnósticas y terapéuticas en las enfermedades infecciosas Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicios de b Radiodiagnóstico y c Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. Cantabria. España. *Medicine*, 11:3341-51.
- [37] Dai, T, Fuchs, BB, Coleman, JJ, Prates, RA, Astrakas, C., Denis, TG, Ribeiro, MS, Mylonakis, E, Hamblin, MR, Tegos, GP. (2012). Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front. Microbiol.*, 3 (120): 1-16.
- [38] Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews. Immunol.* 11, 275-288.
- [39] Solís Cuesta, F, Linares Sicilia, MJ, Casal Román, M, Moreno Giménez, JC. (2006). Clasificación de las infecciones fúngicas. Características microbiológicas de interés clínico. Estudio de resistencia. Infecciones fúngicas superficiales. *Enfermedades infecciosas (IX): Infecciones por hongos. Elsevier.*, 57: 3683-3692.
- [40] Carlile, M.J, Watkinson, SC, Gooday, GW. *The Fungi Book (1994-2001)*. 2^{ed}. Academic Press. Fungal molecular biology.

- [41] Chapman, S, Sullivan, D, Cleary, J. (2008). In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.*, 119: 197-216.
- [42] Sinnollareddy, M., Peake, S.L., Roberts, M.S., Lipman, J. and Roberts, J.A. (2012) Using pharmacokinetics and pharmacodynamics to optimise dosing of antifungal agents in critically ill patients: a systematic review. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 39: 1-10.
- [43] Bidart, T. (2004). Lo antiguo y lo nuevo en antifúngicos y antivirales. *Rev. Chilena Infectol.*, 22: 40-45.
- [44] Diomed, A. (2004). Nuevos antifúngicos: las equinocandinas. *Rev. Chilena Infectol.*, 21(2): 89-101.
- [45] Maestre, JR, Alou, L. (2001). Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. *Rev. Esp. Quimioter.*, 14: 17-21.
- [46] Andes, DR, Kauffman, CA, Pappas, PG, Sobel, J, Dismukes, WE, (2011). *Essentials of Clinical Mycology*. 2^{ed}. Londres. *Springer*, p: 61-93
- [47] Díaz, A, Garcés, C. (2012). Current use of triazole antifungal agents in children. *Infectio.*, 16: 82-93.
- [48] Blyth, CC. (2011). Antifungal azoles: old and new. *Pediatr Infect Dis J.*, 30:506-7
- [49] Zonios, DI, Bennett, JE. (2008). Update on azole antifungals. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 29:198-210.
- [50] Espinel-Ingroff, A. (2008). Mechanisms of resistance to antifungal agents. Yeasts and filamentous fungi, *Rev. Iberoam. Micol.*, 25: 101-106.
- [51] Pfaller, MA. (2012). Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment, *The Am. J. Med.*, 125: 3-13.

- [52] Bonnet, R. (2000). Chemical aspect of photodynamic therapy. *Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam*, ISBN 90-5699-248-1; ISSN 1029-3654 291-305.
- [53] Wan, MT, Lin, JY. (2014). Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 7: 145–163.
- [54] Kharkwal, GB, Sharma¹, SK, Huang, YY, Dai, T and Hamblin, MR. (2011). Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers Surg. Med.*, 43: 755–767.
- [55] Braathen, LR, Szeimies, RM. Basset-Seguín, N, Bissonnette, R, Foley, P, Pariser, D, Roelandts, R, Wennberg, MA, Morton, CA. (2007). Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: An international consensus, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 56: 125-143.
- [56] Lehmann, P. (2007). Methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer, *Br. J. Dermatol.*, 156: 793-801.
- [57] Joyce da Silva Martins, MD, Campos Junqueira, J, Raquel Lourdes Faria, MD, Fonseca, N, Rodnei, S, Rossoni, D, Dias Colombo, CE, Olavo, A, Cardoso, J. (2011). Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. *Oral Surg. Oral Med. O.*, 111: 71–77.
- [58] Pereira Gonzales, F. and Maisch, T. (2012). Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol.* 116: 1-10.

- [59] Calzavara-Pinton, P., Rossi, M.T., Sala, R. and Venturini, M. (2012). Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochem. Photobiol.* 88: 512–522.
- [60] Wainwright, M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.*, 42: 13-28.
- [61] Sharma, S.K., Chiang, L.Y., Hamblin M.R. (2011). Photodynamic therapy whit fullerenes *in vivo*. Reality or a dream?. *Nanomed. (Lond.)*, 6: 1813-25.
- [62] Morton, CA, Brown, SB, Collins, S, Ibbotson, S, Jenkinson, H, Kurwa, H, Langmack, K, Mckenna, K, Moseley, H, Pearse, AD, Stringer, M, Taylor, D.K, Wong, G, Rhodes, LE. (2002). Guidelines for topical photodynamic therapy. *Br. J. Dermatol.*, 146 (4): 552-567.
- [63] Allevato, M. Goldman M. (2006). Terapia fotodinámica. Serie Dermatología Estética, *Jeffrey Dover*. 302-311.
- [64] Ali, H, van Lier, JE. (1999). Metal complexes as photo-and radiosensitizers, *Chem. Rev.*, 99: 2379-2450.
- [65] Aggarwal, A, Singh, S., Zhang, Y, Anthes, M, Samaroo, D, Gao, R and Drain, CM. (2011). Synthesis and photophysics of an octathioglycosylated zinc(II) phthalocyanine. *Tetrahedron Letters*, 52: 5456–5459.
- [66] Cordero, JEM. (2008). Agentes Físicos Terapéuticos PARTE 8. FOTOTERAPIA Capítulo 27. Generalidades de la fototerapia Comportamiento óptico de los tejidos. Libros de autores cubanos. *BVSCUBA*.
- [67] Kharkwal, GB, Sharma, SK, Huang, YY, Dai, T, Hamblin, MR. (2011). Photodynamic therapy for infections: clinical applications, *Lasers Surg. Med.*, 43: 755-767.

- [68] Lambrechts, SA, Aalders, MC, Verbraak, FD, Lagerberg, JW, Dankert, JB, Schuitmaker, JJ. (2005). Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 79: 51-57.
- [69] Spesia, MB, Rovera, M, Durantini, EN. (2010). Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mitis* by cationic zinc(II) phthalocyanines in media with blood derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 45: 2198-2205.
- [70] Mohr, H, Knuver-Hopf, J, Gravemann, U, Redecker-Klein, A, Muller, TH. (2004). West Nile virus in plasma is highly sensitive to methylene blue-light treatment. *Transfusion*, 44: 886-890.
- [71] Maisch, T, Bosl, C, Szeimies, RM, Love, B, Abels, C. (2007). Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin-based photosensitizer against MRSA ex vivo, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6: 545-551.
- [72] Hamblin, MR, Zahra, T, Contag, CHM, Hasan, T. (2003). Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections in vivo. *J. Infect. Dis.*, 187: 1717-1725.
- [73] Shibli, JA, Martins, MC, Nociti, FHJ, Garcia, VG, Marcantonio, EJ. (2003). Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J. Periodontol.*, 74: 338- 345.
- [74] Akilov, OE, Kosaka, S, O'Riordan, K, Hasan, T. (2007) Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical

phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6: 1067-1075.

[75] O'Riordan, K, Akilov, OE, Chang, SK, Foley, JW, Hasan, T. (2007). Real-time fluorescence monitoring of phenothiazinium photosensitizers and their antimycobacterial photodynamic activity against *Mycobacterium bovis* BCG *in vitro* and *in vivo* models of localized infection. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6: 1117-1123.

[76] Jung, JY, Kwon, PS, Ahn, JC, Ge, R, Suh, MW, Rhee, CK. (2009) *In vitro* and *in vivo* photodynamic therapy of otitis media in gerbils. *Laryngoscope*, 119: 1781-1787.

[77] Bisland, SK, Chien, C, Wilson, BC, Burch, S. (2006). Pre-clinical *in vitro* and *in vivo* studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 5: 31-38.

[78] Sperandio, FF, Huang, YY, Hamblin, MR. (2013). Antimicrobial photodynamic therapy to kill gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.*, 8: 108-120.

[79] Rebeiz, C.A, Montazer-Zouhour, A, Hopen, H.J, Wu, S.M. (1984). Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology. *Enzyme Microb Tech.*, 6: 390-396.

[80] Nandihalli, UB, Rebeiz, CA. (1991). Photodynamic herbicides. 9. Structure activity study of substituted 1,10-phenanthrolines as potent photodynamic herbicide modulators. *Pestic. Biochem. Phys.*, 40: 27-46.

[81] Rebeiz, CA, Juvik, JA, Rebeiz, CC. (1988). Porphyrin insecticides: 1. Concept and phenomenology. *Pestic. Biochem. Phys.*, 30: 11-27.

- [82] Ben Amor, T, Jori, G. (2000). Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 915-925.
- [83] Wainwright, M. (2003). Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21: 510-520.
- [84] Wainwright, M. (2004). Photoinactivation of viruses. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 5: 406-411.
- [85] DeRosa, MC, Crutchley, RJ. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem.*, 233-234: 351-371.
- [86] Jori, G, Brown, SB. (2004). Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 5: 403-405.
- [87] Ochsner, M. (1997). Photophysical and photobiological processes in photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 39: 1-18.
- [88] Harris, F, Chatfield, LK, Phoenix, DA. (2005) Phenothiazinium based on photosensitizer photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. *Curr. Drug Targets*, 6: 615-627.
- [89] Dupouy, EA, Lazzeri, D, Durantini, EN. (2004). Photodynamic activity of cationic and non-charged Zn(II)tetrapyrroline derivatives: biological consequences in human erythrocytes and *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3: 992-998.
- [90] Henderson, BW, Dougherty, TJ. (1992). How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.*, 55: 145-157.

- [91] Röeder, B. (1998). Photobiophysical parameters, Chap. 1.2. In: Moser, J. G., Ed, Photodynamic tumor therapy, 2nd and 3rd generation photosensitizers. *Amsterdam, Harwood Academic Publishers.*, 9-20.
- [92] Jori, G, Schindl, L, Schindl, A, Polo, L. (1996). Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized process *in vivo*. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 102: 101-107.
- [93]. Tavares A, Dias, SRS, Carvalho, CMB, Faustino, MAF, Tomé, JPC, Neves, MGPM, Tomé, SAC, Cavaleiro, JAS. Cunha, A, Gomes, NCM, Alves, E and Almeida, A. (2011) Mechanisms of photodynamic inactivation of a Gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10: 1659-1669.
- [94] Spesia, MB and Durantini, EN. (2013) Photodynamic inactivation mechanism of *Streptococcus mitis* sensitized by zinc(II) 2,9,16,23-tetrakis[2-(*N,N,N*-trimethylamino)ethoxy]phthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 125: 179-187.
- [95] Costa, L, Faustino, MAF, Tomé, JPC, Neves, MGP, Tomé, MSA, Cavaleiro, CJAS, Cunha, Â and Almeida, A. (2013) Involvement of type I and type II mechanisms on the photoinactivation of non-enveloped DNA and RNA bacteriophages. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 120: 10-16.
- [96] Cornick, MP, Quiroga, ED, Bertolotti, SG, Alvarez, MG and Durantini, EN. (2011) Mechanistic insight of the photodynamic effect induced by tri- and tetra-cationic porphyrins on *Candida albicans* cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10: 1556-1561.

- [97] Di Palma, MA, Alvarez, MG, Ochoa, AL, Milanesio, ME, Durantini, EN. (2013). Optimization of cellular uptake of zinc(II) 2,9,16,23-tetrakis [4-(*N*-methylpyridyloxy)] phthalocyanine for maximal photoinactivation of *Candida albicans*. *Fungal Biol.*, 117: 744–751.
- [98] Villanueva, A, Vidania, R, Stockert, JC, Cañete, M, Juarrans, A. (2002). Photodynamic effects on cultured tumor cells. Cytoskeleton alterations and cell death mechanisms. *Photochem. Photobiol.*, 3-4: 79-117.
- [99] Ochsner, M. (1997). Photophysical and photobiological processes in photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 39: 1-18.
- [100] Ricci-J´unior, E, Maldonado Marchetti, J. (2006). Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use, *Int. J. Pharm.*, 310: 187-195.
- [101] Hamblin, MR, Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infections disease. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3: 436-450.
- [102] Lambrechts, SAG, Aalders, MCG, Van Marle, J. (2005). Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 2026-2034.
- [103] Mantareva, V, Angelov, I, Kussovski, V, Dimitrov, R, Lapok, L, W€ohrle, D (2011). Photodynamic efficacy of water-soluble Si(IV) and Ge(IV) phthalocyanines towards *Candida albicans* planktonic and biofilm cultures. *Eur J Med. Chem.*, 46: 4430-4440.
- [104] Scalise, I, Durantini, EN. (2005). Synthesis, properties, and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* using a cationic and noncharged

Zn(II) pyridyloxypthalocyanine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 13: 3037-3045.

[105] Cormick, MP., Alvarez, MG., Rovera, M, Durantini, EN. (2009). Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetracationic porphyrin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 44: 1592-1599.

[106] Calzavara-Pinton, PG, Venturini, M, Sala RA. (2005). Comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 78: 1–6.

[107] Tempesti, TC, Alvarez, MG, Durantini, EN. (2011) Synthesis and photodynamic properties of amphiphilic A₃B-phthalocyanine derivatives bearing *N*-heterocycles as potential cationic phototherapeutic agents. *Dyes Pigm.*, 91(1), 6-12.

[108] Ochoa AL, Tempesti, TC; Spesia MB, Milanesio, ME, Durantini, EN. (2012). Synthesis and photodynamic properties of adamantylethoxy Zn(II) phthalocyanine derivatives in different media and in human red blood cells. *Eur. J. med. Chem*, 50: 280-287.

[109] Tempesti, TC, Stockert, JC, Durantini, EN. (2008). Photosensitization Ability of a Water Soluble Zinc(II)tetramethyltetrapyrrolineporphyrin Salt in Aqueous Solution and Biomimetic Reverse Micelles Medium. *J. Phys. Chem. B.*, 112: 15701–15707.

[110] Spesia, MB, Rovera, M, Pascual, L, Durantini, EN. (2005). A. New antibacterial approach using photodynamic inactivation. *Chem. Educator.*, 10 (10): 1-4.

- [111] Harrigan, WF., McCance, ME. (1986). Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Academic. Press. London.*
- [112] Cormick, MP, Rovera, M, Durantini, EN. (2008). Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a novel Zn(II) phthalocyanine substituted by fluconazole groups. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 194: 220-229.
- [113] Schweitzer C, Scmidt R. (2003) Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem. Rev.*, 103: 1685- 1758.
- [114] Miskoski S. Fotooxidaciones sensibilizadas de compuestos de importancia biológica: Tetraciclinas y hormonas tiroideas. (2004). *Tesis doctoral en Ciencias Químicas*. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- [115] Mora, SJ., Milanesio, ME., Durantini, EN. (2013). 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: Chem.*, 270: 75-84.
- [116] Milanesio, ME, Spesia, MB, Cormick, MP, Durantini, EN. (2013). Mechanistic studies on the photodynamic effect induced by a dicationic fullerene C₆₀ derivative on *Escherichia coli* and *Candida albicans* cells. *Photodiag. and Photodyn. Ther.*, 10: 320-327.
- [117] Divon, MS, Nitzan, Y, Malik, Z. (2004). Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-*meso*(*N*-methylpyridyl)porphine, *Photochem, Photobiol. Sci.*, 3: 423-429.

- [118] Bolondi, A, Gaggino, PO. (1995). Técnicas generales para Microscopía Electrónica y Bioquímica Aplicada. Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias.
- [119] Bancroft, JD., Stevens, A. (1996) Theory and practice of histological techniques. *Bancroft and Stevens Eds.*
- [120] Jurado SB, Petruccelli MA. (2005). Aplicaciones de la microscopía electrónica de transmisión en el diagnóstico microbiológico. *Analecta veterinaria*, 25: 18-24.
- [121] Marti, C, Nonell, S, Nicolau, M, Torres, T. (2000). Photophysical properties of neutral and cationic tetrapyrroline porphyrins. *Photochem. Photobiol.*, 71: 53-59.
- [122] Boyle, RW, Dolphin, D. (1996). Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.*, 64: 469-85.
- [123] Kobayashi, N, Ishizaki, T, Ishii, K, Konami H. (1999). Synthesis, spectroscopy, and molecular orbital calculations of subzaphthalocyanines, subphthalocyanines, subnaphthalocyanines, and compounds derived therefrom by ring expansion. *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 9096-9110,
- [124] Islas, I, Rivarola, V, Durantini, EN. (2005) Synthesis and photodynamic activity of zinc(II) phthalocyanine derivatives bearing methoxy and trifluoromethylbenzyloxy substituents in homogeneous and biological media. *Bioorg. Med Chem.*, 13: 39-46.
- [125] Di Palma, MA, Alvarez, MG, Durantini, EN. (2015). Photodynamic action mechanism mediated by zinc(II) 2,9,16,23-tetrakis[4-(N-

- methylpyridyloxy)]phthalocyanine in *Candida albicans* Cells. *Photochem. Photobiol.*, 91: 1203–1209.
- [126] Ergaieg, K, Chevanne, M, Cillard, J, Seux, R. (2008). Involvement of both type I and type II mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria photosensitization by a meso-substituted cationic porphyrin. *Sol. Energy*, 82: 1107-1117.
- [127] Donnelly, RF, McCarron, PA, Tunney, MM. (2008). Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol. Research.*, 163: 1–12.
- [128] Quiroga, ED, Alvarez, MG, Durantini, EN. (2010). Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic action of 5,10,15,20-tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrin in diferent media. *FEMS Immunol. Med.Microbiol.*, 60:123–131
- [129] Spesia MB, Caminos DA, Pons P, Durantini EN. (2009). Mechanistic insight of the photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by a tetracationic zinc(II) phthalocyanine derivative. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 6: 52-61.
- [130] Raddatz, N, Castillo, JP, Gonzalez, C, Alvarez, O, Latorre R. (2014). Temperature and voltaje coupling to channel opening in transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) *J. Biol. Chem.*, 289: 35438-35454.
- [131] Boiron, P, Drouhet, E, Dupont, B, Improvisi, L. (1987). Entry of ketoconazole into *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31: 244-248.
- [132] Viejo-Diaz, M., Andres, MT., Fierro, JF.. (2004). Modulation of *in vitro* fungicidal activity of human lactoferrin against *Candida albicans* by

extracellular cation concentration and target cell metabolic activity.

Antimicrob. Agents Chemother., 48:1242-1248.

[133] Bliss, JM., Bigelow, CE., Foster, TH, Haidaris, CG. (2004).

Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin.

Antimicrob. Agents Chemother., 48: 2000-2006.

[134] Bueno, D, Casale, C, Pizzolitto, RP, Salvano, MA, Oliver, G. (2007).

Physical Adsorption of Aflatoxin B1 by Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A Theoretical Model. *J. Food Prot.*, 70: 2148–2154.

[135] Orenstein, A, Klein, D, Kopolovic, J, Winkler, E, Malik, Z, Keller, N,

Nitzan, Y. (1998). The use of porphyrins for eradication of *Staphylococcus aureus* in burn wound infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 19: 307-314.

[136] Wood, S, Nattress, B, Kirkham, J, Shore, R, Brookes, S, Griffiths, J,

Robinson, C. (1999). 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.*, 50: 1-7.

[137] Kreitner, M, Wagner, KH, Alth, G, Ebermann, R, Foiszy, H.; Elmadfa, I.

(2001). Haematoporphyrin- and sodium chlorophyllin-induced phototoxicity towards bacteria and yeasts-a new approach for safe foods. *Food Control.*, 12: 529-533.

[138] Kato, IT, Prates, RA, Sabino, CP, Burgwyn Fuchs, B, Tegos, GP,

Mylonakis, E, Hamblin, MR. Simões Ribeiro, M. (2013). Antimicrobial

Photodynamic Inactivation Inhibits *Candida albicans* Virulence Factors and Reduces In Vivo Pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother*, 57: 445– 451.

[139] Montejano HA, Gervaldo M, Bertolotti SG. (2005). The excited states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. *Dyes Pigm.*, 64:117-124.

[140] Broglia MF, Bertolotti, SG, Previtali, CM. (2007). Proton and electron Transfer in the Excited State Quenching of Phenosafranine by Aliphatic Amines. *Photochem. Photobiol.*, 83:535-541.

[141] Segalla, A, Borsarelli, CD, Braslavsky, SE, Spikes, JD, Roncucci, G, Dei, D, Chiti, G, Jori, G, Redii, E. (2002). Photophysical, photochemical and antibacterial photosensitizing properties of a novel octacationic Zn(II)-phthalocyanine. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1: 641-648.

[142] Nunes, SMT, Sguilla, FS, Tedesco, AC. (2004). Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37: 273-284.

[143] Ragàs, X, Agut, M, Nonell, S. (2010). Singlet oxygen in *Escherichia coli*: New insights for antimicrobial photodynamic therapy. *Free Radical Bio. Med.*, 49: 770-776.

[144] Zebger, JW, Snyder, LK, Andersen, L, Poulsen, Z, Gao, JDC, Lambert, U, Kristiansen, PR, Ogilby, L. (2004). Direct optical detection of singlet oxygen from a single cell, *Photochem. Photobiol.*, 79: 319-322.

[145] Cormick, MP. Desarrollo de agentes sensibilizadores específicos para la inactivación fotodinámica de levaduras (2010) *Tesis doctoral en Ciencias Químicas*. Universidad Nacional de Río Cuarto.

- [146] Wilkinson, F, Helman, WP and Ross, AB. (1995) 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.*, 24:663-1021.
- [147] Ergaieg, K, Chevanne, M, Cillard J and Seux, R. (2008). Involvement of both type I and type II mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria photosensitization by a *meso*-substituted cationic porphyrin. *Sol. Energy.*, 82:1107-1117.
- [148] Quiroga, ED, Cormick, MP, Pons, P, Alvarez, MG, Durantini, EN. (2012). Mechanistic aspects of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* induced by cationic porphyrin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 58: 332-339.

75069