

Manuel Pablo de la Paz Cristóbal

# Terapia fotodinámica in vitro con Hipericina en hongos causantes de micosis cutáneas

Departamento  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es

Pardo Jimeno, Julián  
Gilaberte Calzada, Yolanda  
Rezusta López, Antonio

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

# TERAPIA FOTODINÁMICA IN VITRO CON HIPERICINA EN HONGOS CAUSANTES DE MICOSIS CUTÁNEAS

Autor

Manuel Pablo de la Paz Cristóbal

Director/es

Pardo Jimeno, Julián  
Gilaberte Calzada, Yolanda  
Rezusta López, Antonio

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2013



# **Terapia Fotodinámica *in vitro* con Hipericina** **en hongos causantes de micosis cutáneas**



A Esther Wohlgenannt ☺; por confiar en mi cuando ni si  
quiera yo lo hice...

Vielen Dank meine Süße für Alles. Ich liebe dich.



# **Agradecimientos**

---

A mis padres, Manuel y Maria Jesús por su paciencia, confianza y apoyo en todo momento.

A mi hermano Lulo por la realización de las imágenes tridimensionales de representación de levaduras.

Ruth und Walter Wohlgenannt (Ph.D.), vielen herzlichen Dank für eure Hilfe in Österreich; Ich werde das nie vergessen.

A mis directores, Antonio Rezústa (Ph.D.), Yolanda Gilaberte (Ph.D.) y Julián Pardo (Ph.D.) sin los cuales esta tesis no habría podido tener lugar.

A Carmen Aspiroz (Ph.D.) por permitirme colaborar en artículos de índole clínica.

A Elena Andrés Ciriano, David Royo Díez y Pablo Martínez Vicente por su contribución en los experimentos de TFD *in vitro* con HIP frente a levaduras.

A Patricia López Chichón (Ph.D.) por la realización de los experimentos de TFD *in vitro* con células humanas, el estudio de incorporación (uptake) con HIP y el montaje de las muestras de los experimentos de microscopía de fluorescencia confocal *in vitro* con células humanas. Todos ellos fueron llevados a cabo en el Institut Químic Sarriá (IQS) de Barcelona. Dicha colaboración dio lugar a una publicación.

A Elena Andrés Ciriano y Yamila Centurión por su contribución en los experimentos de EROs.

A María Royo Cañas (Ph.D.) por su supervisión, apoyo y orientación en los experimentos de microscopía de fluorescencia confocal *in vitro* de células, así como su visualización y adquisición de imágenes en la Unidad de Microscopía e Imagen Servicios Científico Técnicos II de Aragón, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa", Servicio de Inmunología.

A Ángeles Juarranz de la Fuente (Ph.D.) y Elena Andrés Ciriano por la realización de los experimentos de microscopía de fluorescencia invertida sobre células humanas *in vivo* así como la visualización y adquisición de imágenes en la Facultad Autónoma de Ciencias de Madrid bajo la tutela del grupo de investigación de la Dra. Doña (Catedrática del Dep. de Biología de la Facultad de Biología de la UMA de Madrid).

A Marta Pérez por el soporte y orientación en los experimentos de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia para la detección de muerte celular bajo la supervisión del Dr. Don Julián Pardo (Ph.D.) en el departamento de Bioquímica de la Universidad de Ciencias de Zaragoza.

A Santi Nonell (Ph.D.) y Montse Agut (Ph.D.) del Institut Químic Sarriá (IQS) de Barcelona por la confianza que demostraron en nosotros a la hora de colaborar en nuestros proyectos.

Al grupo de investigación encabezado por Jaques Meis (Ph.D.) del Hospital Canisius Wilhemina (Nijmegen, The Netherlands) por suministrarnos las cepas de levaduras fluconazol-resistentes con las que los experimentos de esta tesis fueron realizados.

A Justiniano Aporta (Ph.D.) y a departamento de Física aplicada de la Universidad de Ciencias de Zaragoza por el manufacturado de la lámpara empleada en esta tesis doctoral.

# Abreviaturas

---

## Abreviaturas de Fotosensibilizantes

<sup>1</sup>FS\*: fotosensibilizante en estado singlete

<sup>3</sup>FS\*: fotosensibilizante en estado triplete

ALA: ácido Metil Aminolevulínico

C<sub>FS</sub>: concentración del fotosensibilizante

C<sub>HIP</sub>: concentración de hipericina

DMMB: cloruro de 1,9-Dimetil-3,7-Bis (etilamino)-2,8-dimetilfenotiacina-5-io. (Dimethyl Methylene Blue)

FB: photobleaching o fotoblanqueamiento

FS: fotosensibilizante o fotosensibilizador

Hp: hematoporfirina

HIP: hipericina, hypericin

MAL: aminolevulinato de metilo

NMB: cloruro de 3,7-Bis (etilamino)-2,8-dimetilfenotiacina-5-io. (New Methylene Bue).

PpIX: protoporfirina IX

## Abreviaturas de Reactivos

ATCC: American Type Culture Collection

BSA: albúmina de suero bobino

CAT: catalasa

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CTG: CellTracker<sup>®</sup> Green

CMA: medio de cultivo Corn Meal glucosa Agar

DAPI<sup>®</sup>: 4',6-diamidino-2-fenil indol dihidroclorhidro

DiOC<sub>6</sub><sup>®</sup>: 3-Hexyl-2-[3-(3-hexil-2(3*H*)benzoxazolilidin)-1-propenil]benzoxazol ioduro

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: di-Metil Sulfóxido

DO: densidad Óptica

DO<sub>600</sub>: densidad Óptica medida a 600 nm

FBS: suero fetal bovino

Hoechst 33342<sup>®</sup>: (2'-[4-etoxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazol

trihidrocloruro trihidrato)

LTG: LysoTracker® Green

NaN<sub>3</sub>: azida Sódica

MAN: manitol

MEYA: medio de cultivo agar con extracto de malta levadura “Malt extract yeast agar”

MTG: MitoTracker® Green

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio

PBS: tampón salino de fosfato-cloruro

PFA: para-formaldehido

Sb: medios tipo Sabouraud

SB: medio Sabouraud suplementado con cloranphenicol

SBL: medio Sabouraud líquido

SDS: dodecil sulfato de sodio

SSF: suero fisiológico salino estéril

SOD: súper óxido dismutasa

YPGA: medio de cultivo agar levadura peptona glucosa “Yeast Peptone Grow Agar”

### **Abreviaturas en células**

AG: aparato de golgi

HaCaT: queratinocitos (Human adult high Calcium low Temperature keratinocytes)

hNDF: fibroblastos (human Normal Dermal Fibroblasts)

McF: unidades de escala turbidimétrica (Mc Farland)

RE: retículo endoplasmático

spp.: subespecies

UFC: unidades formadoras de colonias

UFC / mL: unidades formadoras de colonias por mililitro

### **Abreviaturas generales**

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> : oxígeno singlete

EROs: especies reactivas de oxígeno

FD: fotodiagnosia

FIA: fiotoinactivación antimicrobiana

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

J.cm<sup>-2</sup>: joules (julios) por cada cm<sup>2</sup>

LED: diodo emisor de luz (Light Emitting Diode)

mW.cm<sup>-2</sup>: milivatios por cada cm<sup>2</sup>

O<sub>2</sub>: oxígeno molecular ó <sup>3</sup>O<sub>2</sub>

O<sub>2</sub><sup>·-</sup>: radical superóxido

OH<sup>·</sup>: radical hidroxilo

TFD: terapia fotodinámica

TFA: terapia fotodinámica antimicrobiana

UV: ultravioleta

λ: longitud de onda

λ<sub>abs</sub>: longitud de onda de absorción

λ<sub>em</sub>: longitud de onda de emisión

λ<sub>max</sub>: longitud de onda máxima



<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
1) Los Hongos.....	1
a. Descripción .....	1
b. Reproducción.....	3
2) Especies de levaduras empleadas en la tesis doctoral.....	4
a. <i>Saccharomyces</i> spp.....	4
b. <i>Candida</i> spp.....	5
3) Patologías asociadas al género <i>Candida</i> .....	9
4) Especies de hongos dermatofitos empleados en la tesis doctoral .....	11
a. <i>Trichophyton</i> spp .....	11
i. <i>T. mentagrophytes</i> .....	13
ii. <i>T. rubrum</i> .....	14
5) Patologías más frecuentes provocadas por el género <i>Trichophyton</i> .....	15
6) Tratamientos actuales contra las micosis cutáneas.....	16
a. Introducción.....	16
b. Antifúngicos convencionales para las micosis cutáneas .....	17
c. Ventajas e inconvenientes de los tratamientos frente a micosis cutáneas.....	19
7) Terapia fotodinámica (TFD) .....	21
a. Introducción.....	21
b. Historia de la TFD.....	21
c. Componentes de la TFD.....	24
i. Oxígeno molecular.....	24
ii. La luz; fuentes de luz.....	24
iii. El Fotosensibilizante (FS) .....	26
Estructura química.....	26
Transporte de un FS en sistemas biológicos.....	26
Localización de un FS.....	27
Degradación de un FS.....	28
El fotosensibilizante en clínica.....	29
Clasificación de FSs.....	30
-Tricíclicos.....	30
-Policíclicos.....	32
d. Fundamentos de la reacción fotodinámica.....	37
i. Fundamento fotofísico y fotoquímico.....	37
ii. Fundamento Bioquímico .....	38
iii. Vías de generación de EROs .....	38
iv. Las EROs en un Biosistema.....	40
v. Muerte celular / Dianas celulares.....	41
8) Terapia fotodinámica antimicrobiana (TFA) .....	47
a. Introducción.....	47
b. Aplicaciones actuales .....	48
i. aplicaciones no clínicas (FIA) .....	48
ii. Aplicaciones clínicas (TFA) .....	49
c. Ventajas de la TFA .....	50
d. Limitaciones de la TFA .....	51
e. Perspectivas presentes y futuras de la TFA .....	51
9) La Hipericina (HIP) .....	53
a. El Hipérico .....	53
b. Propiedades físico-químicas de la HIP .....	54
c. La HIP como FS.....	56
d. La HIP y el cáncer.....	58
e. La HIP como agente antiviral.....	58

f. La HIP como agente antibacteriano y antifúngico .....	59
g. Localización, uptake y mecanismos de la HIP para producir muerte celular.....	60
i. Uptake y Localización .....	61
ii. Vías de muerte celular provocadas por la HIP .....	61
10) Referencias .....	65
11) Objetivos del estudio .....	83
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>86</b>
<b>Materiales.....</b>	<b>86</b>
1) Reactivos utilizados.....	86
a. Reactivos comunes.....	86
b. Inhibidores de las EROs.....	86
c. Sondas Fluorescentes.....	87
d. Medios de cultivo.....	88
2) Disoluciones del Fotosensibilisante .....	88
3) Microorganismos y células.....	89
a. Especies aisladas de pacientes.....	89
b. Especies de colección.....	89
4) Instrumentación.....	90
a. Fuentes de luz.....	90
b. Medidas turbidimétricas.....	90
c. Microscopía y toma de imágenes.....	91
d. Estudios por citometría de flujo.....	91
<b>Métodos.....</b>	<b>92</b>
1) Cultivos y condiciones de crecimiento.....	92
a. Cultivo de levaduras.....	92
b. Cultivo de dermatofitos.....	93
c. Cultivo de células humanas (HaCaT y hNDF) .....	93
2) Preparación de suspensiones celulares.....	93
a. Preparación de los inóculos de levaduras y dermatofitos.....	93
3) Incorporación (uptake) de HIP en células.....	95
a. Especies Empleadas en el estudio.....	95
b. Uptake en levaduras.....	95
c. Uptake en células animales.....	96
4) Fotoinactivación por TFD <i>in vitro</i> con HIP sobre hongos .....	97
a. Especies empleadas en el estudio.....	97
b. Preparación de las muestras.....	98
c. Tratamiento fotodinámico.....	99
d. Siembra de los inóculos irradiados.....	99
e. Controles empleados.....	99
5) Participación de las EROs en la fotoinactivación con HIP en levaduras / detección de muerte celular .....	103
a. detección de EROs mediante el uso de inhibidores .....	103
i. Especies empleadas en el estudio.....	103
ii. Estudio previo de fototoxicidad de la HIP a pH fisiológico.....	103
iii. Preparación de las muestras.....	104
iv. Tratamiento fotodinámico.....	104
v. Siembra de las muestras.....	105
vi. Controles empleados.....	105
b. Estudio de la formación de EROs y marcadores de muerte celular mediante citometría de flujo.....	107
i. Especies empleadas en el estudio.....	107

ii. Consideraciones previas.....	107
iii. Preparación de las muestras.....	107
iv. Tratamiento fotodinámico.....	107
v. Análisis por citometría de flujo.....	108
vi. Controles empleados.....	108
vii. Estudio adicional de condensación de cromatina.....	109
7) TFD <i>in vitro</i> con HIP sobre células humanas .....	110
a. Especies empleadas en el estudio.....	110
b. Preparación de las muestras.....	110
c. Tratamiento fotodinámico.....	110
d. Tratamiento posterior e incubación de las muestras.....	110
e. Controles empleados.....	111
8) Localización de HIP en células por microscopia de fluorescencia .....	112
a. Localización <i>in vitro</i> de HIP en levaduras y dermatofitos.....	112
b. Localización de HIP en queratinocitos y fibroblastos humanos <i>in vitro</i> .....	114
c. Localización de HIP en queratinocitos y fibroblastos humanos <i>in vivo</i> .....	115
9) Referencias.....	118

<b>Resultados.....</b>	<b>119</b>
1) Uptake (incorporación) de HIP en levaduras y celulas humanas .....	119
a. Incorporación en queratinocitos dérmicos humanos HaCaT.....	119
b. Incorporación en fibroblastos dérmicos humanos hNDF.....	119
c. Incorporación en celulas de levadura.....	120
2) Fotoinactivación <i>in vitro</i> de levaduras con HIP / patrones de EROs en la TFD .....	125
a. Fotoinactivación <i>in vitro</i> de levaduras con HIP.....	125
i. Fotoinactivación según el tiempo de incubación con la HIP.....	125
ii. Fotoinactivación según la especie de <i>Candida</i> .....	125
iii. Fotoinactivación según la Fluencia.....	126
iv. Fotoinactivación según la concentración inicial del inóculo.....	127
v. Fotoinactivación según el N° Log que quieran disminuirse.....	127
vi. Fotoinactivación según el pH del medio.....	128
vii. Fotoinactivación según la resistencia a azoles.....	128
viii. Resultados de los Controles.....	129
b. Participación de las EROs en la fotoinactivación <i>in vitro</i> con HIP en levaduras .....	147
i. Estudio de EROs empleando inhibidores .....	147
c. Estudio de EROs y marcadores de muerte celular por citometría de Flujo .....	153
i. Morfología y complejidad celular.....	153
ii. Relación superóxido (O <sub>2</sub> ) en la TFD .....	153
iii. Presencia de marcadores de muerte celular en la TFD con HIP .....	153
iv. Condensación de la cromatina.....	154
3) Fotoinactivación <i>in vitro</i> de dermatofitos con HIP.....	159
a. Fotoinactivación según la especie de <i>Trichophyton</i> .....	159
b. Fotoinactivación según el tiempo de incubación con la HIP .....	159
c. Resultados de los Controles.....	159
i. Toxicidad de la luz.....	159
ii. Toxicidad del Fotosensibilizante.....	160
4) Efecto de la TFD con HIP <i>in vitro</i> en células cutáneas.....	165
a. Viabilidad celular en las condiciones de reducción de 3 Log.....	165
b. Viabilidad celular en las condiciones de reducción de más de 3 Log.....	165
c. Resultados de los Controles.....	166
i. Toxicidad de la luz.....	166
ii. Toxicidad del Fotosensibilizante.....	166

5) Localización de HIP en células por microscopía de fluorescencia.....	168
a. Localización de HIP en levaduras.....	168
i. Localización intercelular.....	168
ii. Localización nuclear.....	169
iii. Localización frente al tiempo de incubación (time course).....	169
iv. Resultado de los controles.....	169
b. Localización de HIP en dermatofitos.....	170
i. Localización intercelular.....	170
ii. Localización nuclear.....	170
iii. Resultado de los controles.....	170
c. Localización de HIP en queratinocitos dérmicos (HaCaT) .....	171
i. Localización intercelular.....	171
ii. Localización nuclear.....	171
iii. Localización frente al tiempo de incubación (time course).....	171
iv. Resultado de los controles.....	172
d. Localización de HIP en fibroblastos dérmicos (hNDF).....	172
i. Localización intercelular.....	172
ii. Localización nuclear.....	172
iii. Localización frente al tiempo de incubación (time course).....	172
iv. Resultado de los controles.....	173
<b>Discusión .....</b>	<b>196</b>
1) Uptake (incorporación) de HIP en células.....	196
a. Incorporación en queratinocitos dérmicos humanos HaCaT .....	196
b. Incorporación en levaduras.....	197
2) Fotoinactivación in vitro de células con HIP .....	197
i. Fotoinactivación según el tiempo de incubación con la HIP .....	199
ii. Fotoinactivación según la especie ( <i>Candida</i> o <i>Trichophyton</i> ) .....	200
iii. Fotoinactivación según la concentración inicial del inóculo.....	201
iv. Fotoinactivación según la Fluencia / FS .....	202
v. Fotoinactivación según el pH del medio y la presencia de sales.....	203
vi. Fotoinactivación según la resistencia a azoles .....	206
vii. Resultados de los Controles.....	207
Toxicidad de la luz.....	207
Toxicidad del Fotosensibilizante.....	208
Toxicidad / inhibición del disolvente de la HIP.....	208
viii. Influencia del tipo celular en la sensibilidad a la TFD con HIP.....	209
3) Patrones de EROs / marcadores de muerte celular en TFD con levaduras.....	211
4) Localización de HIP en hongos por microscopía de fluorescencia.....	215
a. Localización intracelular.....	215
b. Localización mitocondrial.....	216
c. Evolución de la localización con el tiempo de contacto en levaduras .....	217
d. Otras localizaciones .....	217
i. Vacuolas.....	217
ii. Orgánulos perinucleares .....	218
5) Localización de HIP en células humanas dérmicas por microscopía de fluorescencia .....	219
6) Conclusiones .....	220
7) Referencias .....	221

# **Introducción**

## **Los hongos**

---

### **a. Descripción**

Los hongos son organismos eucariotas que, a diferencia de las bacterias, poseen una pared celular con quitina lo que les confiere rigidez. Poseen una envoltura de glicoproteínas y una estructura intermedia de beta-glucanos. La membrana plasmática consiste en una bicapa lipídica que, a diferencia de las bacterias contiene esteroides (Figura 1). Como células eucariotas, los hongos poseen núcleo verdadero con membrana y su división celular es por mitosis o meiosis [1].

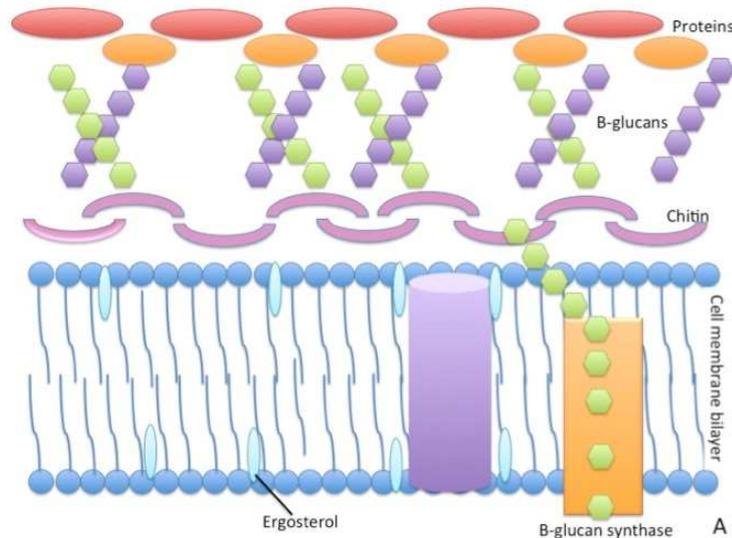


Figura 1: Estructura básica de la envuelta celular de los hongos consistente en una pared celular de  $\beta$ -glucanos, quitina y proteínas, y una membrana plasmática bilipídica con ergosterol donde se incluye la  $\beta$ -glucano-sintasa.

Su estructura puede ser uni o pluricelular [2]:

### **i.Pluricelular**

Las estructuras básicas son cadenas de células filamentosas nucleadas; esta estructura se denomina hifa. La combinación de múltiples hifas se denomina micelio o talo [2]. Las hifas se muestran como células separadas entre ellas por una pared denominada septo [1].

### **ii. Unicelular**

Las estructuras básicas son células independientes que se dividen por gemación. Dicha estructura de reproducción se denomina blastoconidia o blastospora. Los hongos no productores de hifas se denominan levaduras [3] (Figura 2). Este tipo de células no pueden dar lugar a estructuras tipo hifa, pero, bajo determinadas condiciones, son capaces de formar estructuras similares a ellas denominadas pseudohifas. Estas estructuras se distinguen de las hifas verdaderas por presentar constricción en las zonas de unión de las células y a no presentar un septo verdadero de separación entre células. Un conjunto de pseudohifas se denomina pseudo micelio [2].

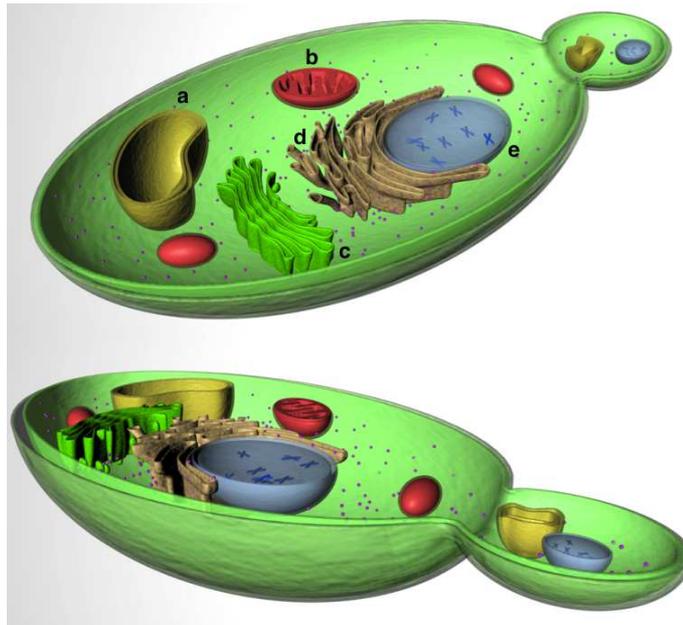


Figura 2: Representación tridimensional de una blastoconidia tipo de levadura con su gema característica. Se pueden observar los orgánulos subcelulares principales: a. Vacuola; b. Mitocondria; c. Aparato de Golgi; d. Retículo endoplásmico; e. núcleo.

### **b. Reproducción**

En el reino fungi existe tanto la reproducción asexual como la sexual. Las clases de reproducción asexual más importantes son la gemación (*budding*), producida por las levaduras y la reproducción por esporas (mitosis) asexuales denominadas conidios o conidios [2, 3].

La recopilación de ensayos recogidos en esta tesis doctoral se encuentra enfocada a dos grupos bien diferenciados de hongos causantes de patologías cutáneas: los dermatofitos y las levaduras.

## **Especies de levadura empleadas en la tesis doctoral**

Las levaduras empleadas en esta tesis doctoral pertenecen a los *Ascomycetes*. Taxonómicamente, dentro de esta familia, las levaduras empleadas pertenecen a los hongos *Saccharomycetales* y son hongos que crecen generalmente por gemación en forma de blastoconidias, que pueden ser globosas, ovoides, cilíndricas o alargadas. En algunos casos, forman pseudohifas y pseudo micelio. Las levaduras, cuando crecen sobre medios sólidos, forman colonias de colores cremosos y aspecto mantecoso [2].

Dentro de este grupo, han sido empleadas especies de los géneros *Saccharomyces* y *Candida*.

### **a. *Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* es la especie más común de este género y es la más empleada como modelo para estudios diversos. Macroscópicamente, en MEYA (agar con extracto de malta levadura) forma colonias húmedas color crema [2]. Microscópicamente destaca por tener blastoconidias de 3,0-10,0 x 4,5-21,0  $\mu\text{m}$  predominantemente globosas y ovoides con presencia de gemación multilateral rodeando a la célula madre [4]. Las gemas son con forma elipsoidal. Presenta blastoconidias con pseudohifas en medio Corn Meal Agar (CMA) con Tween 80. En determinadas condiciones es capaz de formar esporas sexuales (ascosporas) [5].

Patogenicidad: *S. cerevisiae*, comúnmente conocida como la levadura del panadero, es un componente habitual de la flora del tracto intestinal y de la piel. Se han descrito algunos casos de fungemia, endocarditis y peritonitis en pacientes bajo diálisis peritoneal. También se han encontrado infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos (cancerosos sometidos a quimioterapia y pacientes con SIDA) [5].

## **b. Candida spp.**

El género *Candida* comprende a un número muy amplio de especies diferentes; debido a ello, su estructura básica de blastoconidia es muy variable. La mayor parte pueden presentar estructura de pseudo micelio (Figura 3) y algunas de ellas son diploides, como es el caso de *C. albicans* [2].

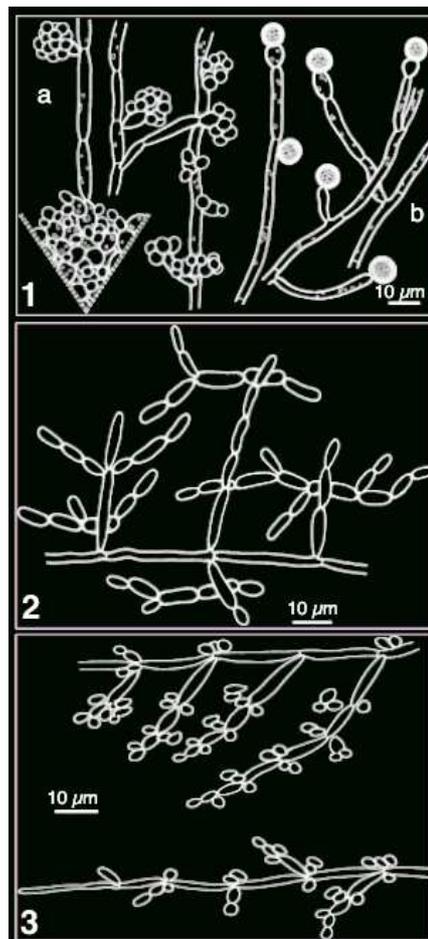


Figura 3: Representación de las estructuras microscópicas de diferentes cepas del género *Candida*: 1. *C. albicans*: a. pseudomicelio b. clamidiosporas; 2. *C. rugosa*: Fragmento de pseudomicelio con cadenas de blastoconidias; 3. *C. parapsilosis*: pseudomicelio. Modificado de [5].

La identificación macroscópica de las diferentes especies puede ser realizada mediante el uso de medios cromogénicos como CHROMagar® donde son identificables por su diferente coloración [6] (Figuras 4A, 5A y 6A). La mayoría de las especies pertenecientes al género *Candida* crecen bien en condiciones aeróbicas entre 25 y 30 °C y, al tratarse de organismos asociados a animales de sangre caliente, muchas de ellas además también crecen óptimamente hasta 37 °C, como es el caso de *C. albicans* [7].

En los experimentos se han utilizado diversas levaduras del género *Candida* de importancia clínica.

### **i. *C. albicans***

Macroscópicamente, en medio YPGA (agar peptona glucosa) forman colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas, pastosas y blandas (Figura 4B).

Microscópicamente es una levadura dimórfica que forma largas pseudohifas pero también crece en forma de blastoconidias sub-esféricas de un tamaño promedio de 3-8 x 2-7  $\mu\text{m}$ . [2] (Figura 4C).

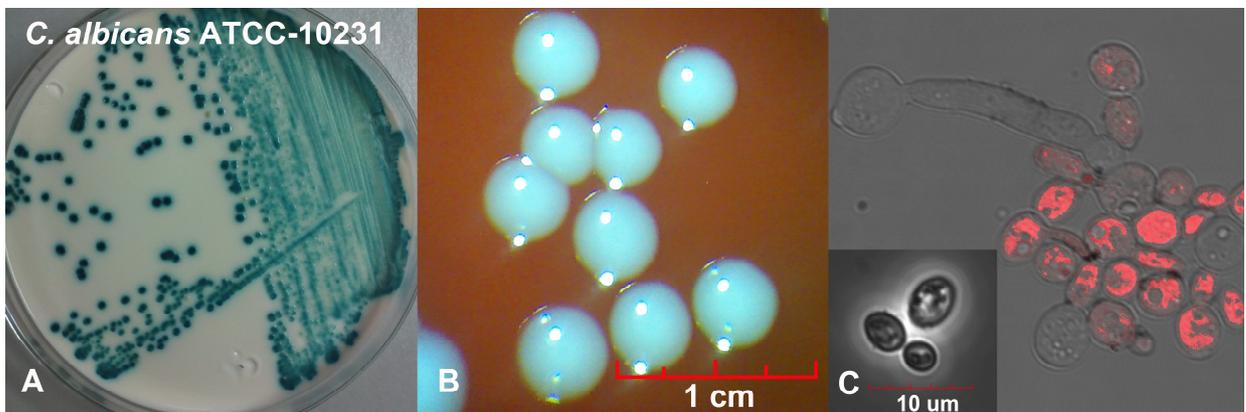


Figura 4: *C. albicans*: A. en medio cromogénico 24h de incubación a 35°C; B. detalle de la morfología de colonias (en medio agar-sangre 48h de incubación a 35°C); C. inóculo en suspensión acuosa preparado con blastoconidias y pseudohifas incubadas 24h a 35°C en SB; vista al microscopio óptico marcadas con hipericina.

Patogenicidad: en el hombre, se encuentra en el tracto digestivo, el respiratorio y en la mucosa genital (vagina) comportándose generalmente como microbiota aunque puede transformarse en saprobio colonizando al huésped. Las infecciones más frecuentes que provoca se localizan en las mucosas, piel y uñas [8]. Tales infecciones, denominadas candidiasis superficiales, son frecuentes en niños, ancianos, embarazadas, diabéticos y en portadores de prótesis dentales [9]. En personas inmunodeprimidas como consecuencia de un tratamiento quimioterápico o en portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) se observa un aumento de las candidiasis muco-cutáneas pudiendo comprometer la vida del paciente por su ausencia de un sistema inmunológico completo [2].

### **ii. *C. krusei***

Macroscópicamente (en YPGA) forma colonias color blanco-crema, no brillantes de aspecto butiroso (Figura 5B). Microscópicamente forma blastoconidias predominantemente pequeñas elongadas con gemaciones ovoides (Figura 5C). Su tamaño oscila entre 4-5 x 2-5  $\mu\text{m}$ . Puede presentar pseudomicelio [2].

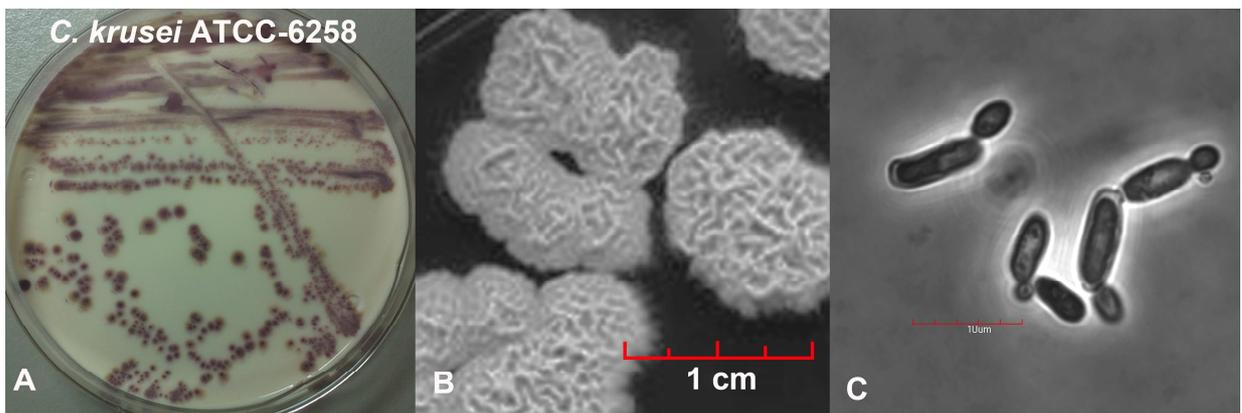


Figura 5: *C. krusei*: A. en medio cromogénico 24h de incubación a 35°C; B. detalle de la morfología butirosa de las colonias (en medio SB 48h de incubación a 35°C); C. inóculo en suspensión acuosa con blastoconidias incubadas 24h a 35°C en SB; vista al microscopio óptico.

Patogenicidad: puede provocar ocasionalmente candidiasis sistémicas en pacientes con defectos en el sistema inmune innato, en pacientes transplantados, con leucemia y rara vez en pacientes con SIDA. También se han encontrado infecciones rectales y en infecciones asociadas a contaminación de catéteres [2].

### **iii. *C. parapsilosis***

Características macroscópicas: en YPGA forma colonias color crema-amarillentas que suelen ser lisas, regulares, brillantes, redondas y húmedas, aunque pueden también ser de aspecto rugoso [2] (Figura 6B). Características microscópicas: blastoconidias predominantemente pequeñas; formas globosas semi-alargadas con gemas ovoides (Figura 6C). El tamaño oscila 2,0-3,5 x 3,0-4,5  $\mu\text{m}$ , pudiendo presentarse algunas formas elongadas. Cultivadas en medio CMA con Tween 80 crecen pseudohifas multirramificadas con forma de árbol formando patrones de racimos de 2-3 blastoconidias en determinados intervalos a lo largo de las pseudohifas [10].

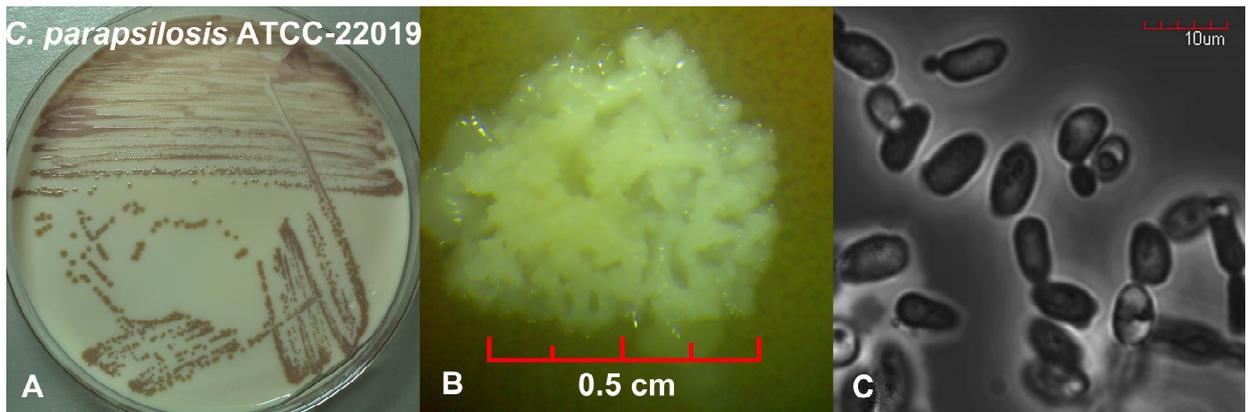


FIGURA 6: *C. parapsilosis*: A. en medio cromogénico 24h de incubación a 35°C; B. detalle de la morfología de las colonias (en medio SB 48h de incubación a 35°C); C. inóculo en suspensión acuosa con blastoconidias incubadas 24h a 35°C en SB; vista al microscopio óptico.

Patogenicidad: está involucrada ocasionalmente como oportunista en infecciones cutáneas y en enfermedades sistémicas; en el último caso se asocia a pacientes con defectos en el sistema inmune como en postoperatorios, pacientes con cancer, leucemia y en niños [2].

#### **iv. *C. rugosa***

Características macroscópicas: en YPGA aparecen colonias de color blanco-crema de aspecto butiroso [2]. Características microscópicas: blastoconidias ovoides, elipsoidales y cilíndricas de tamaño 2,4-6,4 x 3,2-8,0 μm. Observación de pseudohifas en CMA (7 días 25 °C) [10].

Patogenicidad: se asocia a algunas infecciones oportunistas; también se han reportado fungemias asociadas a catéteres contaminados y en colonizaciones en pacientes con quemaduras [2].

## **Patologías más frecuentes provocadas por el género**

### **Candida**

Fundamentalmente se destacan tres tipos principales que dependen de la localización de la colonización:

#### **a. Candidiasis cutáneas**

Afectan las uñas y piel en sus capas más externas. Encontramos la zona más frecuentemente de colonización en los pliegues cutáneos. Este hecho es debido a que las condiciones de temperatura y humedad son óptimas para su supervivencia [11] (Tabla 1).

#### **b. Candidiasis en las mucosas**

Afectan a mucosas tanto de la zona superior del tracto intestinal como en la zona perteneciente inferior. También se presentan en la vagina [11] (Tabla 1).

#### **c. Candidiasis sistémicas**

Producidas mayoritariamente por *C. albicans*, son las micosis sistémicas más frecuentemente observadas en nuestro medio [5]. se considera como candidiasis sistémica cuando son invadidos órganos profundos o la sangre. Resulta más típicamente un proceso endógeno de la propia flora candidiásica localizada en las mucosas por traumatismos gastrointestinales aunque la causa puede ser también la contaminación de sondas o catéteres [12].

[11]	PATOLOGÍA	ZONA AFECTADA
Candidiasis cutáneas	Intértrigo de grandes pliegues	Axilas, ingle, surco interglúteo, pliegue submamario, pliegue suprapúbico
	Erosión interdigital	Espacios interdigitales de manos y pies
	Candidiasis del área del pañal	Pliegues inguinales, suprapúbico e interglúteo
	Foliculitis	Folículo piloso en pacientes con SIDA
	Onicomycosis con paroniquia y perionixis	Infección ungueal e inflamación periungueal
Candidiasis en las mucosas	Orales	Lengua, cara interna de mejillas y paladar blando
	Esofágicas	Esófago en pacientes con procesos malignos hematológicos y de VIH
	Mucosa gastrointestinal	Mucosa gástrica y mucosa intestinal
	Vulvovaginitis candidiásica	Mucosa vulvo-vaginal

TABLA 1: Candidiasis superficiales más frecuentes. Modificado de [11].

## **Especies de hongos dermatofitos empleadas en la tesis doctoral**

Los dermatofitos constituyen un grupo heterogéneo de hongos con capacidad de reproducción sexual y asexual. Tienen la capacidad de invadir los tejidos queratinizados (piel, pelo y uñas) del ser humano y los animales causando las infecciones conocidas como dermatofitosis [13].

Los dermatofitos pueden ser clasificados en tres géneros anamórficos (asexuales o imperfectos): *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*. En cuanto al agente causal considerado globalmente el más frecuente en seres humanos en esta familia es el *T. rubrum* [14].

### **a. *Trichophyton* spp.**

Características macroscópicas: su aspecto abarca una gran variabilidad entre especies, que comprende generalmente la observación de colonias algodonosas, aterciopeladas, pulverulentas o blanquecinas con pigmentos en la zona del envés del cultivo. Sin embargo, este punto depende fuertemente del medio de cultivo en el que trabajemos y de la especie [14]. Características microscópicas: presencia de macroconidias lisas, paredes delgadas o gruesas, y con entre uno y doce septos. Pueden encontrarse organizadas solas o en racimos y pueden ser elongadas, claviformes, fusiformes o cilíndricas. Su tamaño oscila desde 8-86 x 4-14  $\mu\text{m}$  (Figura 7). Las microconidias, que suelen ser más abundantes que las macro, se presentan como estructuras globosas, claviformes o piriformes y entre pediculadas o sésiles [13].

Dentro de las especies antropofílicas (asociada generalmente al hombre y rara vez infecta a animales) pertenecientes a este género, existe dificultad a la hora de identificar y clasificarlas correctamente. Esto es debido a dos factores [15]:

- las técnicas moleculares han demostrado que, dermatofitos de éste

género, considerados como verdaderas especies por ser clasificados atendiendo a su morfología y tipo de infección, realmente no lo son.

- diferentes criterios empleados por diferentes autores donde se engloban características epidemiológicas, morfologías y sintomatología.

La taxonomía del género *Trichophyton* ha variado mucho en los últimos años atendiendo al huésped al que colonizan. Si bien existen especies muy bien establecidas como colonizadoras zoofilicas (usualmente se asocia a animales pero ocasionalmente infecta al ser humano) como *T. equinum* o antropofilicas como *T. tonsurans*, se encuentran otras como *T. interdigitale*, la cual es capaz de invadir ambos nichos biológicos [16].

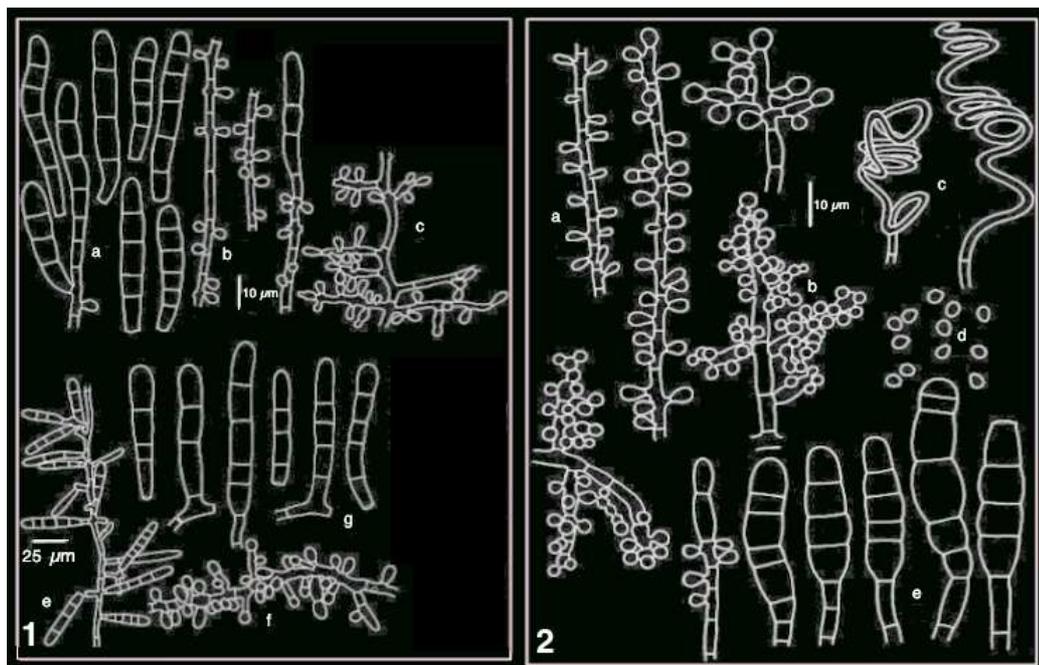


FIGURA 7: Representación de las estructuras microscópicas de hongos dermatofitos del género *Trichophyton*: 1. *T. rubrum*: a,e. sistema de ramificaciones con macroconidias; b, c, f. sistema de ramificaciones con microconidias; g. macroconidia. 2. *T. mentagrophytes*: a. ramificaciones con microconidias jóvenes; b. ramificaciones con microconidias maduras; c. hifas en forma de espiral; d. microconidias; e. macroconidias. Modificado de [5].

**i. *T. mentagrophytes***

Actualmente conocida como *T. interdigitale*, resulta fenotípicamente indistinguible con las antiguas variedades *T. mentagrophytes* variedad *granulosum* y *T. mentagrophytes* variedad *mentagrophytes* [15].

Características macroscópicas: en medios Sb las colonias crecen con un núcleo protuberado central, con una superficie fina y granular (Figura 8A). Los bordes de las colonias presentan una superficie con forma de flecos. En el envés del cultivo aparece un brillante pigmento amarillo (Figura 8B). La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 26 y 35 °C [13]. Características microscópicas: Presencia de numerosas microconidias en forma de células independientes, con frecuencia formando densos racimos. Las microconidias son de pared lisa y predominantemente con formas esféricas y/o subesféricas, apareciendo en ocasiones en formas claviformes o piriformes. Presenta macroconidias multiceluladas con forma claviforme de pared fina y lisa (Figura 8C). Son características las hifas en forma espiral [14].

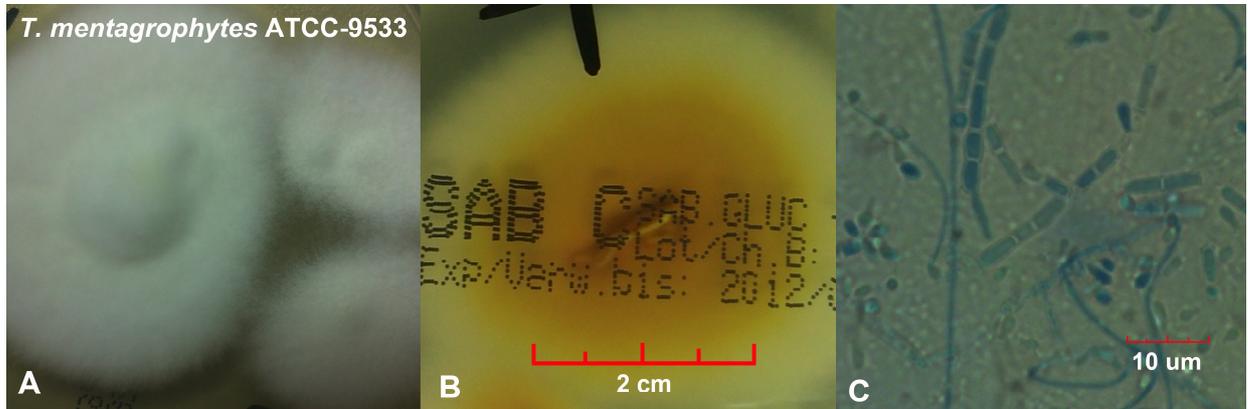


Figura 8: *T. mentagrophytes*. A. cultivo esporulado de 7-12 días en SB a 30°C. Se observan colonias algodonosas; B. detalle del color amarillento del envés del mismo cultivo; C. hifas y conidias teñidas con azul de lactofenol; vista al microscopio óptico.

## **ii. *T. rubrum***

La caracterización taxonómica del complejo *T. rubrum* es dificultosa ya que algunos autores engloban algunas especies dentro de esta familia debido a su sintomatología y otros no debido a sus características epidemiológicas. Tal es el caso de la antigua especie *T. raubitschekii* [15]. En otros casos, el factor taxonómico diferencial es su localización geográfica a pesar de que resultan ser la misma especie molecularmente. Tal es el caso de las especie *T. rubrum* y *T. soudanense*, las cuales son fenotípicamente distinguibles pero genéticamente indistinguibles [15].

Características macroscópicas: Los cultivos de *T. rubrum* en medios tipo Sb muestran leves pliegues radiales cerca de los márgenes de la colonia (Figura 9A). Con el tiempo, los cultivos se cubren completamente de un micelio aéreo largo, mullido y blanco. En medios Sb forma un pigmento púrpura en la zona arraigada al agar [13] (Figura 9B). Características microscópicas: Existen dos tipos de manifestaciones microscópicas [13, 14]:

- Tipo veloso: producción de escaso a moderado número de microconidias; no se observan macroconidias.
- Tipo granular: producción de moderado a abundante número de microconidias; moderada a abundante producción de macroconidias de pared fina y forma de cigarro. Las macroconidias pueden tener o no apéndices terminales (Figura 9B).

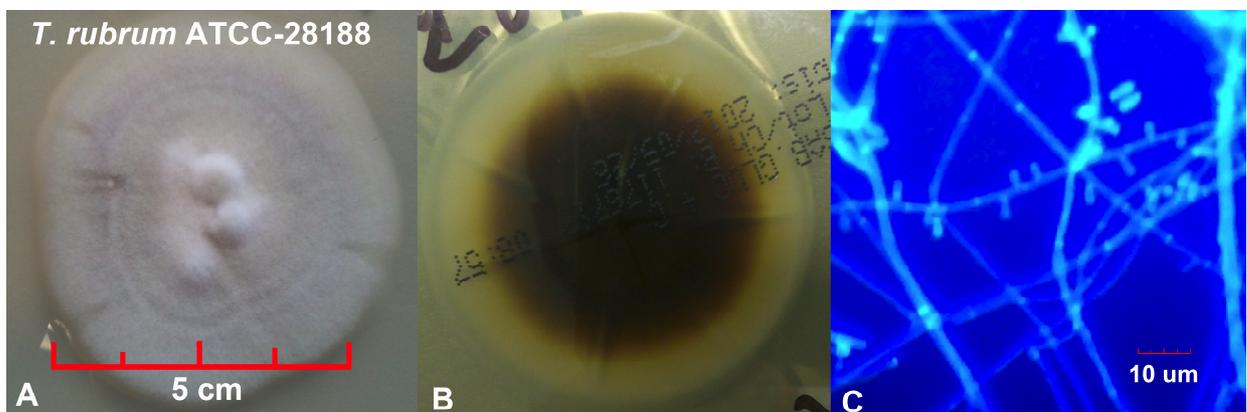


Figura 9: *T. rubrum*: A. cultivo esporulado de 7-12 días en SB a 30°C. Se observan los pliegues radiales; B. detalle del color marrón oscuro del envés del mismo cultivo; C. hifas y conidias teñidas con azul de lactofenol; vista al microscopio óptico.

## **Patologías más frecuentes provocadas por el género**

### **Trichophyton**

Tradicionalmente, las infecciones causadas por dermatofitos del género *Trichophyton* se han denominado atendiendo a su localización anatómica en latín y acompañado por la palabra *Tinea* (Tiña). Aunque no son los únicos agentes causantes de estas patologías, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* (en la actualidad denominado *T. interdigitale*) son las especies más frecuentemente aisladas. La Tabla 2 recoge las formas más frecuentes de tiñas causadas por cada uno de los dos hongos patógenos.

[13,14]	PATOLOGÍA	ZONA AFECTADA
<i>T. interdigitale</i>	<i>Tinea barbae</i>	Barba
	<i>Tinea capitis</i> <i>Tinea corporis</i>	Cabeza Piel lampiña
	<i>Tinea unguium</i> (Onicomycosis dermatofítica)	Uña
	<i>Tinea pedis</i> (pie de atleta)	Pie
<i>T. rubrum</i>	<i>Tinea corporis</i>	Generalizada
	<i>Tinea cruris</i>	Zona inguinal
	<i>Tinea manuum</i>	Mano
	<i>Tinea pedis</i> <i>Tinea unguium</i> (Onicomycosis dermatofítica)	Pie Uña

Tabla 2: Dermatofitosis superficiales más frecuentes provocadas por *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Modificado de [13,14]

# Tratamientos actuales (clásicos) contra las micosis cutáneas

## a. Introducción

Los agentes desarrollados para la erradicación de las infecciones causadas por hongos se denominan antifúngicos o antimicóticos. Estos reactivos se comenzaron a desarrollar en la década de los 50 principalmente para las infecciones superficiales [17].

La evolución histórica de los antifúngicos ha tenido tres momentos remarcables, que son: la aparición de la anfotericina B a mediados de los 50, el auge de los azoles entre los 70 y los 90 y la aparición de la caspofungina y sus derivados a partir del año 2000 (Figura 10) [18]. En la actualidad están siendo investigadas alrededor de 60 nuevas sustancias antifúngicas, como las nuevas formulaciones y nuevos derivados semisintéticos de polienos y anfotericina o nuevos péptidos como las equinocandinas y aerotricinas [19].

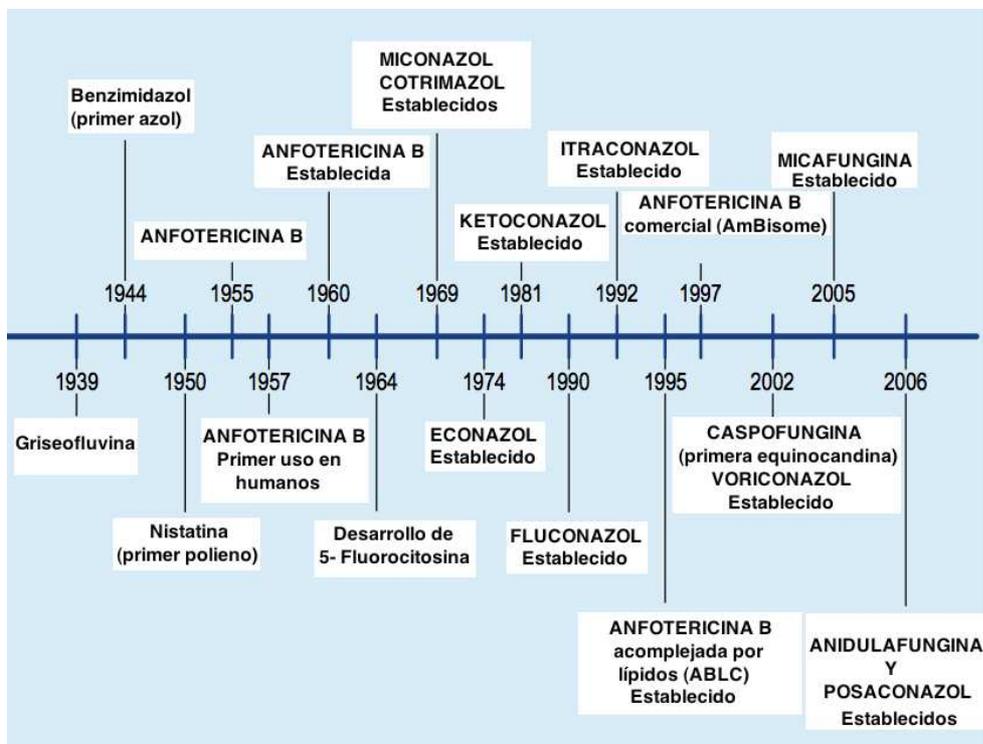


Figura 10: Historia de los antifúngicos. Modificado de [20].

Los antifúngicos se pueden clasificar atendiendo a la diana celular según interfieran la síntesis de la pared celular, la del ergosterol o la de los ácidos nucleicos, o bien si alteran la función de la membrana o la división nuclear (Figura 11):

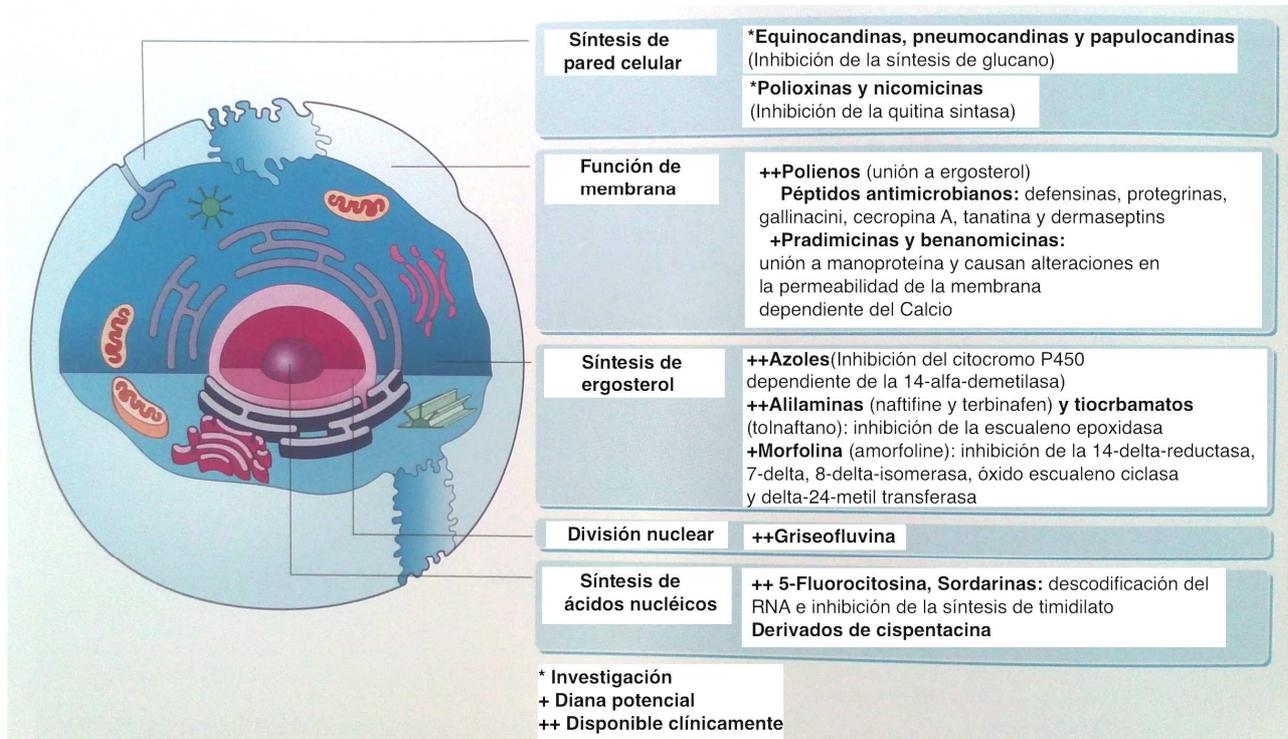


FIGURA 11: Clasificación de los antifúngicos actuales más importantes atendiendo a la diana celular donde actúan. Modificado [21].

## **b. Antifúngicos convencionales para las micosis cutáneas**

En cuanto a las micosis cutáneas, la elección del tratamiento puede ser clasificada atendiendo a cuadro clínico manifestado (Tabla 3) o al microorganismo que provoca la infección:

CUADRO CLÍNICO	TRATAMIENTO 1ª ELECCIÓN	TRATAMIENTO 2ª ELECCIÓN
<b>Onicomycosis</b>	<b>Terapia secuencial: ciclopirox tópico + itraconazol + terbinafina orales</b>	<b>Terapia secuencial: itraconazol + terbinafina orales + ciclopirox tópico</b>
<b>Intértrigo y paroniquias</b>	<b>Terbinafina, ciclopirox, un azol o nistatina tópicos</b>	
<i>Tinea</i>		
<i>Pedis</i>	<b>Terbinafina tópica</b>	<b>Ciclopirox tópico. Itraconazol terbinafina tópico/orales</b>
<i>Cruris</i>	<b>Azol tópico</b>	
<i>Corporis</i>	<b>Azol tópico</b>	
<i>Barbae</i>	<b>Griseoflúvina oral</b>	
<i>Capitis</i>	<b>Griseoflúvina oral</b>	<b>Terbinafina oral</b>
<b>Tinea extensa y de piel glabra de la mano</b>	<b>Terbinafina oral</b>	<b>Itraconazol oral</b>
<b>Tineas inflamatorias</b>	<b>Azol tópico</b>	<b>Terbinafina o ciclopirox tópicos</b>

Tabla 3: Clasificación de los tratamientos antifúngicos actuales para el tratamiento de las micosis cutáneas. Modificada de [19].

Dentro del género *Candida*, la *C. albicans* es la especie más patógena debido a su habilidad para evadir tanto mecanismos de defensa naturales como antibióticos. El tratamiento actual de la candidiasis superficial persistente consiste en la administración de fluconazol [22], mientras que para las candidiasis invasoras es más eficaz el tratamiento con equinocandinas [23]. Las onicomycosis provocadas por *Candida* son tratadas con itraconazol 7 días al mes 3-4 meses. Para el caso del intertrigo y paroniquias provocadas por *Candida* el tratamiento consiste en aplicación tópica, dos veces al día, ciclopirox, un azol o nistatina manteniendo el área seca [24]. En el género de *Trichophyton* el tratamiento difiere dependiendo de la manifestación clínica; así, por ejemplo para el caso de *tinea capitis*, se administra

tratamiento sistémico con griseofluvina de 6-8 semanas y en las formas crónicas de pie y onicomicosis se emplea la terbinafina [24].

### **c. Ventajas e Inconvenientes de los tratamientos frente a micosis cutáneas**

La experiencia que se ha adquirido en el manejo de los agentes antifúngicos mencionados a lo largo del tiempo es considerada la mayor de las ventajas en su uso para tratar las micosis superficiales. El desarrollo de técnicas de identificación macroscópicas, microscópicas y genéticas de los hongos ha permitido desarrollar fármacos que actúan en unas dianas claves en la vitalidad del hongo. Este hecho ha provocado que actualmente se disponga de tratamientos de una elevada especificidad contra uno o un grupo concreto de microbios causantes de determinadas patologías.

En el campo de la terapia antifúngica, la búsqueda de nuevas dianas celulares ha propiciado el desarrollo progresivo de agentes como los azoles, las equinocandinas o los polienos. Con ello, la multiplicidad en los objetivos celulares, dependiente del tipo de antifúngico empleado, ofrece una amplia variedad de tratamientos secuenciales y combinados cuyo objetivo es evitar el desarrollo de resistencias, provocando una mejora con respecto al tratamiento convencional de un solo agente antifúngico [19].

Sin embargo, la alta tasa de mutagenicidad de los microorganismos unida a transferencias de genes de resistencia, fomentan el proceso de expansión de resistencias. Estas transferencias pueden ser de células madre a células hija o de forma horizontal, incluso entre especies diferentes [25]. Además, el hombre está jugando un papel predominante en la producción de especies resistentes a agentes antimicrobianos mediante un uso abusivo e incorrecto de estas sustancias junto con la inapropiada prescripción médica. En los últimos años, la elevada densidad de población así como su gran movilidad y el aumento de vectores no humanos han contribuido a la transferencia de gérmenes entre diferentes nichos ecológicos. Estas premisas, se juntan con el hecho de que la mayoría de los tratamientos antifúngicos

para el tratamiento de las micosis superficiales son largos, tediosos y de difícil cumplimiento, que acaban por ser abandonados por lo que se fomenta adicionalmente la aparición de especies resistentes a ellos [26]. Hablando de los tratamientos orales, hay que remarcar que la mayoría no están exentos de efectos secundarios importantes y/o interacciones que dificultan su uso especialmente en pacientes polimedicados.

La sociedad actual ha de aprender entonces a combatir la amenaza de los microorganismos de maneras alternativas para poder seguir preservando la calidad de vida actual en las zonas desarrolladas y ayudar a mejorarla en las zonas subdesarrolladas. Para ello se presenta una alternativa antimicrobiana basada en las propiedades fototóxicas de algunas sustancias. Esta modalidad terapéutica está bien establecida en clínica antitumoral y se denomina terapia fotodinámica (Photodynamic Therapy, PDT) [27], en español TFD.

## **Terapia fotodinámica (TFD)**

---

### **a. Introducción**

La terapia fotodinámica (TFD) se basa en el uso de sustancias, denominadas fotosensibilizadores o fotosensibilizantes (FSs) que en combinación con luz visible son capaces de producir especies reactivas de oxígeno (EROs) y así destruir tejidos o células diana. Aplicada a la inhibición del crecimiento microbiano en general, la técnica se denomina fotoinactivación antimicrobiana (FIA) (Photodynamic Inactivation, PDI) [28, 29] y en estudios con perspectivas a aplicaciones clínicas se conoce como terapia fotodinámica antimicrobiana (TFA) (Antimicrobial Photodynamic Therapy APDT [30] o Photodynamic Antimicrobial Chemo-Therapy PACT [31]) . El desarrollo de estas terapias ha sido posible gracias al amplio estudio de las propiedades fototóxicas de los FSs. El fundamento de la reacción fotodinámica, tanto fotofísica como fotobioquímicamente, es similar en la TFD, la FIA y la TFA.

### **b. Historia de la TFD**

#### **i. TFD en la antigüedad**

El uso de sustancias químicas fotosensibilizantes o fotosensibilizadoras se ha venido utilizando a lo largo de la historia para el tratamiento de ciertas enfermedades. Se encuentran referencias del antiguo Egipto donde ya se usaban extractos de plantas que contenían agentes que sensibilizaban la piel con la luz del sol como tratamiento para la psoriasis y el vitíligo. Años más tarde se caracterizó a estas sustancias, los psoralenos o furocumarinas [32].

#### **ii. Estudios Fotodinámicos**

Los primeros en estudiar seriamente la TFD fueron, llevados a cabo por Oscar Raab en Munich. Raab [33], en 1900, demostró que el FS naranja de acridina aplicado en conjunto con la luz era capaz de producir daño celular sobre paramecios. Fue entonces el primero en documentar el proceso de fotooxidación biológica intuyendo el poder de un FS en presencia de luz y oxígeno. Por otra parte, en el Instituto Pasteur de Paris Ledoux-Lebards [34] demostraba también

que el oxígeno molecular era un componente necesario para hacer reaccionar a un FS.

En éste ámbito, Von Tappeiner [35], en 1904, basándose en los experimentos de Raab fue el primero que introduce el término “reacción fotodinámica” en una de sus obras (Tappeiner & Jodlbauer 1904) iniciando así la ciencia "fotodinámica" con sus posteriores aplicaciones en medicina. La idea de Tappeiner era que el efecto estaba basado en la fluorescencia, en contraste con Neisser y Halberstaedter [36] o Dreyer [37] que describieron paralelamente que el tipo de sensibilización que se producía para originar la reacción fotodinámica mediada por un FS dependía de la luz blanca.

Los primeros estudios clínicos en pacientes fueron realizados por el propio Tappeiner en colaboración con Jesionek en 1903 [37]. Realizaron pruebas de TFD sobre pacientes con cáncer de piel, lesiones sifilíticas y tuberculosas utilizando la eosina como FS. Este fue el primer paso hacia la terapia fotodinámica enfocada al tratamiento de diferentes enfermedades .

### **iii. La Hp como primer FS aprobado**

En 1908, Hausuman [37], en Viena, ensayó los efectos la Hematoporfirina (Hp), la porfirina de la sangre, sobre paramecios, eritrocitos y ratones. En 1911 publicó que la Hp era inocua en la oscuridad, mientras que si se exponía a la luz del sol provocaba necrosis en la piel de los ratones. En 1912 Friedrich Meyer-Betz [38] en Munich se inyectó a sí mismo una dosis de Hp, observando que se producía una ulceración en la zona de la aplicación, seguida de una reacción fototóxica al exponer la zona a la luz del sol. Finalmente en 1931 en Alemania se aprobó la Hp como fármaco bajo el nombre de “Photodyn” [37].

### **iv. La TFD en el cáncer y los pro-FS**

A partir de la década los 30 la TFD desvía sus esfuerzos al tratamiento contra el cáncer debido a los estudios realizados antes de la segunda guerra mundial por Policard (1924) por una parte y por Auler y Banzer (1942) [37] por otra. En sendos experimentos fue encontrada fluorescencia roja en diferentes cánceres inyectados previamente con Hp; esto fue la constatación de que la Hp se concentra en los

tejidos cancerosos. Constatación que fue también corroborada tras la segunda guerra mundial, en 1948 por Figge et al. [39]. Este último punto abrió un nuevo camino hacia el diagnóstico de diversos cánceres.

En 1955 fue desarrollado por Swartz et al. [40] un derivado de la Hp, la HpD, como una mezcla de 10 derivados de porfirinas (ésteres de dihematoporfirina) útil para la identificación y localización de carcinomas humanos que fue utilizado nueve años más tarde por Lipson et al. [41] en pacientes para la localización y detección de tumores.

Entre 1978 y 1989, los estudios realizados por Dougherty et al. [42,43,44] con porfirinas sentaron las bases del primer FS que sería aprobado por la Food and Drug Administration (FDA, USA) en 1995 para el tratamiento del cáncer esofágico por medio de TFD, una versión purificada de la HpD porfirina llamada Photofrin® [37].

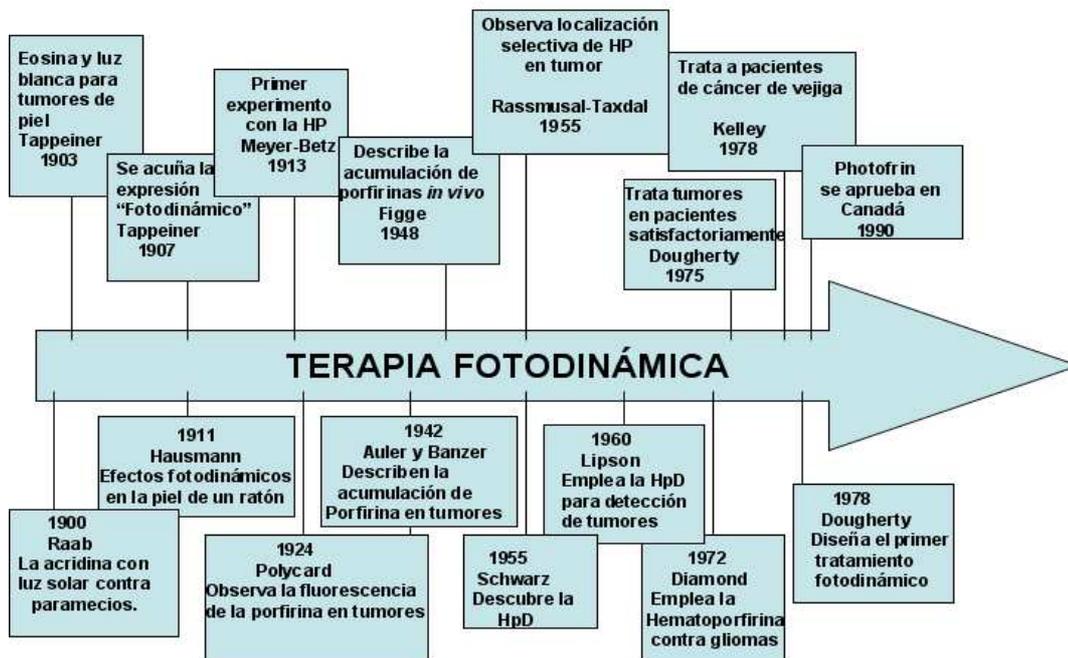


Figura 12: Historia cronológica de la Terapia fotodinámica hasta los años 90. Modificado de [37].

En 1990 Kennedy et al. [45] reportaron el primer caso de TFD con un reactivo pro-porfirínico, el Ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) utilizado como FS tópico. Este

reactivo no era el fotosensibilizante en sí, sino un pro-fármaco bio-precursor de las porfirinas naturales generadas en todos los tejidos. Por lo tanto, era capaz de seguir las reacciones de biosíntesis del verdadero FS, la protoporfirina IX, capaz de activarse con la luz roja y azul. El ALA al 20 % fue aprobado por la FDA y comercializado bajo el nombre “Levulan<sup>®</sup>” en 1999 para las queratosis actínicas no hiperqueratósicas y para el tratamiento de las lesiones precancerígenas y cáncer cutáneo [46]. En el 2001, fue aprobado en Europa el empleo de la TFD con metil éster del ALA, metil aminolevulinato o aminolevulinato de metilo al 16 % ( MAL; Metvix<sup>®</sup> de Galderma ) para el tratamiento de las queratosis actínicas y del carcinoma basocelular nodular y superficial. Posteriormente, fue aprobado su uso en la enfermedad de Bowen [57].

### **c. Componentes de la TFD**

#### **i. El oxígeno molecular (O<sub>2</sub>)**

El oxígeno es un gas diatómico que es la base de la respiración celular en organismos aerobios. Sin embargo, a elevadas concentraciones resulta tóxico *per se* incluso para las especies capaces de tolerarlo [48].

La eficacia de la TFD mediante el uso de FSs localizados en las células diana está directamente relacionada con la capacidad que tenga el FS de formar especies reactivas de oxígeno (EROs), donde se incluye entre ellas el oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Este hecho dependerá de la bio-disponibilidad de oxígeno en el tejido a tratar. Es crucial entonces que el FS pueda encontrarse con el oxígeno para poder aplicar una TFD efectiva [49]. El hecho de que se haya demostrado que las células que sufren patrones de hipoxia, como las tumorales, presenten una alta resistencia a la TFD ha llevado a la conclusión de que el oxígeno es indispensable en este tipo de terapia [50]. Posteriormente se ha demostrado que el uso de cámaras hiperbáricas incrementa los efectos de la TFD en terapia antitumoral en modelos animales [51].

#### **ii. Fuentes de luz en la TFD**

Tres son los tipos de fuentes de luz empleadas para realizar TFD:

### Fuentes de luz “coherentes” o Láser

Fuentes de luz monocromáticas y polarizadas en una sola dirección que poseen ciertas ventajas frente a las luces convencionales como su capacidad de producir luz de alta energía con un rango estrecho de longitud de onda. Esto permite una aplicación en zonas muy concretas y con un tiempo de aplicación mucho menor. Además pueden ser incorporados mucho más fácilmente a sondas [52].

### Fuentes de luz “no-coherentes”

Las que primero se emplearon en estudios clínicos. Dentro de ellas podemos encontrar:

- Lámparas halógenas. Emiten un haz muy grande por lo que no pueden focalizarse en zonas pequeñas. En la actualidad son las que más se utilizan en dermatología [53, 54].
- Diodos “Light Emmiting Diode” (LED). Las lámparas LED son capaces de generar luces de alta energía de longitudes de onda deseadas con un ancho de banda suficientemente estrecho. Mediante su uso se tiene la posibilidad de diseñar formas y tamaños determinados, más pequeños y focalizables. El desarrollo de los LEDs de alta potencia puede ayudar a que se revelen como las más efectivas [55].
- Luz pulsada intensa (IPL): luces sin la capacidad de ser monocromáticas y unidireccionales como los Láseres pero que generan una fuente de luz policromática de alta intensidad, con un espectro de luz entre 515 nm y 1.200 nm.

A pesar de las ventajas que parece presentar la implantación de los láseres respecto a las luces no coherentes en cuanto a su optimización en clínica, algunos estudios han demostrado que el hecho de reducir el tiempo de los tratamientos fotodinámicos utilizando una mayor densidad de energía lumínica, reduce la eficacia debido a una menor oxigenación del tejido. Así, si aplicamos

una fuente de luz con intensidad menor pero durante más tiempo, damos más tiempo al tejido para oxigenarse, con lo que el daño oxidativo es mayor [56].

### **iii. El Fotosensibilizante FS**

Un FS es, normalmente una molécula que presenta homo o heterociclos que poseen aromaticidad por la presencia de sistemas pi ( $\pi$ ) en su estructura. Presentan hibridación  $sp^2$ , lo que confiere al FS una estructura planar o cuasi-planar. Los FSs son fluorocromos eficientes en interaccionar con los fotones de una radiación de longitud de onda determinada para formar un estado de excitación electrónica de alta energía denominado tripletes ( $^3FS^*$ ) el cual es capaz de ceder energía para formas EROs. Este estado altamente energético está mediado por un intermedio de reacción denominado estado singlete ( $^1FS^*$ ) [31]. La transferencia continuada de energía lumínica sobre un FS promueve su degradación hacia otros sustratos mediante un proceso denominado fotoblanqueamiento. Al mismo tiempo, puede ocurrir que las moléculas excitadas  $^3FS^*$  que no han encontrado sustratos a los que transferir su energía regresen a su estado basal por emisión de fosforescencia, o que el estado  $^1FS^*$  regrese al estado basal del FS por emisión de calor o fluorescencia [57, 58, 59].

### **Transporte de un FS en sistemas biológicos**

Un FS puede penetrar en una célula, generalmente, por tres vías principales (Figura 13) [60]:

- Difusión a través de membrana (simple o facilitada) si el FS tiene propiedades de base débil y propiedades lipofílicas; una vez dentro podría ser atrapado en ambientes ácidos como endosomas tardíos o lisosomas.
- Endocitosis no específica o incluso por pinocitosis para FSs altamente hidrofílicos o anfifílicos (afinidad por los compuestos anfipáticos). La penetración más plausible sería por pinocitosis (FSs hidrofílicos) o por endocitosis adsorptiva (FSs anfifílicos).
- Fagocitosis si el FS se encuentra formando homoagregados o agregados portadores de FS (como asociados a moléculas de colesterol de baja

densidad (LDL). El FS debería ser capaz, una vez ha penetrado, de liberarse de la asociación con la macromolécula o partícula y ser él mismo capaz de atravesar membranas celulares.

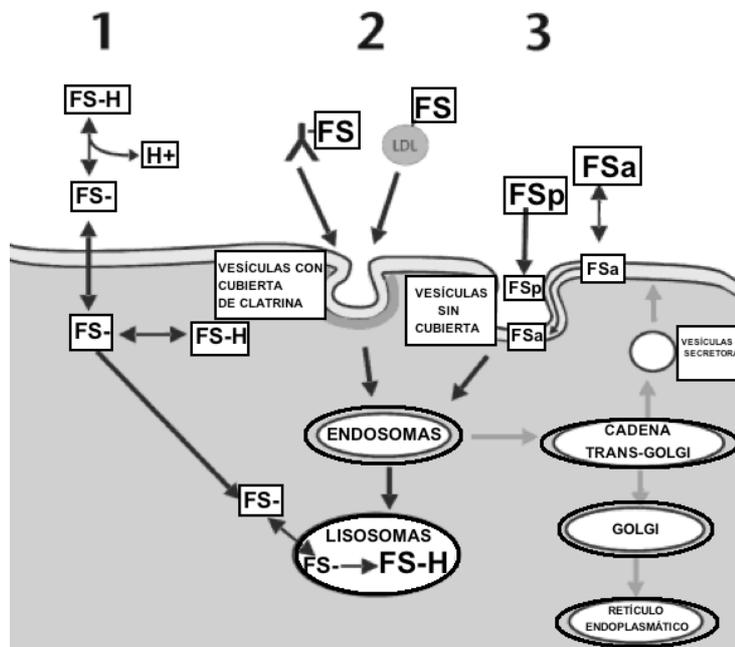


Figura 13: Mecanismos de penetración de un FS en sistemas biológicos descritos como los más probables. 1. Difusión; 2. Fagocitosis; 3. Endocitosis / Pinocitosis. Modificado de [60].

Debido al corto radio de acción de las EROs y a su poca movilidad, la localización de un FS de forma periférica en la superficie celular o dentro de ella es crítica para la eficiencia del proceso de acción fotodinámica y su localización condicionará el tipo de muerte celular provocada [62, 63].

### Localización del FS

La distribución de un FS dentro de la célula depende de la ruta por la cual éste penetre y ésta, a su vez, depende también de sus características físico-químicas, tales como su ratio hidrofobia / lipofilia, su número de cargas y su signo, el número de anillos aromáticos, la presencia de estructuras tetrapirrólicas, su estado de agregación, etc. También puede darse la característica de que el FS se presente localizado en la superficie celular y que no necesite penetrar para provocar el efecto fototóxico [64].

### Degradación del FS o Fotoblanqueamiento

Molecularmente, un FS no deja de ser un fluorocromo, y como se ha explicado anteriormente, sus electrones más externos son capaces de interactuar con los fotones de la luz. Sin embargo, la capacidad de transferir energía por parte de un FS tiene fecha de caducidad que viene dada por su fotoblanqueamiento. Este proceso está promovido por las EROs formadas y por la radiación incidente; ambos hechos provocan la descomposición total o parcial del FS, lo que genera su pérdida de actividad como catalizador de la luz [65]. El fotoblanqueamiento es un paso limitante en la reacción fotodinámica por lo que dependiendo del uso que se le dé al FS interesará un fotoblanqueamiento más lento o más rápido. En el caso de TFD, en este aspecto se necesita un equilibrio, ya que un fotoblanqueamiento muy rápido puede cursar con la no erradicación de las células diana, mientras que uno muy lento puede provocar reacciones de hipersensibilidad a la luz a largo plazo sobre células no diana.

Existen dos tipos de fotoblanqueamiento definidos en compuestos con anillos tetrapirrólicos o derivados y ambos son irreversibles. Estos procesos conllevan un cambio químico en el fluorocromo [66]:

- Fotomodificación

Proceso de autooxidación del FS por las propias EROs que forma. Produce una pérdida de absorbancia o fluorescencia a ciertas longitudes de onda pero no genera una inactivación total. La molécula permanece en un estado transitorio intermedio entre activada y desactivada. Éste hecho suele concurrir con la pérdida de orbitales  $sp^2$  o lo que es lo mismo, con la reducción de algunos de los dobles enlaces de la molécula.

- Fotoblanqueamiento verdadero

Degradación química más profunda que provocan una pérdida total de la capacidad de absorber luz. La molécula literalmente se descompone en subproductos con capacidad nula de actuar como FSs. En el caso de FSs policíclicos provoca la apertura parcial o total de la estructura generando cadenas largas no fotoactivas de heterociclos enlazados (pirroles en el caso

de porfirinas). El fotoblanqueamiento acaba por descomponer dichas cadenas.

Hay FSs que son capaces de, primero sufrir el primero, por pérdida de alguna pequeña parte de la molécula, y después, sufrir el segundo, por disgregación en subproductos [66].

### Requisitos del FS ideal en clínica

En TFD, un FS ha de reunir unas características básicas que lo hagan óptimo para el tratamiento fotodinámico. Evidentemente, el tipo de tratamiento condiciona las propiedades que se buscan en un FS. No obstante, existen unas características genéricas bien definidas para que un FS sea idóneo para su uso clínico y son las siguientes [67, 68]:

- Ser altamente selectivo para las células diana (microbianas o cancerosas).
- Baja toxicidad en oscuridad a dosis terapéuticas.
- No generar subproductos tóxicos para el paciente (productos del fotoblanqueamiento inocuos).
- Distribuirse de manera homogénea en las células diana.
- Presentar alta lipofilia para difundir y penetrar a través de las membranas biológicas (en caso negativo, precisar de un vehículo adecuado para llegar a las células diana).
- Requerir una baja dosis lumínica para su activación, lo que disminuye el tiempo de iluminación. Como caso óptimo, que fuera capaz de activarse y ser efectivo solo con luz solar.
- Presentar un alto rendimiento fotodinámico *in vivo* (alta producción de especies EROs).
- Presentar una rápida acumulación en las células diana a la vez que un rápido aclaramiento del mismo (rápida localización en el tejido diana y rápida eliminación del organismo).
- Picos de absorción entre el rojo y el infrarrojo cercano (dependiente de la profundidad de la lesión a tratar).
- Fácil obtención o síntesis.
- Fácil administración.

- Composición homogénea.

### Clasificación de fotosensibilizantes

A pesar de existir FSs más diferenciables como los fullerénicos o los pro-FSs, la mayoría de los FSs actuales pueden clasificarse atendiendo a su estructura química y pueden englobarse en dos grupos principales: los compuestos Tricíclicos de estructura A-B-C y los Policíclicos.

-Compuestos Tricíclicos de estructura A-B-C.

- Fluoresceínas: A:Benceno-B:Pirilo-C:Benceno.

Este tipo de compuestos han sido ampliamente estudiados, particularmente por su producción de  $^1\text{O}_2$ . Poseen un pico de absorción máxima en la zona entre los 400 y los 600 nm en disoluciones acuosas (fluoresceína isotiocianato (FITC): Máx  $\lambda_{\text{abs}}$ : 495 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ : 519 nm) [69]. Los halógeno-sustituídos son los FSs más importantes debido a que al aumentar la masa del FS por halogenaciones sucesivas también aumenta el cruzamiento intersistema ( $K_{\text{ISC}}$ ) en su activación fotodinámica; esto incrementa la capacidad del FS de alcanzar el estado triplete y, por tanto, de formar  $^1\text{O}_2$ . Los FSs halogenados de ésta familia son: Eosina (tetrabromofluoresceína), Eritrosina (tetrayodofluoresceína) y Rosa de Bengala (tetraclorotetraiodofluoresceína) (Figura 14). Este último, se destaca en estudios de terapia antifúngica *in vitro* [70]. Comparten similar estructura los FSs de la familia de las Rodaminas, moléculas de naturaleza generalmente catiónica y con mayor solubilidad en agua. Sus picos de absorción máxima se encuentran en la zona de 500 a 600 nm dependiendo del medio de disolución (Rodamina: Máx  $\lambda_{\text{abs}}$ : 540 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ : 570 nm). Sin embargo, estas moléculas poseen una casi nula capacidad de formación de  $^1\text{O}_2$ . Moléculas poli halogenadas derivadas de las Rodaminas aumentan su capacidad de cruzamiento intersistema (como en el caso anterior), pero también van disminuyendo paulatinamente su solubilidad en agua [71].

- Acridinas: A:Benceno-B:Piridina-C:Benceno.

Colorantes triciclos relacionados con los antracenos. Poseen un anillo de piridina flanqueado por dos bencenos. El naranja de acridina (NA) es el padre

de esta familia (Figura 14), y fue el primer FS tricíclico empleado en quimioterapia moderna. Los picos de absorción máxima de las acridinas se encuentran en torno a 500 nm ( $\lambda_{\text{abs}}$ : 460, 502 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ : 526, 650 nm). El NA ha demostrado la producción de  $^1\text{O}_2$  (vía II) como mecanismo mayoritario de muerte celular por mecanismo fotodinámico en un estudio sobre células tumorales [72].

- (Antra)Quinonas: A: Benceno-B:Bencenona-C:Benceno.

Las antraquinonas son estructuras tribencénicas (antraceno) con grupos funcionales cetónicos como sustituyentes principales en la estructura tricíclica (Figura 14). El espectro de absorción de las quinonas sustituidas posee una banda de absorción débil pero generalmente muy ancha en la zona de los 350-500 nm que depende del disolvente en el que se encuentre [73]. Sus propiedades fotobiológicas dependen de la presencia de sustituyentes amino y grupos hidroxilo (alcohol) [74].

- Fenotiazinas: A:Benceno-B:Tiazina-C:Benceno.

Poseen una estructura básica consistente en dos bencenos rodeando a un heterociclo de tiazina. El pico de absorción máxima clásico se encuentra entre los 600 y 700 nm en disoluciones acuosas. El azul de metileno es el padre de esta familia [75] (Figura 14). Las fenotiazinas son unos de los FSs más ampliamente empleados en fotoinactivación antimicrobiana [74].

- Furocumarinas o Furanocumarinas: A:Oxazol-B:Benceno-C:Pirilo / Pirlona.

Debido a su presencia en la naturaleza fueron los primeros FSs empleados ya en la antigüedad. Los picos de absorción máxima de las cumarinas rondan los 300-350 nm y los de emisión se sitúan en torno a 400-450 nm [76]. Las cumarinas pueden presentarse en plantas, principalmente en: lima, limón, naranja, apio, perejil, eneldo, zanahoria e higo. Su estructura, a diferencia de los colorantes tricíclicos, consiste en tres anillos heterocíclicos donde es obligatoria la presencia de un anillo furánico (pentágono aromático con 4 átomos de carbono y uno de oxígeno). Grupo destacado es el de los psolarenos y sus derivados [77] (Figura 14).

- Flavinas: A:Benceno-B:Pirazina-C:Pirimidina.

Derivados de la vitamina B2 (Riboflavina, RF) (Figura 14), son las estructuras tricíclicas con mayor número de nitrógenos en sus anillos. Se demuestra su producción de EROs por la vías fotodinámicas I y II [78]. La RF posee dos picos de absorción en torno a 300 y 500 nm en etanol aunque, dependiendo de la flavina y de su estado (oxidado o reducido), condicionado por el pH y por el disolvente, existen desplazamientos bato o hipsocrómicos. Posee su pico de emisión máxima de fluorescencia en torno a 450 nm [79]. Debido a que sus picos de absorción máxima se localizan en la zona del UV se han probado eficaces en la inactivación *in vitro* de diversos microorganismos mediante el uso de luz UV como aislados de *Acanthamoeba* [80] SARM o *Pseudomonas aeruginosa* [81].

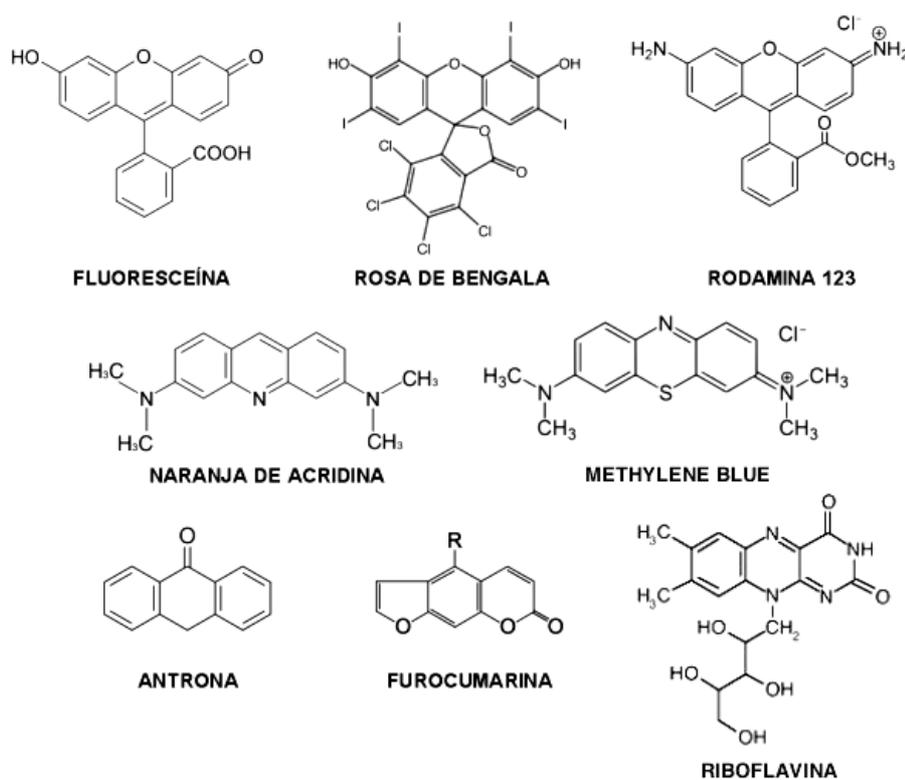


Figura 14: FSs tricíclicos destacados

-Compuestos con estructuras policíclicas

Los FSs policíclicos poseen generalmente estructuras repetidas de homo o heterociclos unidos entre sí de forma directa o indirecta. En algunos casos el FS puede ser resultado de la condensación de dos moléculas iguales entre sí de alguna de las estructuras tricíclicas antes citadas para formar el policiclo. Pueden ser naturales o de síntesis artificial y pueden clasificarse atendiendo a su estructura central básica.

### Naturales

- Porfirinas, derivados y precursores

Consisten en una estructura central con cuatro anillos de pirrol, que suele ir acompañada de un elemento, generalmente metálico, formando complejo con sus átomos de nitrógeno centrales (Figura 15). El espectro de absorción de los tetrapirroles poseen bandas características; una posee su máximo de absorción en la zona entre 300 y 400 nm y se denomina “banda Soret”. Es la banda con mayor intensidad. Un grupo de bandas de menor intensidad en la zona del visible entre 500 y 700 nm se las denomina “bandas Q” [82]. Es debido a la capacidad de penetración mayor en los tejidos de las longitudes de onda donde se localizan las bandas Q con respecto a la banda Soret lo que ha despertado más el interés de esta zona del espectro de los tetrapirroles. La hematóporfirina (Hp), un ejemplo de ésta familia, se encuentra en forma reducida en los eritrocitos como Protoporfirina IX (PpIX) y se acompleja con el hierro para formar el grupo hemo, grupo prostético de la hemoglobina [83]. La PpIX se emplea como FS en terapia antitumoral fundamentalmente mediante el suministro de sus precursores para estimular su producción endógena (MAL (Metvix<sup>®</sup>) y 5-ALA (Levulan<sup>®</sup>) (Figura 15)).

- Clorofilas y derivados

Moléculas distinguibles de las porfirinas clásicas por la pérdida de dobles enlaces en su estructura lo que hace también perder parte de su aromaticidad por la pérdida de electrones  $\pi$  resonantes. Cuando se pierde una sola insaturación con respecto a la porfirina, aparece una estructura denominada clorina, la cual posee dos electrones  $\pi$  menos que la porfirina. Si la estructura

porfirínica básica aparece con cuatro electrones pi menos (pérdida de dos insaturaciones) las estructuras se denominan bacterioclorinas e isobacterioclorinas. Las clorofilas clásicas son clorinas en su estructura básica que se caracterizan por poseer una cadena de ácido graso propanóico o propenoico que, a menudo aparece esterificada con un alqueno de una sola insaturación y 16 carbonos, la cadena de fitol. Las clorofilas se caracterizan por encontrarse acomplejadas por un átomo de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) [84, 85].

Las clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas son un grupo heterogéneo de tetraciclos que pueden derivar, bien de la clorofila, bien de las porfirinas (Figura 15). Presentan gran absorción de la luz visible (640-700 nm). Son más efectivas que los HpD tanto *in vivo* como *in vitro* por poseer una eficiente producción de  $^1O_2$  debido a la intensidad que presenta su pico de absorción, alrededor de diez veces mayor que el de las porfirinas clásicas y derivadas de la Hp [86].

En el apartado de las clorinas, destacan la meta(Tetra)hidrofenilclorina (m-THPC o FOSCAN®) y sus derivados como unos de los FSs más activos debido a la poca cantidad de luz y de concentración de FS necesarios (Figura 15). Su único inconveniente es que son insolubles en agua y con ello necesitan una formulación especial para su correcta vehiculización [87]. FOSCAN® ha sido aprobado en la Unión Europea para el tratamiento paliativo de cánceres escamosos avanzados de cabeza y cuello [88]. Asimismo, es utilizado para el tratamiento del cáncer de páncreas avanzado [89].

### Sintéticas

- Porfínicos (porfirinoides)

Isómeros estructurales de las porfirinas (Figura 15), los porfínicos poseen deliberadamente un espectro de absorción similar a ellas y cuyas bandas Q se localizan entre los 550 y los 650 nm (para el porfínico CPO). Se han estudiado las propiedades fotofísicas de estas moléculas [90] y se ha demostrado el efecto fotodinámico de los porfínicos en tumores inducidos en ratones constatando que se producía una necrosis del tejido tumoral [91]. Los estudios

de Kessel et al. [92] sobre los porfíricos en TFD demostraron su eficacia fotodinámica y su capacidad de provocar apoptosis en células de leucemia. Demuestran que los porfíricos se localizan en las mitocondrias y promueven pérdida de potencial mitocondrial y la liberación del citocromo c al citoplasma, hechos de suficiente importancia como para provocar muerte celular apoptótica. También demostraron que los porfíricos pueden localizarse en el RE favoreciendo la muerte celular por apoptosis y autofagia [93].

- Ftalocianinas (PCs)

Tetrapirroles que, si se encuentran a complejados con metales diamagnéticos como el aluminio o el zinc (Figura 15), poseen alta eficiencia en transformarse en sus estados triplete y alta producción de  $^1\text{O}_2$ . Presentan un pico máximo de absorción a 650-700 nm, permitiendo una penetración más profunda que las porfirinas clásicas. Poseen una tasa de aclaramiento muy rápida, resultando en mínima fotosensibilización cutánea [94]. Las PCs son completamente inocuas en ausencia de luz. Se han utilizado en TFD antitumoral demostrando una alta localización en el tejido canceroso después de 1 a 3 horas tras su administración por vía intravenosa.

Los conjugados de este FS con zinc han sido patentados en TFD en el tratamiento y fotodiagnóstico contra enfermedades de origen infeccioso [95].

Asimismo, las PCs con zinc fluorosustituidas han sido patentadas para su uso fotodinámico en la inactivación de virus en la sangre y en cáncer [96].

- (Metal) Purpurinas

Clorinas modificadas, generalmente partiendo de productos de la degradación de clorofilas [97] con fuerte absorción en el rojo (630-715 nm). Poseen pobre solubilidad en agua por lo que han de ser formuladas correctamente. Se encuentran a complejadas con un metal, y solo las que se encuentran asociadas al  $\text{Sn}^{2+}$  o al  $\text{Zn}^{2+}$  poseen eficacia fotodinámica [98] (Figura 15). Con un núcleo de  $\text{Sn}^{2+}$  en el complejo, la Purlytin SnET2 es la más representativa. Éste FS se encuentra en estudios clínicos de fase II / III en varios tipos de cánceres como el de mama mostrando resultados satisfactorios [99]. También se encuentra en estudios clínicos en fase II para el tratamiento del Sarcoma de

Kaposi relacionado con el SIDA [100], para la degeneración macular asociada a la edad (ADE) [101].

- **Texafirinas (TP)**

Porfirinas patentadas acomplejadas con lantánidos. Son solubles en agua y se activan con luz roja de alta penetración. Son selectivas para los tumores pero poseen una tasa de aclaramiento muy rápida [102, 103]. TPs como la Motexafina con gadolinio ha demostrado localizarse en células tumorales [104]. La TP con mayor capacidad de actuar como FS es la que se encuentra acomplejada con Lutecio (Lu-Tex, Antrin, Lutrin, Optrin). Este FS absorbe a 732 nm [105]. Los tratamientos con Lutrin en cáncer de mama han mostrados prometedores resultados [106].

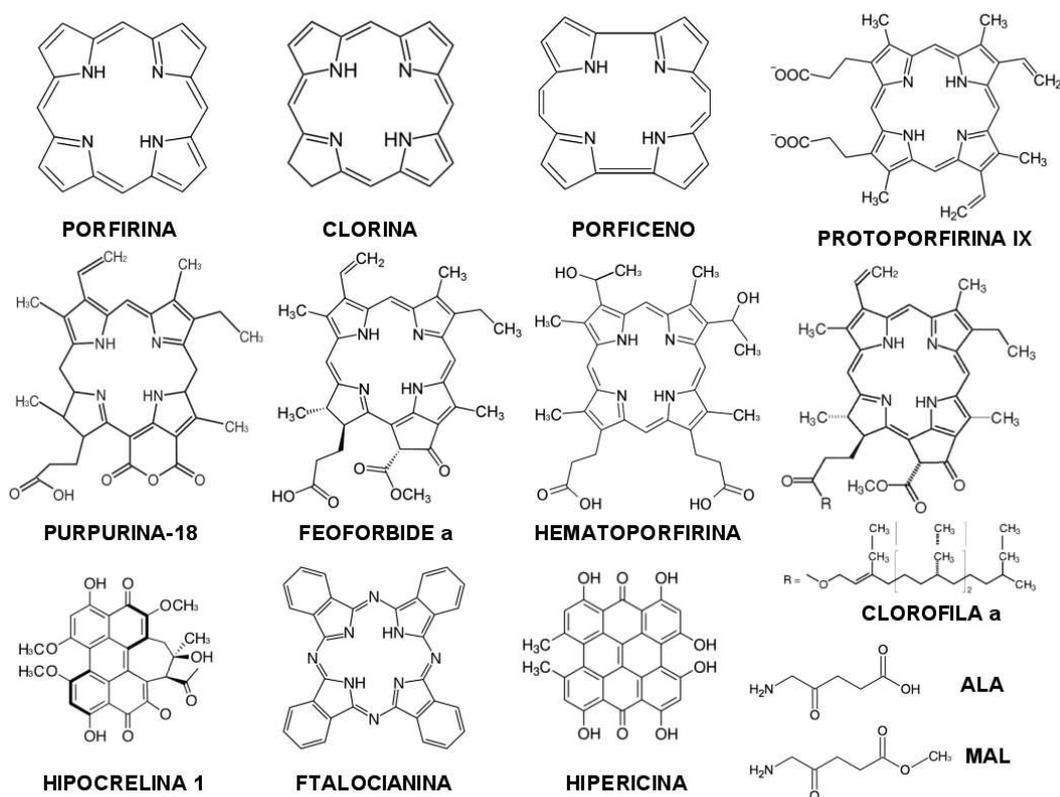


Figura 15: FSs policíclicos y precursores destacados.

#### **d. Fundamentos de la reacción fotodinámica.**

La reacción fotodinámica que tiene lugar durante la TFD implica el uso de un FS capaz de activarse químicamente con la radiación recogida en una zona concreta del espectro de la luz [59].

##### **i. Fundamento fotofísico y fotoquímico**

Fotofísicamente, los FSs, que generalmente suelen ser inocuos en oscuridad, presentan un aumento en su reactividad molecular en combinación con ciertas radiaciones, las cuales suelen ser también inofensivas *per se* porque se encuentran en el espectro visible de la luz. Así pues, los FSs ( $^1\text{FS}$ : FS en estado basal) modifican su estructura electrónica con una radiación de longitud de onda acertada, alcanzando el estado transitorio singlete  $^1\text{FS}^*$ . Este hecho sucede debido a la interacción de los electrones más externos del FS con fotones de la radiación [59, 108, 109].

Fotoquímicamente, el efecto resultante de esta interacción es la elevación de sus electrones externos a orbitales de mayor energía. En el estado  $^1\text{FS}^*$  transitorio los espines de los electrones del orbital de mayor energía se encuentran emparejados lo que confiere al FS una reactividad aparente baja. Sin embargo, este estado transitorio, mediante diversos mecanismos (que dependerán del FS), entre los que se encuentran los entrecruzamientos intersistemas ( $K_{ISC}$ ), puede generar una inversión rápida en el espín de uno de esos electrones lo que genera una cierta proporción de moléculas de FS en estado triplete excitado  $^3\text{FS}^*$  con los espines desemparejados lo que hace que sea mucho más reactivo que el estado  $^1\text{FS}^*$  [31, 109]. El  $^1\text{FS}^*$  es capaz de volver a su estado basal  $^1\text{FS}$  por emisión de fluorescencia y/o calor. El  $^3\text{FS}^*$  es capaz también de regresar al estado  $^1\text{FS}$  por emisión de fosforescencia (Figura 16) [109].

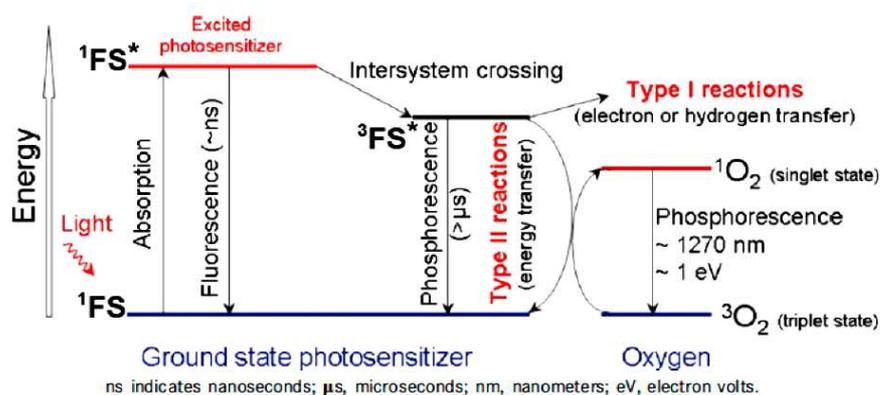


Figura 16 : Representación en diagrama modificado de Jablonski de las diferentes fases que sufre un FS al ser excitado por la luz y su forma de transferencia de energía con el oxígeno molecular. [110]

La energía lumínica es capaz de transformarse entonces en energía química y la reactividad del FS hace que éste sea capaz de ceder su exceso de energía al oxígeno molecular de forma directa o indirectamente mediante otros sustratos biológicos. Esto provoca diferentes reacciones, mayoritariamente de reducción-oxidación o redox, formando las EROs [110].

## **ii. Fundamento bioquímico**

La consecuencia de esta serie de reacciones en un sistema biológico que culminan con la formación de EROs provocan un daño a sustratos biológicos diversos. En sistemas celulares, la capacidad de un FS de producir especies reactivas dañinas está condicionada a la capacidad que éste tenga de formar mayor o menor número de moléculas de FS en estado triplete  $^3\text{FS}^*$  [31].

Las EROs formadas por la excitación de un FS son capaces de llegar a destruir una célula o tejido [107] a diferentes niveles mediante apoptosis [111-113], necrosis o una combinación de ellas [114,115]. También se ha demostrado que las EROs provocadas por algunos FSs pueden generar muerte celular mediada por autofagia [116, 117].

## **iii. Vías de generación de EROs**

Existen dos vías principales por las que un  $^3\text{FS}^*$  puede formar EROs. Se denominan reacciones de tipo I y de tipo II (Figura 17).

- Via I

El  $^3\text{FS}^*$  reacciona con diversos sustratos biológicos orgánicos para formar un FS-radical, el cual produce, por auto-oxidación en combinación con el  $\text{O}_2$ , anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). Este radical libre puede dismutar o reducir un electrón para formar peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el cual, a su vez, puede experimentar la reducción de un electrón generando radical hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ). Estos radicales tienen un radio de acción muy limitado espacialmente por lo que su acción se ve limitada al espacio celular concreto donde se forman [118].

- Via II

Implica una reacción directa entre el  $^3\text{FS}^*$  y el oxígeno molecular, generando un radical de corta duración (<40 nanosegundos en sistemas biológicos), de muy corto radio de acción (<20nm; debido a ello su efecto se encuentra limitado al lugar donde se forme) [119] pero de un alto poder oxidante llamado oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (Figura 17), el cual es capaz de dañar directamente al material biológico [107]. Debido a que el  $^1\text{O}_2$  no es un radical, es capaz de reaccionar con moléculas biológicas a través de mecanismos diferentes a los que los hacen las EROs de la vía I, como la reacción con dobles enlaces o sobre puentes disulfuro [120, 121]. Es por ello por lo que en sistemas biológicos el  $^1\text{O}_2$  rápidamente reacciona provocando peroxidación de membranas celulares destruyendo lípidos insaturados y colesterol. También es capaz de producir “cross linking” de proteínas de membrana afectando a algunos aminoácidos, sobre todo al triptófano, la histidina y la metionina. Estos efectos provocan una bajadas del potencial de membranas celulares, incluyendo las de las organelas, así como una inactivación de proteínas de transporte, iniciando una destrucción celular inminente [122].

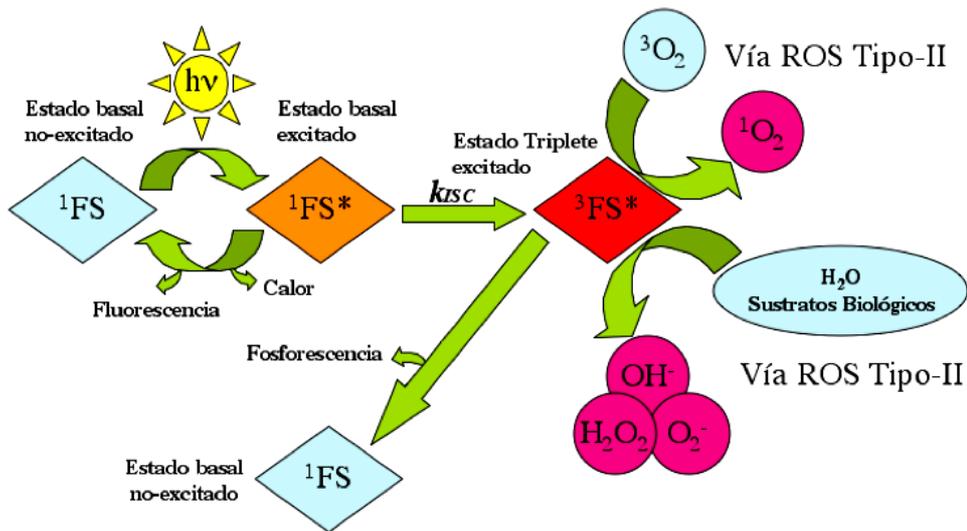


Figura 17: Representación esquemática de la excitación del FS: el estado basal  $^1\text{FS}$  se excita con una luz de longitud de onda adecuada y se convierte en el estado singlete  $^1\text{FS}^*$  activado. Debido a una reorganización de sus electrones (cruzamiento intersistema  $K_{ISC}$ )  $^1\text{FS}^*$  forma el estado triplete  $^3\text{FS}^*$ , el cual promueve la excitación del oxígeno molecular ( $^3\text{O}_2$ ) por dos vías para formar las EROs: Vía I: la reacción, propiciada por la intermediación de sustratos biológicos, promueve la formación de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que por medio de la SOD forma peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que se descompone a radical hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) por acción de la CAT. Vía II el  $^3\text{O}_2$  reacciona sin intermediarios con el  $^3\text{FS}^*$  para formar el radical oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Modificado de [31].

#### **iv. Importancia de las EROs en la reacción fotodinámica y su efecto en biosistemas**

La formación de EROs es habitual en sistemas biológicos como consecuencia del envejecimiento de las células derivado de diferentes procesos. Para proteger los efectos de las EROs existen diferentes proteínas de “amortiguación” que se activan al formarse dichos reactivos oxigenados. Las EROs formadas durante el proceso de fotooxidación en la TFD sobrepasan el efecto protector de estos sistemas de choque y se presentan insuficientes a la hora de proteger a la célula. Un ejemplo de esto la sobreexpresión que sufre la enzima que neutraliza al anión  $\text{O}_2^-$ , la superóxido dismutasa (SOD) durante la reacción fotodinámica en células tumorales [123].

De los estudios realizados hasta la fecha se deduce que, para que se provoque el daño fotodinámico, culminado en una muerte del tejido o célula diana, ambos tipos de reacciones (vía I y II) son necesarias. [125, 124].

En la FIA se acepta que, en presencia de oxígeno, la especie reactiva EROs más importante es el  $^1\text{O}_2$  [126], aunque también se conoce que la formación de EROs por vía I por parte de algunos FSs es crucial para la oxidación de biomoléculas esenciales en el sistema biológico [127].

Los estudios realizados con diferentes fotosensibilizantes porfirínicos demuestran que la formación de EROs provocados en los procesos fotodinámicos no provoca daños nucleares significativos en sistemas celulares eucarióticos superiores. Esto es debido a que las EROs generadas son de vida media muy corta y con un radio de acción muy pequeño ( $<0,01\mu\text{m}$ ), lo que hace que su potencial mutagénico o genotóxico sobre una célula eucariota media, que mide entre 10 y 30  $\mu\text{m}$ , sea muy bajo [128].

### **v. Muerte celular provocada por las EROs / Dianas celulares**

Existen 3 vías principales por las que la reacción fotodinámica induce muerte celular: necrosis, apoptosis y autofagia; la vía que seguirá una célula dependerá principalmente de cuales sean las dianas celulares de las EROs / FS y del tipo de célula. Éste apartado se encuentra influenciado por la complejidad celular. [129-131].

La muerte celular puede definirse como una pérdida irreversible de la integridad de la membrana plasmática [132]. La desorganización celular provocada por el efecto fototóxico comienza en la zona donde se generan las EROs y continúa por diferentes mecanismos hasta provocar el efecto global. La localización interna del FS influye, entonces, directamente, en el tipo de muerte celular que se genere.

En células eucariotas (se descarta a las bacterias) se ha demostrado la existencia de una multiplicidad generalizada en las dianas celulares; esto se extiende al caso de hongos; por lo tanto, se reduce el riesgo de que seleccionen fotomutantes resistentes lo que genera una ausencia de efectos mutagénicos en la TFD antifúngica [133]. A pesar de no estar demostrada la generación de cepas resistentes a la TFD, existen algunas levaduras, incluyendo especies de *Candida* que son capaces de usar mecanismos para reducir la penetración de FSs o para

inducir la síntesis de bombas para expulsarlos. Asimismo, existe la posibilidad de que induzcan enzimas de inhibición de especies EROs (catalasa, súper óxido dismutasa, etc.) [134, 135].

- Apoptosis

La apoptosis se distingue por cambios característicos en la morfología celular como condensación de la cromatina (pyknosis) o fragmentación (karyorrhexis), por modificaciones menores en organelas celulares que provocan la formación de cuerpos apoptóticos. Todo esto se acompaña de la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Su activación puede iniciarse bien por señales externas, o ruta externa o por señales iniciadas en la mitocondria (ruta mitocondrial) [132, 136]. Es fundamental apuntar que para explicar los diferentes mecanismos relativos a la biología molecular y celular, así como los procesos bioquímicos aquí descritos, han sido utilizadas referencias de TFD en cáncer debido a que su descripción en microorganismos es relativamente pobre.

La primera evidencia de que la TFD *in vitro* provocaba apoptosis fue reportada en 1991 por el grupo de Oleinick [137] en experimentos sobre células de linfoma de ratón. Los estudios de Kessel et al. [138] concretaron como diana de la TFD a la proteína antiapoptótica Bcl-2 con un derivado de porfirina (una ftalocianina) como FS. La asociación con Bcl-2 fue también demostrada con otros FSs derivados de porfirinas como SnET2 (purpurina), el porficeno CPO (isómeros estructurales de las porfirinas), y la clorina m-THPC (derivados de la clorofila) Se demostró que, por encima de 15 °C, el Bcl-2 dañado libera a la proteína Bax, la cual, por ruta apoptótica interna, viajaría a la membrana mitocondrial y se asocia a la proteína Bad formando los poros de salida del citocromo c al citosol / citoplasma (cascada apoptótica mitocondrial) [139].

La característica especial que posee la apoptosis mediada por TFD es que por regla general, el tiempo requerido por un grupo de células para volverse apoptóticas de forma natural o en respuesta a agentes externos es, en ningún caso, menor de un día. Sin embargo, con la TFD se observa DNA fragmentado a los 30 minutos de comenzar con la iluminación [107]. Esto atribuye otro valor

añadido a la TFD debido a la importancia que tiene la celeridad en un tratamiento antitumoral o antibacteriano convencionales.

La apoptosis mediada por receptores mortales ha sido estudiada en TFD antitumoral en especial con el FS utilizado en esta investigación, la hipericina. Este apartado será expuesto en el punto en el que se habla de éste FS.

### ▪ Necrosis

La necrosis se suele definir como la muerte celular que no posee signos identificativos ni de apoptosis ni de autofagia. Sin embargo, y a pesar de no resultar una definición suficientemente refinada, la necrosis consiste en rupturas de la membrana plasmática y una dilatación de organelas subcelulares, principalmente de la mitocondria [132, 136].

Los FS localizados en la membrana plasmática (MP) o en otras organelas no mitocondriales son más susceptibles a provocar muerte por necrosis. Y conectando con esto, si las propiedades fisicoquímicas propician una localización del FS en la MP, el daño celular comenzará, evidentemente con ella. En éste sentido, se ha demostrado que los FSs mono-catiónicos son más susceptibles a localizarse en la MP, provocando necrosis y posterior inhibición de la apoptosis debido su capacidad de destruir la MP, penetrar en el citosol e inhibir la acción de las caspasas 3 y 9, enzimas fundamentales en el proceso apoptótico [140].

Asimismo, los FSs que tienden a formar agregados, suelen ser incorporados a la célula por pinocitosis / endocitosis por lo que hay más probabilidad de que se encuentren en lisosomas o endosomas y que por medio de la luz el FS rompa su membrana y libere enzimas tóxicas y su ambiente ácido hacia el citoplasma concluyendo en una degradación de proteínas y citoesqueleto que daría paso a una necrosis generalizada, hecho que sucede con algunos FSs di-catiónicos [107]. Este efecto podría, no obstante, revertirse y provocar la formación de autofagosomas para evitar la contaminación del citoplasma con los enzimas lisosomales. La formación de autofagosomas cursa con autofagia.

### ▪ Autofagia

La autofagia se caracteriza por una acumulación masiva de vacuolas autofágicas de doble membrana en el interior del citoplasma. Este tipo de muerte provee señales que indican la fagocitación de este tipo de células por los fagocitos del sistema inmune [141, 142].

Se ha de pensar que en el daño fotodinámico que provoca la TFD no hay una programación específica para cada FS; es decir, que un mismo FS es capaz de provocar procesos pro-apoptóticos y pro-necróticos y al final acaba por decantarse por uno u otro. El hecho de que en algún punto la necrosis y la apoptosis parezcan contrarrestar sus efectos como ya hemos visto en el apartado de necrosis se resuelve introduciendo el tercer mecanismo de muerte celular, la autofagia. Pese a que inicialmente la autofagia se describió como un mecanismo de respuesta de supervivencia celular frente a la privación de nutrientes, se demuestra que posee otras funciones relacionadas con el proceso de muerte-supervivencia [143]. Este mecanismo ha sido propuesto como un mecanismo adicional a la apoptosis cuando ésta es inhibida. Es más, ha sido descrito un equilibrio entre apoptosis y autofagia [93].

Kessel et al. [142] demostraron en 2006, sobre células resistentes a la apoptosis la presencia de muerte celular por autofagia utilizando FSs localizados en el retículo endoplásmico (RE). Más tarde, en 2007, el mismo autor, hizo uso de un porfoceno localizable en el RE y una clorina, localizable en las mitocondrias. Demostró que los procesos autofágicos protegían a líneas celulares de leucemia de sufrir muerte celular si las dosis de luz eran bajas; sin embargo, a dosis altas de luz demostraron que la autofagia se alía con la apoptosis para potenciar el efecto fotodinámico [93]. Así pues, se ha demostrado que, son, principalmente los FSs acumulados mayoritariamente en organelas celulares los que pueden provocar muerte por autofagia, proceso que concurre a la par que la apoptosis (en el caso de que la organela dañada fueran los lisosomas, el proceso producido se describen una serie de pasos en los que supuestamente, se formaría el autofagosoma; este proceso se encuentra descrito en el mecanismo de autofagia del FS Hipericina) [117]. Tanta consonancia no es casual pues se demuestra en varios estudios que la

proteína antiapoptótica Bcl-2 es un inhibidor de los procesos autofágicos, y al resultar dañado en el proceso de fotooxidación desciende su acción inhibitoria sobre el proceso [144, 145].



## **Fotoinactivación antimicrobiana (FIA) y terapia fotodinámica antimicrobiana (TFA)**

### **a. Introducción**

Pese a que ya en los años 70 ya se realizaban estudios de FIA de bacterias [147], la implantación de una idea fija de aplicabilidad de esta técnica a la clínica hospitalaria comenzaría a extenderse como una concepto factible a principios de los años 90. Experimentos como los de Nitzan et al. [146] redescubrieron la capacidad biocida de las porfirinas frente a bacterias grampositivos y gramnegativos. En estos estudios posteriores se observó que la susceptibilidad de microorganismos frente a la TFA era dependiente de la estructura de la membrana externa de la célula diana. Aunque el hecho de que una célula posea mayor permeabilidad no significa necesariamente que posean mayor sensibilidad a la TFA [148, 149].

A diferencia de la TFD contra el cáncer, donde el FS normalmente se suministra al torrente sanguíneo y éste se acumula en el tumor, en la TFA se emplean métodos de aplicación como la inyección intersticial, el spray aerosol, la instilación (aplicación por goteo) o, como más destacada, la aplicación tópica mediante pomadas [149]. Debido a este tipo de aplicaciones, el FS es altamente selectivo en infecciones localizadas. Además, se puede lograr una mayor selectividad debido a la conjugación del FS con anticuerpos específicos [150], con péptidos policatiónicos [151], o empleando bacteriófagos [152].

Son muchos los FSs que han demostrado ser eficaces *in vitro* e *in vivo* en modelos animales para el tratamiento de distintos agentes infecciosos [149, 153,154]. Sin embargo, muy pocos han sido probados en humanos y la variabilidad de ensayos clínicos en esta materia es muy reducida. En la actualidad, el campo en el que más se está utilizando la TFA es en la odontología, pues ya existen dispositivos que utilizan compuestos derivados de las fenotiazinas como el azul de metileno o el azul de toluidina O como FSs para desinfecciones dentarias (Periowave<sup>®</sup>, FotoSan<sup>®</sup>) [155]. También son relevantes los estudios clínicos de TFA con ALA o con MAL

contra onicomicosis provocadas por especies de dermatofitos [156,157] o no dermatofitos [158] y contra infecciones bacterianas como el *acne vulgaris* [159].

### **b. Aplicaciones actuales de la FIA / TFA**

La posibilidad que nos brinda la TFA para destruir células diana está aplicada a la lucha antimicrobiana en diferentes aspectos donde se distinguen los no clínicos y los clínicos; dentro de los primeros se destacan la desinfección de aguas o de material biológico, aunque también es importante la creación de materiales biocidas.

#### **i. Aplicaciones no clínicas (FIA)**

- Desinfección y saneamiento de aguas

La potabilización de aguas fecales resulta un recurso potencialmente importante para el ahorro de agua. Asimismo, nuevas técnicas de tratamiento de aguas provenientes de fuentes naturales alternativas a las actuales, representan un campo interesante de actuación. Las limitaciones de las técnicas actuales propician el desarrollo de las técnicas fotodinámicas en este campo [160]. FSs capaces de generar especies oxidantes con excelentes rendimientos cuánticos han sido probados en la FIA antimicrobiana [161]. Algunas porfirinas como la (4-*N*-metil-piridil)porfirina también representan una clase de fotosensibilizadores potencialmente útiles en este campo, demostrando más eficacia que el azul de metileno y rosa bengala, tanto a altas como a bajas concentraciones sobre aguas fecales en la eliminación de bacterias coliformes [162].

Todos estos hallazgos hacen presagiar un gran futuro a la fotoinactivación de patógenos de las aguas, ayudando activamente a la prevención de enfermedades epidémicas que son causantes de tantas enfermedades en el tercer mundo debido a su alta versatilidad y su bajo coste.

- Desinfección de material biológico (sangre)

La transfusión de sangre o de sus componentes como plasma o trombocitos resulta, hoy en día, un complemento indispensable para la medicina. Sin

embargo, la aparición de algunos patógenos en la sangre puede dar lugar a la transferencia de enfermedades indeseables. Por ejemplo, una de las causas de la pandemia que es el HIV fueron las transfusiones de sangre contaminada a personas hemofílicas. Es por ello por lo que se haya establecido un riguroso control de búsqueda de patógenos a la hora de realizar donaciones de sangre [163]. En este campo, se encuentra bien establecida en Europa desde hace mas de 9 años la desinfección con fotoinactivación con el Methylene blue (MB), un FS tricíclico [164]. En células anucleadas, como bacterias, el FS se centra en atacar al material genético. Además, al encontramos en un fluido donde hay posibles células contaminantes las cuales poseen material genético, este tipo de tratamiento no discrimina entre hongos, virus o bacterias y es capaz de erradicar a todos y además es capaz de preservar, bajo determinadas condiciones, la integridad de las células sanguíneas [163].

- Desinfección de superficies y de material quirúrgico

Desde hace 20 años se está pensando en la creación de materiales bactericidas activados por la luz [165]. Un ejemplo claro es la creación de superficies con propiedades germicidas, basadas en nylon con protoporfirina IX y su derivado con Zinc como FSs [166]. En el ámbito oftalmológico se han diseñado lentes intraoculares con derivados porfirínicos activados con la luz del día que mantendrían en asepsia la zona [167]. Mediante métodos similares, muy interesante resulta la creación de “coberturas fotosensibilizantes” para sondas endoscópicas, catéteres y otros accesorios de un solo uso utilizados directamente sobre pacientes que evitarían numerosas infecciones hospitalarias demasiado extendidas como es el caso del *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) o infecciones candidiásicas recurrentes que pueden comprometer la vida de pacientes con inmunosupresión de algún tipo [168].

### **ii. Aplicaciones clínicas (TFA)**

La FIA en el ámbito médico se conoce como TFA y resulta una nueva y muy eficiente aproximación en la eliminación de agentes patógenos que se encuentren localizados en un tejido, infectándolo. Los estudios *in vitro* demuestran que la TFA puede desvelarse como un arma potencial en el tratamiento contra infecciones provocadas por virus, bacterias y hongos [27].

## **b. Ventajas de la TFA**

Los efectos positivos de la TFA se pueden resumir en los siguientes:

- No se han observado fenómenos de generación de resistencias; este hecho es debido a que la mayoría de los FSs no penetran en el núcleo celular por lo que es muy complicado que se produzcan mutaciones [169]. Quizás habría que aclarar en los microorganismos, creo que esto no está tan claro en el cáncer
- Amplio espectro de acción, que permite actuar a un mismo FS sobre hongos, bacterias, parásitos y protozoos. Además, debido a las diferencias de tamaño y estructura entre los microbios y las células eucariotas superiores provocan selectividad de la terapia [170]. Se ha de tener en cuenta, además, que la tasa metabólica, tanto de un microorganismo, como de una célula tumoral es mucho más elevada que la encontrada en células eucariotas superiores en estado no-tumoral. Este hecho fomenta una internalización más rápida del FS en este tipo de células y, por tanto, a tiempos de incubación más cortos, genera selectividad fototóxica sobre estas células [171].
- Eficacia independiente de que el microorganismo posea resistencia frente a antibióticos. Se ha demostrado su eficacia *in vitro* contra bacterias como el SARM [172] y hongos como *C. albicans* [173] resistentes a antibióticos y o antifúngicos convencionales respectivamente.
- Mecanismo de acción multidiana con la posibilidad de atacar a la célula diana por diferentes flancos [174].
- Se observa que en estudios *in vitro* que las concentraciones de FS y luz necesarios para provocar efecto germicida sobre bacterias colonizadoras de la cavidad bucal son aparentemente inocuos sobre células humanas [175].

### **c. Limitaciones de la TFA**

Pese al enorme potencial como alternativa antimicrobiana este tipo de terapia también tiene sus limitaciones [59]:

- Limitado solo a infecciones externas o localizadas en cavidades por la dificultad a la hora de aplicar la fuente de luz en zonas intersticiales.
- Generación de fototoxicidad en algunos tejidos o células del huésped; esta terapia ha demostrado posibles efectos fototóxicos sobre células de la piel como queratinocitos y fibroblastos.
- Al no poder emplearse más allá de una infección localizada, se descarta su uso en sepsis generalizadas.
- Es necesario establecer mejor las dosis necesarias de luz y FS para cada caso.

### **d. Perspectivas presentes y futuras de la TFA**

El estudio de las reacciones fotodinámicas en diversos campos, como la TFD ha ido evolucionando hasta nuestros días por diferentes senderos y reportando numerosas publicaciones cada año. Recientemente, se han editado libros completos dedicados a estos temas como “Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security” (2012) de T. Nyokong, “Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications” (2011), “Advances in photodynamic therapy: basic, translational, and clinical” (2008) ambas obras del Dr Michael R. Hamblin o “Photosensitisers in Biomedicine” (2009) del Dr M. Wainwright. Esto demuestra que la TFD está de moda y que tiene un inmenso potencial aun por descubrir.

En el campo en el que la inactivación antimicrobiana y antifúngica la TFD aun tiene un largo camino que recorrer para destacarse como alternativa a los agentes

antimicrobianos actuales, pero por la gran cantidad de pruebas que se han realizado en este campo, todo hace indicar una revolución en los próximos 20 años de los tratamientos microbianos localizados.

## **El fotosensibilizante hipericina (HIP)**

### **a. El Hipérico**

La HIP es una sustancia natural producida por diversas plantas de la familia del *Hypericum*. El *Hypericum perforatum* es un arbusto leñoso de dicha familia conocido popularmente como Hierba de San Juan o Hipérico (Figura 18). El Hipérico se ha utilizado durante décadas en medicina tradicional debido a sus muy variados efectos beneficiosos entre los que se encuentran [176]:

- Vía externa: antiséptico y cicatrizante.
- Vía Oral: astringente, antidepresivo y contra problemas de ansiedad y de alteración del sueño.



Figura 18: Tallo e inflorescencias del *Hypericum perforatum*. [176].

Los extractos de la hierba de San Juan contienen al menos diez principios farmacológicamente activos por lo que el mecanismo de acción global de los efectos de esta planta aun no se encuentran aclarados al 100 %. Entre los componentes principales del hipérico encontramos las naftodiantronas, flavonoides, xantonas y biflavonoides [177].

En el *Hypericum perforatum* también encontramos otras sustancias fotosensibilizantes de la familia de las naftodiantronas; una de ellas es una molécula muy parecida a ella, la pseudo-HIP con un grupo hidroxilo adicional [178].(Figura...)

En el hipérico existen también proporciones bajas proto-HIP, proto-pseudoHIP y la ciclo-pseudoHIP, siendo las dos primeras precursores biosintéticos de la HIP y de la pseudo-HIP respectivamente. El contenido de HIP en el hipérico general se encuentra entre 0,03 y 0,09 % [179]. Estudios a principios de los años 40 ya apuntaban las propiedades fotosensibilizantes de este arbusto [180].

Las propiedades fotosensibilizantes del hipérico se desarrollaron debido a una extraña reacción de fotosensibilidad que sufrían los animales domésticos al ingerir plantas silvestres en las zonas de montaña. Esta enfermedad se reconoció como Hipericismo cuando se demostró que la ingestión de altas cantidades de Hipérico seguida de una exposición prolongada a la luz era la causante de este efecto [181]. Asimismo se descubrió que la presencia del oxígeno era fundamental en la reacción de fotosensibilización al comprobarse que los tejidos isquémicos no resultaban afectados. Este hecho ayudó a esclarecer el proceso fotodinámico que se producía [182].

### **b. Propiedades físicas y químicas de la HIP**

La HIP como molécula es una cetona policíclica de la familia de las naftodiantronas de fórmula molecular  $C_{30}H_{16}O_8$  [178] (Figura 19). Pese a poseer una estructura aromática, los estudios realizados por difracción de rayos X, indican que la HIP no es una molécula plana debido a la proximidad entre sus esqueletos aromáticos que provoca repulsiones entre ellos. Este hecho impide que la HIP adquiera una configuración planar completa [183].

Se disuelve mono-molecularmente en disolventes polares práticos comunes hasta concentraciones de  $10^{-3}$  mol / L. Sin embargo la HIP tiene afinidad por formar homoasociados en contacto con el agua [184]. Las sales de HIP producen disoluciones rojo-vino intensas en solventes orgánicos y de color más cercano al

violáceo en etanol y agua. (absorbancia  $\lambda_{\text{abs}}$ : 548 y 591 nm en etanol), con una característica fluorescencia roja ( $\lambda_{\text{em}}$ : 594 y 642 nm en etanol) (Figura 19). La formación de homoasociados de alto peso molecular en agua reduce su fluorescencia global porque éstos no poseen capacidad para producirla [185, 186].

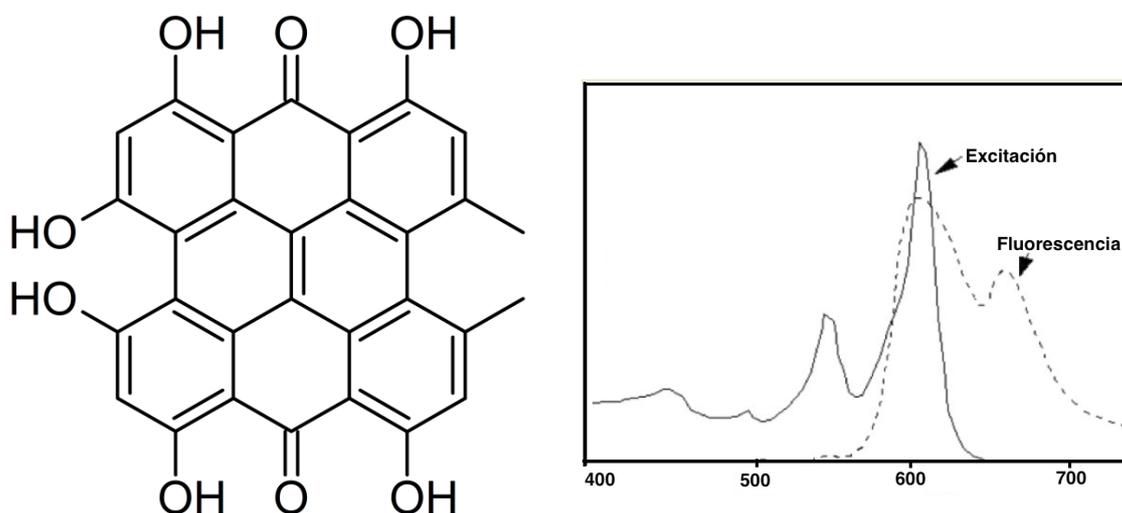


Figura 19: Estructura de la hipericina (HIP). [187]. Espectro de absorción y fluorescencia de la HIP [188].

Pese a la formación de homoasociados en disolución acuosa, la HIP sigue manteniendo propiedades como FS. Bánó et al. [184] han demostrado en 2011 que al aumentar el contenido de agua en disoluciones con HIP disminuía la intensidad de la fluorescencia de la misma porque también disminuía el contenido de monómeros de HIP. Demostraron que con un porcentaje de agua entre 40 y 100 % se producía un desplazamiento batocrómico del espectro de la HIP (en los experimentos llevados a cabo en esta tesis con este FS fueron llevados a cabo en un ambiente acuoso de más del 95 %). Esto quiere decir que el espectro de absorción se desplaza hacia longitudes de onda más largas o hacia el rojo. Este hecho haría que la HIP en soluciones acuosas necesitara una longitud de onda más larga para excitarse (entre 590 y 620 nm). Además, este grupo corrobora que en las condiciones acuosas antes citadas el coeficiente de extinción molar llega a ser 4 veces menor que el obtenido en el disolvente polar DMSO puro [184], hecho que ya había sido demostrado por Falk et al. [189], los cuales también estudiaron la influencia de los tautómeros de la HIP en las propiedades de la misma.

Para comprender la estabilidad de la HIP en agua hay que comprender el significado de sus tautómeros, los cuales no son más que isómeros que se diferencian en sus grupos ceto / hidroxilo. La HIP posee 2 tautómeros principales atendiendo a sus átomos de oxígeno enlazados: la forma 1,6-dioxo y la 7,14-dioxo. Naturalmente la HIP varía su configuración entre ceto / hidroxilo dependiendo del disolvente; y es el DMSO el que acelera la tautomerización hacia la especie 7,14 que es la más estable, lo que hace que aumente hasta en 4 veces su coeficiente de extinción molar con respecto al que posee en disolución acuosa [189]. (Ver FIGURA..) Por lo tanto, su espectro de absorción depende fuertemente de su estatus tautomérico. Y la formación de homoasociados se encuentra condicionada a su vez por sus formas tautoméricas. Así, los homoasociados de la estructura 1,6 poseen bandas de absorción más estrechas y coeficientes de extinción mayores comparados con la forma 7,14 [190].

En disolventes polares la HIP tiende a sufrir una disociación de un protón lo que otorga a la HIP un carácter aniónico. Esto ocurre también cuando la HIP es fotoactivada, formando un estado aniónico semiquinónico [191]. Este hecho influye en las propiedades fotosensibilizantes de la HIP; es más, ha sido sugerido que la formación del estado excitado del FS tenga lugar debido a una tautomerización (transferencia intramolecular de un protón unida a cambios conformacionales intramoleculares) [192,193].

### **c. La HIP como FS**

Debido a sus efectos fototóxicos y a su baja genotoxicidad, la HIP ha recibido un renovado interés como FS de nueva generación en TFD y en fotodiagnóstico (FD) [194].

La HIP es uno de esos FSs que ha demostrado poseer vías diferentes en la consecución de la muerte celular por vía fotodinámica. Ha demostrado ser un potente FS con un gran potencial en TFD [195], probando una alta eficiencia en la formación de su estado triplete correspondiente y una alta capacidad de generar  $^1\text{O}_2$  y aniones  $\text{O}_2^-$ . Handjuri et al. [196,197] ya habían demostrado con liposomas “egg

“yolk lecithin” (EYL) como modelo de sistema de membranas, a pH =7 y en condiciones aerobias que al fotoactivarse la HIP propicia la formación de  $^1\text{O}_2$  y de aniones  $\text{O}_2^-$ . Y más tarde demostraron la peroxidación lípídica de la HIP como FS contra células melanómicas.

Como se ha dicho antes, la HIP es capaz de formar un anión semiquinónico al ser fotoactivada [198]. Este hecho parece influir notablemente en su fototoxicidad, proponiéndose un mecanismo alternativo en el que éste anión sería capaz de ceder su electrón al oxígeno formando radicales  $\text{O}_2^-$  [199]:



La formación de este radical intermedio ha sido probada por Resonancia Paramagnética de Electrones (EPR) [198, 200]. Evidentemente, la presencia de donores electrónicos incrementa la generación del anión [201] y se ha demostrado la existencia de estados aniónicos del FS a pHs neutros o fisiológicos lo que concuerda con los estudios anteriores [202]. La formación del radical de HIP no se centra solo en el estado basal del FS sino que parece ser el estado triplete el que se beneficia de esta acepción de electrones, siendo éste capaz también de cedérselos a otros aceptores como el oxígeno para formar especies reactivas [203].

La HIP posee una baja tasa de fotoblanqueamiento; esto quiere decir que posee mayor fotoestabilidad y, por tanto una desactivación más lenta como FSs que otros como el Photofrin o la m-THPC, siendo capaz de transferir su energía sin descomponerse y recuperar de nuevo su estructura basal no-excitada para poder así volver a funcionar durante más ciclos catalíticos y poder volver a formar especies reactivas [204]. El fotoblanqueamiento de la HIP ha sido estudiado por espectroscopia en diferentes sistemas biológicos. Se ha probado a inducir el fotoblanqueamiento en soluciones con suero de albúmina humana, aplicando una fluencia de  $570 \text{ J.cm}^{-2}$  en un tiempo de 95 minutos con una longitud de onda de 596 nm. Se demuestra que el fotoblanqueamiento es independiente del  $^1\text{O}_2$  y que de su descomposición genera reactivos secundarios también capaces de emitir fluorescencia [205].

#### **d. La HIP en el cáncer**

De la misma forma que las porfirinas fueron empleadas en FD, debido a la brillante fluorescencia que presentan, la HIP ha sido utilizada con éxito en la detección de diversos carcinomas como el de vejiga *in situ*, con una sensibilidad y especificidad muy cercanas al 100 % [206]. Además del FD, la HIP ha demostrado su amplia versatilidad antitumoral, bien por TFD *in vitro e in vivo* con modelos animales [207, 208], pero también demuestra propiedades antitumorales haciendo uso de otro tipo de mecanismos no fotodinámicos. En este sentido Blank et al. [209] en 2001 demostraron que, usando HIP sin luz sobre un modelo de ratón, la HIP era capaz de producir una homeostasis sobre las células tumorales produciendo un efecto antimetastásico, ralentizando de la expansión del tumor.

La HIP también demuestra sus efectos sobre la angiogénesis tumoral. En 2003 Du et al demostraron que el TFD con HIP inducía daños y muerte tisular en la vascularización en células cancerosas humanas [210].

Pese a los grandes avances que se han realizado en el campo de la HIP como tratamiento antitumoral en TFD todavía quedan pendientes los estudios clínicos para una posible aprobación del fármaco como tratamiento real en clínica.

#### **e. La HIP como agente antiviral**

La HIP ha demostrado una profunda capacidad antiviral *per se*, la cual se incrementa si añadimos sus propiedades fotosensibilizantes [211], aumentando su capacidad de inhibir a la pK viral [212, 213]. Por otro lado, la capacidad antiviral producida por las propiedades fotosensibilizantes se ha demostrado asimismo en la desactivación de virus en sangre [214]. Esta capacidad para erradicar la actividad de diferentes clases de virus parece ser específica para los virus con envuelta como el virus del herpes simple, el citomegalovirus o retrovirus como el HIV (virus del SIDA o del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) [185, ,214, 215, 216].

En 1993 Stevenson et al. [217] propusieron un modelo de ratón para demostrar el efecto protector *in vivo* de la TFD antiviral contra el Friend leukemia virus (FLV), que confirmó las capacidades anti-retrovirales de la HIP. Pese a lo atractivos que resultaron los ensayos primarios sobre el HIV, al no tratarse de infecciones localizadas, los tratamientos fotodinámicos con HIP sobre los virus de inmunodeficiencia humanos estaban abocados al fracaso, debido a que necesitarían una alta concentración de FS para ser efectivos. Gulick et al. [218] demostraron en estudios en fase clínica que, a pesar de los prometedores efectos de la TFD antiviral con HIP sobre infecciones retrovíticas como el HIV, la capacidad antiviral era superada por el efecto fototóxico que producía la HIP sobre la piel a las concentraciones a las que se requería para ser efectiva.

### **f. La HIP como agente antibacteriano y antifúngico**

En 1999, Kubin et al. [219] investigaban los efectos bactericidas de la m-THPC y del Photofrin<sup>®</sup> contra el *S. aureus* y decidieron estudiar la posible sinergia de la HIP con ambos FSs. Descubrieron que la HIP inhibía el efecto fotodinámico de ambos FSs y la propusieron como un antagonista a los efectos de ambos.

En 2004 Avato et al. [220] concluyeron que el hipérico tenía compuestos bactericidas cuando utilizaron extractos de la planta disueltos separadamente en metanol, éter metílico, cloroformo y acetato de etilo para probar su efecto *in vitro* contra las bacterias grampositivas *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*. Dedujeron que la HIP inhibía parcialmente el crecimiento de las bacterias, siendo la disolución en acetato de etilo la más efectiva. Más tarde, Cecchini et al. [221] estudian las propiedades fotosensibilizantes de extractos de variedades de hipérico de la zona central de Italia. En soluciones de metanol / acetona demuestran que tienen propiedades inhibitorias del crecimiento de bacterias grampositivas (*S. aureus* y *Enterococcus faecalis*), gramnegativas (*Escherichia coli* y *P. aeruginosa*) y de una levadura, *C. albicans*. Deducen que el aislamiento de los fotosensibilizantes de la planta auguraría una mayor eficacia en su capacidad biocida.

En 2009 Lüthia et al. [222] demostraron la eficacia de la HIP en TFA contra las bacterias causantes de la caries como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* a concentraciones aproximadas a 5  $\mu\text{M}$  con una luz con longitud de onda emitente de entre y 400–505 nm. Esto quiere decir que, utilizando luces con longitudes de onda más cercanas al rojo se conseguiría disminuir la concentración de HIP necesaria (recordar el efecto batocrómico de la HIP en disolución acuosa).

La HIP se ha utilizado *in vitro* contra el *S. aureus* a concentraciones tan bajas como 100 nM, una incubación previa de 5 min y 135  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  produciendo una disminución de 4-5 logaritmos con respecto al número de unidades formadoras de colonias / mL (UFC / mL) del inóculo inicial (si se parte de 6 logaritmos se tienen  $10^6$  UFC / mL por lo que si se reducen 5 log el inóculo final tendrá  $10^1$  UFC / mL y se habrá reducido un 99,999 % con respecto al inóculo inicial) [223].

Estudiando infecciones cutáneas, la HIP no es un FS que pueda emplearse para tratar infecciones profundas debido a la longitud de onda que es capaz de absorber, la cual no es capaz de penetrar más allá de 0,5 mm en la piel [224]. Es por ello por lo que se ha venido investigando su capacidad para tratar infecciones superficiales. Se ha estudiado la vehiculización cutánea del FS con diferentes modelos y uno realmente atractivo es el uso en un modelo de ratón del Solketal<sup>®</sup>, una forma derivada del glicerol con un grupo acetal isopropilideno juntando a dos hidroxilos vecinos. Se observa que dicho compuesto incrementa la fotoactividad del FS en el tratamiento de psoriasis y otras enfermedades de la piel debido a una mayor penetración en la zona de acción del fármaco [225, 226].

### **g. Localización, uptake y mecanismos de la HIP para producir muerte celular**

La totalidad de los estudios realizados en este campo están basados en las investigaciones de la HIP como FS en cáncer; por lo tanto, todos los procesos que aquí se cuentan están estudiados sobre células tumorales o modelos animales tumorales debido a que no existen hasta la fecha ensayos realizados sobre células de microorganismos.

### **i. Uptake y Localización**

Se han sugerido dos mecanismos de internalización de la HIP en las células. El primero es la endocitosis / pinocitosis de los homoagregados y monómeros, y el otro es la difusión a través de membrana de los monómeros o de homoasociados de pequeño tamaño debido a su naturaleza lipofílica y su menor tamaño [227]. La demostración de que la HIP penetra en células de adenocarcinoma mayoritariamente por difusión hace pensar que éste sea el mecanismo más importante de penetración aunque no puede generalizarse [228].

La localización subcelular de cualquier FS se encuentra siempre asociada a las propiedades fisicoquímicas del mismo, como su carga iónica neta, su ratio hidrofilia / lipofilia o su simetría molecular entre otras. En el caso de la HIP, su vehiculización y localización también van a depender fuertemente de la composición de las membranas celulares. Estudios realizados en neuronas indican una asociación general con los lípidos de membrana debido a su carácter lipofílico [229].

Estudios de microscopía convencional y de fluorescencia con sondas fluorescentes para diferentes organelas subcelulares revelan colocalizaciones de la HIP que concuerdan con redistribuciones y acumulaciones de la misma en mitocondrias [230,231,232, ], retículo endoplasmático (RE) [228, 231, 233], aparato de Golgi (AG) [228, ,231,228] y lisosomas [228] utilizando diferentes tiempos de contacto.

Estudios en células tumorales han demostrado que a bajas concentraciones de HIP (100-200 nM) ésta fluye por la membrana plasmática durante 1-2 h. Al pasar de 5 a 16 h. la HIP sigue la vía de internalización celular RE – AG y en una menor proporción se extiende a los lisosomas [233].

### **ii. Vías de muerte celular provocadas por la HIP**

En su revisión sobre las vías de muerte celular inducidas por la HIP, Theodossiou et al. [182] afirman que puede actuar a través de todas las vías posibles. Las vías de muerte celular provocadas por la fotooxidación de la HIP pueden ser:

- **Autofagia**

El posible esquema de procesos que concluyen en autofagia podría ser el siguiente, aunque no se encuentra del todo aclarado: la fotooxidación de la HIP en el RE genera liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (por la destrucción de las bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa-2 (SERCA2) [233] y provoca daños en la mitocondria (funcionamiento incorrecto por inhibición o depleción de las enzimas del ciclo de Krebs como la succinoxidasa entre otras [234] y activación de mecanismos pro-apoptóticos por despolarización en la membrana, liberación del cyt c etc.); como consecuencia se generan mitocondrias y fragmentos de RE aberrantes lo que provoca la formación de autofagosomas para eliminarlos. La disrupción de los lisosomas por el daño fotooxidativo de la HIP puede provocar una fusión de éstos con el autofagosoma. Este efecto puede reducir los efectos de las EROs y concurrir en una supervivencia parcial de la célula o también puede provocar defectos en el mecanismo de apoptosis y una posterior autofagia. En este mismo camino también se demuestra que si células con deficiencias en la formación de canales BAX-BAK, fundamentales para los procesos apoptóticos, son tratadas con TFD con HIP como FS, presentan imposibilidad de proceder por una vía apoptótica, promoviéndose una digestión autofágica según el siguiente esquema. (MOMP: Permeabilización de la membrana mitocondrial externa; PI3K: Fosfatidil inositol 3-kinasa) [233].

- **Necrosis**

Cuando la HIP se localiza en la membrana plasmática o lisosomas provoca una desorganización de membranas en el primer caso o una liberación del material ácido en el segundo caso. Esto propaga un efecto de necrosis que frena temporalmente los procesos apoptóticos [233]. La HIP provoca una peroxidación de los lípidos de membranas celulares en células melanómicas [197] seguido del aumento de enzimas inhibidores de EROs (catalasa, glutation-peroxidasa y súper óxido dismutada) o de la depleción del Glutation. Este hecho provoca una desorganización de membranas celulares que concluye con una muerte por necrosis de las células fotooxidadas [235].

- **Apoptosis**

Vía mitocondrial: Ali y Olivo [236] demostraron que la apoptosis por vía endógena o mitocondrial parece aparecer cuando la HIP se localiza principalmente en las mitocondrias. En 2008 Theodossiou et al. [237] demostraron, mediante el uso de diferentes inhibidores de la cadena de transporte de electrones, que el sitio más probable de actuación de la HIP sobre la mitocondria es el complejo III (CIII) a nivel del centro quinónico reducido (Qr). El uso de antimicina A, un inhibidor de la Qr del CIII demostró proteger a la mitocondria del efecto de la HIP, mientras que el Myxotiazol, inhibidor del centro quinónico oxidado (Qo) del CII no provocaba el citado efecto. Por este mecanismo Osyczka et al. [238] sugirieron una posible interacción donador-aceptor de electrones entre el radical semiquinonio de la HIP con el centro Q. El hecho de interrumpir la cadena de transporte de electrones tiene como consecuencia la disrupción de la bomba de protones ATPasa. Este hecho genera una acidificación del interior de la mitocondria y una caída del potencial de membrana mitocondrial de membrana. Esto cursa con la inactivación de enzimas, la desorganización de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c al citoplasma, lo que genera toda la cascada enzimática apoptótica. Asimismo, se ha demostrado por Miccoli et al. [239] que la HIP actúa liberando a la hexoquinasa mitocondrial en células de glioblastoma (línea celular SNB-19) y que esto modifica la interacción con proteínas canal-aniónicos voltaje-dependientes (VDAC); está demostrado, asimismo, por Shoshan-Barmatz et al. [240] que la disrupción entre ambos componentes provoca un incremento de los procesos apoptóticos. En los estudios de Chaloupka et al. [241] se demuestra que la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 fotoinducida en la TFD con HIP, reduce la formación del apoptosoma por asociación con el citocromo c pero no es capaz de evitar la apoptosis, no pudiendo frenar la despolarización mitocondrial.

Vía citoplasmática: En 2001, Schempp et al. [242] investigaron la apoptosis vía exógena con HIP por fotoactivación en células Jurkat con neutralizadores de Fas, FasL, TNF-R1 y TRAIL. Observaron que el anti-TRAIL era el único que inhibía visiblemente la apoptosis provocada por fotooxidación. Un año más tarde, Ali et al. [35] demostraron que la vía Fas estaba implicada en la activación de la apoptosis exógena vía HIP fotoactivada en células de cáncer

nasofaríngeo, de vejiga y de colon. Con estos resultados queda patente que la vía exógena apoptótica generada como consecuencia de la fotooxidación con HIP depende de las condiciones y del tipo de célula.

Las siguientes figuras intentan aclarar parcialmente los procesos que ocurren en la apoptosis generada por fotooxidación con HIP. Las flechas rojas indican a qué nivel actúa la HIP en los procesos apoptóticos propios de una célula (líneas amarillas).

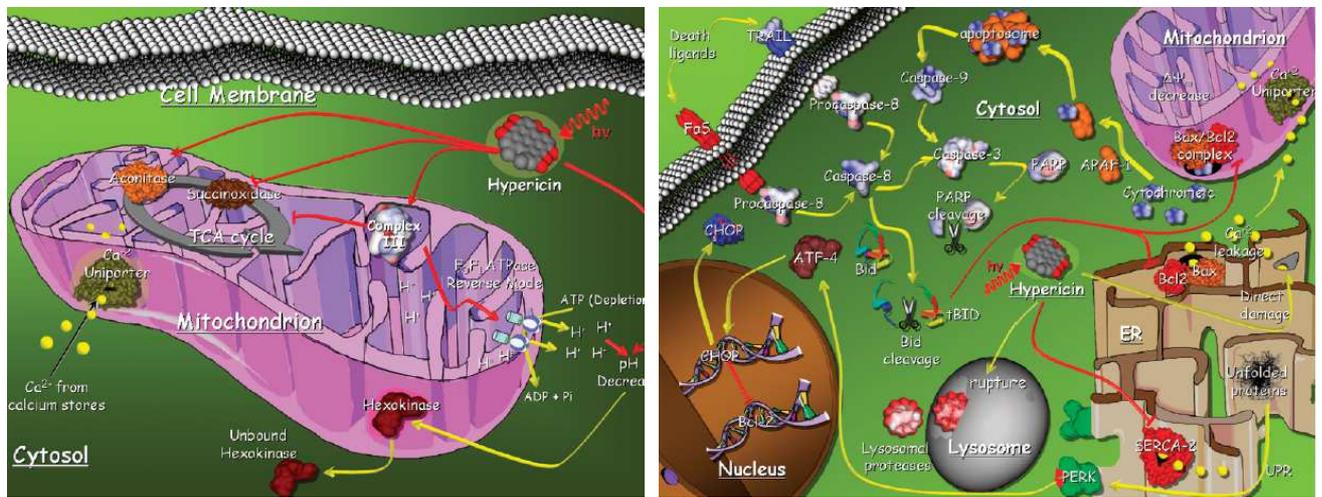


Figura 20: A. Representación del mecanismo propuesto para la generación de procesos proapoptóticos de la TF con HIP relacionados con la mitocondria. B- Representación de los mecanismos generalizados propuestos para la generación de procesos proapoptóticos de la TF con HYP [182].

## Referencias

---

- [1] - **Hazan I, and Liu H.** Regulation of morphogenesis by conserved developmental pathways in pathogenic fungi en: San-Blas G y Calderone RA. *Pathogenic Fungi: Structural Biology and Taxonomy*. Chapter 6, **2004**.
- [2] - **de Hoog GS,** Guarro J, Gené J, and Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi* 2nd Edition, Ascomycetous Yeasts (pgs 178 - 224), CBS, The Netherlands, **2000**.
- [3] - **Brandt ME, and Warnock DW.** Mycology taxonomy and classification of fungi en: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, and Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology* 9th Edition, Volume II, **2009**.
- [4] - **Howell SA, and Hazen KC.** *Candida, Cryptococcus, and other yeasts of medical importance* en: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, and Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology* 9th Edition, ASM Press, Washington DC, **2009**.
- [5] - **de Hoog GS,** Guarro J, Gené J, and Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi* Edition 3.1. PC; Meyen ex Hansen. *Saccharomyces cerevisiae*. CBS, The Netherlands, **2011**.
- [6] - **Sivakumar VG,** Shankar P, Nalina K, and Menon T. Use of CHROMagar in the differentiation of common species of *Candida*. *Mycopathologia* **2009**; 167:47-9.
- [7] - **Buschelman B,** Jones RN, Pfaller MA, Koontz FP, and Doern GV. Colony morphology of *Candida* spp. as a guide to species identification. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1999**; 35:89-91.
- [8] - **Rex J,** Walsh T, Sobel J, Filler S, Pappas P, Dismukes W, and Edwards J. Practice Guidelines for the treatment of Candidiasis. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2000**; 30:662-678.
- [9] - **Silva RF.** Chapter 8: Fungal infections in immunocompromised patients. *J Bras Pneumol* **2010**; 36:142-7.
- [10] - **Ellis D,** Davis S, Alexiou H, Handke R, and Bartley R. Descriptions of medical fungi 2nd Edition, **2007**. MIRAR CAPITULO
- [11] - **Rubio MC,** Gil J, Benito R, Ramírez I, y Navarro M. Micosis más frecuentes en nuestro medio. *Rev Iberoam Micol* **2001**; 84-607-3050-6.
- [12] - **Edwards Jr JE** et al. International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe Candidal infections. *Clin Infect Dis* **1997**; 25: 43-59.
- [13] - **Summerbell RC,** Weitzman I, and Padhye AA. *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton, and Agents of Superficial Mycoses* en: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, and Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology* 9ª Edición. Volumen II (Págs 1874 - 1897), 2009.
- [14] - **Weitzman I, and Summerbell RC.** The Dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* **1995**; 8:240-259.
- [15] - **Guarro J.** Taxonomy and biology of fungi causing human infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2012**; 30:33-9.
- [16] - **Gräser Y,** Scott J, and Summerbell R. The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. *Mycopathologia* **2008**; 166:239-56.

## Introducción

---

- [17] - **Maestre JR y Alou L.** Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. *Rev Esp Quimioter* **2001**; 14:17-21.
- [18] - **Chapman S,** Sullivan D, and Cleary J. In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **2008**; 119:197-216.
- [19] - **Pereiro Ferreirós Jr. M,** García-Martínez FJ y Alonso-González J. Actualización en el tratamiento de las micosis cutáneas. *Actas Dermosifiliogr* **2012**; 103:778-783.
- [20] - **Gubbins PO, and Anaissie EJ.** Antifungal Therapy: development of antifungal drugs en: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, *Clinical Mycology* 2nd Edition, Chapter 7 (pgs 167-199) Churchill Livingstone, Elsevier New York, NY, **2009**.
- [21] - **Anaissie EJ,** McGinnis MR, and Pfaller MA. *Clinical Mycology*, 2nd Edition, Chapter 7 (Pág 164), Churchill Livingstone, Elsevier New York, NY, **2009**.
- [22] - **Pappas PG,** Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, and Sobel JD. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2009**; 48:503-535.
- [23] - **Cornely OA,** Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Akova M, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Castagnola E, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Jensen HE, Lass-Flörl C, Petrikos G, Richardson MD, Roilides E, Verweij PE, Viscoli C, and Ullmann AJ. ESCMID Guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* **2012**; 18 Suppl 7:19-37.
- [24] - **Mensa J, Gatell JM, García-Sánchez JE, Letang E, López-Suñé E y Marco F.** Guía terapéutica antimicrobiana, Ediciones Escofet Zamora S.L. Barcelona, España **2012**.
- [25] - **Chastre J.** Evolving Problems with Resistant Pathogens. *Clin Microbiol Infect* **2008**; 14 Suppl 3:3-14.
- [26] - **Singer RS,** Ward MP, and Maldonado G. Can Landscape ecology untangle the complexity of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **2006**; 4:943-952.
- [27] - **Hamblin MR, and Hasan T.** Photodynamic Therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *J Photochem Photobiol Sci* **2004**; 3:436-450.
- [28] - **Zeina B,** Greenman J, Purcell WM, and Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol* **2001**; 144:274-278.
- [29] - **Huang L,** Dai T, and Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods Mol Biol* **2010**; 635:155-173.
- [30] - **Dai T,** Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St Denis TG, Ribeiro MS, Mylonakis E, Hamblin MR, and Tegos GP. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol* **2012**; 3:120.
- [31] - **Wainwright M.** Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* **1998**; 42:13-28.
- [32] - **Ei-Mofy AM.** The treatment of vitiligo with a combination of psolarens and quinolidines. *Br J Dermatol* **1964**; 76:56-62.
- [33] - **Raab O.** Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusoria. *Z Biol* **1900**; 39:524-566.
- [34] - **Ledoux-Lebard C.** Action de la lumiere sur la toxicite de l'éosine et de quelques autres substances. *Ann l'Institut Pasteur.* **1902**; 16:587-593.

- [35] - **Tappeiner H und Jodlbauer A.** Über die wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) stoffen auf protozoen und enzyme. *Dtsch Arch Klin Med* **1904**; 80:427-437.
- [36] - **Neisser A und Halberstaedter L.** Mitteilung über Lichtbehandlung nach Dreyer. *Dtsch Med Wochenschr* **1904**; 8: 265-269.
- [37] - **Hamblin MR, and Mroz P.** Advances in photodynamic therapy: basic, translational and clinical. Chapter 1: "History of PDT; The first hundred years". Engineering in Medicine & Biology, **2008**.
- [38] - **Meyer-Betz F.** Untersuchung über die Biologische (photodynamische) wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut und Gallenfarbstoffs. *Dtsch Arch Klin Med* **1913**; 112:476-503.
- [39] - **Figge FHJ, Weiland GS, and Manganiello OJ.** Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med* **1948**; 68:640-641.
- [40] - **Schwartz S, Absolon K, and Vermund H.** Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors. *Bull Minn Univ School Med* **1955**; 27:7-13.
- [41] - **Lipson RL, Baldes EJ, and Olsen AM.** The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Nat Cancer Inst* **1961**; 26:1-8.
- [42] - **Dougherty TJ.** Studies on the structure of porphyrins contained in photofrin II. *J Photochem Photobiol* **1987**; 46:569.
- [43] - **Dougherty TJ.** Photodynamic therapy; new approaches. *Sem Surg Oncol* **1989**; 5:6-16.
- [44] - **Dougherty TJ, Kaufman JE, and Goldfarb A.** Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Can Res* **1978**; 38:2628-2635.
- [45] - **Kennedy JC, Pottier RH and Pross DC.** Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin ix: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B* **1990**; 6:143-148.
- [46] - **Schleyer V, and Szeimies RM.** ALA/MAL-PDT in dermatology en: Häder DP and Jori G. Photodynamic Therapy with ALA. A Clinical Handbook. Chapter 3. RSC Publishing. European Society for Photobiology, **2006**.
- [47] - **Morton CA, Brown SB, and Collins S.** Guidelines for topical photodynamic therapy: report of a workshop of the british photodermatology group. *Br J Dermatol* **2002**; 146:552-567.
- [48] - **Spielvogeli H.** El lado oscuro del oxígeno. *Scientifica* **2008**; 1:57-61.
- [49] - **Weishaupt KR, Gomer CJ, and Dougherty TJ.** Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in cancer photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res* **1976**; 36:2326-2329.
- [50] - **Tromberg BJ, Orenstein A, Kimel S, Barker SJ, Hyatt J, Nelson JS, and Berns MW.** In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol* **1990**; 52:375-385.
- [51] - **Colussi VC.** intensificação da terapia fotodinâmica do câncer pela variação da pressão parcial do oxigênio no tecido: efeitos físicos e biológicos. Doctoral thesis, University of Campinas. UNICAMP, São Paulo, Brazil, **1997**.
- [52] - **Huang Z, Xu H, Meyers AD, Musani AI, Wang L, Tagg R, Barqawi AB, and Chen YK.** Photodynamic therapy for treatment of solid tumors – potential and technical challenges. *Technol Cancer Res Treat* **2008**; 7:309–320.

## Introducción

---

[53] - **Zelickson BD**. mechanisms of action of topical aminolevulinic acid en: Goldman MP. Photodynamic Therapy. 1st Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, **2005**.

[54] - **Brancaleon L, and Moseley H**. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* **2002**; 17:173-186.

[55] - **Juzeniene A**, Juzenas P, Ma LW, Iani V, and Moan J. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* **2004**; 19:139-149.

[56] - **Strasswimmer J, and Grande DJ**. Do pulsed lasers produce an effective photodynamic therapy response?. *Lasers Surg Med* **2006**; 38:22-5.

[57] - **Wainwright M**. Methylene blue derivatives - suitable photoantimicrobials for blood product disinfection?. *Int J Antimicrob Agents* **2000**; 16:381-394.

[58] - **Lyon JP**, Moreira LM, de Moraes PC, dos Santos FV, and de Resende MA. Photodynamic Therapy for Pathogenic Fungi. *Mycoses* **2011**; 54:265-271.

[59] - **Kharkwal GB**, Sharma SK, Huang YY, Dai T, and Hamblin MR. photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med* **2011**; 43:755-767.

[60] - **Hamblin MR and Mroz P**. Advances in photodynamic therapy: basic, translational and clinical. engineering in medicine and biology 1st Edition, **2008**.

[62] - **Dellinger M**. Apoptosis or necrosis following photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *J Photochem Photobiol* **1996**; 64:182-187.

[63] - **Berg K**, Bommer JC, Winkelman JW, and Moan J. Cellular uptake and relative efficiency in cell inactivation by photoactivated sulfonated meso-tetraphenylporphines. *J Photochem Photobiol* **1990**; 52:775-781.

[64] - **Malik Z**, Dishi M, and Garini Y. Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin in single melanoma cells. *J Photochem Photobiol* **1996**; 63:608-614.

[65] - **Verhoeven JW**. Glossary of terms used in photochemistry. *Pure Appl Chem* **1996**; 68:2223-2286.

[66] - **Bonnett R**, Djelal BD, Hamilton PA, Martinez G, and Wierrani F. Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPP) and bacteriochlorin (m-THPP). a comparative study. *J Photochem Photobiol B Biol* **1999**; 53:136-143.

[67] - **Allison RR y Sibata CH**. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2010**; 7:61-75.

[68] - **Allison RR**, Downie GH, MD, Cuenca R, Hu X, Childs CJH y Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2004**; 1:27-42.

[69] - **Mihashi K**, Nakabayashi M, Yoshimura H, and Ohnuma H. Absorption, fluorescence, and linear dichroism spectra of fluorescein mercuric acetate (FMA) bound to f-actin. Two kinds of effects of divalent cations. *J Biochem* **1979**; 85:359-366.

[70] - **Nyokong T and Ahsen V**. Photosensitizers in medicine, environment, and security, Edit. Springer, **2012**.

[71] - **Butorina DN**, Krasnovskii AA, Savvina LP, and Kuznetsovan NA. Bromorhodamines as efficient photosensitizers in the formation of singlet molecular oxygen in aqueous and ethanolic solutions. *Russ J Phys Chem* **2005**; 79:791-794.

- [72] - **Zdolsek JM**. Acridine orange-mediated photodamage to cultured cells. *APMIS* **1993**; 101:127-132.
- [73] - **Markovic Z, Manojlovic N y Zlatanovic S**. Electronic absorption spectra of substituted anthraquinones and their simulation using ZINDO/S method. *J Serb Soc Comput Mec* **2008**; 2:73-79.
- [74] – **Rousset N, Bourré L y Thibaud S**. Sensitizers in photodynamic therapy en: Patrice T. Häder D, and Jori G. Photodynamic Therapy. Chapter 3. European Society for Photobiology, **2003**.
- [75] - **Ragàs X**, Dai T, Tegos GP, Agut M, Nonell S y Hamblin MR. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: *in vitro* and *in vivo* studies. *Lasers Surg Med* **2010**; 42:384-390.
- [76] - **Peng H**, Makarona E, He Y, Song YK, Nurmikko AV, Su J, Ren Z, Gherasimova M, Jeon SR, and Cui G y Han J. Ultraviolet light-emitting diodes operating in the 340 nm wavelength range and application to time-resolved fluorescence spectroscopy. *Appl Phys Lett* **2004**; 85:1436-1438.
- [77] - **De Leo V and Harber L**. Contact photodermatitis en: Rietschel R, Fowler J. Fisher's contact dermatitis. Williams & Williams 4d Edition, Maryland, **1995**.
- [78] - **Cardoso DR**, Libardi SH, and Skibsted LH. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. *Food Funct* **2012**; 3:487-502.
- [79] - **Kozioł J**. Absorption spectra of riboflavin, lumiflavin, and lumichrome in organic solvents. *Experientia* **1965**; 21:189-190.
- [80] - **del Buey MA**, Cristóbal JA, Casas P, Goñi P, Clavel A, Mínguez E, Lanchares E, García A, and Calvo B. Evaluation of *in vitro* efficacy of combined riboflavin and ultraviolet a for *Acanthamoeba* isolates. *Am J Ophthalmol* **2012**; 153:399-404.
- [81] - **Schrier A**, Greebel G, Attia H, Trokel S, and Smith EF. *In vitro* Antimicrobial Efficacy of riboflavin and ultraviolet light on *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Refract Surg* **2009**; 25:799-802.
- [82] - **Moore MR**. An historical introduction to porphyrin and chlorophyll synthesis en: Warren M and Smith A. Tetrapyrroles: birth, life and death. Chapter 1, **2009**.
- [83] - **Gajdos A**. Quantitative regulation of porphyrins and heme biosynthesis. *G Clin Med* **1968**; 49:1-6.
- [84] – **Huber V**, Sengupta S, and Würthner F. Structure-property relationships for self-assembled zinc chlorin light-harvesting dye aggregates. *Chemistry* **2008**; 14:7791-807.
- [85] - **Chang CK**. On the structure of heme d1. An isobacteriochlorin derivative as the prosthetic group of dissimilatory nitrite reductase?. *J Biol Chem* **1985**; 260:9520-9522.
- [86] - **Dolmans DE**, Fukumura D, and Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* **2003**; 3:380-387.
- [87] - **Bonnett R**, White RD, Winfield UJ, and Berenbaum MC. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem J* **1989**; 261:277-280.
- [88] - **de Visscher SA**, Dijkstra PU, Tan IB, Roodenburg JL, and Witjes MJ. mTHPC mediated photodynamic therapy (PDT) of squamous cell carcinoma in the head and neck: a systematic review. *Oral Oncol* **2013**; 49:192-210.

## Introducción

---

- [89] - **Ayaru L**, Wittmann J, MacRobert AJ, Novelli M, Bown SG, and Pereira SP. photodynamic therapy using verteporfin photosensitization in the pancreas and surrounding tissues in the syrian golden hamster. *Pancreatology* **2007**; 7:20-27.
- [90] - **Aramendia PF**, Redmond RW, Nonell S, Schuster W, Braslavsky SE, Schaffner K, and Vogel E. The photophysical properties of porphycenes: potential photodynamic therapy agents. *J Photochem Photobiol* **1986**; 44:555-559.
- [91] - **Guardiano M**, Biolo R, Jori G, and Schaffner K. Tetra-n-propylporphycene as a tumour localizer: pharmacokinetic and phototherapeutic studies in mice. *Cancer Lett* **1989**; 44:1-6.
- [92] - **Kessel D and Luo Y**. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ* **1999**; 6:28-35.
- [93] - **Kessel D and Reiners JJ Jr**. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *J Photochem Photobiol* **2007**; 83:1024-1028.
- [94] - **Doiron DR**, Svaasand LO, and Profio AE. Light dosimetry in tissue: application to photoradiation therapy. *Adv Exp Med Biol* **1983**; 160:63-76.
- [95] - **Roncucci G**, Fantetti L, De Filippis MP, Dei D, and Jori G. Substituted metal phthalocyanines, their preparation and use Thereof. European Patent N° 1164135, **2004**.
- [96] - **SM Gorun**. Novel substituted perhalogenated phtalocyanines useful as PDT agents for the treatment of cancer. Brown Univ. Res. Found. WO-00021965 European Patent N° 6511971, **2000**.
- [97] - **Rousset N, Bourré L, and Thibaud S**. Sensitizers in photodynamic therapy en: Patrice T. Häder D, and Jori G. Photodynamic Therapy. Chapter 3. European society for photobiology, **2003**.
- [98] - **Spikes JD**. Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. *J Photochem Photobiol B* **1990**; 6:259-274.
- [99] - **Kaplan M**, Wieman T, Glaspy J, Mang T, Rifkin R, Panella T, and Albrecht D. Phase II/III controlled multicenter study of single dose tin ethyl etiopurpurin (SnET2) photodynamic therapy (PDT) in cutaneous metastatic breast cancer (CMBC). ASCO Annual meeting, Abstract N° 419, **1999**.
- [100] - **Grekin R**, Razum N, Trommer R, Doiron D, and Snyder A. Tin ethyl etiopurpurin (SNET2) photodynamic therapy (PDT): results of a phase I/II clinical study conducted at ucse for the treatment of aids-associated cutaneous kaposi's sarcomas. *Inf Conf Aids* **1996**; 11:98.
- [101] - Miravant Medical Technologies. FDA designates Miravant's Purlytin as fast track product for macular degeneration. Press Release, **2000**.
- [102] - **Kostenich G**, Orenstein A, Roitman L, Malik Z, and Ehrenberg B. *In vivo* photodynamic therapy with the new near-ir absorbing water soluble photosensitizer lutetium texaphyrin and a high intensity pulsed light delivery system. *J Photochem Photobiol B* **1997**; 39:36-42.
- [103] - **Yuen AR**, Panella TJ, Wieman TJ, Julius C, Panjehpour M, Taber S, Fingar V, Horning SJ, Miller RA, Young SW, and Renschler MF. Phase I trial of photodynamic therapy with lutetium-texaphyrin (LU-TEX). *Proc Am Soc Clin Oncol* **1997**; 16:219a.
- [104] - **Woodburn KW**. Intracellular localization of the radiation enhancer motexafin gadolinium using interferometric fourier fluorescence microscopy. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**; 297:888-894.
- [105] - **Young SW**, Woodburn KW, Wright M, Mody TD, Fan Q, Sessler JL, Dow WC, and Miller RA. Lutetium Texaphyrin (PCI-0123): a near-infrared, water-soluble photosensitizer. *J Photochem Photobiol* **1996**; 63:892-897.

- [106] - **Wieman TJ**, Panella T, Lustig R, Liebmann J, Carlson R, Esserman L, Dougherty S, Fingar V, Hoth D, Renschler M, and Adelman D. Photodynamic therapy (PDT) of locally recurrent breast cancer (LRBC) with Lutetium Texaphyrin (Lutrin): a phase IB/IIA trial. *Proc Am Soc Oncol* **1999**; 18:418.
- [107] - **Dougherty TJ**, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbely M, Moan J, and Peng Q. Photodynamic Therapy. *J Natl Cancer Inst* **1998**; 90:889-905.
- [108] - **Ochsner M**. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* **1997**; 39:1-18.
- [109] - **Vermeersch G**, Ronfard-Haret JC, Bazin M, Carillet V, Morliere P, and Santus R. Type I and type II photosensitization by the antibacterial drug nalidixic acid. a laser flash photolysis study. *J Photochem Photobiol* **1991**; 54:661-666.
- [110] - **Serrano MP, Lorente C**, Vieyra FE, Borsarelli CD, and Thomas AH. Photosensitizing properties of biopterin and its photoproducts using 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate as an oxidizable target. *Phys Chem Chem Phys* **2012**; 7;14:11657-11665.
- [111] - **He XY**, Sikes RA, Thomsen S, Chung LW, and Jacques SL. photodynamic therapy with photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. *J Photochem Photobiol* **1994**; 59:468-473.
- [112] - **Granville DJ**, Carthy CM, Jiang H, Shore GC, McManus BM, and Hunt DW. Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. *FEBS Lett* **1998**; 437:5-10.
- [113] - **Gupta S**, Ahmad N, and Mukhtar H. Involvement of nitric oxide during phthalocyanine (Pc4) photodynamic therapy-mediated apoptosis. *Cancer Res* **1998**; 58:1785-1788.
- [114] - **Dahle J**, Steen HB, and Moan J. The mode of cell death induced by photodynamic treatment depends on cell density. *J Photochem Photobiol* **1999**; 70:363-367.
- [115] - **Villanueva A**, Dominguez V, Polo S, Vendrell VD, Sanz C, Canete TM, Juarranz A, and Stockert JC. Photokilling mechanisms induced by zinc(II)-phthalocyanine on cultured tumor cells. *Oncol Res* **1999**; 11:447-453.
- [116] - **Buytaert E**, Callewaert G, Vandenheede R, and Agostinis P. deficiency in apoptotic effectors bax and bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy* **2006**; 2:238-240.
- [117] - **Reiners JJ Jr**, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, and Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy* **2010**; 6:7-18.
- [118] - **Agostinis P**, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbely M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, and Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* **2011**; 61:250-281.
- [119] - **Moan J and Berg K**. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *J Photochem Photobiol* **1991**; 53:549-553.
- [120] - **Leach AG and Houk KN**. Diels-Alder and ene reactions of singlet oxygen, nitroso compounds and triazolinediones: transition states and mechanisms from contemporary theory. *Chem Commun Camb* **2002**; 21:1243-1255.
- [121] - **Singleton DA**, Hang C, Szymanski MJ, Meyer MP, Leach AG, Kuwata KT, Chen JS, Greer A, Foote CS, and Houk KN. Mechanism of ene reactions of singlet oxygen. A two-step no-intermediate mechanism. *J Am Chem Soc* **2003**; 125:1319-1328.
- [122] - **Pass HI**. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst* **1993**; 85:443-456.

## Introducción

---

- [123] - **Golab J**, Nowis D, Skrzycki M, et al. Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. a superoxide dismutase inhibitor. *J Biol Chem* **2003**; 278:407-414.
- [124] - **Mroz P**, Pawlak A, Satti M, Lee H, Wharton T, Gali H, Sarna T, and Hamblin MR. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: type i versus type ii photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med* **2007**; 43:711-719.
- [125] - **Girotti AW**. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* **1998**; 39:1529-1542.
- [126] - **Jori G**, Schindl L, Schindl A, and Polo L. Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized process *in vivo*. *J Photochem Photobiol A* **1996**; 102:101-107.
- [127] - **Dubbelman TM and Steveninck J**. Photodynamically induced damage to cellular functions and its relation to cell death. *J Photochem Photobiol B* **1990**; 6:345-347.
- [128] - **Fuchs J**, Weber S, and Kaufmann R. Genotoxic potential of porphyrin type photosensitizers with particular emphasis on 5-aminolevulinic acid: implications for clinical photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* **2000**; 28:537-548.
- [129] - **Lemasters JJ**, Qian T, He L, KiZ JS, Elmore SP, Cascio WE, and Brenner DA. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal* **2002**; 4:769-781.
- [130] - **Chipuk JE and Green DR**. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?. *Nat Rev Mol* **2005**; 6:268-275.
- [131] - **Lockshin RA and Zakeri Z**. Caspase-independent cell death? *Oncogene* **2004**; 23:2766-2773.
- [132] - **Kroemer G et al**. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ* **2005**; 12:1463-1467.
- [133] - **Calzavara-Pinton P**, Rossi MT, Sala R, and Venturini M. Photodynamic antifungal chemotherapy. *J Photochem Photobiol* **2012**; 88:512-522.
- [134] - **González-Párraga P**, Hernández JA, and Argüelles. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast* **2003**; 20:1161-1169.
- [135] - **Sanglard D**. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* **2002**; 5:379-385.
- [136] - **Edinger AL, and Thompson CB**. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **2004**; 16:663-669.
- [137] - **Agarwal ML**, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, and Oleinick NL. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res* **1991**; 51:5993-5996.
- [138] - **Kim HR**, Luo Y, Li G, and Kessel D. Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after Bcl-2 transfection. *Cancer Res* **1999**; 59:3429-3432.
- [139] - **Kessel D and Castelli M**. Evidence that Bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *J Photochem Photobiol* **2001**; 74:318-322.
- [140] - **Kessel D**. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol Sci* **2002**; 1:837-840.
- [141] - **Yan CH**, Liang ZQ, Gu ZL, Yang YP, Reid P y Qin ZH. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CRTX-induced death of K562 cells. *Toxicol* **2006**; 47:521-530.

- [142] - **Kessel D**, Vicente MG, and Reiners JJ Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* **2006**; 38:482-488.
- [143] - **Klionsky DJ and Emr SD**. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **2000**; 290:1717-1721.
- [144] - **Castelli M**, Reiners JJ Jr, and Kessel D. Mechanism for the proapoptotic activity of ursodeoxycholic acid: effects on Bcl-2 conformation. *Cell Death Differ* **2004**; 11:906-914.
- [145] - **Pattingre S**, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **2005**; 122:927-939.
- [146] - **Nitzan Y**, Gutterman M, Malik Z, and Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *J Photochem Photobiol* **1992**; 55:89-96.
- [147] - **Acher AJ and Juven BJ**. Destruction of coliforms in water and sewage water by dye-sensitized photooxidation. *Appl Environ Microbiol* **1977**; 33:1019-1022.
- [148] - **Minnock A**, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, and Brown SB. Mechanism of uptake of acationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44:522-527.
- [149] - **Dai T**, Huang YY, and Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections. State of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2009**; 6:170-188.
- [150] - **Berthiaume F**, Reiken SR, Toner M, Tompkins RG, and Yarmush ML. Antibodytargeted photolysis of bacteria *in vivo*. *Biotechnology (N Y)* **1994**; 12:703-706.
- [151] - **Gad F**, Zahra T, Francis KP, Hasan T, and Hamblin MR. Targeted photodynamic therapy of established soft-tissue infections in mice. *J Photochem Photobiol Sci* **2004**; 3:451-458.
- [152] - **Embleton ML**, Nair SP, Heywood W, Menon DC, Cookson BD, and Wilson M. Development of a novel targeting system for lethal photosensitization of antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49:3690-3696.
- [153] - **Demidova T, and Hamblin MR**. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol* **2004**; 17:245-254.
- [154] - **Huang L, Dai T, and Hamblin MR**. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods Mol Biol* **2010**; 635:155-173.
- [155] - **Ge LH**, Shu R, and Shen MH. Effect of Photodynamic Therapy on IL-1beta and MMP-8 in gingival crevicular fluid of chronic periodontitis. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* **2008**; 17:10-4.
- [156] - **Piraccini BM**, Rech G, and Tosti A. Photodynamic therapy of onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*. *J Am Acad Dermatol* **2008**; 59:75-76.
- [157] - **Kamp H**, Tietz HJ, Lutz M, Piazena H, Sowyrda P, Lademann J, and Blume-Peytavi U. Antifungal effect of 5-aminolevulinic acid PDT in *Trichophyton rubrum*. *Mycoses* **2005**; 48:101-107.
- [158] - **Gilaberte Y**, Aspiroz C, Martes MP, Alcalde V, Espinel-Ingroff A, and Rezusta A. Treatment of refractory fingernail onychomycosis caused by nondermatophyte molds with methylaminolevulinate photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol* **2011**; 65:669-671.

- [159] - **Wang HW**, Lv T, Zhang LL, Guo MX, Stepp H, Yang K, and Huang ZW. Prospective study of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of moderate to severe *Acne vulgaris* in chinese patients. *J Cutan Med Surg* **2012**; 16:324-333.
- [160] - **Orellana G**, Villén L y Jiménez-Hernández ME. Desinfección mediante fotosensibilizadores: principios básicos en: Blesa M y Blanco J. Solar save water: tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua. Capítulo 15 Escuela de postgrado UNSAM, **2005**.
- [161] - **Wilkinson F**, Helman WP, and Ross AB. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J Phys Chem Ref Data* **1993**; 22:113-262.
- [162] - **Jemli M**, Alouini Z, Sabbahi S, and Gueddari M. Destruction faecal bacteria in wastewater by three photosensitizers. *J Environ Monitoring* **2002**; 4:511-516.
- [163] - **Wainwright M**. The emerging chemistry of blood product disinfection. *Chem Soc Rev* **2002**; 31:128-136.
- [164] - **Politis C**, Kavallierou L, Hantziara S, Katsea P, Triantaphylou V, Richardson C et al. Quality and safety of fresh-frozen plasma inactivated and leucoreduced with the Theraflex methylene blue system including the Blueflex filter: 5 years' experience. *Vox Sang* **2007**; 92:319-326.
- [165] - **Bonnett G**, Buckley DG, Burrow T, Galia AB, Saville B, and Songca SP. photobactericidal materials based on porphyrins and phthalocyanines *J Mater Chem* **1993**; 3:323-324.
- [166] - **Bozja J**, Sherrill J, Michielsen S, and Stojiljkovic I. Porphyrin-based, light-activated antimicrobial materials. *J Polym Sci Polym Chem* **2003**; 41:2297-2303.
- [167] - **Brady C**, Bell SE, Parsons C, Gorman SP, Jones DS, and McCoy CP. Novel porphyrin-incorporated hydrogels for photoactive intraocular lens biomaterials. *J Phys Chem* **2007**; 111:527-534.
- [168] - **Wilson M**. Light-activated antimicrobial coating for the continuous disinfection of surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2003**; 24:782-784.
- [169] - **Lauro FM**, Pretto P, Covolo L, Jori G, and Bertoloni G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. *J Photochem Photobiol Sci* **2002**; 1:468-470.
- [170] - **Zeina B**, Greenman J, Corry D, and Purcell WM. Antimicrobial photodynamic therapy: assessment of genotoxic effects on keratinocytes *in vitro*. *Br J Dermatol* **2003**; 148:229-232.
- [171] - **Cassidy CM**, Tunney MM, McCarron PA, and Donnelly RF. Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B* **2009**; 95:71-80.
- [172] - **Maisch T**, Hackbarth S, Regensburger J, Felgenträger A, Bäumler W, Landthaler M, and Röder B. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *J Dtsch Dermatol Ges* **2011**; 9:360-366.
- [173] - **Mang TS**, Mikulski L, and Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2010**; 7:98-105.
- [174] - **Soukos NS**, Wilson M, Burns T, and Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated *in vitro*. *Lasers Surg Med* **1996**; 18:253-259.

## Introducción

---

- [175] - **Giulio J**, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, and Fantetti L. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* **2006**; 38:468-481.
- [176] - **Borrás Blaso J, Navarro Ruiz A y González Delgado M**. Hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) Farmacia Hospitalaria, Copyright® Arán Ediciones, **2001**.
- [177] - **Wagner H and Bladt S**. Pharmaceutical quality of *Hypericum perforatum* extracts. *J Geriatr Psychiatry Neurol* **1994**; 7:65-68.
- [178] - **Karioti A and Bilia AR**. Hypericins as potential leads for new therapeutics *Int J Mol Sci* **2010**; 11:562-594.
- [179] - **Mauri P and Pietta P**. High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of *Hypericum perforatum* extracts. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2000**; 14:95-99.
- [180] - **Pace N and Mackinney G**. Hypericin, the photodynamic pigment from St. John's wort. *J Am Chem Soc* **1941**; 63:2570-2574.
- [181] - **Giese AC**. Hypericium. *J Photochem Photobiol ReV* **1980**; 5:229-255.
- [182] - **Theodossiou TA**, Hothersall JS, De Witte PA, Pantos A, and Agostinis P. The multifaceted photocytotoxic profile of hypericin. *Mol Pharm* **2009**; 6:1775-1789.
- [183] - **Etzlstorfer C**, Falk H, Müller N, Schmitzberger W, and Wagner UG. Tautomerism and stereochemistry of hypericin: force field, nmr, and X-ray crystallographic investigations. *Monatsh Chemie* **1993**; 124:751-761.
- [184] - **Bánó G**, Stanicová J, Jancura D, Marek J, Bánó M, Ulicny J, Strejcková A y Miskovsky P. On the diffusion of hypericin in dimethylsulfoxide/water mixtures; the effect of aggregation. *J Phys Chem B* **2011**; 115:2417-2423.
- [185] - **Lavie G**, Mazur Y, Lavie D, and Meruelo D. The chemical and biological properties of hypericin-a compound with a broad spectrum of biological activities. *Med Res ReV* **1995**; 15:111-119.
- [186] - **Yamazaki T**, Ohta N, Yamazaki I, and Song PS. Excited-state properties of hypericin: electronic spectra and fluorescence decay kinetics. *J Phys Chem* **1993**; 97:7870-7875.
- [187] - **Zhao J**, Meng W, Miao P, Yu Z, and Li G. Photodynamic effect of hypericin on the conformation and catalytic activity of hemoglobin. *Int J Mol Sci* **2008**; 9:145-153.
- [188] - **Head CS**, Luu Q, Sercarz J, and Saxton R. Photodynamic therapy and tumor imaging of hypericin-treated squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol* **2006**; 4:87.
- [189] - **Falk H and Meyer J**. On the homo- and heteroassociation of hypericin. *Monatsh Chemie* **1994**; 125:753-762.
- [190] - **Kapinus EI**, Falk H, and Tran HTN. Spectroscopic investigation of the molecular structure of hypericin and its salts. *Monatsh Chemie* **1999**; 130:623-635.
- [191] - **Shen L**, Ji HF, and Zhang HY. Anion of hypericin is crucial to understanding the photosensitive features of the pigment. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**; 16:1414-1417.
- [192] - **Gai F**, Fehr MJ, and Petrich JW. Observation of excited-state tautomerization in the antiviral agent hypericin and identification of its fluorescent species. *J Phys Chem* **1994**; 98:5184-5195.
- [193] - **English DS**, Zhang W, and Kraus GA. Petrich. J.W. Excited-state photophysics of hypericin and its hexamethoxy analog: intramolecular proton transfer as a nonradiative process in hypericin. *J Am Chem Soc* **1997**; 119:2980-2986.

## Introducción

---

- [194] - **Kersten B**, Zhang J, Bendler-Schwaab SY, Kasper P, and Muller L. The application of the micronucleus test in chinese hamster v79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutat Res* **1999**; 445:55-71.
- [195] - **MacRobert AJ and Theodossiou T**. Photodynamic therapy of cancer en: Guenther RD and Steel DG Encyclopedia of modern optics. Elsevier, **2004**.
- [196] - **Hadjur C**, Jeunet A, and Jardon P. Photosensitization by hypericin: electron spin resonance (ESR). evidence for the formation of singlet oxygen and superoxide anion radicals in an *in vitro* model. *J Photochem Photobiol B* **1994**; 26:67-74.
- [197] - **Hadjur C**, Richard MJ, Parat MO, Jardon P, and Favier A. Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *J Photochem Photobiol* **1996**; 64:375-381.
- [198] - **Diwu Z and Lown JW**. Photosensitization with anticancer agents. EPR studies of photodynamic action of hypericin: formation of semiquinone radical and activated oxygen species on illumination. *Free Radical Biol Med* **1993**; 14:209-215.
- [199] - **Malkin J**, and Mazur Y. Hypericin derived triplet states and transients in alcohols and water. *J Photochem Photobiol* **1993**; 57:929-933.
- [200] - **Rahimipour S**, Palivan C, Barbosa F, Bilkis I, Koch Y, Weiner L, Fridkin M, Mazur Y, and Gescheidt G. Chemical and photochemical electron transfer of new helianthrone derivatives: aspects of their photodynamic activity. *J Am Chem Soc* **2003**; 125:1376-1384.
- [201] - **Rahimipour S**, Palivan C, Freeman D, Barbosa F, Fridkin M, Weiner L, Mazur Y, and Gescheidt G. Hypericin derivatives: substituent effects on radical-anion formation. *J Photochem Photobiol* **2001**; 74:149-156.
- [202] - **Lajos G**, Jancura D, Miskovsky P, García-Ramos JV, and Sanchez-Cortes S. Surface-enhanced fluorescence and raman scattering study of antitumoral drug hypericin: an effect of aggregation and self-spacing depending on pH. *J Phys Chem C* **2008**; 112:12974-12980.
- [203] - **Darmany AP** et al. Quenching of excited triplet state hypericin with energy acceptors and donors and acceptors of electrons. *J Phys Chem B* **1999**; 103:3323-3331.
- [204] - **Falk H**. From the photosensitizer hypericin to the photoreceptor stentorin. The chemistry of phenanthroperylene quinones. *Angew Chem Int Ed Engl* **1999**; 38:3116-3136.
- [205] - **Uzdensky AB**, Iani V, Ma LW, and Moan J. Photobleaching of hypericin bound to human serum albumin, cultured adenocarcinoma cells and nude mice skin. *J Photochem Photobiol* **2002**; 76:320-328.
- [206] - **D'Hallewin MA**, Kamuhabwa AR, Roskams T, De Witte PA, and Baert L. Hypericin-based fluorescence diagnosis of bladder carcinoma. *BJU Int* **2002**; 89:760-763.
- [207] - **Miskovsky P**. Hypericin - a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Curr Drug Targets* **2002**; 3:55-84.
- [208] - **Agostinis P**, Vantiegheem A, Merievede W, and de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* **2002**; 34:221-241.
- [209] - **Blank M**, Mandel M, Hazan S, Keisari Y, and Lavie G. Anti-cancer activities of hypericin in the dark. *J Photochem Photobiol* **2001**; 74:120-125.

## Introducción

---

- [210] - **Du HY**, Bay BH, and Olivo M. Biodistribution and photodynamic therapy with hypericin in a human NPC murine tumor model. *Int J Oncol* **2003**; 22:1019-1024.
- [211] - **Hudson JB**, Lopez-Bazzocchi I, and Towers GH. Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res* **1991**; 15:101-112.
- [212] - **Takahashi I**, Nakanishi S, Kobayashi E, Nakano H, Suzuki K, and Tamaoki T. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase c: possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**; 165:1207-1212.
- [213] - **Utsumi T**, Okuma M, Utsumi T, Kanno T, Yasuda T, Kobuchi H, Horton AA, and Utsumi K. Light-dependent inhibition of protein kinase c and superoxide generation of neutrophils by hypericin, an antiretroviral agent. *Arch Biochem Biophys* **1995**; 316:493-497.
- [214] - **Lavie G**, Mazur Y, Lavie D, Prince AM, Pascual D, Liebes L, Levin B, and Meruelo D. Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components. *Transfusion* **1995**; 35:392-400.
- [215] - **Lavie G**, Valentine F, Levin B, Mazur Y, Gallo G, Lavie D, Weiner D, and Meruelo D. Studies of the mechanisms of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci* **1989**; 86:5963-5967.
- [216] - **Meruelo D, Lavie G, and Lavie D**. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc Natl Acad Sci* **1988**; 85:5230-5234.
- [217] - **Stevenson NR, and Lenard J**. Antiretroviral activities of hypericin and rose bengal: photodynamic effects on friend leukemia virus infection of mice. *Antiviral Res* **1993**; 21:119-127.
- [218] - **Gulick RM**, McAuliffe V, Holden-Wiltse J, Crumpacker C, Liebes L, Stein DS, Meehan P, Hussey S, Forcht J, and Valentine FT. Phase I studies of hypericin, the active compound in St. John's Wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults. AIDS clinical trials group protocols 150 and 258. *Ann Intern Med* **1999**; 130:510-524.
- [219] - **Kubin A**, Wierrani F, Jindra RH, Loew HG, Grünberger W, Ebermann R, and Alth G. Antagonistic effects of combination photosensitization by hypericin, meso-tetrahydroxyphenylchlorin (m-THPC) and Photofrin II on *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exp Clin Res* **1999**; 25:13-21.
- [220] - **Avato P**, Raffo F, Guglielmi G, Vitali C, and Rosato A. Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity. *Phytother Res* **2004**; 18:230-242.
- [221] - **Cecchini C**, Cresci A, Coman MM, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Lucarini D, and Maggi F. Antimicrobial activity of seven *Hypericum* entities from central Italy. *Planta Med* **2007**; 73:564-566.
- [222] - **Lüthia M**, Gyenge EB, Engstrüma M, Bredell M, Grätz K, Walzb H, Gmürc R, and Maakea C. Hypericin and m-THPC-Mediated photodynamic therapy for the treatment of cariogenic bacteria. *Med Laser Appl* **2006**; 4:227-236.
- [223] - **Engelhardt V**, Krammer B, and Plaetzer K. Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or m-THPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *J Photochem Photobiol Sci* **2010**; 9:365-369.
- [224] - **Gilaberte Y**, Serra-Guillén C, de las Heras ME, Ruiz-Rodríguez R, Fernández-Lorente M, Benvenuto-Andrade C, González-Rodríguez S, and Guillén-Barona C. Photodynamic therapy in dermatology. *Actas Dermosifiliogr* **2006**; 97:83-102.
- [225] - **Kamuhabwa AR**, Geboes KR y De Witte PA. Investigation of the absorption of hypericin into the skin of hairless mice. *J Pharm Pharmacol* **2000**; 52:487-494.
- [226] - **Kamuhabwa AR**, Roelandts R y De Witte PA. Skin photosensitization with topical hypericin in hairless mice, *J Photochem Photobiol B* **1999**; 53:110-114.

- [227] - **Saw CL**, Olivo M, Soo KC, and Heng PW. Delivery of hypericin for photodynamic applications. *Cancer Lett* **2006**; 241:23-30.
- [228] - **Uzdensky AB**, Ma LW, Iani V, Hjortland GO, Steen HB, and Moan J. Intracellular localisation of hypericin in human glioblastoma and carcinoma cell lines. *Lasers Surg Med* **2001**; 16:276-283.
- [229] - **English DS**, Doyle RT, Petrich JW, and Haydon PG. Subcellular distributions and excited-state processes of hypericin in neurons. *J Photochem Photobiol* **1999**; 69:301-305.
- [230] - **Dauids LM**, Kleemann B, Kacerovska D, Pizinger K, and Kidson SH. Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. *J Photochem Photobiol B* **2008**; 91:67-76.
- [231] - **Galanou M.**, Theodossiou TA, Tsiourvas D, Sideratou Z, and Paleos CM. Interactive transport, subcellular relocation and enhanced phototoxicity of hypericin encapsulated in guanidinylated liposomes via molecular recognition. *J Photochem Photobiol* **2008**; 84:1073-1083.
- [232] - **Ali SM y Olivo M**. Bio-Distribution and subcellular localization of hypericin and its role in pdt induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* **2002**; 21:531-40.
- [233] - **Buytaert E**, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, Vandenhede JR, Heirman I, Grooten J, and Agostinis P. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic bax and bak proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J* **2006**; 20:756-758.
- [234] - **Thomas C**, MacGill RS, Miller GC, Pardini RS. Photoactivation of hypericin generates singlet oxygen in mitochondria and inhibits succinoxidase. *J Photochem Photobiol* **1992**; 55:47-53.
- [235] - **Buytaert E**, Dewaele M, and Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* **2007**; 1776:86-107.
- [236] - **Ali SM and Olivo M**. Bio-distribution and subcellular localization of hypericin and its role in pdt induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* **2002**; 21:531-540.
- [237] - **Theodossiou TA**, Papakyriakou A, and Hothersall JS. Molecular modeling and experimental evidence for hypericin as a substrate for mitochondrial complex III; mitochondrial photodamage as demonstrated using specific inhibitors. *Free Radical Biol Med* **2008**; 45:1581–1590.
- [238] - **Osyczka A**, Moser CC, and Dutton PL. Fixing the Q cycle. *Trends Biochem Sci* **2005**; 30:176–82.
- [239] - **Miccoli L**, Beurdeley-Thomas A, De Pinieux G, Sureau F, Oudard S, Dutrillaux B, and Poupon MF. Light-induced photoactivation of hypericin affects the energy metabolism of human glioma cells by inhibiting hexokinase bound to mitochondria. *Cancer Res* **1998**; 58:5777-5786.
- [240] - **Shoshan-Barmatz V**, Zakar M, Rosenthal K, and Abu-Hamad S. Key Regions of VDAC1 functioning in apoptosis induction and regulation by hexokinase. *Biochim Biophys Acta* **2009**; 1787:421-430.
- [241] - **Chaloupka R**, Petit PX, Israël N, and Sureau F. Over-expression of Bcl-2 does not protect cells from hypericin photo-induced mitochondrial membrane depolarization, but delays subsequent events in the apoptotic pathway. *FEBS Lett* **1999**; 462:295-301.
- [242] - **Schempp CM**, Simon-Haarhaus B, Termeer CC, and Simon JC. Hypericin photo-induced apoptosis involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8. *FEBS Lett* **2001**; 493:26-30.

[243] - **Ali SM**, Chee SK, Yuen GY, Olivo M. Hypericin induced death receptor-mediated apoptosis in photoactivated tumor cells. *Int J Mol Med* **2002**; 9:601-616.







## **Objetivos del estudio**

---

### **Objetivo general**

Evaluar el potencial de la Hipericina (HIP) en la TFD antifúngica *in vitro* frente a los hongos que con mayor frecuencia producen patología cutánea; tal es el caso de los hongos dermatofitos del género *Trichophyton* spp. y levaduras del género *Candida* spp. y *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Objetivos secundarios**

- Estudiar de la capacidad antifúngica *in vitro* de la TFD con HIP sobre especies de levaduras patógenas cutáneas del género *Candida*, tanto sensibles como resistentes a azoles.
- Estudiar la capacidad antifúngica *in vitro* de la TFD con HIP sobre los dermatofitos que más frecuentemente causan micosis cutáneas: *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.
- Estudiar la influencia que ejercen sobre la efectividad de la TFD con HIP factores externos, como el pH, la presencia de sales o la clase de medio empleado.
- Estudiar del patrón de especies reactivas de oxígeno (EROs) generado durante el proceso de TFD *in vitro* con HIP sobre levaduras que ocasiona la fototoxicidad mediante el empleo de:
  - inhibidores de especies EROs
  - citometría de flujo
- Estudiar la toxicidad de la TFD con HIP en las células humanas cutáneas (queratinocitos HaCaT y fibroblastos hNDF).
- Estudiar de la incorporación (uptake) de la HIP a levaduras y células

humanas a lo largo del tiempo.

- Estudiar la localización celular de la HIP en las especies de hongos y levaduras estudiados así como en las células cutáneas humanas.
- Detectar marcadores de muerte celular en células tratadas con TFD *in vitro* con HIP.



# **Materiales y Métodos**

## **Materiales**

### **Reactivos utilizados**

---

#### **a. Reactivos comunes**

Suero fisiológico salino estéril (SSF) y agua destilada estéril no tamponada (pH ~ 5,5) ambos de Fresenius Kabi<sup>®</sup> (Spain). Etanol (70 % v / v) de Alcohocel (Spain). Dimetil sulfóxido (DMSO) de Panreac<sup>®</sup> (Barcelona, Spain). Tampón salino de fosfato estéril (PBS) de Bio-Rad<sup>®</sup> Laboratories, (Redmond, WA 98052, USA). Tampón salino de fosfato Dulbecco estéril (PBS). Bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-yl]-2,5- difenil-tetrazolio (MTT) de Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, MO, USA). Kit de ensayo Pierce BCA Protein de ThermoScientific (Waltham, MA, USA).

#### **b. Inhibidores de especies reactivas de oxígeno EROs**

Catalasa (CAT) (inhibidor del peróxido de hidrógeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), súper óxido dismutasa (SOD) (inhibidor del anión superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup>) de Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, MO, USA). Azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) (inhibidor del oxígeno singlete <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) y Manitol (MAN) (inhibidor del radical hidroxilo OH<sup>-</sup>), ambos de Panreac<sup>®</sup> (Barcelona, Spain). Las disoluciones Stock de cada inhibidor fueron preparadas en PBS y fueron conservadas en oscuridad a -20 °C.

### **c. Sondas fluorescentes**

#### **i. Marcadores en microscopía de fluorescencia**

MitoTracker<sup>®</sup> Green (MTG) (Ref. M7514), MitoTracker<sup>®</sup> Red (Ref. M7153) y DiOC<sub>6</sub><sup>®</sup> (Ref. D273) (marcadores mitocondriales), CellTracker<sup>®</sup> Green (CTG) (Ref. C2925) (marcador celular general), DAPI<sup>®</sup> (Ref.D3571) y Hoechst<sup>®</sup> 33342 (Ref. H3570) (marcadores nucleares) y Lysotracker<sup>®</sup> Green (LTG) (Ref. L7526) (marcador lisosomal), de Life Technologies<sup>™</sup>, Invitrogen<sup>™</sup>, Molecular Probes<sup>®</sup> (USA).

#### **ii. Marcadores específicos para citometría de flujo**

- Sondas detectoras de EROs: 2HE (Dihidroxietidio) (medición de superóxido) y DCFA (diclorohidrofluoresceína diacetato C 2398) (medición de peróxidos).de Life Technologies<sup>™</sup>, Invitrogen<sup>™</sup>, Molecular Probes<sup>®</sup> (USA).
- Sondas detectoras de señales de muerte celular: Anexina V FITC y 7AAD (7-Amino-actinomicina D: marcador de DNA. No puede penetrar en células sanas) de Immunostep<sup>™</sup>, España y Hoechst<sup>®</sup> 33342 (Ref. H3570) de Life Technologies<sup>™</sup>, Invitrogen<sup>™</sup>, Molecular Probes<sup>®</sup> (USA).

### **d. Medios de cultivo**

#### **i. Sabouraud<sup>®</sup> dextrosa agar**

pH 5,6 ± 0,2 CM0041 de Oxoid LTD by ThermoScientific (Hampshire, England) suplementado con Chloranphenicol<sup>®</sup> a 50 mg / L Sigma<sup>®</sup> (St. Louis, USA) (SB).

#### **ii. Medio Sabouraud<sup>®</sup> dextrosa líquido**

pH ~5,5: Fabricación propia con agua destilada (1.000 mL), glucosa (40 g) y peptona bacteriológica (10 g) con Chloranphenicol<sup>®</sup> a 50 mg / L Sigma<sup>®</sup> (St. Louis, USA) (SBL). El medio se prepara calentando los ingredientes mediante una estufa eléctrica con agitador magnético hasta alcanzar la ebullición; posteriormente, se retira del calor y se esteriliza en un autoclave a 121 °C durante 15 min.

#### **iii. Medio para cultivo de células animales HaCaT y hNDF**

Medio Eagle modificado Dulbecco (DMEM) pH 7,0-7,4 suplementado (suero fetal bobino (FBS) 10 % v / v, L-glutamina 2 mM, Penicilina estreptomycin 1% v / v) disolución (South American).

## **Disoluciones del Fotosensibilizante**

---

La disolución Stock de hipericina (HIP) Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, MO, USA) y HWI Analytik<sup>®</sup> GmbH (Ruelzheim, Germany) se realizó en Etanol (70 % v / v) la de Sigma-Aldrich<sup>®</sup> y en DMSO la adquirida de HWI Analytik<sup>®</sup> GmbH y fue conservada en oscuridad repartida en viales de 50 µL a -20 °C.

#### **i. Estudios con levaduras y dermatofitos**

Las disoluciones de trabajo fueron realizadas partiendo del stock diluido en agua destilada estéril y en disolución de tampón PBS (pH=

## **Materiales y Métodos**

---

7,2-7,3). Las concentraciones utilizadas en los experimentos estuvieron en el rango de 0,31 a 640  $\mu$ M.

### **ii. Estudios con células humanas**

Las disoluciones de trabajo de HIP fueron preparadas partiendo del stock diluido con medio DMEM suplementado pero sin FBS. Las concentraciones utilizadas en los experimentos estuvieron en el rango de 0 a 10  $\mu$ M.

## **Microorganismos y células**

---

### **a. Especies aisladas de pacientes**

Especies resistentes a azoles: *C. albicans* AZN9635, 456325H y AM07/0267 y *C. rugosa* YFJ002-29. Estas cepas fueron adquiridas del Hospital Canisius Wilhemina (Nijmegen, The Netherlands).

### **b. Especies de colección**

Especies adquiridas de las colecciones de cultivos americanos (ATCC) y españoles (CECT):

ATCC: American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA).

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (Universitat de Valencia, España).

#### **i. Levaduras**

*C. parapsilosis* ATCC-22019, *C. krusei* ATCC-6258, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC-9763 y *C. albicans* ATCC-10231 y CECT-1001.

#### **ii. Dermatofitos**

*T. rubrum* ATCC-28188, *T. mentagrophytes* ATCC-9533.

### **iii. Células humanas**

Queratinocitos (ATCC PCS-200-011; Human adult high Calcium low Temperature keratinocytes [HaCaT]) y fibroblastos (ATCC PCS-201-012; human Normal Dermal Fibroblasts [hNDF]).

## **Instrumentación**

---

### **a. Fuentes de luz**

#### **i. Estudios de TFD *in vitro* con levaduras y dermatofitos**

Se empleó una lámpara que montaba LEDs de la casa comercial Zydoled<sup>®</sup> de luz ámbar con una longitud de onda de  $602 \pm 10$  nm y una irradiancia de  $10,3 \text{ mW.cm}^{-2}$ . Las irradiaciones fueron realizadas a 5 cm de distancia. Fueron utilizadas fluencias de 18 y 37 Joules /  $\text{cm}^2$  ( $\text{J.cm}^{-2}$ ).

#### **ii. Estudios *in vitro* con células humanas**

Los Queratinocitos y fibroblastos fueron irradiados utilizando una lámpara de LEDs genéricos a  $593 \pm 10$  nm con una irradiancia de  $9 \text{ mW.cm}^{-2}$ .

### **b. Medidas turbidimétricas**

Para la realización de los inóculos de trabajo se empleó un espectrofotómetro (colorímetro) DINKO<sup>®</sup> D-100 Código 1.9301.00 con rango de longitud de onda entre 420 nm y 680 nm y portacubetas redondo de 16 mm. El dispositivo contó con medición de la turbidez por escala McFarland (McF).

### **c. Microscopía y toma de imágenes**

#### **i. Visualización de las muestras *in vitro***

Microscopio confocal de Fluorescencia Olympus Fluoview FV10i. Las imágenes fueron recogidas utilizando el modo secuencial del microscopio con el objetivo de aceite de inmersión 63x y con calidad de 1024x1024 píxeles, empleando diferentes modalidades de zoom digital para amplificar la imagen. Las imágenes fueron exportadas desde el software del microscopio FV10i a Adobe Photoshop Illustrator para realizar las figuras que aquí se exponen.

#### **ii. Visualización de las muestras *in vivo***

Microscopio invertido de fluorescencia Olympus BX61 acoplado a una cámara de captura digital Olympus DP50. Las imágenes fueron exportadas a Adobe Photoshop Illustrator para realizar las figuras que aquí se exponen.

### **d. Estudios por citometría de flujo**

Tanto las pruebas de caracterización de EROs como la constatación del tipo de muerte celular provocada por la TFA en levaduras fueron realizadas en un citómetro de flujo modelo BD FACS Calibur™.

## **Métodos**

### **Cultivos y condiciones de crecimiento**

#### **a. Cultivo de levaduras**

Para la realización de los estudios de TFD y localización celular, las especies fueron cultivadas en SB durante 24 h a 35 °C y en condiciones aerobias mediante siembra por aislamiento. Para la evaluación del efecto de la TFD la siembra de las muestras se realizó bajo las mismas condiciones pero empleando un tiempo de incubación de 48 h. mediante siembra por recuento.

En el uptake de la HIP, se utilizaron condiciones de crecimiento especiales: las levaduras se cultivaron 24 h. en medio SBL y con una agitación de 200 rpm; después se centrifugó y se cambió el medio por SBL fresco y se volvió a cultivar bajo las mismas condiciones hasta que alcanzó  $\sim 1 \times 10^6$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC / mL).

### **b. Cultivo de dermatofitos**

Tanto para la realización de los estudios como para la evaluación de los resultados, las especies fueron cultivadas de 7-12 días en SB a 30 °C en condiciones aerobias. El método de siembra fue en masa, intentando ocupar toda la superficie del medio.

### **c. Cultivo de células humanas**

HaCaT y hNDF fueron cultivados en recipientes T-25 flask y T-75 flask, respectivamente, durante 2 días a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Los medios de cultivo utilizados fueron DMEM suplementado.

## **Preparación de suspensiones celulares**

---

### **a. Preparación de los inóculos de levaduras y dermatofitos**

Las suspensiones fueron realizadas dependiendo del experimento en diferentes diluyentes:

- TFD *in vitro*: agua destilada estéril (pH ~ 5,5).
- formación de EROs en la TFD en levaduras: PBS estéril (pH= 7,2-7,3) (experimento realizado sobre levaduras).
- localización intracelular de HIP por microscopía confocal en levaduras: SBL pH ~ 5,5.

Todos los inóculos partieron de los cultivos de cada microorganismo ajustados a las condiciones de siembra antes citadas. Las preparaciones fueron llevadas a cabo bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

### **i. Inóculo de levaduras**

Se prepara un “autozero” en un tubo (un blanco) en el espectrofotómetro solo empleando el diluyente. Tocando ligeramente colonias separadas en el cultivo mediante un asa de siembra estéril, se hace una suspensión celular en el tubo “autozero”. Utilizando un vortex se homogeneiza la suspensión de las células en un tubo donde se realizará la medida espectrofotométrica. Se ajustaron los inóculos a las medidas de 0,5 o de 4 ( $\pm 0,05$ ) McF, correspondientes a concentraciones celulares de  $\sim 1 \times 10^6$  UFC / mL y  $\sim 1 \times 10^7$  UFC / mL respectivamente. En ese orden fueron empleados los inóculos para los estudios de reducción de 3 y 6 Log, respectivamente.

### **ii. Inóculo de microconidios de dermatofitos**

Se vierte una pequeña cantidad de agua destilada estéril sobre el cultivo esporulado de cada hongo; mediante un asa de siembra esterilizada se raspó la superficie del mismo para arrastrar las microconidias. Posteriormente, utilizando una pipeta de plástico estéril, se recogió la suspensión resultante que se vertió en un recipiente estéril y se vortió. Con el objeto de descartar las posibles hifas arrastradas debido al raspado, la disolución se hizo pasar dos veces por un filtro compuesto por gasas estériles y se recogió en otro recipiente donde se realiza la medida espectrofotométrica. En el mismo tubo ya se había hecho previamente un blanco solo con el diluyente. Como prueba de la eficacia del filtrado, se hizo una observación previa de los inóculos en un microscopio óptico; en el caso de observar hifas, el inóculo procedería a ser filtrado una vez más y volvería a ser ajustada su densidad óptica. Al solo realizarse estudios de reducción de 3 Log, se buscó obtener una turbidez de 0,5 ( $\pm 0,05$ ) McF equivalente a una concentración ajustada a un rango entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  UFC / mL, dependiendo del hongo [1,2].

### **iii. Preparación de los inóculos de levaduras para la realización del Uptake**

Como se ha mencionado anteriormente en el apartado de cultivos, las levaduras se cultivaron 24 h. en medio SBL y con una agitación de 200 rpm; después se centrifugó y se le cambió el medio por SBL fresco y se volvió a cultivar bajo las mismas condiciones hasta que alcanzó  $\sim 1 \times 10^6$  UFC / mL .

### **iv. Preparación de los inóculos de células animales**

Tanto para los estudios de TFD, como para el uptake, transcurridos 2 días después del cultivo inicial, el 80 % de las células confluentes fueron tripsinizadas para despegarlas de los recipientes de cultivo y se cultivaron 2 días más a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % en placas de 48 pocillos hasta alcanzar la concentración de  $\sim 1 \times 10^6$  células / pocillo.

## **Incorporación (uptake) de HIP en células**

### **a. Especies Empleadas en el estudio**

#### **i. Levaduras**

*C. parapsilosis* ATCC-22019, *C. krusei* ATCC-6258, *C. albicans* ATCC-10231 y CECT-1001.

#### **ii. Células humanas**

[HaCaT] ATCC PCS-200-011 y [hNDF] ATCC PCS-201-012.

### **b. Uptake en levaduras**

El uptake de la HIP en levaduras se realizó partiendo de cultivos de las mismas en SBL medido con el tiempo en un espectrofotómetro hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC / mL. Las suspensiones stock fueron lavadas tres veces con PBS estéril centrifugando a 3.000 rpm (1.400 g) 3 minutos para retirar el medio de cultivo. Tras el tercer lavado, las células fueron resuspendidas en una disolución de FS (realizada con PBS estéril) con una concentración de 5  $\mu$ M de HIP. Inmediatamente

después de la adición, las nuevas suspensiones de células con el FS fueron mantenidas en oscuridad durante diferentes periodos de tiempo, teniendo una muestra diferente para cada tiempo (30 min., 1, 3, 5, 7, 18, 19 y 24 h.) a una temperatura de 37 °C y en condiciones de agitación suave (120 rpm). Pasado cada tiempo de incubación, se descartó nuevamente el medio con el FS lavando las células tres veces con PBS para eliminar la HIP aun presente en el medio no asociada o internalizada en las células (utilizando las mismas condiciones de centrifugación descritas arriba). El pellet final que contenía las células fue resuspendido en una disolución de dodecil sulfato sódico (SDS) en agua al 2 % (1 mL). Finalmente, la muestra se mantuvo en agitación 120 rpm durante 24 h. en condiciones de temperatura ambiente y en oscuridad. Mediante este proceso nos asegurábamos el completo lisado de las células.

La cantidad de FS incorporado por las células a cada tiempo de incubación fue obtenida por espectroscopia de fluorescencia excitando el lisado a 530 nm y recogiendo el espectro de emisión (fluorescencia) en el rango de 550-750 nm. Fue utilizado un método de integración (Jobin-Yvon Spex Fluoromax 4 spectrofluorometer) para calcular el área bajo la curva de cada espectro de fluorescencia a cada diferente tiempo de contacto del FS con las células.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

### **c. Uptake en células animales**

El uptake de la HIP en células humanas partió de una siembra de las mismas en placas de titulación microtiter de 6 pocillos en medio DMEM suplementado. Transcurridos los 2 días de siembra se alcanzó una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ pocillo. Al encontrarse adheridas las células al pocillo, éstas fueron lavadas dos veces por pipeteado con PBS para retirar el medio de cultivo. El pellet final que contenía a las

células fue resuspendido en medio DMEM fresco suplementado sin FBS y con HIP a una concentración de 2,5  $\mu$ M. Inmediatamente después, las células fueron incubadas en oscuridad durante diferentes periodos de tiempo, teniendo una muestra para cada tiempo (30 min., 1, 2, 6, 8, 18 y 24 h.) a 37 °C y con una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5 %. Pasado cada tiempo de incubación, las células fueron lavadas tres veces con PBS para retirar la HIP presente en el medio y no asociada o internalizada en las células. Tras esto, las células fueron raspadas para separarlas del pocillo y lisadas con una disolución de SDS al 2 % en agua (1mL). El lisado se realizó con agitación de 120 rpm durante 24 h. a temperatura ambiente y en oscuridad.

La evaluación de la cantidad de HIP incorporada por las células fue obtenida por espectroscopía de fluorescencia siguiendo el mismo método que el descrito en el uptake de las levaduras. Los valores de intensidad de la fluorescencia obtenidos para cada muestra fueron referidos por normalización al número total de células en cada pocillo para corregir las variaciones existentes entre las diferentes muestras. Para este fin se utilizó el ensayo “bicinchoninic acid protein” (BCA) o también llamado ensayo de Smith [3].

Los experimentos fueron realizados por triplicado para cada condición.

## **TFD *in vitro* con HIP sobre hongos**

### **a. Especies empleadas en el estudio**

#### **i. Levaduras**

*C. albicans* AZN9635, 456325H, AM07/0267, ATCC-10231 y CECT-1001, *C. rugosa* YFJ002-29, *C. parapsilosis* ATCC-22019, *C. krusei* ATCC-6258 y *S. cerevisiae* ATCC-9763.

### **ii. Dermatofitos**

*T. rubrum* ATCC-28188, *T. mentagrophytes* ATCC-9533.

### **b. Preparación de las muestras**

Tanto los estudios realizados con levaduras como con dermatofitos partieron de volúmenes variables de cada inóculo realizados en agua destilada estéril (pH ~ 5,5). El volumen dependió de la concentración de FS requerida [2, 4]. Los inóculos fueron depositados en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Dichos inóculos fueron mezclados con disoluciones de HIP de diferentes concentraciones. Se alcanzó una cantidad aproximada de células en cada pocillo de:

Front

#### **i. Inóculos de 0,5 en la escala McF**

~  $1 \times 10^5$  células/ pocillo en el caso de levaduras y  $0,5-1 \times 10^5$  células/ pocillo en el caso de dermatofitos.

#### **ii. Inóculos de 4 en la escala McF**

~  $1 \times 10^6$  células / pocillo para levaduras. En el caso de dermatofitos, este experimento no llegó a realizarse.

La HIP se testó para levadura en diluciones seriadas de 0,32 a 640  $\mu\text{M}$  dependiendo de las necesidades para cada especie y del tipo de inóculo) y entre 5 y 200  $\mu\text{M}$  en el caso de los dermatofitos. Tras la adición del FS, las placas fueron mantenidas a oscuridad y a 35 °C durante diferentes periodos de tiempo para las levaduras: 1, 15, 30, 60 min., 3, 5 h. y 24 h. y 1, 15, 30, 60 min para los dermatofitos. Este parámetro permite evaluar la influencia del tiempo de contacto del FS en el tratamiento fotodinámico.

### **c. Tratamiento fotodinámico**

Las células fueron sometidas a iluminación LED utilizando dosis de luz aproximadas de 18 ó 37 J.cm<sup>-2</sup> para levaduras y 37 J.cm<sup>-2</sup> para el caso de dermatofitos. Atendiendo a las condiciones de irradiancia de la lámpara empleada, las muestras fueron irradiadas a una distancia de 5 cm de la fuente de iluminación durante un tiempo aproximado de 30 min. para el caso de 18 J.cm<sup>-2</sup> y de 60 min. para el caso de la fluencia de 37 J.cm<sup>-2</sup>.

### **d. Siembra de los inóculos irradiados**

Finalizado el tratamiento fotodinámico, los volúmenes de los inóculos irradiados fueron cultivados en su totalidad:

#### **i. Levaduras**

Cultivadas en recuento en placas SB durante 48 h. a 35 °C, en condiciones aerobias.

#### **ii. Dermatófitos**

Cultivados en placas de SB por recuento durante al menos 96 h. a 30 °C, en condiciones aerobias. Las placas fueron precintadas con parafilm para evitar contaminaciones.

### **e. Controles empleados**

En estos ensayos se utilizaron tres tipos de controles:

#### **i. Control 1**

Inóculo inicial sin iluminación LED y sin FS: Control de referencia respecto del cual se refieren los resultados de las muestras tratadas con TFD.

#### **ii. Control 2**

Inóculo inicial con iluminación LED y sin FS: evaluación de la toxicidad de la luz sin FS.

### **iii. Control 3**

Inóculo inicial sin iluminación LED y con FS: evaluación de la toxicidad del FS en oscuridad. Uso de las concentraciones empleadas del FS que provocaron la inhibición deseada.

Los controles 1 y 2 de este ensayo, para poder realizar el recuento de colonias se realizaron por dilución de cada inóculo inicial en el diluyente correspondiente:

- diluciones de 1 / 1.000 y 1 / 10.000 en el caso de los inóculos de levaduras y dermatofitos correspondientes a un 0,5 en la escala McF.
- diluciones de 1 / 10.000 y 1 / 100.000 en el caso de los inóculos de levaduras y dermatofitos correspondientes a un 4 en la escala McF.

Para el caso del control 3, se emplearon las mismas condiciones de diluciones pero los inóculos fueron preparados conteniendo las mismas concentraciones de HIP que las utilizadas para cada cepa en las muestras.

Los controles fueron sometidos a los mismos tiempos de incubación que las muestras y fueron cultivados en SB (48 h. a 35 °C para levaduras y 96 h. a 30 °C para dermatofitos) en condiciones aerobias y realizando una siembra por recuento.

Con el objeto de afianzar la fiabilidad de los controles, en los estudios iniciales se hicieron recuentos de los inóculos nada más realizarlos en una cámara de Neubauer.

Tanto la manipulación de las disoluciones del FS, como la de las muestras y controles antes de aplicar el tratamiento fotodinámico completo, se realizó en condiciones de oscuridad parcial para asegurar la mínima desactivación del FS.

El efecto de inhibición deseado sobre las cepas fue evaluado contando el número de colonias en las placas de muestras y control. Con ello se estableció la concentración UFC / mL antes y después de la terapia con lo que se pudieron establecer los Logs de inhibición [5].

Para establecer la inhibición en términos de actividad fungicida, fue adoptado el criterio de una inhibición del 99,9 % o reducción de 3 unidades logarítmicas (3 Log) con respecto a la muestra inicial. Este criterio ya ha sido utilizado previamente en otras publicaciones para asegurar la actividad antifúngica de fármacos frente a *Candida* spp. Este criterio fue aplicado sobre los experimentos en los que fueron empleados los inóculos correspondientes a un 0,5 en la escala McF [6].

La inhibición actividad antifúngica consistente en la reducción del 99,9999 % de la muestra inicial, o reducción de 6 Log, fue un criterio más riguroso que fue empleado para averiguar la magnitud de inhibición posible de la terapia en comparación con el daño fototóxico que podría provocar sobre las células humanas. Este criterio fue aplicado sobre los experimentos en los que fueron empleados los inóculos correspondientes a un 4 en la escala McF [2].

Los experimentos fueron llevados a cabo al menos nueve veces ( tres días diferentes y por triplicado) y en el caso de los ensayos de levaduras, fueron realizados por diferentes técnicos para asegurar su reproducibilidad.

Las reducciones en el número de colonias se expresan en forma logarítmica calculándose la media y desviación estándar como medidas

de posición. Los valores de supervivencia se refirieron a la disminución de unidades logarítmicas con respecto al inóculo inicial (Control 1).

Fue realizado un análisis estadístico para los resultados obtenidos en la TFD con las levaduras. Para el tratamiento de datos se realizaron tests no paramétricos entre los que se encontraron el test de Kruskal-Wallis para el análisis de la influencia de la cepa testada y la prueba de la U de Mann-Whitney para el análisis de la influencia del inóculo testado, la fluencia empleada y la reducción logarítmica deseada. La significancia estadística fue aceptada a valores de  $p < 0,05$ . Para el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS 19 con licencia de la Universidad de Zaragoza.

## **Participación de las EROs en la fotoinactivación *in vitro* con HIP en levaduras / detección de señales de muerte celular**

### **a. Detección de EROs mediante el uso de inhibidores**

#### **i. Especies empleadas en el estudio**

*C. albicans* AZN9635, 456325H y AM07/0267, *C. rugosa* YFJ002-29, *C. parapsilosis* ATCC-22019, *C. krusei* ATCC-6258 y *C. albicans* ATCC-10231 y CECT-1001.

#### **ii. Estudio previo de fototoxicidad de la HIP a pH fisiológico**

Se tuvo la limitación de que los pHs óptimos de actuación de los enzimas utilizados como inhibidores (ver apartado de formación de EROs durante la TFD *in vitro*) distaban del pH alcanzado en los inóculos realizados con agua destilada. Ello obligó a realizar los inóculos correspondientes para este apartado en solución tamponada de PBS pH = 7,2-7,3.

Para poder realizar el ensayo de la evaluación de EROs fue necesario, además, la realización de un experimento previo de fototoxicidad con HIP de las cepas testadas a ese nuevo pH. Este estudio permitió averiguar las nuevas concentraciones inhibitorias del FS. El ensayo fue llevado a cabo bajo las mismas condiciones del apartado de “Estudio de la TFD *in vitro* con HIP sobre hongos” centrado en unas condiciones determinadas:

- inóculos correspondientes a la medida de 0,5 unidades en la escala McF.
- 18 J.cm<sup>-2</sup> de fluencia.

Al emplear inóculos de 0,5 McF se obtuvieron las concentraciones fungicidas de HIP para eliminar 3 Log empleando, esta vez el PBS como diluyente [6].

### **iii. Preparación de las muestras**

Los estudios partieron de volúmenes variables de cada uno de los inóculos de 0,5 en la escala McF realizados en PBS (pH = 7,2-7,3).. El ensayo fue llevado a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos. Los inóculos fueron mezclados con las disoluciones que contenían los inhibidores:  $\text{NaN}_3$ , CAT, SOD o MAN hasta alcanzar concentraciones en cada suspensión de 80 mM, 1880 U / mL, 200 U / mL y 100 mM de cada inhibidor respectivamente [7]. El volumen de cada pocillo fue ajustado para contener  $1 \times 10^5$  células/ pocillo y los inhibidores fueron utilizados por separado unos respecto de los otros.

Inmediatamente después de añadir los inhibidores, las suspensiones se incubaron en oscuridad durante 15 min. a 35 °C. Tras la incubación, se añadió la cantidad FS a cada pocillo para alcanzar la concentración que provoca una reducción de 3 Log en cada especie con respecto al inóculo inicial (las concentraciones de HIP empleadas resultaron entre 0,62 y 40  $\mu\text{M}$  dependiendo de las necesidades para cada especie). Dichas concentraciones de FS fueron las obtenidas en los estudios previos.

### **iv. Tratamiento fotofinámico**

Al quedar demostrado en apartados anteriores que en el caso de las levaduras, el efecto fototóxico de la TFD *in vitro* con HIP es máximo desde el minuto 1 de su adición sobre las suspensiones, no se utilizan tiempos de incubación con el FS y las suspensiones con la HIP recién añadida se irradian inmediatamente utilizando una fluencia aproximada de 18  $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Atendiendo a las condiciones de irradiación de la lámpara empleada, las muestras fueron irradiadas a una distancia de 5 cm de la fuente de iluminación durante un tiempo aproximado de 30 min.

### **v. Siembra de las muestras**

Finalizado el tratamiento fotodinámico, las muestras fueron cultivadas en placas SB durante 48 h. a 35 °C, en condiciones aerobias y realizando una siembra por recuento. La siembra se realizó a razón de diluciones 1/1000, 1/100 y muestra directa para asegurar el contaje de las colonias.

### **vi. Controles empleados**

Para la realización de este ensayo se realizaron diferentes controles:

- Control 0.

Prueba de toxicidad de la azida sódica sin FS y sin iluminación LED: primeramente se realizó una curva de toxicidad de la azida sódica a diferentes concentraciones sobre la cepa de *C. albicans*

AM071/0267 El experimento consistió en poner en contacto inóculos de la cepa, correspondientes a la concentración de células de trabajo, con concentraciones crecientes de azida sódica. Este test nos ayudó a confirmar la concentración de azida óptima para el estudio, que resultó ser de 80 mM.

- Control 1.

Estudio del efecto de los inhibidores sobre las cepas con o sin iluminación LED. Se realizó un control inicial que consistió en poner en contacto los diferentes inhibidores con las diferentes cepas a oscuridad durante 15 min. a 35 °C para evaluar su efecto perse. Este control consistió en una muestra sin irradiar y otra irradiada con la misma fluencia que la empleada en el experimento (18 J.cm<sup>-2</sup>). La forma de proceder fue la misma que en la empleada en el estudio original pero sin utilizar FS.

- Control 2.

Estudio del efecto de los inhibidores con el FS en oscuridad. De la misma forma que el anterior, este control permitió evaluar si la HIP

en contacto con cada inhibidor provocaba algún efecto sin aplicar iluminación LED. El control se realizó de la misma forma de proceder que las muestras del estudio original con la salvedad de que éste no fue irradiado.

- Control 3.

HIP con iluminación LED pero sin inhibidores. Control realizado para corroborar que la TFD con el FS seguía funcionando de la misma forma que en el ensayo previo.

- Control 4.

Inóculo inicial sin iluminación LED y sin FS. Control de referencia respecto del cual se refieren los resultados de las muestras tratadas con TFD con los inhibidores.

El control 3 se sembró entero. El resto de los controles consistieron en diluciones 1/1.000 y 1/10.000, óptimas de cada uno en PBS para su óptima cuantificación en placa.

Los controles fueron cultivados en SB durante 48 h. a 35 °C, en condiciones aerobias y realizando una siembra por recuento.

Tanto el análisis de los controles, como el de las muestras del estudio fueron evaluadas por recuento de las UFC por placa y referidas a UFC / mL. La actividad foto-protectora de los inhibidores frente a la TFD *in vitro* fue referida respecto al inóculo inicial (control 4).

Las pruebas se realizaron por triplicado para cada condición. Asimismo, fueron realizados por diferentes técnicos para asegurar su reproducibilidad.

Los resultados se presentaron del mismo modo expuesto anteriormente: las reducciones en el número de colonias se expresan en forma logarítmica calculándose la media y desviación estándar como medidas

de posición. Las representaciones gráficas se refirieron a la disminución de unidades logarítmicas con respecto al inóculo inicial (Control 4).

### **b. Estudio de EROs mediante citometría de flujo; presencia de marcadores de muerte celular**

#### **i. Especies empleadas en el estudio**

*C. krusei* ATCC-6258 y *C. albicans* ATCC-10231.

#### **ii. Consideraciones previas**

Para poder realizar el ensayo de la evaluación de EROs se adquirieron las siguientes condiciones iniciales:

- inóculos correspondientes a la medida de 0,5 unidades en la escala McF.
- 18 y 37 J.cm<sup>-2</sup> de fluencia.

#### **iii. Preparación de las muestras**

Los estudios partieron de un volumen de cada inóculo de 900 µL donde se contenía una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  células / mL. Los inóculos fueron realizados en agua destilada (pH ~ 5,5) a los cuales se les fueron añadidas concentraciones de HIP que conocíamos como dañinas para cada cepa para reducir 3 unidades logarítmicas (0,62 µM en *C. albicans* y 40µM para *C. krusei*). El volumen de cada muestra fue ajustada para contener 1000 µL.

#### **iv. Tratamiento fotodinámico**

Al quedar demostrado en apartados anteriores que en el caso de las levaduras, el efecto fototóxico de la TFD *in vitro* con HIP es máximo desde el minuto 1 de su adición sobre las suspensiones, no se utilizan tiempos de incubación con el FS y las suspensiones con la HIP recién añadida se irradian inmediatamente (en una microtiter y, debido al volumen, empleando varios pocillos por muestra) utilizando fluencias

de 18 y 37 J.cm<sup>-2</sup>. Atendiendo a las condiciones de irradiancia de la lámpara empleada, las muestras fueron irradiadas a una distancia de 5 cm de la fuente de iluminación durante un tiempo aproximado de 30 y 60 min. respectivamente.

### **v. Análisis por citometría de flujo**

Finalizado el tratamiento fotodinámico, muestras y controles fueron centrifugados; el pellet resultante se resuspendió en PBS al que le fue añadido diferentes reactivos:

- análisis de la presencia de EROs para cada cepa: 2HE para la detección de superóxido y DCFA para la detección de como marcador de DNA.
- análisis de la presencia de marcadores de muerte celular: 7AAD (marcador de la integridad de la membrana nuclear) y Anexina V FITC (marcador de pérdida de integridad de membrana provocada por la apoptosis por detección residuos de fosfatidil serina ) [8].

### **vi. Controles empleados**

Para la realización de este ensayo se realizaron diferentes controles, los cuales fueron sujetos a las pruebas de citometría empleando los mismos reactivos que las muestras:

- Control 1.  
Consistió en una muestra de la suspensión inicial, la cual, fue secundariamente sembrada en una placa de SB para confirmar el número de colonias. Para ello se realizaron diluciones 1/1.000 y 1/10.000, en agua destilada estéril para su óptima cuantificación en placa. Este control fue cultivado en SB durante 48 h. a 35 °C, en condiciones aerobias.

Posteriormente, una alícuota de ese control fue sujeta a citometría de flujo para establecerse como una referencia de las células de levadura sanas y sin generación ni de EROs ni de muerte celular.

- Control 2.

Muestra con HIP pero sin iluminación LED. Control realizado para corroborar la inocuidad del FS en oscuridad.

- Control 3.

Inóculo inicial con iluminación LED pero sin HIP. Control realizado para corroborar la inocuidad de la iluminación LED.

### **vi. Estudio adicional de condensación de cromatina**

Las células con HIP e irradiadas fueron sometidas a un marcaje con Hoechst 5  $\mu\text{M}$  para comprobar la presencia de cromatina condensada, síntoma de apoptosis celular. La preparación, tanto de muestra como de su control se realizó fijando con para-formaldehído al 4% durante 15 min a 35 °C en oscuridad. Se retiró el fijador y se lavó con PBS dos veces centrifugando entre cada lavado (10.000 rpm 5 min.). El último pellet fue resuspendido en 20 $\mu\text{L}$  de medio de montaje Mowiol con el marcador nuclear incluido. Muestras y controles fueron depositados en portas de vidrio y fueron cubiertos con un cubre; se dejaron secar y fueron selladas. Las muestras fueron comparadas con un control consistente en una preparación de células marcadas con Hoechst sin irradiar y sin FS. La visualización tuvo lugar en un microscopio de fluorescencia convencional.

## **TFD *in vitro* con HIP sobre células humanas**

### **a. Especies empleadas en el estudio**

[HaCaT] ATCC PCS-200-011 y [hNDF] ATCC PCS-201-012.

### **b. Preparación de las muestras**

Las células fueron crecidas en medio de cultivo DMEM suplementado. El cultivo se realizó en placas de titulación de 24 pocillos a 37 °C. Transcurridos los 2 días de siembra se alcanzó una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ pocillo. Al encontrarse adheridas al recipiente, las células fueron lavadas tres veces resuspendiendo con una pipeta disolución de PBS para retirar el medio de cultivo. El último pellet de células fue resuspendido en una disolución medio fresco DMEM suplementado pero sin FBS para evitar que el FS se adhiera a las proteínas del FBS. Dicha disolución contendrá diferentes concentraciones de HIP (0,5, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ).

### **c. Tratamiento fotodinámico**

Los pocillos fueron entonces irradiados utilizando diferentes fluencias (8, 18 y 37  $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Atendiendo a las condiciones de irradiancia de la lámpara empleada, las muestras fueron irradiadas a una distancia de 5 cm de la fuente de iluminación durante un tiempo aproximado de 15 min. para el caso de 8  $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ , de 35 min. para el caso de 18  $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$  y de 70 min. para el caso de la fluencia de 37  $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ .

### **d. Tratamiento posterior e incubación de las muestras**

Tras el tratamiento fotodinámico las células se lavaron con PBS (siguiendo las mismas condiciones de lavado descritas al principio del apartado) para eliminar el exceso de HIP y fueron incubadas con MTT (0,5 mg / mL) en medio de cultivo DMEM suplementado durante 24 h. a 37 °C. Después de la incubación, el medio se reemplaza por DMSO, y la suspensión resultante fue agitada durante 15 min. Se midió la absorbancia a 550 nm con un lector de microplacas (Biotek EL x 808).

### **e. Controles empleados**

En el experimento se realizaron controles que fueron encaminados exactamente al mismo fin que los utilizados en los apartados de TFD *in vitro* con dermatofitos y con levaduras. El primer control consistente en el cultivo original sin luz y sin FS, fue respecto del cual se compararon los resultados de las muestras irradiadas. Los dos últimos controles se realizaron para evaluar la influencia, tanto de la luz, como del FS por separado, sobre las células humanas utilizando las mismas dosis de ambos parámetros que las empleadas en los ensayos.

Para expresar la supervivencia los valores fueron referenciados a los controles, que consistieron en las mismas células de la misma forma cultivadas y siguiendo los mismos pasos aplicados en las muestras pero sin añadir FSs.

## **Localización de HIP en células por microscopía de fluorescencia**

### **a. Localización *in vitro* de HIP en levaduras y dermatofitos por microscopía confocal de fluorescencia**

#### **i. Especies empleadas en el estudio**

- Levaduras: *C. parapsilosis* ATCC-22019, *C. krusei* ATCC-6258 y *C. albicans* ATCC-10231.
- Dermatófitos: *T. rubrum* ATCC-28188 y *T. mentagrophytes* ATCC-9533.

#### **ii. Preparación de las muestras**

Se parte de inóculos realizados en SBL pH ~ 5,5 con una medida de 0,5 unidades en la escala McF. Se toma 1 mL de cada inóculo y las células contenidas en él se lavan:

- centrifugación 5 min. a 10.000 rpm descartando el sobrenadante.
- resuspensión en el mismo volumen de suero fisiológico estéril (SSF).  
precalentado a 35 °C;

se repite esta operación dos veces más para lavar las células completamente de medio de cultivo.

#### **iii. Marcaje con el FS**

Las células se resuspenden finalmente en una disolución de HIP de una concentración determinada (5 µM) preparada por dilución de la disolución madre de cada FS en agua destilada estéril pH ~ 5,5. Las

células se mantienen en oscuridad en contacto con el FS a 35 °C durante diferentes tiempos para levaduras: 1, 30 min. y 24 h. y para dermatofitos: 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavan las células tres veces con SSF precalentado a 35 °C para eliminar los restos del FS que no se han adherido o no han penetrado en ellas (condiciones de lavado iguales a las descritas más arriba).

### **iv. Marcaje con sondas primarias**

Tras el lavado, las células son resuspendidas en un mismo volumen de disolución de PBS pH = 7,2-7,3 que contendrá la sonda. La mezcla de las células con cada sonda se incuba 40 min. y a unas concentraciones de sonda determinados por la condiciones del fabricante:

- MitoTracker<sup>®</sup> Green (MTG): 200, 400, 800, 1.600 y 5.000 nM
- CellTracker<sup>®</sup> Green (CTG): 200, 400, 800, 1.600 y 5.000 nM
- MitoTracker<sup>®</sup> Red (MTR): 200 y 400 nM
- DIOC6<sup>®</sup>: 120 nM

(Las sondas se utilizan separadamente)

### **v. Fijación de las células**

Tras la incubación, las muestras se lavaron 3 veces con las mismas condiciones descritas arriba y se resuspendieron en una disolución de para-formaldehído (PFA) al 3 %, manteniéndose 15 min. a 35 °C y en oscuridad. La disolución de PFA se retira por lavado con agua destilada estéril dos veces, dejándose en 500 µL de agua el volumen final de las células resuspendidas.

### **vi. Tratamiento final y montaje de las muestras** (adición de la sonda secundaria)

Las suspensiones resultantes se dispensan en una placa microtiter de 12 pocillos que contiene cubres redondos de vidrio tratados

previamente con una disolución de poli-lisina (30 min., lavados con agua destilada dos veces y dejados secar a temperatura ambiente). La placa se centrifuga durante 30 min. a 3.000 rpm para fijar las células a los cubres.

Tras la última centrifugación se retiran los cubres y se montan sobre portas con Mowiol como medio de montaje, el cual contiene la sonda DAPI® 5 µM.

### **vii. Visualización de las muestras**

Las muestras fueron visualizadas con un microscopio de escaneado confocal Olympus FV10i. Las imágenes fueron recogidas utilizando el modo secuencial del microscopio con el objetivo de aceite de inmersión 63x (lens specification, Plan S-APO 60xO, NA 1.35) y con calidad de 1024x1024 pixels, empleando diferentes modalidades de zoom digital para amplificar la imagen. Las imágenes fueron exportadas desde el software del microscopio FV10i a Adobe Photoshop Illustrator para realizar las figuras que aquí se exponen.

### **b. Localización de HIP en queratinocitos y fibroblastos humanos por microscopía confocal de fluorescencia *in vitro***

#### **i. Especies empleadas en el estudio**

Células humanas [HaCaT] ATCC PCS-200-011 y [hNDF] ATCC PCS-201-012.

#### **ii. Preparación de las muestras**

Se incuban las células sobre cubreobjetos en medio de cultivo DMEM suplementado sin FBS (tratado previamente con glicerina durante 30 minutos a 37° C) durante 2 días a 37° C y 5 % de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la concentración celular deseada de 1x10<sup>6</sup> células / mL. Tras esto, se realizan 3 lavados con PBS pH= 7,4 para retirar el medio de cultivo.

### **iii. Marcaje con HIP**

Se añade cada FSs por separado a una concentración de 2,5  $\mu\text{M}$ . El FS se encontrará en medio fresco y se incuba en oscuridad durante 1 h. a 37 °C y 5 %CO<sub>2</sub>. Se vuelven a realizar 3 lavados con PBS pH= 7,4 para retirar los FSs.

### **iv. Marcaje con las sondas y fijación de las muestras**

Se añaden las sondas celulares a la concentraciones de trabajo establecidas disueltas en PBS (Hoechst<sup>®</sup> (300 nM en PBS durante 5min Tamb), DiOC<sub>6</sub><sup>®</sup> (200 nM en PBS durante 15min, 37 °C 5 %CO<sub>2</sub>), LTG (75 nM en PBS durante 30min, 37 °C 5 %CO<sub>2</sub>)) y se incuban con agitación orbital, siempre a oscuras. Se realizan 3 lavados con PBS pH= 7,4 para eliminar el exceso de sondas y se extrae el cubreobjetos del pocillo, se deposita una gota de glicerol sobre el portaobjetos y se coloca el cubreobjetos invertido sobre el portaobjetos. En este momento las muestras ya están preparadas para ser examinadas en el microscopio.

### **v. Visualización de las muestras**

Las muestras fueron visualizadas con un microscopio de escaneado confocal Olympus FV10i utilizando las mismas opciones empleadas para la visualización de las preparaciones con levaduras.

### **c. Localización de HIP en queratinocitos y fibroblastos humanos por microscopía invertida de fluorescencia *in vivo***

Se realizaron cultivos de células de la piel a partir de biopsias cutáneas de piel normal obtenida de un voluntario sano para obtener células tipo queratinocitos y fibroblastos dérmicos. Las células se cultivaron en microplacas de 6 pocillos a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> en medio DMEM suplementado. Al alcanzar una confluencia de crecimiento de, al menos,

## **Materiales y Métodos**

---

el 70 %, las células se incubaron con concentraciones de HIP 2 y 5  $\mu\text{M}$  durante periodos de tiempo: 30 min., 5 y 24 h. Como marcadores fluorescentes selectivos de orgánulo se utilizaron las sondas DiOC<sub>6</sub><sup>®</sup> y LTG a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , las cuales fueron incubadas durante un periodo de tiempo determinado por las condiciones del fabricante. Posteriormente se procedió a la observación microscópica *in vivo* y toma de imágenes.



## Referencias

---

- [1] - **Swenson JM and Thornsberry C.** Preparing inoculum for susceptibility testing of anaerobes. *J Clin Microbiol* **1984**; 19:321-325.
- [2] - **Dai T, Huang Y, and Hamblin MR.** Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2010**; 3-4:170-188.
- [3] - **Smith PK,** Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **1985**;150(1):76-85.
- [4] - **Dai T,** Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St Denis TG, Ribeiro MS, Mylonakis E, Hamblin MR, and Tegos GP. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol* **2012**; 3:120.
- [5] - **Pagonis TC,** Chen J, Fontana CR, Devalapally H, Ruggiero K, Song X, Foschi F, Dunham J, Skobe Z, Yamazaki H, Kent R, Tanner AC, Amiji MM, Soukos NS. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J Endod* **2010**; 36:322-328.
- [6] - **Ernst EJ,** Yodoi K, Roling EE, Klepser ME. Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *C. lusitaniae* determined by microdilution, Etest, and time-kill methods. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46, 578-581.
- [7] – **Grossman N,** Schneid N, Reuveni H, Halevy S, and Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med* **1998**; 22:212-218.

# **Resultados**

## **Incorporación (uptake) de HIP en levaduras y en células humanas**

### **a. Uptake en queratinocitos dérmicos humanos HaCaT**

En el ensayo con células humanas, las medidas de los valores de fluorescencia del lisado de HaCaT mostraron que la incorporación del FS se incrementa gradualmente con el tiempo de contacto hasta alcanzar su pico máximo a las 6 horas. Tras éste punto se observa que con tiempos de contacto mayores hay un descenso pronunciado en la incorporación de la HIP hasta alcanzar un mínimo en el tiempo de incubación máximo empleado (24h) (Figura 1).

### **b. Uptake en fibroblastos dérmicos humanos hNDF**

En el caso de las células hNDF, la incorporación del FS se incrementa de forma continuada con el tiempo hasta alcanzar un pequeño pico aproximadamente a la hora de contacto. Tras este máximo, se produce una disminución en la absorción de la HIP hasta que en el intervalo entre las 6 y las 18 horas de contacto se produce un aumento de la captación del FS hasta alcanzar su pico máximo de captación en el tiempo de incubación máximo empleado (24h) (Figura 1).

### **c. Uptake en células de levadura**

En el caso de todas las especies de levaduras estudiadas se observó, primeramente, que la velocidad de captación del FS fue muy elevada en los 30 primeros minutos de contacto del mismo con las levaduras (Figura 2 y 3). Posteriormente, se produce un máximo de captación del FS entre las 5-8 horas de tiempo de contacto dependiendo de la levadura estudiada. Una vez alcanzado el pico máximo, los valores de fluorescencia permanecen constantes hasta alcanzar el tiempo de incubación máximo empleado (24h) (Figura 2). *C. albicans* ATCC-10231 fue la excepción ya que experimenta una pequeña disminución en el rango comprendido entre las 18 y las 24 horas de contacto.

Comparando la cantidad de fluorescencia de los lisados de cada una de las dos líneas celulares, correspondiente a la cantidad de HIP captada por las mismas, se observó que fue mucho mayor en las células HaCaT que en las hNDF.

En ningún momento los valores de captación del FS en hNDF, traducidos fluorescencia de lisado, superan a los presentados en las células de levadura. Sin embargo, al comparar la fluorescencia en levaduras con la obtenida con células HaCaT, los valores de captación del FS fueron menores con respecto a las HaCaT en todos los tiempos de incubación empleados (Figura 2 y 3).

En los tiempos de incubación cortos (30 min.), se encuentra que, la proporción en la captación del FS es mayor en levaduras hNDF pero menor que en células HaCaT (Figura 3).

## Resultados

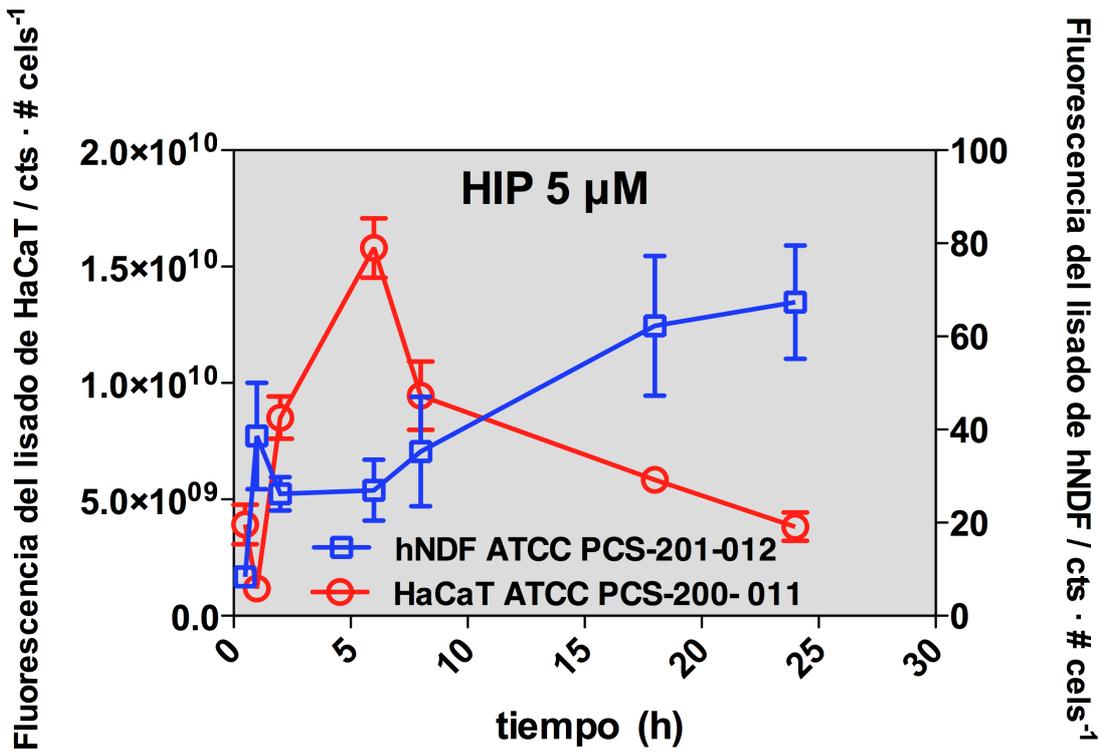


Figura 1: Estudio de la captación (uptake) de HIP en células humanas dérmicas HaCaT y hNDF. Se representa, en los ejes verticales, la fluorescencia del lisado celular (HaCaT eje izquierdo, hNDF eje derecho) frente a diferentes tiempos de incubación (eje horizontal).

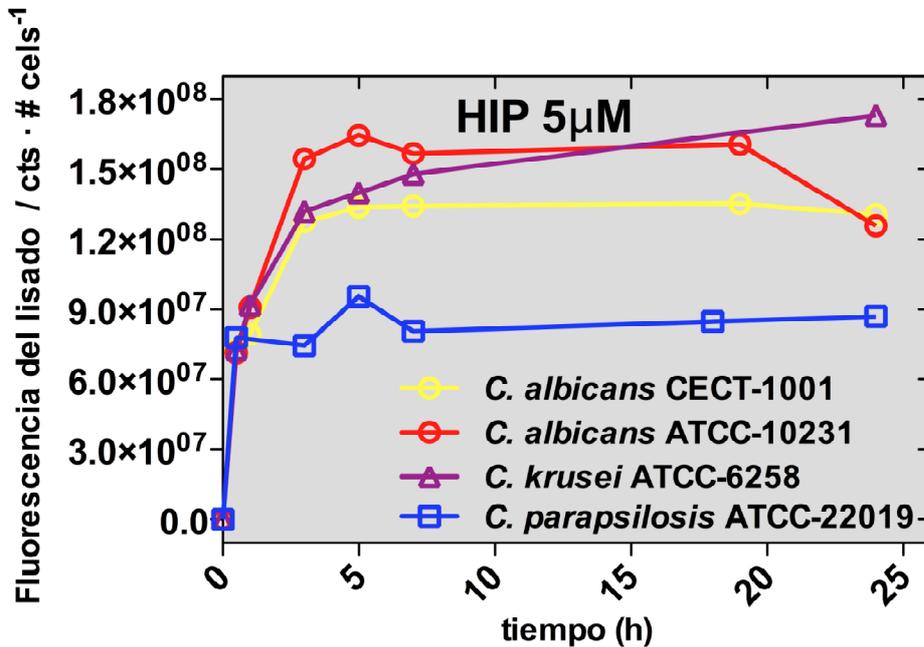


Figura 2: Estudio de la captación (uptake) de HIP en células de levadura *Candida* spp. Se representa, en el eje vertical, la fluorescencia del lisado celular frente a diferentes tiempos de incubación (eje horizontal).



## Resultados

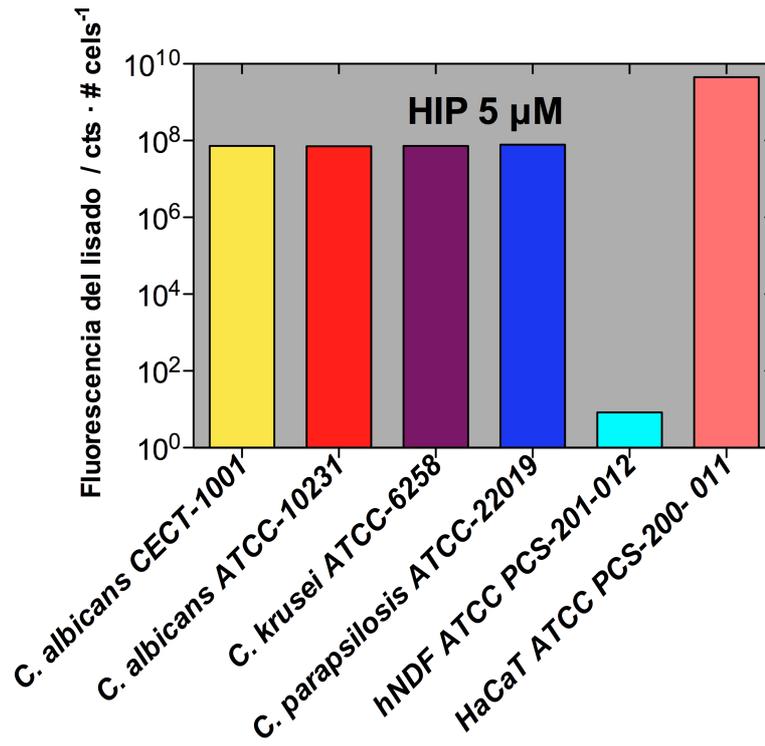


Figura 3: Comparativa entre la fluorescencia del lisado de las células humanas y las células de levadura a los 30 minutos de incubación con HIP 5 μM.



## **Fotoinactivación *in vitro* de levaduras con HIP / patrones de eros en la TFD**

### **a. Fotoinactivación *in vitro* de levaduras con HIP**

La TFD con HIP provocó efectos antifúngicos sobre la totalidad de las especies testadas en concentraciones variables dependiendo de la especie, de la fluencia y de la concentración inicial del inóculo empleados. La HIP sobre levaduras demostró su capacidad fototóxica produciendo muerte celular hasta alcanzar los valores antifúngicos de reducción de 3 y 6 Log con respecto a los inóculos iniciales. A continuación se exponen los resultados según los distintos factores o variables estudiadas:

#### **i. Fotoinactivación según el tiempo de incubación con la HIP**

El tiempo de incubación con HIP no proporcionó ninguna ventaja en la fotoinactivación de levaduras en la reducción ni de 3 ni de 6 Log. A tiempos de incubación entre 1 min. y 5 h. se mantuvo constante la concentración de HIP necesaria para provocar las disminuciones logarítmicas antes citadas en la mayoría de los casos. Sin embargo, en el tiempo de incubación máximo empleado (24 h.), las concentraciones fungicidas de FS a tiempos de contacto más cortos dejaron de serlo las condiciones de fluencia empleadas (18 y 37 J.cm<sup>-2</sup>) en la TFD para todas las estudiadas. (Tablas 1 y 2). Con ello se pudo optimizar el tiempo de incubación medio más efectivo para este FS para todas las cepas testadas, que resultó oscilar entre 1 min. y 3h. Atendiendo a la necesidades de todas las especies decidió establecerse en 1 min.

#### **ii. Fotoinactivación según la especie de *Candida***

Las cepas de *C. albicans*, tanto sensibles como resistentes a azoles, son a su vez las más sensibles a la fotoinactivación con HIP de todas las especies de *Candida* testadas en este estudio.

## Resultados

---

Bajo las condiciones de incubación óptima con el FS (1 min.) y atendiendo a que siempre fueron empleadas concentraciones dobles de FS:

- la reducción del  $\geq 99,9\%$  (3 Log) del inóculo inicial empleando una fluencia de  $18 \text{ J.cm}^{-2}$  requirió una concentración de HIP que osciló entre  $0,32$  y  $1,25 \mu\text{M}$  para todas las especies de *C. albicans*, de entre  $1,25$  y  $2,5 \mu\text{M}$  para *C. parapsilosis*, de  $2,5$  a  $5 \mu\text{M}$  para *S. cerevisiae*, entre  $5$  y  $10 \mu\text{M}$  para *C. rugosa* y entre  $40$  y  $80 \mu\text{M}$  para *C. krusei* (Tabla 1 y figura 4(A/B)).
- la reducción del  $\geq 99,9999\%$  (6 Log) del inóculo inicial empleando una fluencia de  $18 \text{ J.cm}^{-2}$  requirió una concentración de HIP de  $10$  a  $80 \mu\text{M}$  para las especies de *C. albicans* (ATCC-10231:  $20-80 \mu\text{M}$ , CECT-1001 y AZN9635:  $10-40 \mu\text{M}$ , 456325H y AM07/0267:  $10-20 \mu\text{M}$ ),  $320-640 \mu\text{M}$  para *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. rugosa* y  $40-80 \mu\text{M}$  para la especie *S. cerevisiae* (Tabla 2 y figura 4(C/D)).

Mediante el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis realizado sobre las especies de *Candida* de colección (ATCC y CECT) se observa que, para todas las condiciones empleadas en los experimentos, existen diferencias estadísticamente significativas atendiendo a su especie a la hora de fotoinactivarlas (Tabla 3).

### **iii. Fotoinactivación según la fluencia empleada**

El estudio con diferentes fluencias mostró que al emplear  $37$  en lugar de  $18 \text{ J.cm}^{-2}$  se produce una reducción generalizada en la concentración de HIP necesaria para disminuir los inóculos tanto de 3 como 6 Log. En la reducción de 6 Log se presentó un contraste mayor entre fluencias que en el caso de la reducción de 3 Log:

- En la reducción de 3 Log empleado  $37 \text{ J.cm}^{-2}$  se observó que, para el caso de las especies de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *S. cerevisiae*, las concentraciones permanecieron en rango similar que empleando  $18 \text{ J.cm}^{-2}$ . Para el resto de especies se observó una reducción de la concentración del FS desde  $40-80$  a  $10-20 \mu\text{M}$  para *C. krusei* y desde  $2,5-5$  a  $2,5-1,25 \mu\text{M}$  para *C. rugosa*. (Tabla 1 y figura 4(A/B)).

- En el caso de los estudios de reducción de 6 Log se produjo una disminución de la cantidad necesaria de HIP para todas las especies al duplicar la fluencia. Las concentraciones necesarias alcanzaron valores absolutos de entre 5 y 20  $\mu\text{M}$  para el caso de las especies de *C. albicans* (CECT-1001: 2,5-5  $\mu\text{M}$ , ATCC-10231, AZN9635 y AM07/0267: 5-10  $\mu\text{M}$  y 456325H: 10-20  $\mu\text{M}$ ), 5-10  $\mu\text{M}$  para *C. rugosa* y *S. cerevisiae* de 80-160  $\mu\text{M}$  para *C. parapsilosis* y de 320  $\mu\text{M}$  para *C. krusei* (Tabla 2 y figuras 4 y 5(C/D)).

Mediante la prueba no paramétrica U Mann Whitney se observa que la fluencia no posee un efecto estadísticamente significativo sobre las cepas de colección (ATCC y CECT) estudiadas del género *Candida* bajo ninguna de las condiciones los experimentos fueron llevados a cabo (Tabla 6).

### **iii. Fotoinactivación según la concentración inicial del inóculo**

Los inóculos con menor concentración de levadura (0,5 McF) (Figura 4(A/B) y Figura 5(A/B)) resultaron ser más o igualmente sensibles a la TFD con HIP comparándolos con los más concentrados (4 McF) (Figura 4(C/D) y Figura 5(C/D)). Este hecho se repitió para todas las especies testadas.

Aplicado sobre las cepas del género *Candida* de colección (ATCC y CECT) la prueba no paramétrica de la U Mann Whitney se observó que la concentración inicial del inóculo empleada tuvo una influencia estadísticamente significativa únicamente para las cepas *C. parapsilopsis* ATCC-22019 empleando ambas fluencias, *C. albicans* ATCC-10231 empleando 37  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  y *C. krusei* ATCC-6258 con 18  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  de fluencia (Tabla 4).

### **iv-Fotoinactivación según el N° Log que quieran disminuirse**

Este estudio solo pudo evaluarse partiendo de un inóculo inicial de 4 McF debido a que con el inóculo menor (0,5 McF) no pudieron alcanzarse con precisión la reducción de 6 Log. Se observa que, partiendo de un inóculo de 4 McF, existe diferencia entre la concentración necesaria para reducir 3 o 6 Log para todas las especies.

Aplicado a las especies de colección del género *Candida* (ATCC y CECT) la prueba no paramétrica U Mann Whitney, se observa que existen diferencias estadísticamente significativas dependientes del N° Log que quieran disminuirse partiendo en todos los casos de un inóculo inicial de 4 McF (Tabla 5).

### **vi. Fotoinactivación según el pH del medio**

Tanto el pH de trabajo como la presencia de sales tamponadoras del medio en las suspensiones y en las muestras influyó en el efecto fototóxico de la HIP sobre las levaduras. Al trabajar con pH fisiológico tamponado en presencia de sales de fosfato y cloruro (tampón PBS), se produjo una disminución en la fotosensibilidad en todas las cepas en comparación con los resultados obtenidos en agua destilada sin tamponar. Esto se tradujo en una mayor resistencia a la TFD con HIP. La base de nuestros experimentos resultó el emplear siempre concentraciones de FS dobles con respecto a la inmediatamente anterior. Con esa metodología se obtuvo que un incremento de la concentración del FS al doble de la empleada en agua destilada para todas las especies fue necesaria para alcanzar los mismos efectos empleando tampón PBS como diluyente.

### **vii. Fotoinactivación según la resistencia a azoles**

La especies resistentes a azoles, como son *C. krusei*, *C. rugosa* y *C. albicans* AZN9635, 456325H y AM07/0267 se inactivan por medio de TFD con HIP bajo todas las condiciones empleadas en nuestros ensayos.

Dentro de la especie *C. albicans*, con especies sensibles y resistentes a azoles, no se observaron diferencias significativas en cuanto a las concentraciones requeridas para provocar disminuciones de 3 Log entre las especies resistentes y las sensible a azoles (Tabla 1 y figura 5(A/B)). Sin embargo, en el caso de disminución de 6 Log las especies sensibles a azoles requirieron una mayor concentración de FS con respecto a las especies resistentes cuando se irradiaba con 18 J.cm<sup>-2</sup> de fluencia. Las especies resistentes a azoles requirieron, por otra parte una mayor concentración de FS con 37 J.cm<sup>-2</sup> con respecto a las especies azol-sensibles. (Tabla 2 y figura 5(C/D)).

### **viii. Resultados de los Controles**

Los controles permitieron evaluar la citotoxicidad por separado tanto de la luz, como del FS empleado:

#### Toxicidad de la luz

Irradiando las muestras sin FS se demostró que la propia luz LED inhibía el crecimiento de algunas cepas. Esta inhibición, en ningún caso, alcanzó valores mayores de un 15 % ó de 0,15 unidades logarítmicas (0,15 Log) (Figura 6). Al irradiar algunas cepas con una fluencia de 37 J.cm<sup>-2</sup> y sin FS aumentó el número de colonias frente a los controles no irradiados. Debido a ello se realizó una prueba del porcentaje de evaporación del medio en las muestras debido a la irradiación. Trabajando con volúmenes de 100-250 µL por pocillo, el largo periodo de exposición a la luz (60 min) produjo una deshidratación entre el 10 y el 20 % del volumen inicial, con lo cual tenemos una suspensión más concentrada de células. Los controles se siembran por dilución de los inóculos para el recuento de la colonias iniciales. Es por ello que al producirse mayor evaporación del medio existieron recuentos mayores.

#### Toxicidad del Fotosensibilizante

El control que consistió en poner en contacto la muestra con el FS pero sin aplicar irradiación, demostró que la HIP es inocua en oscuridad en los estudios de reducción de 3 Log (Figura 7). Sin embargo, en los estudios de reducción de 6 Log, en el caso de las especies de *C. krusei* y *C. parapsilosis*, donde se requirió una concentración muy alta de HIP (Tabla 2) (entre 320 a 640 µM), los estudios sin irradiación revelaron un potente efecto tóxico de las disoluciones de HIP preparadas en DMSO del 98 % de pureza (v / v) . Como se explicará en el apartado siguiente, la toxicidad en estos últimos casos es debida en su mayor medida al disolvente DMSO en el que se preparó la disolución stock de la HIP.

#### Toxicidad del disolvente de la HIP (DMSO)

Las muestras con elevadas concentraciones de HIP también poseían elevadas concentraciones de DMSO (el cual llegaba a representar en algunos casos (640 µM de HIP) hasta el 65 % (v / v) del volumen de la disolución), se pensó

en un posible efecto tóxico del DMSO.

Por lo tanto, para comprobar la procedencia del efecto tóxico de las disoluciones de HIP en DMSO se realizó un estudio de toxicidad de las levaduras (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. rugosa*) frente al DMSO sin HIP y sin irradiación empleando el mismo porcentaje de DMSO utilizado en las correspondientes disoluciones de HIP empleadas para reducir 3 y 6 Log de cada especie (resultados no mostrados). Estas pruebas adicionales revelaron que:

- el DMSO no inhibió el crecimiento celular ni produjo efectos tóxicos si no se encontraba en proporciones mayores al 7,5 % del total del volumen de las muestras en cepas de *C. krusei* y *C. parapsilosis*. En el caso de las cepas *C. rugosa* y *C. albicans* los efectos tóxicos empezaron a manifestarse con proporciones iguales o superiores al 15 % del volumen total.
- la proporción de DMSO empleada en los estudios de 3 Log no produce inhibición o toxicidad alguna sobre las especies testadas ya que el porcentaje del disolvente no superó en ningún caso el 4 % del volumen total de las muestras.
- la proporción de DMSO empleada en los estudios de 6 Log demuestra ser altamente tóxica, inhibiendo el 100 % de los inóculos de *C. krusei* y *C. parapsilosis* y el 20 % del inóculo en el caso de *C. rugosa* (datos no mostrados). Sobre las especies de *C. albicans* el DMSO resultó ser completamente inócuo al no encontrarse en una proporción menor al 7,5 % del volumen total de las muestras.
- en las muestras sin FS donde el porcentaje de DMSO no superaba el 7,5% del volumen, no se produjo una inhibición de las especies de *C. krusei* y *C. parapsilosis* que supusiera más de 4 Log (99,99%). Estas concentraciones de DMSO son las equivalentes a las encontradas en las muestras de concentraciones de HIP menores o iguales a 80  $\mu$ M (Figura

## Resultados

---

4). El DMSO, por tanto, predomina en el efecto tóxico sobre la HIP en sus disoluciones sobre *C. krusei* y *parapsilosis* por encima de 80  $\mu$ M del FS. Al no disponerse de disoluciones de HIP de mayor concentración, no pudo calcularse la concentración de la misma necesaria para disminuir 6 Log del inóculo inicial de las especies de *C. parapsilosis* y *C. krusei*.

Los controles consistentes en diluciones de los inóculos iniciales sin irradiar y sin HIP no sufrieron modificaciones a lo largo de los ensayos.



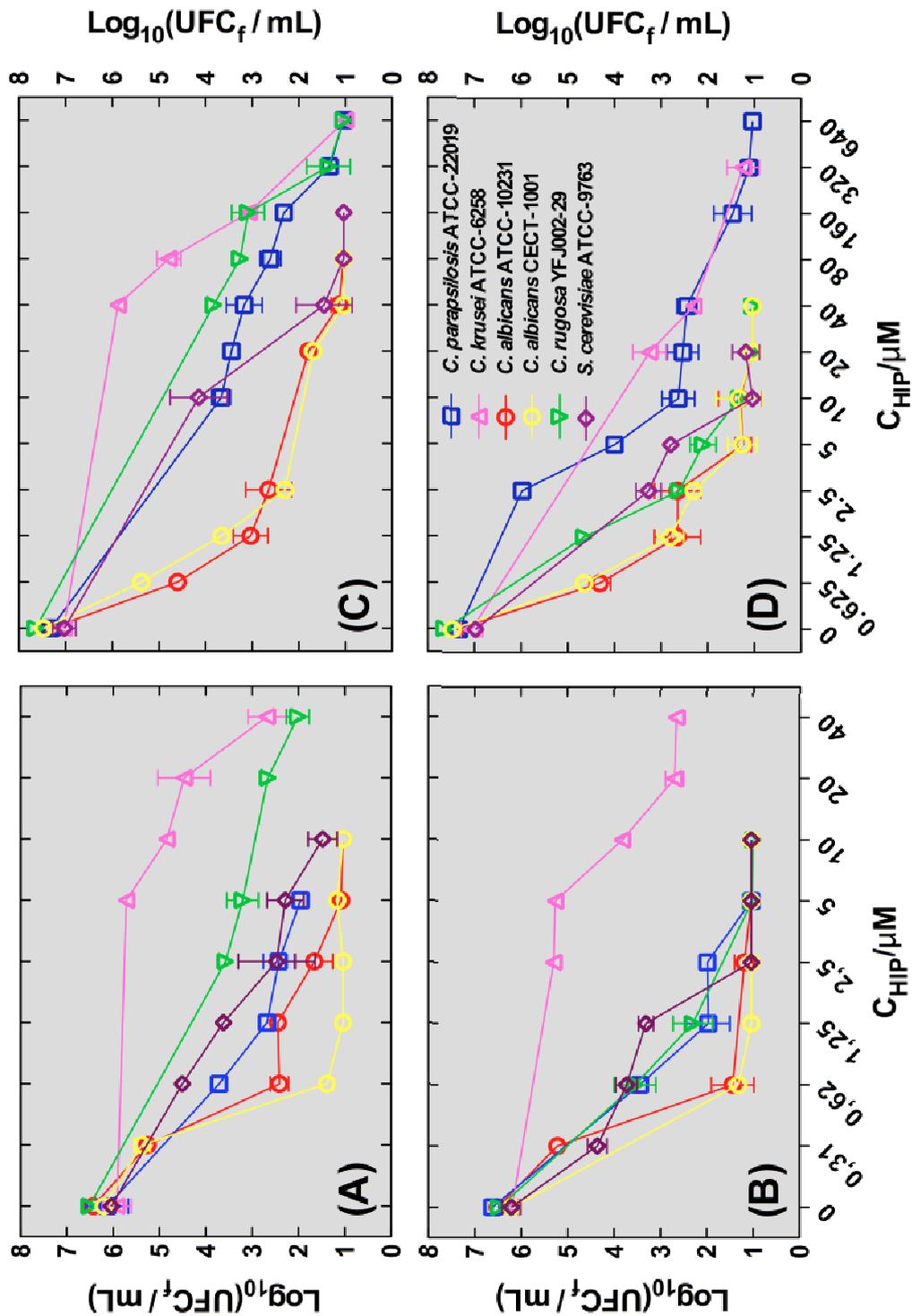


Figura 4: Representación gráfica de la toxicidad de la TFD *in vitro* con HIP frente a levaduras del género *Candida* spp y *S. cerevisiae* ATCC-9763 empleando tiempo de incubación 1 min. Las gráficas representan en el eje vertical el logaritmo en base 10 de la concentración de germen para cada concentración de HIP (eje horizontal) empleada. A: inóculo inicial: 0.5 McF (-  $1 \times 10^6$  UFC / mL); Fluencia (F) =  $18 \text{Jcm}^{-2}$ . B: inóculo inicial: 0.5 McF (-  $1 \times 10^6$  UFC / mL); Fluencia (F) =  $37 \text{Jcm}^{-2}$ . C: inóculo inicial: 4 McF (-  $1 \times 10^7$  UFC / mL); Fluencia (F) =  $18 \text{Jcm}^{-2}$ . D: inóculo inicial: 4 McF (-  $1 \times 10^7$  UFC / mL); Fluencia (F) =  $37 \text{Jcm}^{-2}$ .



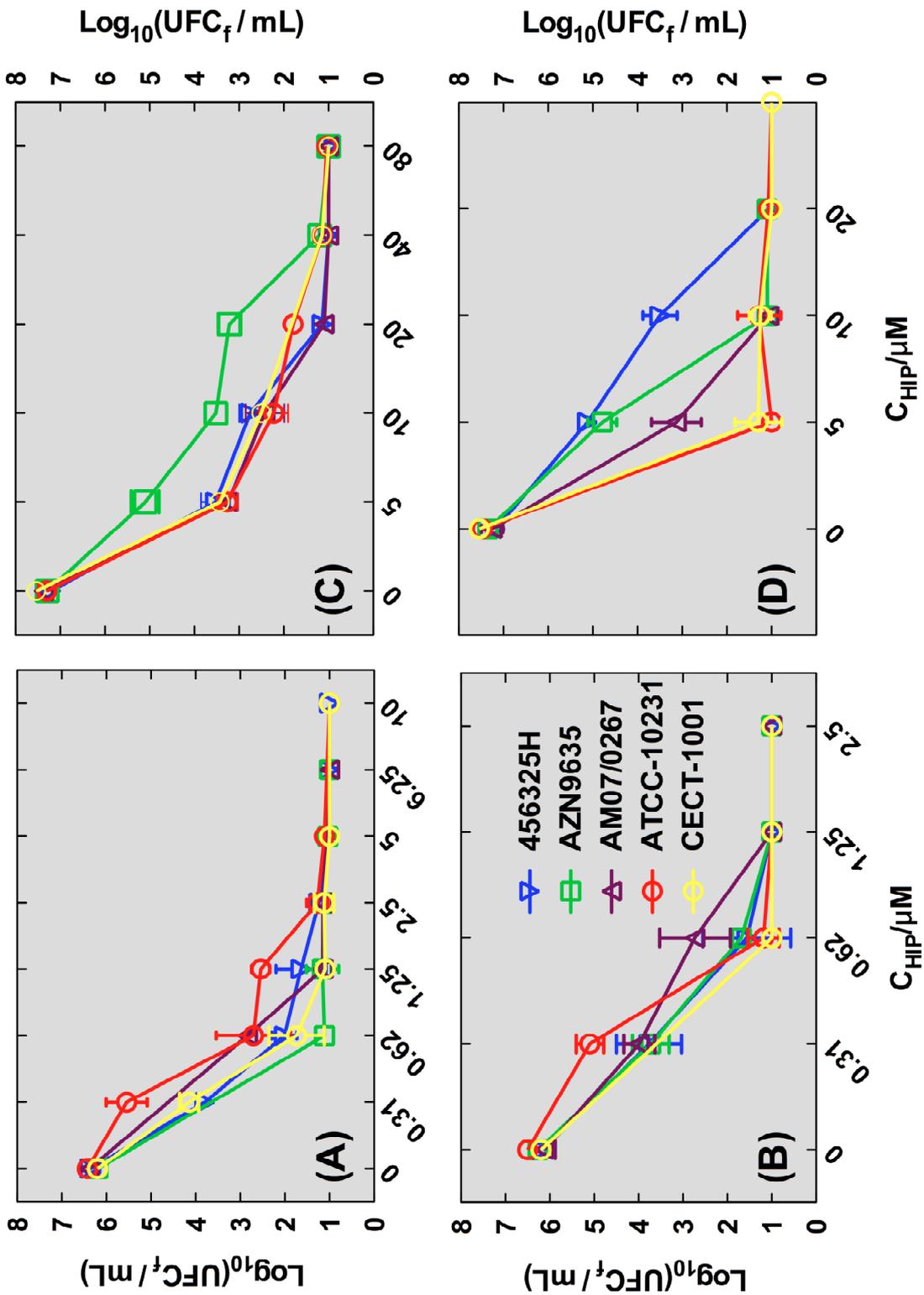
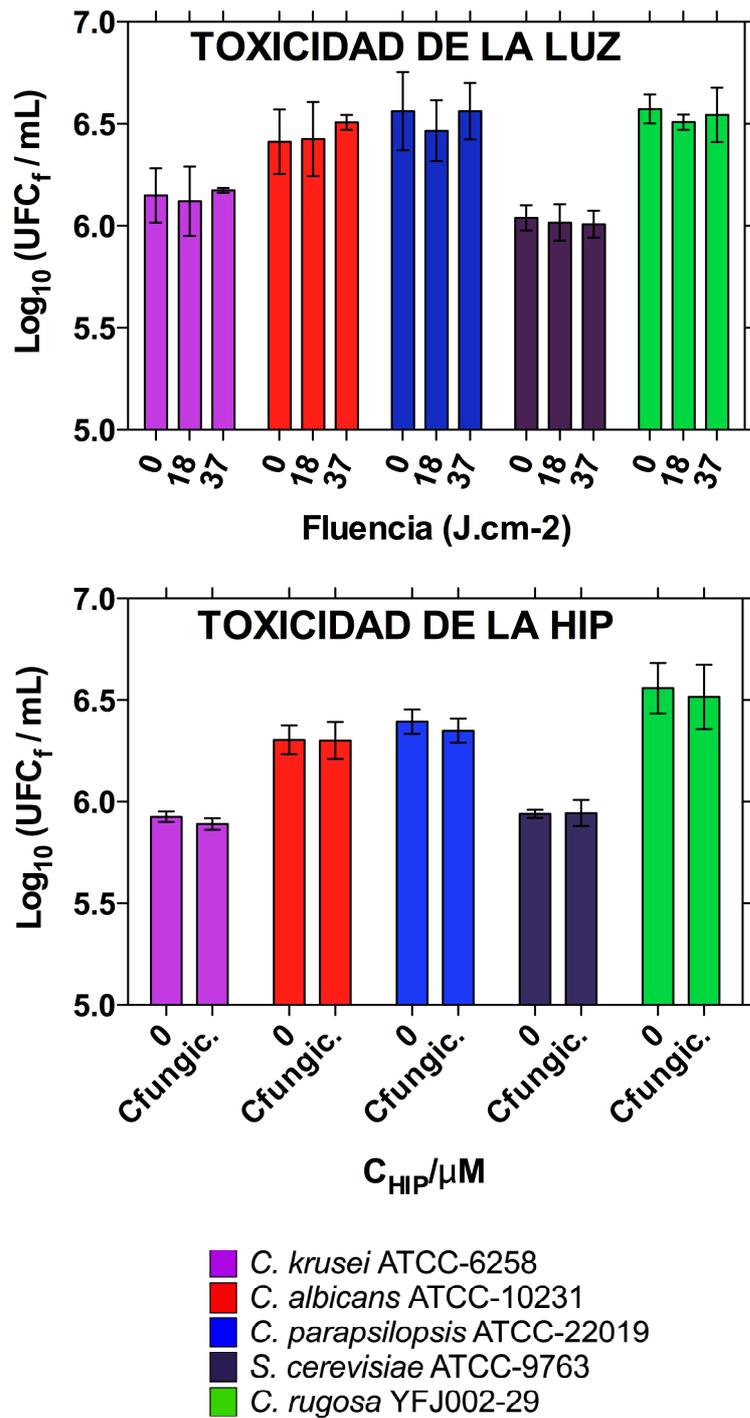


Figura 5: Representación gráfica de la toxicidad de la TFD con HIP *in vitro* frente a levaduras *C. albicans* para establecer la diferencia de susceptibilidad frente a la terapia entre especies sensibles (ATCC-10201 y CECT-1001) y resistentes a azoles (el resto) empleando tiempo de incubación 1 min. Las gráficas representan en el eje vertical el logaritmo en base 10 de la concentración de germen para cada concentración de HIP (eje horizontal) empleada en la terapia. A: inóculo inicial:  $0.5 \text{ McF}$  ( $1 \times 10^6 \text{ UFC} / \text{mL}$ ); Fluencia (F) =  $18 \text{ Jcm}^{-2}$ . B: inóculo inicial:  $0.5 \text{ McF}$  ( $1 \times 10^6 \text{ UFC} / \text{mL}$ ); Fluencia (F) =  $37 \text{ Jcm}^{-2}$ . C: inóculo inicial:  $4 \text{ McF}$  ( $1 \times 10^7 \text{ UFC} / \text{mL}$ ); Fluencia (F) =  $18 \text{ Jcm}^{-2}$ . D: inóculo inicial:  $4 \text{ McF}$  ( $1 \times 10^7 \text{ UFC} / \text{mL}$ ); Fluencia (F) =  $37 \text{ Jcm}^{-2}$ .





F

figura 6-7: Representación de la toxicidad per se de la HIP en oscuridad (se utiliza las concentraciones de HIP requeridas para conseguir una reducción de  $\geq 99.9\%$  o 3 Log para cada especie pero sin uso de radiación) de la toxicidad per se de la fuente de iluminación empleada. Cada color representa una especie diferente y los valores agrupados representando concentración de HIP = 0 (0) y concentración de HIP que produce disminución de 3 Log (C<sub>fungic.</sub>) y las tres fluencias empleadas en los experimentos, 0, 18 y 37 Jcm<sup>-2</sup>. Sobre el eje vertical se representa el logaritmo en base 10 de la concentración de las colonias de los inóculos testados (inóculos iniciales de 0.5 McF (- 1x10<sup>6</sup> UFC / mL). Se representa una sola de las *C. albicans* debido a la similitud entre ambas de los resultados obtenidos.



## Resultados

0,5 McF / 3 Log	<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. krusei</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	ATCC-10231		CECT-1001		ATCC-22019		ATCC-6258		ATCC-9763	
Fluencia (J.cm <sup>-2</sup> )	18	37	18	37	18	37	18	37	18	37
tiempo de contacto (h)										
0	0,62-1,25	0,32-0,62	0,32-0,62	0,32-0,62	1,25-2,5	0,62-1,25	40-80	10-20	2,5-5	1,25-2
0,25	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	1,25-2,5	1,25-2,5	40-80	10-20	2,5-5	2,5-5
0,5	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	1,25-2,5	1,25-2,5	40-80	10-20	2,5-5	2,5-5
1	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	1,25-2,5	1,25-2,5	40-80	10-20	2,5-5	2,5-5
3	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	2,5-5	1,25-2,5	40-80	10-20	2,5-5	2,5-5
5	1,25-2,5	0,62-1,25	1,25-2,5	0,62-1,25	2,5-5	1,25-2,5	40-80	20-40	2,5-5	2,5-5
24	2,5-5	1,25-2,5	2,5-5	1,25-2,5	5-10	5-10	-	-	5-10	5-10
0,5 McF / 3 Log	<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. rugosa</i>			
	456325H		AZN96325		AM07/0267		YFJ002-29			
Fluencia (J.cm <sup>-2</sup> )	18	37	18	37	18	37	18	37		
tiempo de contacto (h)										
0	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	5-10	1,25-2,5		
0,25	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	5-10	2,5-5		
0,5	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	5-10	2,5-5		
1	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	5-10	2,5-5		
3	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	5-10	2,5-5		
5	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	0,62-1,25	0,32-0,62	5-10	2,5-5		
24	1,25-2,5	0,62-1,25	1,25-2,5	0,62-1,25	1,25-2,5	0,62-1,25	10-20	5-10		

Tabla 1: Rangos de concentración de HIP necesarios (en  $\mu\text{M}$ ) en la TFD CON HIP *in vitro* para conseguir una reducción de  $\geq 99,9\%$  o 3 Log sobre inóculos de levaduras de  $1 \times 10^6$  UFC / mL o 0.5 McF. Se indican las concentraciones de HIP necesarias para provocar la disminución de 3 Logs empleando tiempos de incubación de las cepas en oscuridad con HIP a 35°C (1, 15, 30 min. y 1, 3, 5 y 24 h.). Se emplean fluencias de 18 y 37 Jcm<sup>2</sup>. Con una raya se indican las concentraciones que no pudieron calcularse.

4 McF / 6 Log	<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. krusei</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	ATCC-10231		CECT-1001		ATCC-22019		ATCC-6258		ATCC-9763	
Fluencia (J.cm <sup>-2</sup> )	18	37	18	37	18	37	18	37	18	37
tiempo de contacto (h)										
0	40-80	5-10	10-40	2,5-5	320-640	80-160	320-640	320	40-80	5-10
0,25	40-80	5-10	20-40	2,5-5	320-640	80-160	-	-	40-80	5-10
0,5	40-80	5-10	20-40	2,5-5	320-640	80-160	-	-	40-80	5-10
1	40-80	5-10	20-40	2,5-5	320-640	80-160	-	-	40-80	5-10
3	40-80	5-10	20-40	2,5-5	320-640	80-160	-	-	40-80	5-10
5	40-80	5-10	20-40	2,5-5	-	-	-	-	40-80	10-20
24	-	10-20	40-80	5-10	-	-	-	-	40-80	10-20
4 McF / 6 Log	<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. rugosa</i>			
	456325H		AZN96325		AM07/0267		YFJ002-29			
Fluencia (J.cm <sup>-2</sup> )	18	37	18	37	18	37	18	37		
tiempo de contacto (h)										
0	10-20	10-20	10-20	5-10	10-20	5-10	320-640	5-10		
0,25	10-20	10-20	10-20	5-10	10-20	5-10	320-640	5-10		
0,5	10-20	10-20	10-20	5-10	10-20	5-10	320-640	5-10		
1	10-20	10-20	10-20	5-10	10-20	5-10	320-640	5-10		
3	10-20	10-20	10-20	5-10	10-20	5-10	-	5-10		
5	10-20	10-20	10-20	5-10	10-20	5-10	-	5-10		
24	20-40	10-20	20-40	10-20	20-40	10-20	-	10-20		

Tabla 2: Rangos de concentración de HIP necesarios (en  $\mu\text{M}$ ) en la TFD CON HIP *in vitro* para conseguir una reducción de  $\geq 99,9999\%$  o 6 Log sobre inóculos de levaduras de  $1 \times 10^7$  UFC / mL o 4 McF. Se indican las concentraciones de HIP necesarias para provocar la disminución de 6 Log empleando tiempos de incubación de las cepas en oscuridad con HIP a 35°C (1, 15, 30 min. y 1, 3, 5 y 24 h.). Se emplean fluencias de 18 y 37 Jcm<sup>2</sup>. Con una raya se indican las concentraciones que no pudieron calcularse.



**i. Fotoinactivación según la especie de *Candida***

McF	F (J.cm <sup>2</sup> )	Nº Red. Log <sub>10</sub>	P
0,5	18	3	0,004
0,5	37	3	0,012
4	18	3	0,01
4	18	6	0,01
4	37	3	0,012
4	37	6	0,001

Tabla 3: significancia estadística en la TFD con HIP *in vitro* atendiendo a la especie de *Candida* que tratemos. Kruskal-Wallis . Rechazar la hipótesis nula si p<0,05

**ii. Fotoinactivación según la concentración inicial del inóculo**

CEPA	INÓCULO INICIAL (McF)	FLUENCIA (Jcm <sup>2</sup> )	P
<i>C. albicans</i> ATCC-10231	0,5	18	0,541
	4	18	
	0,5	37	0,026
	4	37	
<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019	0,5	18	0,02
	4	18	
	0,5	37	0,018
	4	37	
<i>C. krusei</i> ATCC-6258	0,5	18	0,046
	4	18	
	0,5	37	0,264
	4	37	
<i>C. albicans</i> CECT-1001	0,5	18	0,083
	4	18	
	0,5	37	0,102
	4	37	

Tabla 4: significancia estadística en la TFD con HIP *in vitro* atendiendo a la concentración inicial de inóculo empleada (0,5 o 4 McF). U de Mann-Whitney. P<0,05 diferencia estadísticamente significativa.



**iv-Fotoinactivación según el N° Log que quieran disminuirse**

CEPA	INÓCULO INICIAL (McF)	N° Red. Log <sub>10</sub>	FLUENCIA (Jcm-2)	P
<i>C. albicans</i> ATCC-10231	4	3	18	0,012
	4	6	18	
	4	3	37	0,004
	4	6	37	
<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019	4	3	18	0,009
	4	6	18	
	4	3	37	0,013
	4	6	37	
<i>C. krusei</i> ATCC-6258	4	3	18	0,046
	4	6	18	
	4	3	37	0,046
	4	6	37	
<i>C. albicans</i> CECT-1001	4	3	18	0,034
	4	6	18	
	4	3	37	0,029
	4	6	37	

Tabla 5: significancia estadística en la TFD con HIP *in vitro* atendiendo al número de unidades logarítmicas que se quiera disminuir (3 o 6 Log un inóculo inicial de 4 McF (- 1x10<sup>7</sup> UFC / mL). U Mann Whitney .P<0,05 diferencia estadísticamente significativa.



**v. Fotoinactivación según la fluencia empleada**

CEPA	INÓCULO INICIAL (McF)	Nº Red. Log <sub>10</sub>	FLUENCIA (Jcm <sup>-2</sup> )	P
<i>C. albicans</i> ATCC-10231	0,5	3	18	0,118
	0,5	3	37	
	4	3	18	0,881
	4	3	37	
<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019	0,5	3	18	0,088
	0,5	3	37	
	4	3	18	0,179
	4	3	37	
<i>C. krusei</i> ATCC-6258	0,5	3	18	0,18
	0,5	3	37	
	4	3	18	0,083
	4	3	37	
<i>C. albicans</i> CECT-1001	0,5	3	18	1
	0,5	3	37	
	4	3	18	0,317
	4	3	37	

Tabla 6: significancia estadística en la TFD con HIP *in vitro* atendiendo a la fluencia empleada (18 o 37 Jcm<sup>-2</sup>).  
U Mann Whitney .P<0,05 diferencia estadísticamente significativa.



### **b. Participación de las EROs en la fotoinactivación *in vitro* con HIP en levaduras**

#### **i. Estudios de EROs empleando con inhibidores**

Todos los inhibidores estudiados disminuyeron el efecto fotoinactivador ó fototóxico de la HIP en las distintas especies de *Candida* estudiada pero en diferente magnitud, reduciendo así la capacidad de la HIP de provocar efecto fungicida. El efecto de cada uno de los inhibidores de EROs dependió de la especie de levadura estudiada.

##### ▪ Efecto de la catalasa (CAT) como inhibidor de la TFD

La CAT fue el inhibidor que más redujo el efecto fotoinactivador del FS en la mayoría de las especies de *Candida* (Figura 9). La CAT llegó a inhibir casi por completo la actividad de la HIP en todas las cepas de *C. albicans* y en *C. parapsilosis*, recuperando casi por completo las 3 unidades logarítmicas fotoinactivadas por la TFD con HIP. El efecto “fotoprotector” de la CAT fue menos acusado en el caso de *C. krusei* y *C. rugosa* alcanzando, como máximo, una recuperación cercana a los 2 logaritmos con respecto a la TFD *in vitro* con HIP (Figura 8 y tabla 8).

##### ▪ Efecto de la súper óxido dismutasa (SOD) y la azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) como inhibidores de la TFD

La SOD y la NaN<sub>3</sub> inhibieron una menor proporción del efecto fototóxico de la HIP comparado con el que la CAT provocó. Este hecho ocurrió tanto para las especies de *Candida* no *albicans* ((Figura 8 y tabla 8) como para las de *C. albicans* (Figura 9). Numéricamente, ambos inhibidores demostraron una mayor significación en *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* donde hubo un incremento en la supervivencia celular de más de 2 unidades logarítmicas (de las 3 inhibidas por la TFD con HIP) en la inmensa mayoría de los casos. Para *C. krusei*, los valores de recuperación fueron, dependiendo de si se usó SOD o NaN<sub>3</sub>, de

entre 1 y 1,5 unidades logarítmicas con respecto a las muestras tratadas sin inhibidores ((Figura 8 y tabla 8).

- Efecto del MAN como inhibidor de la TFD

El empleo del MAN con las levaduras no produjo una inhibición aparente de la TFD con HIP sobre ninguna de las cepas testadas, con excepción de *C. krusei*. Se obtuvo una recuperación menor a un 1% en todas las cepas, salvo en el caso de *C. krusei*, donde presentó un valor promedio de un 14% de recuperación, lo que correspondería a una recuperación de 2 unidades logarítmicas de las 3 inhibidas por la TFD con HIP (Tabla 8 y figura 8).

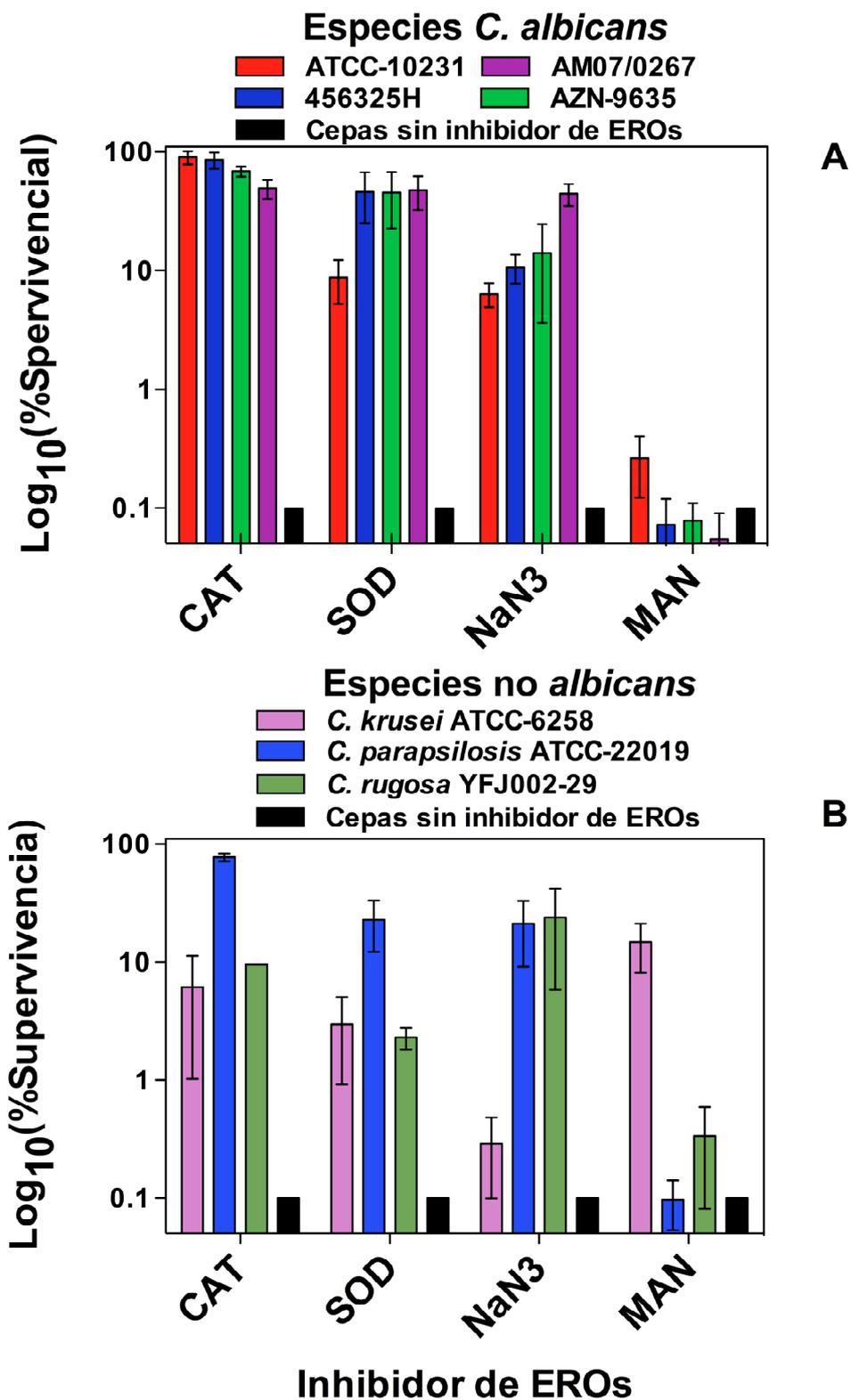


Figura 8: Representación del efecto de los inhibidores de EROs sobre de la TFD con HIP *in vitro*. Gráfica que representa las especies del género *Candida albicans*.(A) y *C. no-albicans* (B). Sobre el eje horizontal se representa, en grupos de 4, para cada inhibidor empleado (CAT, SOD, NaN<sub>3</sub> o MAN), las especies testadas (un color para cada especie) con un valor adicional que representa a todas las cepas sometidas a TFD CON HIP sin hacer uso de inhibidores (All strain. No quencher). Sobre el eje vertical se representa el logaritmo en base 10 de la concentración de las colonias de los inóculos testados representado por UFC / mL. La escala logarítmica del gráfico verticalmente representa los 3 Log capaces de ser reducidos con la TFD CON HIP donde el valor mínimo de 0.1 representa el efecto fototóxico de la TFD sin quenchers (valor que corresponde con All strain. No quencher) y el valor máximo de 100 como la "fotoprotección" del inhibidor frente a la terapia.



## Resultados

Especie reactiva de Oxígeno (ERO)	Inhibidor empleado	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	
		ATCC-10231	ATCC-22019	ATCC-6258	
Anión superóxido ( $O_2^-$ )	Superóxido dimutasa (SOD)	8,693	22,72	2,992	
Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	Catalasa (CAT)	85,82	77,18	4,478	
Radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ )	Manitol (MAN)	0,262	0,097	14,64	
Oxígeno singlete ( $^1O_2$ )	Azida sódica ( $NaN_3$ )	5,891	21,07	0,371	
		<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. rugosa</i>
		456325H	AZN96325	AM07/0267	YFJ002-29
Anión superóxido ( $O_2^-$ )	Superóxido dimutasa (SOD)	45,75	45,08	47,32	2,298
Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	Catalasa (CAT)	85,41	60,53	49,07	9,523
Radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ )	Manitol (MAN)	0,045	0,157	0,045	0,335
Oxígeno singlete ( $^1O_2$ )	Azida sódica ( $NaN_3$ )	10,67	14,07	44,41	23,81

Tabla 8: % de inhibición de la TFD con HIP sobre levaduras. Inhibición mediada por agentes antioxidantes neutralizadores de especies EROs



### **c. Estudios de EROs y marcadores de muerte celular por citometría de flujo**

#### **i- Morfología / complejidad (tamaño) celular**

Seleccionando como material de partida una zona concreta donde las células poseen una relación morfología / complejidad SSC-H / FSS-H determinada coincidente con las células de levadura, los datos de citometría de flujo reflejan que al aumentar la fluencia de la TFD con HIP sobre las cepas estudiadas (*C. krusei* ATCC-6258 y *C. albicans* ATCC-10231) existe un aumento en el número de células cuya morfología y complejidad celular se aleja de los valores normales de supervivencia (Figura 9, 10, 11, 12). Al aplicar, tanto 18 como 37 J.cm<sup>-2</sup> sobre las levaduras con HIP se observa, asimismo, un aumento de células en la zona de las células muertas (Figura 9, 10, 11, 12).

#### **ii- Relación superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en la TFD con diferentes levaduras**

Los estudios efectuados mediante el uso de dihidroxi-etidio (2HE) revelan que para ambas cepas empleadas en el estudio se observa la presencia de radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> en ambas cepas. Dentro de una misma cepa, conforme es aumentada la fluencia (0, 18 y 37 J.cm<sup>-2</sup>) se recogen valores mayores de células que están produciendo radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Comparando ambas cepas se observa una mayor proporción de células productoras de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en el caso de *C. albicans* ATCC-10231 a todas las fluencias empleadas (Figura 9, 11). El empleo de diclorohidrofluoresceína diacetato (DCFA) como detección de peróxido de hidrógeno no funcionó correctamente por lo que no pudo ser cuantificada su presencia.

#### **iii- Presencia de marcadores de muerte celular**

El empleo de 7-Amino-actinomicina D (7AAD) reflejan que la TFD produce pérdida de la integridad de la membrana nuclear para todas las condiciones de fluencia empleadas (18 y 37 J.cm<sup>-2</sup>) y para las dos cepas estudiadas. Se observa una mayor proporción de células con su membrana nuclear dañada en el caso de las células que recibieron la

mayor fluencia (para ambas cepas). Entre ambas cepas, la especie *C. albicans* fue en la que se constató una mayor proporción de células con su membrana nuclear dañada para ambas fluencias en comparación con la especie *C. krusei* (Figura 10, 12). El empleo de anexina V FITC como detector de residuos de fosfatidil serina no funcionó correctamente, por lo que no se pudo saber nada acerca de la integridad general de membranas.

### **iv- Condensación de la cromatina**

Utilizando Hoechst como marcador nuclear y empleando el microscopio de fluorescencia, se observa condensación de la cromatina del DNA en todas las condiciones de fluencia empleadas (18 y 37 J.cm<sup>-2</sup>) en la TFD para las dos cepas estudiadas (Figura 13).

# Resultados

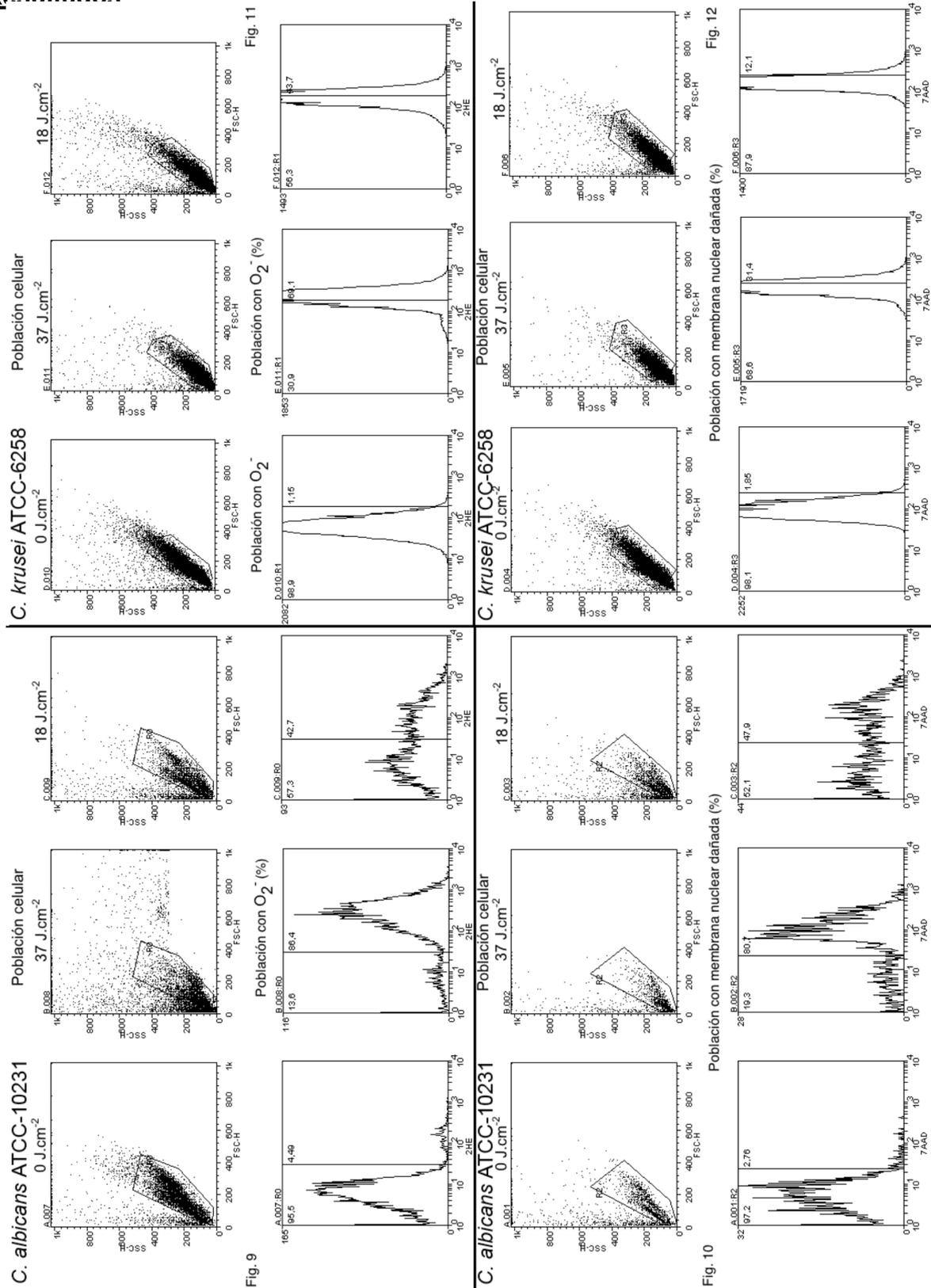


Figura 9, 11: Primera fila: Representación de las poblaciones celulares obtenidas por citometría de flujo tras irradiar con diferentes fluencias (0, 18 y 37 J.cm<sup>-2</sup>) y con HIP (Para *C. albicans* 0.62 μM y *C. krusei* 40 μM). Segunda fila: % de células en cada población superior con formación de radical superóxido.

Figura 10, 12: Primera fila: Representación de las poblaciones celulares obtenidas por citometría de flujo tras irradiar con diferentes fluencias (0, 18 y 37 J.cm<sup>-2</sup>) y con HIP (Para *C. albicans* 0.62 μM y *C. krusei* 40 μM). Segunda fila: % de células en cada población superior con la membrana nuclear dañada.



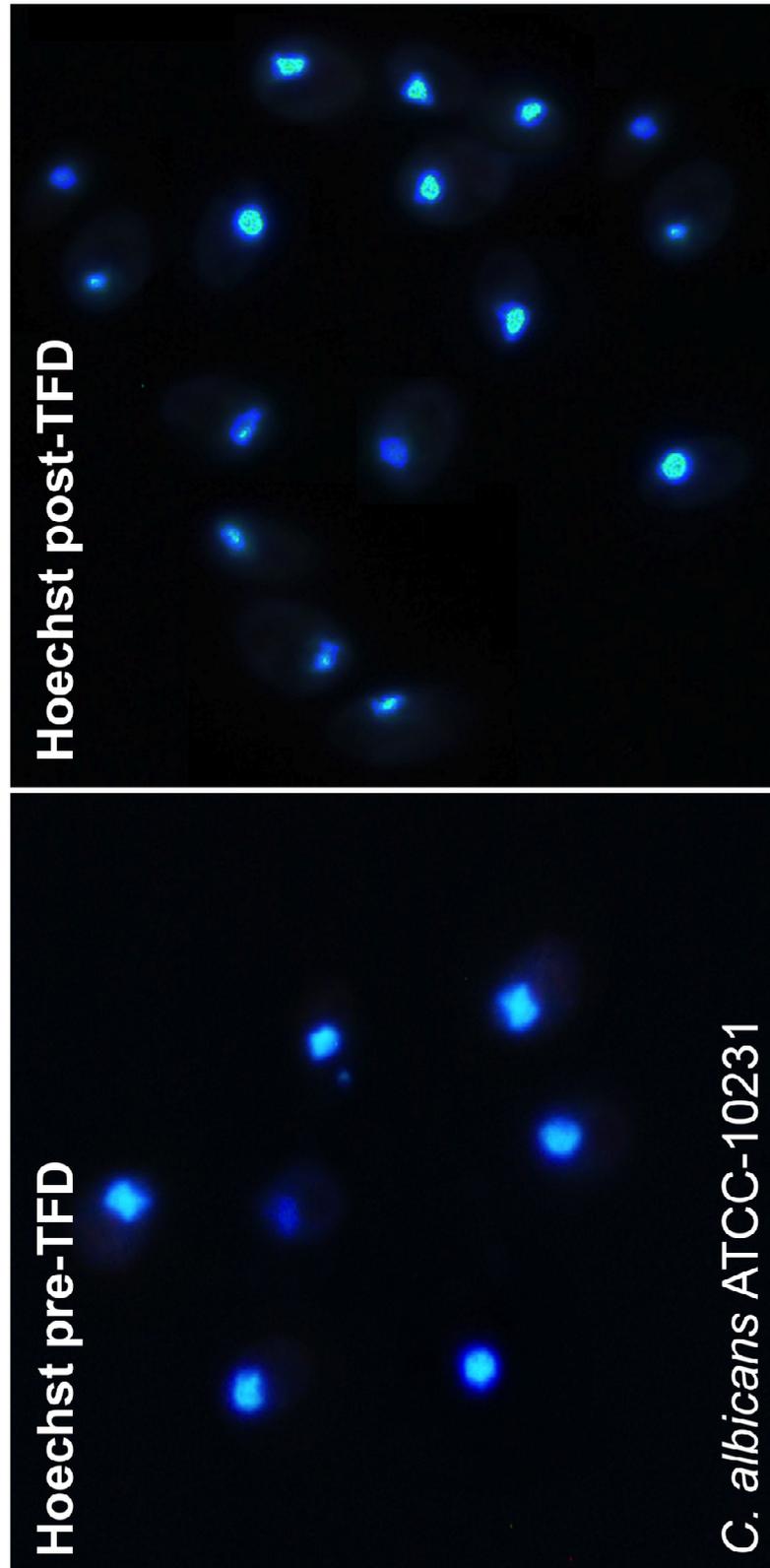


Figura: 13: Detalle de la condensación de la cromatina manifestada en los núcleos de células de *C. albicans* ATCC-10231 por tinción con Hoechst tras someter a las células a TFD con HIP.



# **Fotoinactivación *in vitro* de dermatofitos con HIP**

## **a. Fotoinactivación según la especie *Trichophyton***

El tratamiento fotodinámico *in vitro* con HIP en dermatofitos demostró producir muerte celular hasta alcanzar los valores fungicidas de reducción de 3 Log. La reducción de más de 3 Log del inóculo inicial requirió una concentración de HIP de entre 25 y 50  $\mu\text{M}$  para la especie de *T. rubrum* y entre 50 y 200  $\mu\text{M}$  para *T. mentagrophytes* empleando 37  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  de fluencia (Figura 14 y tabla 7).

## **b. Fotoinactivación según el tiempo de incubación con la HIP**

Aplicando tiempos de incubación de 0, 15, 30 y 60 min. se observa que la eficacia fotoinactivadora de la HIP aumenta cuanto mayor es el tiempo de incubación con la misma. Se comprueba que los tiempos de incubación máximos (30 y 60 min.) resultan efectivos en la reducción de 3 Log a concentraciones de HIP incapaces de lograrlo a tiempos de incubación menores (Tabla 7).

## **c. Resultados de los Controles**

### **i. Toxicidad de la luz**

Al igual que en los experimentos de levaduras, el control demostró que la lámpara LED no produce un efecto biocida aparente en el crecimiento microbiano al no inhibir su crecimiento más allá de 0,5 Log (Figura 14).

En algunos casos se obtuvieron un mayor número de colonias en las muestras incubadas e irradiadas sin FS que en los controles sin irradiar y sin FS. Sin embargo, en cómputo global, la cantidad de colonias fue

menos en las muestras irradiadas (Figura 14).

### **ii.Toxicidad del Fotosensibilizante**

El control demostró que la HIP a las concentraciones que provocan los efectos fototóxicos es inocua en oscuridad al provocar una inhibición en ambas cepas que no supera los 0,5 Log (Figura 15).

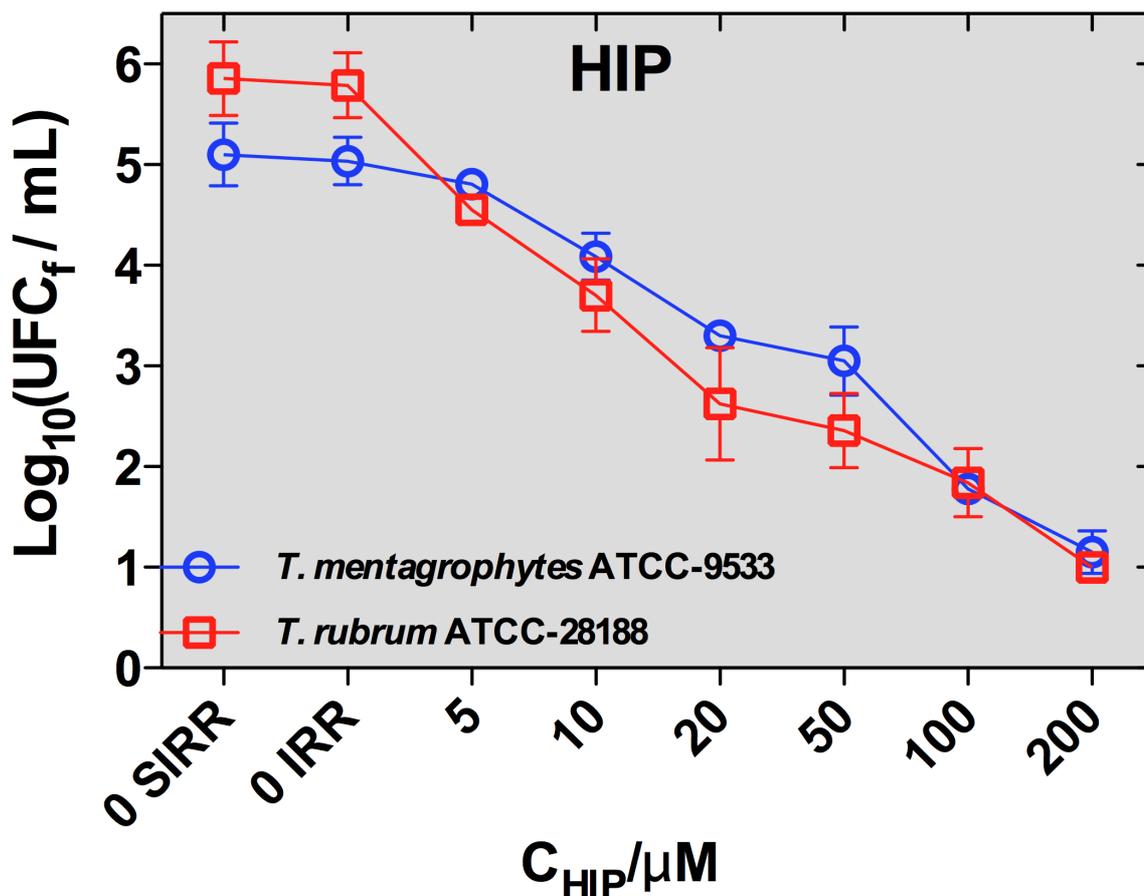


Figura 14: Representación gráfica de la toxicidad de la TFD con HIP *in vitro* frente a hongos dermatofitos del género de *Trichophyton*. La gráfica representa, en el eje vertical, el logaritmo en base 10 de la concentración de germen, partiendo de un inóculo inicial de 0.5 McF (~10<sup>6</sup> UFC / mL), frente a la concentración de HIP (eje horizontal) empleada. Asimismo se representa la influencia de la fuente de luz empleada sobre las cepas: 0<sub>SIRR</sub> (inóculo inicial sin irradiar y sin HIP) y 0<sub>IRR</sub> (inóculo inicial irradiado y sin HIP).

0,5 McF / 3 Log	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
	ATCC-9533	ATCC-28188
Fluencia (J.cm <sup>-2</sup> )	37	37
tiempo de contacto (h)		
0	50-200	20-50
0,25	50-200	20-50
0,5	50-100	10-20
1	20-50	10-20

Tabla 7: Rangos de concentraciones de HIP necesaria (en μM) en la TFD *in vitro* para conseguir una reducción de ≥ 99.9 % o 3 Log de un inóculo de células de ~1x10<sup>6</sup> UFC / mL o 0.5 McF. Se indican los tiempos de incubación empleados (1, 15, 30 y 60 min.) de la HIP con las cepas en oscuridad a 30°C y empleando una fluencia de 37 Jcm<sup>-2</sup>.



## Resultados

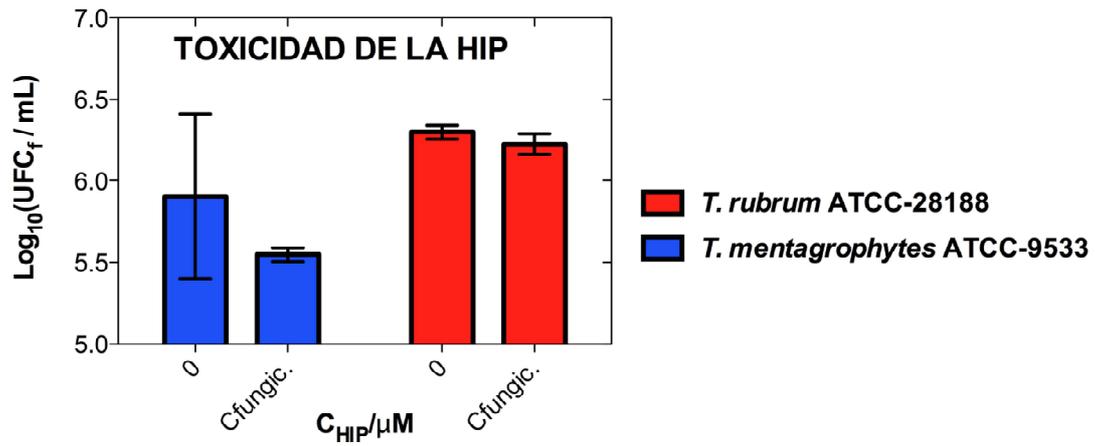


Figura 15: Representación de la toxicidad *per se* de la HIP en oscuridad sobre Hongos dermatofitos del género *Trichophyton*. Los valores están agrupados en dúos representando concentración de HIP = 0 (0) y concentración de HIP para la reducción de  $\geq 99.9\%$  o 3 Log (C<sub>fungic.</sub>). Sobre el eje vertical se representa el logaritmo en base 10 de la concentración de las colonias de los inóculos testados (inóculos iniciales de 0.5 McF o  $1 \times 10^6$  UFC / mL).



# **Efecto de la TFD *in vitro* con HIP en células cutáneas humanas**

El tratamiento fotodinámico con HIP sobre queratinocitos y fibroblastos humanos demostró su capacidad fototóxica sobre células cutáneas humanas produciendo muerte celular apreciable. En todos los experimentos (salvo en los controles) se empleó el tiempo de incubación óptimo obtenido para tratar *in vitro* a las levaduras (1 min).

## **a. Viabilidad celular en las condiciones de reducción de**

### **3 Log**

Las células mantuvieron una viabilidad superior o igual al 90 % sólo en los casos en los que se aplicaron las mismas condiciones de concentración de FS iguales o menores que para las cepas de *C. albicans* en la eliminación de 3 Log, es decir, uso de concentraciones de HIP no superiores a 1,25  $\mu\text{M}$  con fluencias no superiores a 37  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Figura 16; HaCaT (A) y hNDF (C)).

## **b. Viabilidad celular en las condiciones de reducción de más de 3 Log**

La viabilidad de ambos tipos celulares experimentaba un descenso hasta alcanzar valores nulos de supervivencia si eran empleadas concentraciones de FS superiores o iguales a 5  $\mu\text{M}$  con las dos fluencias máximas (18 y 37  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) (Figura 16; HaCaT (A) y hNDF (C)). Este descenso en la supervivencia no fue tan acusado a esa misma concentración si se empleaba la fluencia mínima (8  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), donde la viabilidad celular se mantenía en un 70 %.

### **c. Resultados de los controles**

Tanto la toxicidad de la HIP como de la luz por separado (ambos parámetros testados empleando las mismas condiciones de concentración de FS y fluencia que para las que provocaban efectos fototóxicos sobre ellas) no ejercieron efectos tóxicos aparentes:

#### **i. Toxicidad de la luz**

Empleando diferentes fluencias (8, 18 y 37 J.cm<sup>-2</sup>) se observó que este parámetro no ejerció influencia sobre la toxicidad de la fuente de luz sin FS sobre las células.

#### **ii. Toxicidad del FS**

Empleando tiempos de incubación con HIP de 1, 15, 30 y 60 min se observó que éste parámetro no ejerció influencia sobre la toxicidad del FS en oscuridad sobre las células (Figura 16; HaCaT (B) y hNDF (D)).

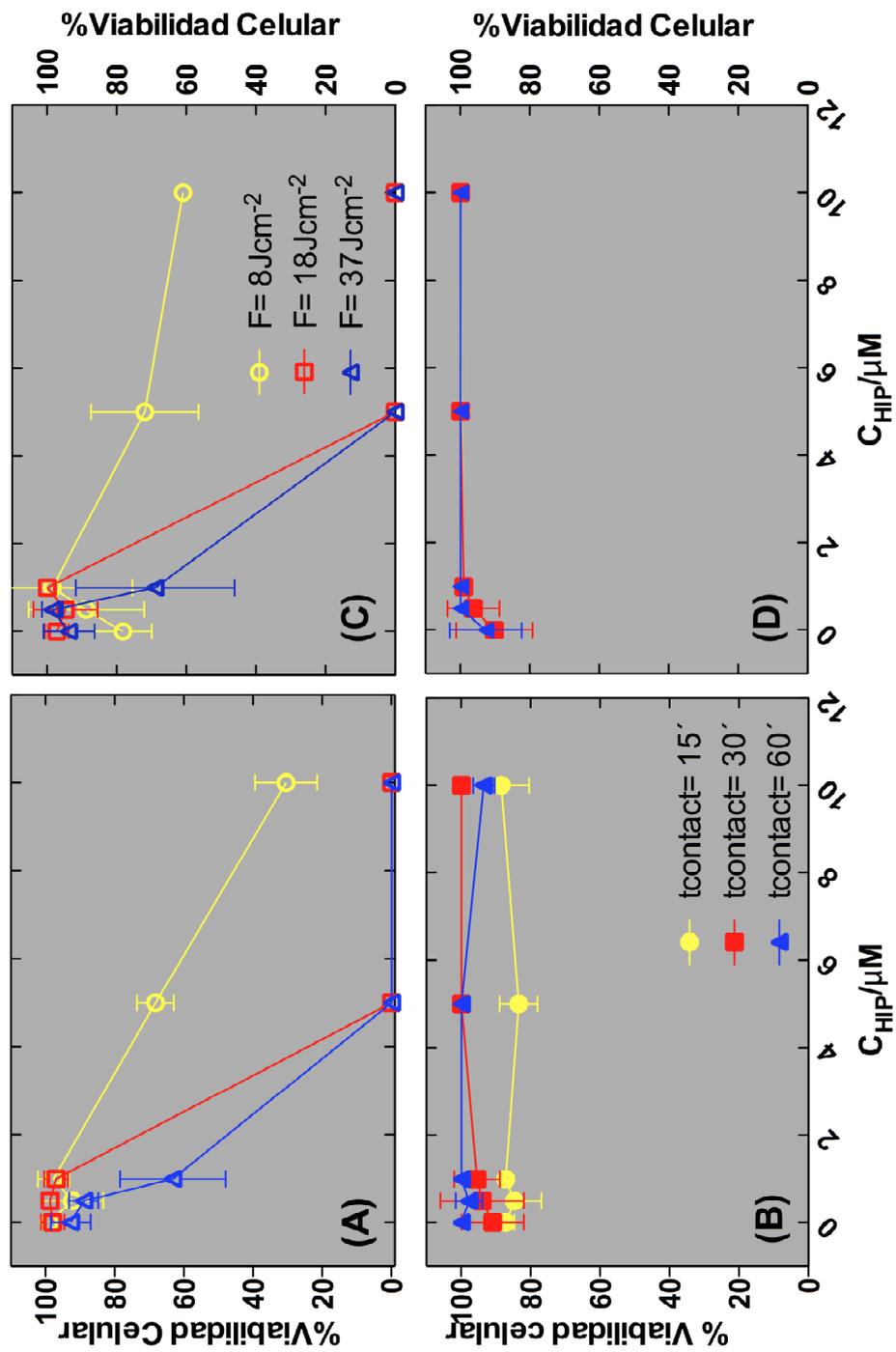


Figura 16: Toxicidad *in vitro* de la HIP sobre células humanas dérmicas bajo diferentes condiciones: Queratinocitos HaCaT sometidos a HIP con irradiación (8, 18 y 37  $Jcm^{-2}$ ) (A) y a oscuridad (B) (Dark Toxicity). Fibroblastos hNDF sometidos a HIP con irradiación (8, 18 y 37  $Jcm^{-2}$ ) (C) y a oscuridad (D) (Dark Toxicity).



## **Localización de HIP en células por microscopía de fluorescencia**

### **a. Localización de HIP en levaduras**

#### **i. Localización intracelular**

Los estudios de microscopía confocal *in vitro* revelan que existe una co-localización del FS con la sonda citoplasmática CellTracker® Green (CTG) (Figura 17D, 18D y 27). Esta co-localización se mantiene en todos los tiempos de incubación del FS con las células empleados (1 y 30 min.).

El FS se multilocaliza, presentando una distribución citoplasmática que varía dependiendo de cual sea la cepa testada. El FS aparece formando acúmulos pequeños en forma de punteado y en un bloque círculo-elipsoidal de mayor tamaño en el caso de *C. albicans* (Figura 16(A/C)). En el caso de *C. parapsilosis* (Figura 17(A/C)) la HIP aparece como acúmulos en zonas concretas, mostrando co-localización con la sonda MitoTracker® Green (MTG). En *C. krusei* (Figura 18(B/F)) la distribución es mucho más dispersa que en el caso de las otras dos y se desdibuja en todo el citoplasma pese a poseer también punteados característicos que no co-localizan con la sonda mitocondrial.

No se pudo obtener información acerca de la co-localización de la HIP con el MTG por microscopía confocal en las especies de *C. albicans* y *C. krusei*. Para ello fueron empleadas las sondas mitocondriales DIOC<sub>6</sub>® (Figura 25 y 26) y MitoTracker Red® (MTR) (solo para el caso de *C. albicans*) (Figura 26) mediante un microscopio de fluorescencia no-confocal. Se obtuvo un patrón de localización de la HIP con respecto al DIOC<sub>6</sub>® en algunos casos similar en el caso de *C. krusei* (Figura 25). Para *C. albicans* el patrón de localización del MTR y del DIOC<sub>6</sub>® fue similar en algún caso pero no en todos (Figura 26).

### **ii. Localización nuclear**

La HIP no se encuentra en el plano focal donde encontramos el marcador nuclear DAPI a los tiempos de incubación del FS empleados (1 y 30 min.), por lo que, en todas las especies testadas, no se muestra colocalización con él (Figura 17C, 18C 19(E/F) y 21).

### **iii. Localización frente al tiempo de incubación (time course)**

Al mantener un contacto de la HIP con las cepas durante 24h en oscuridad y a 35 °C, se sigue observando co-localización con la sonda CTG. La HIP sigue sin co-localizar con la sonda nuclear DAPI (Figura 20). Al comparar los resultados con los de los tiempos de contacto de 1 y 30 min, la distribución celular del FS sufre en líneas generales una mayor especificidad de localización, exceptuando el caso de *C. albicans*, donde la localización no varía. En *C. parapsilosis* la localización varía al aparecer el FS en punteados más gruesos, equivalentes a los encontrados en *C. albicans*. Finalmente, en el caso de *C. krusei* se observa una menor multilocalización, apareciendo acúmulos del FS en zonas más específicas, que no pudieron ser identificadas debido a la limitación que se tuvo a la hora de emplear el marcador nuclear MTG (explicación más adelante). Pese a que no se realizaron estudios relativos a la intensidad de la emisión del FS, parece que en las tres cepas se mantiene la intensidad de la fluorescencia emitida en comparación con los tiempos de contacto de 1 y 30 minutos (Figura 20).

### **iv. Resultado de los controles**

El empleo de muestras control sin FS demostró que en la franja de fluorescencia donde emite la HIP no existe ninguna sustancia perteneciente a la levadura que pudiera provocar auto-emisión. Con este hecho se confirma que es la HIP la sustancia que se encuentra en el interior y no existe auto-fluorescencia de la levadura en ese rango de longitud de onda.

### **b. Localización de HIP en dermatofitos**

#### **i. Localización intracelular**

Empleando la microscopía confocal *in vitro* se observa que la HIP co-localiza con la sonda CTG durante, al menos, los primeros 30 minutos de contacto con la cepa *T. mentagrophytes*. La microscopía confocal revela que el plano del marcador celular concuerda con el del FS tanto en el caso de las células septadas formando hifas como en el de las microconidias (Figura 22). Se observa una multilocalización del FS en el interior celular presentando acúmulos específicos no identificables (Figura 22-2(A/C/D)).

Al igual que en el caso de las levaduras, la sonda MTG no funcionó satisfactoriamente por lo que no pudo establecerse con claridad si la HIP se acumula en las mitocondrias.

No se pudo concretar la localización del FS en el caso de la especie *T. rubrum* debido a que dicha especie no fue capaz de acumular ninguna de las sondas en las condiciones de reacción que fueron empleadas.

#### **ii. Localización nuclear**

En líneas generales no existió colocalización del FS con la sonda nuclear DAPI, ni en hifas ni en microconidias (Figura 22-2C). Sin embargo existe algún ejemplo aislado en hifas en los que si que se observa un acumulo de HIP (Figura 22-1C) en zonas donde encontramos a la sonda DAPI.

#### **iii. Resultado de los controles**

El empleo de muestras control sin HIP demostró que en la franja de emisión de fluorescencia del FS no existe auto-fluorescencia del hongo.

### **c. Localización de HIP en queratinocitos HaCaT**

#### **i. Localización intracelular**

En los estudios de microscopía invertida *in vivo* existen sondas específicas de organelas celulares que co-localizan con la HIP.

Pese a presentar una multilocalización en el interior celular, la HIP muestra una clara co-localización con el marcador LysoTracker Green (LTG) (Figura 23F). Asimismo, la HIP presenta colocalización parcial con el marcador DiOC<sub>6</sub> en células (Figura 23C).

#### **ii. Localización nuclear**

Los estudios de microscopía confocal *in vitro* demuestran que la HIP no presenta colocalización con el marcador nuclear Hoechst (Figura 23B).

#### **iii. Localización frente al tiempo de incubación (time course)**

En los estudios de time course de microscopía invertida *in vivo* se observa que al mantener un contacto la HIP con las células durante 1, 5 y 24 h en oscuridad y a 37 °C, ambos FSs no varían en gran medida su localización durante todo el estudio (Figura 24(A/B/C)).

Sin embargo se puede decir que, pese a no manifestar grandes cambios, su especificidad de localización aumenta al aumentar el tiempo de contacto, disminuyendo su diseminación generalizada. No puede descartarse, no obstante, que haya menor fluorescencia en el interior celular a las 24 h de contacto, hecho parece concordar con los estudios de uptake de HIP expuestos más arriba.

No se dispone de colocalizaciones a los tiempos de incubación de 5 y 24 h por lo que no se puede concluir con total exactitud la localización del FS. Sin embargo, observando los patrones de localización de las sondas se observa que, conforme va pasando el tiempo, la HIP se va acumulando en zonas cercanas al núcleo que coinciden con la

localización de algunas de las sondas empleadas, en particular, con la sonda LTG.

Estudios de time course realizados con DAPI siguen descartando la presencia de la HIP en el núcleo a lo largo del tiempo de incubación del FS con las células.

### **iv. Resultado de los controles**

El empleo de muestras control sin HIP demostró que en la franja de emisión de fluorescencia del FS no existe auto-fluorescencia de las células.

## **d. Localización de HIP en fibroblastos hNDF**

### **i. Localización intracelular**

Los estudios de microscopía confocal *in vitro* revelan que la HIP se presenta en el mismo plano focal que marcadores intracelulares como CTG (Figura 23J).

Sin embargo, a rasgos generales, no hubo un buen funcionamiento de las sondas en los estudios *in vitro* debido a que se observó que las células no se encontraban en buen estado. Con este estudio no podíamos saber con total certeza si los FS se encuentran en el interior celular o no pese a encontrarse en el mismo plano focal que las sondas intracelulares. A pesar de ello se ha decidido adjuntar imágenes de uno de los estudios para evaluar de alguna forma los resultados obtenidos.

### **ii. Localización nuclear**

Estudios posteriores de microscopía invertida *in vivo* revelan, que la HIP se no presenta colocalización con el marcador nuclear DAPI (Figura 23K).

### **iii. Localización frente al tiempo de incubación (time course)**

## **Resultados**

---

En los estudios de time course de microscopía invertida *in vivo* se observa que al mantener un contacto la HIP con las células durante 1, 5 y 24h en oscuridad y a 37 °C no se producen grandes variaciones en el patrón de localización del FS. (Figura 24(D/E/F)).

No se realizaron estudios con marcador nuclear a 5 y 24h por lo que no puede asegurarse la no presencia de la HIP en el núcleo a esos tiempos de contacto.

### **iv. Resultado de los controles**

El empleo de muestras control sin HIP demostró que en la franja de emisión de fluorescencia del FS no existe auto-fluorescencia de las células.

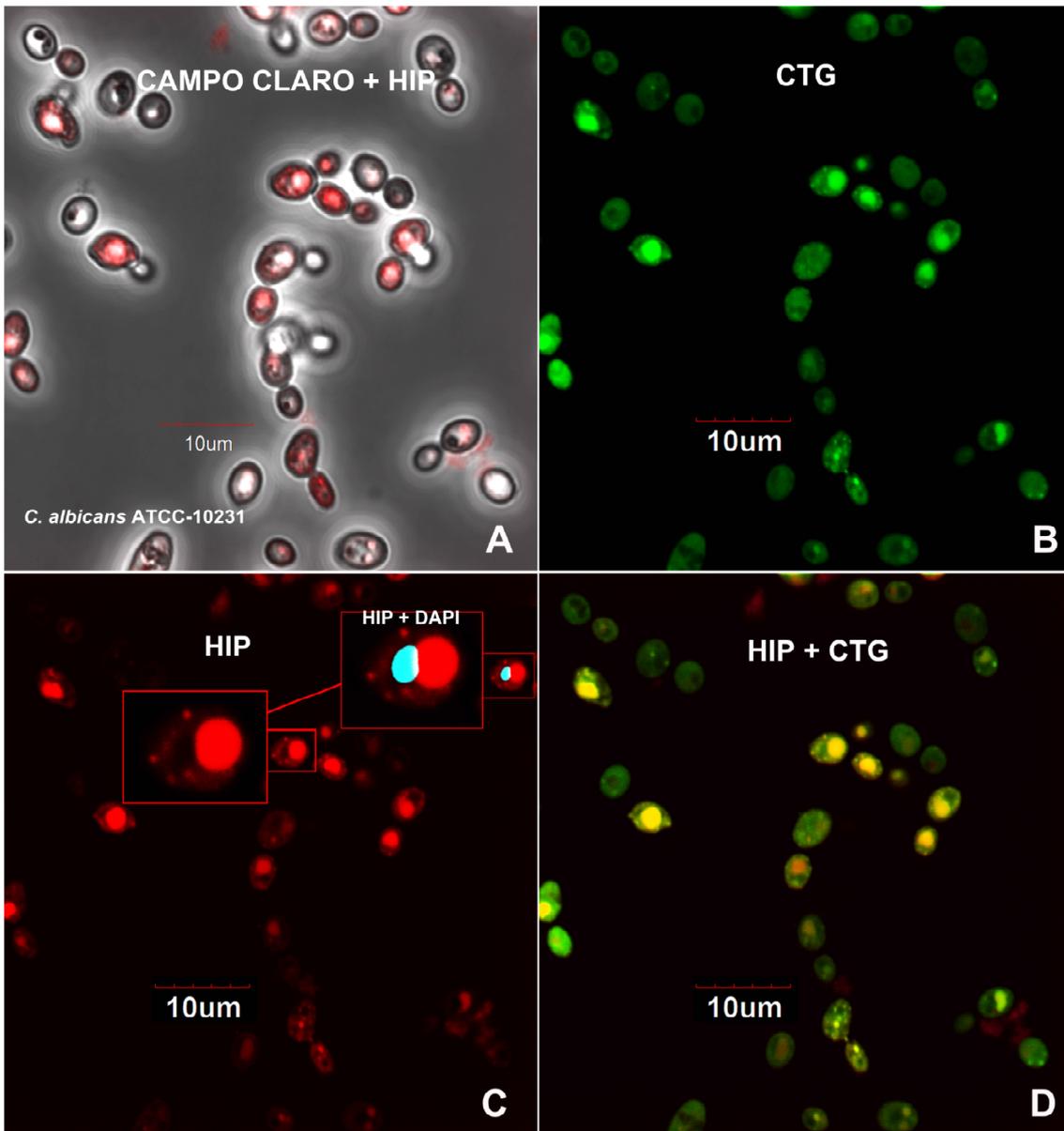


Figura 17: Estudio del patrón de localización de la HIP mediante microscopía confocal de fluorescencia *in vitro* sobre la cepa *Candida albicans* ATCC-10231 con un tiempo de incubación de la HIP de 1 min en oscuridad y 35°C . Estudio de la colocalización de la HIP con diferentes sondas en un mismo plano focal. A: superposición de microscopía de campo claro con la fluorescencia de la HIP (roja) recogida. B: fluorescencia de la sonda citoplasmática CTG (verde). C: fluorescencia de la HIP (roja) con detalle de la no colocalización con la sonda nuclear DAPI (azul). Se observa el detalle de la localización punteada de la HIP. D: Colocalización HIP con la sonda CTG (verde + roja = amarillo/naranja).



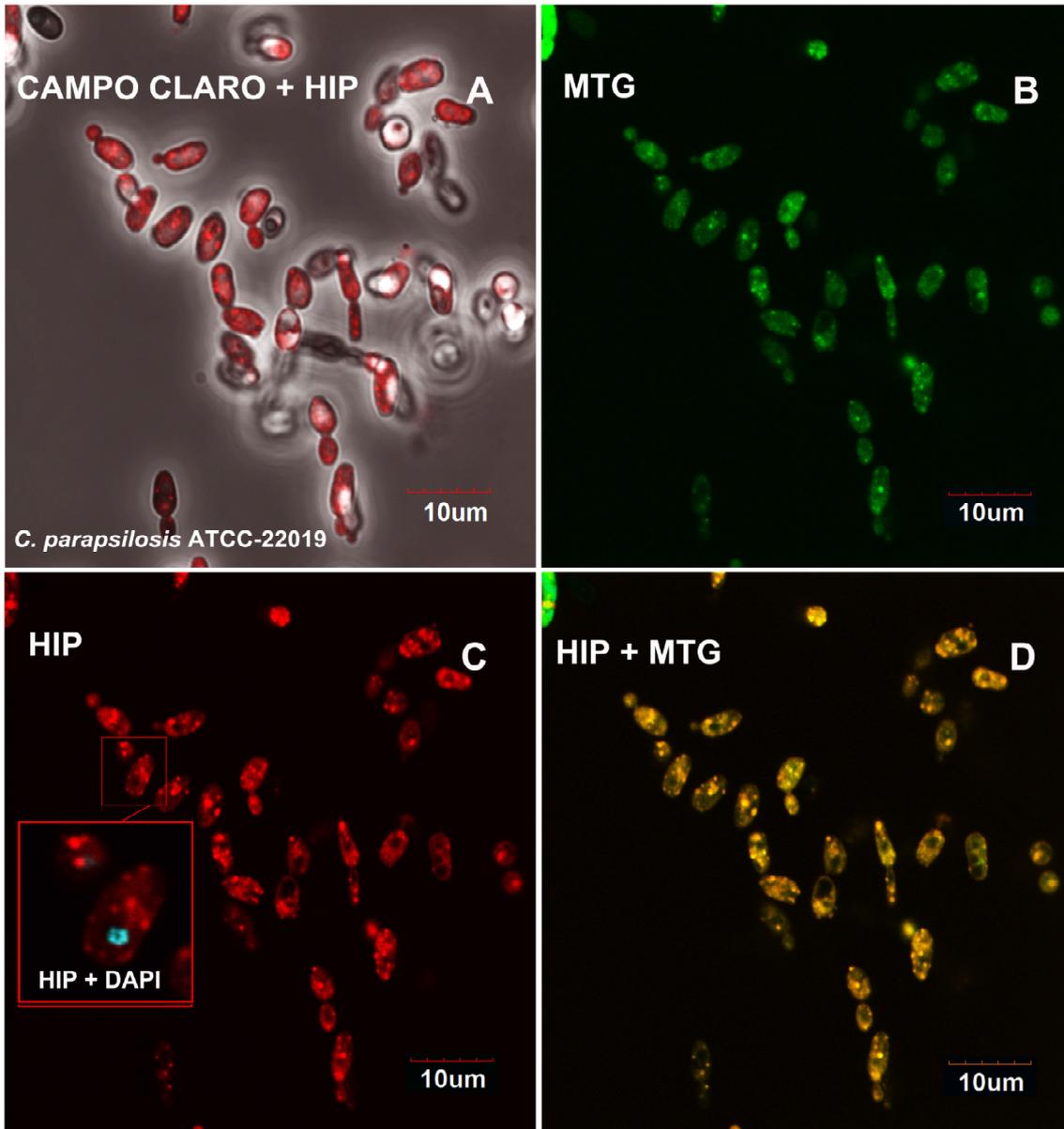


Figura 18: Estudio del patrón de localización de la HIP mediante microscopía confocal de fluorescencia in vitro sobre la cepa *Candida parapsilosis* ATCC-22019 con un tiempo de incubación de la HIP de 1 min en oscuridad y 35°C . Estudio de la colocalización de la HIP con diferentes sondas en un mismo plano focal. A: superposición de microscopía de campo claro con la fluorescencia de la HIP (roja) recogida. B: Fluorescencia de la sonda mitocondrial MTG (verde). C: Fluorescencia de la HIP (roja) con detalle de la no colocalización con el marcador nuclear DAPI (azul). Se observa la localización punteada de la HIP. D: Colocalización HIP con la sonda MTG (verde + roja = amarillo/naranja) con DAPI (azul) no colocalizado con la HIP.



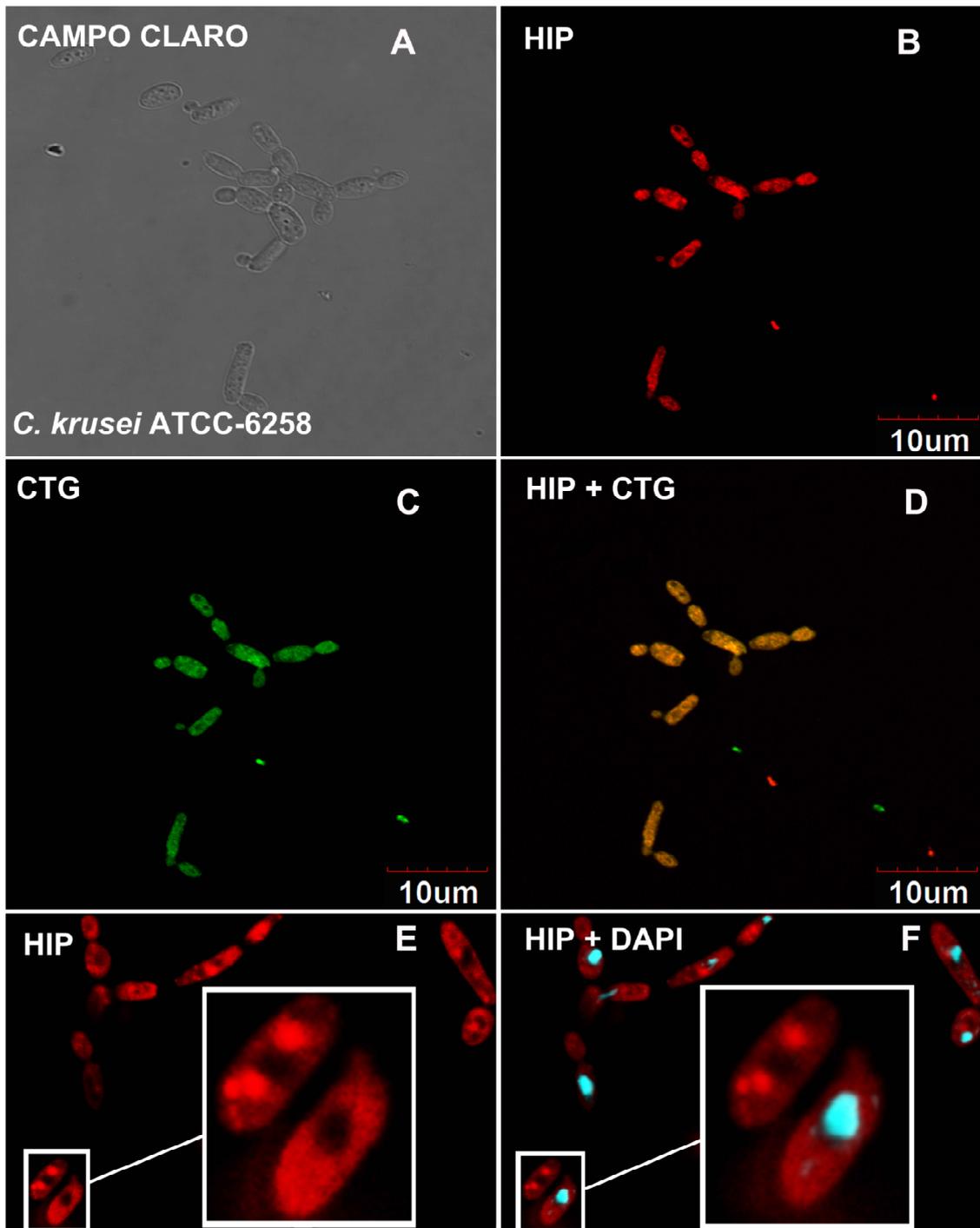


Figura 19: Estudio del patrón de localización de la HIP mediante microscopía confocal de fluorescencia *in vitro* sobre la cepa *Candida krusei* ATCC-6258 con un tiempo de incubación de la HIP de 1 min en oscuridad y 35°C . Estudio de la colocalización de la HIP con diferentes sondas en un mismo plano focal. A: microscopía de campo claro. B: Fluorescencia de la HIP (roja). C: Fluorescencia de la sonda citoplasmática CTG (verde). D: Colocalización HIP con la sonda CTG (verde + roja = amarillo/naranja). E/F: demostración de la no colocalización de la HIP (roja) con la sonda nuclear DAPI (azul). Detalle de la localización punteada de la HIP.



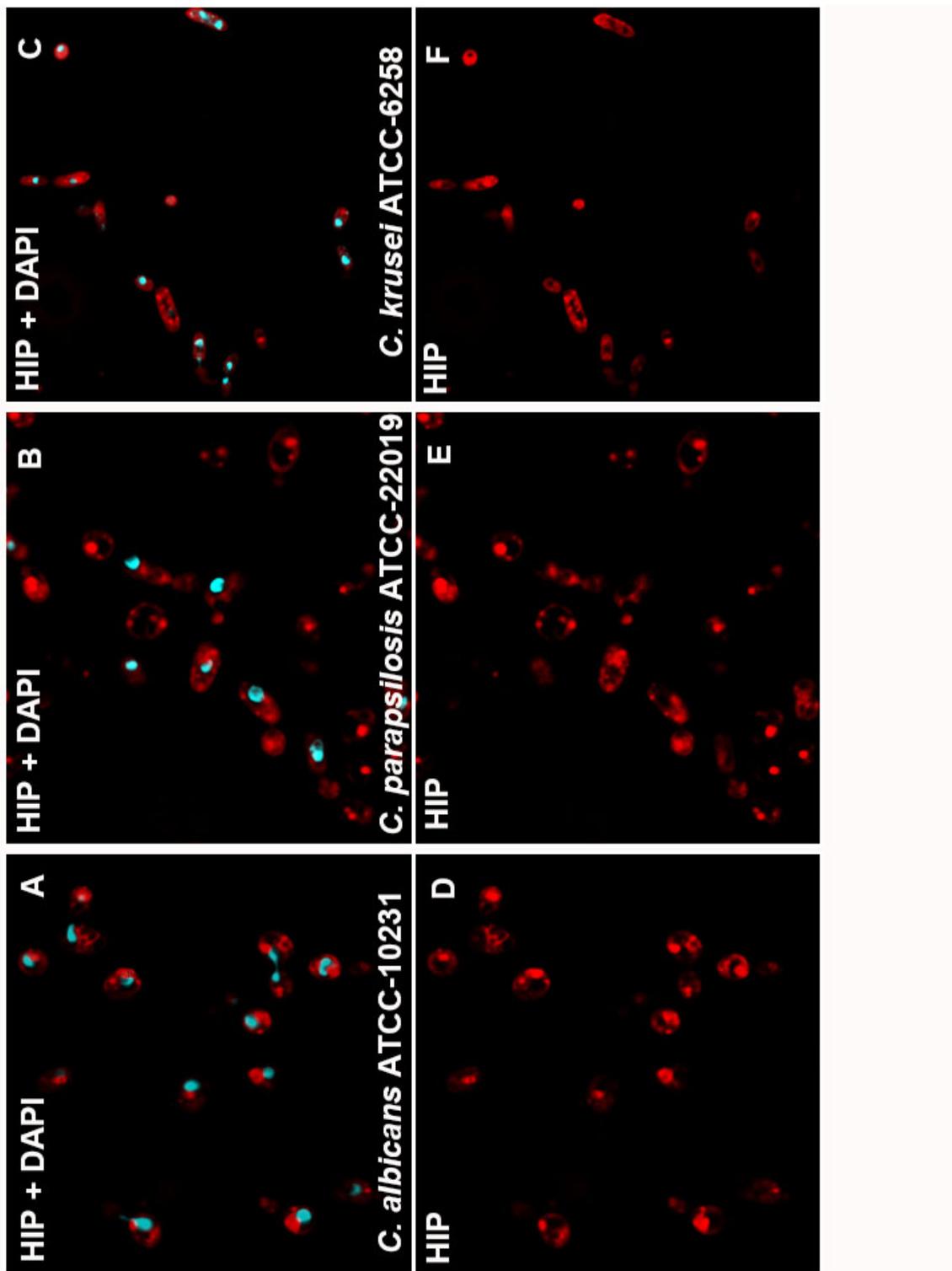


Figura 20: Estudio mediante microscopía confocal de fluorescencia in vitro del patrón de localización de la HIP (roja) a tiempo de incubación de la HIP de 24h en oscuridad y 35°C con detalle de la no localización con la sonda nuclear DAPI (azul) para las cepas *C. albicans* ATCC-10231 (A/D), *C. parapsilosis* ATCC-22019 (B/E) y *C. krusei* ATCC-6258 (C/F).



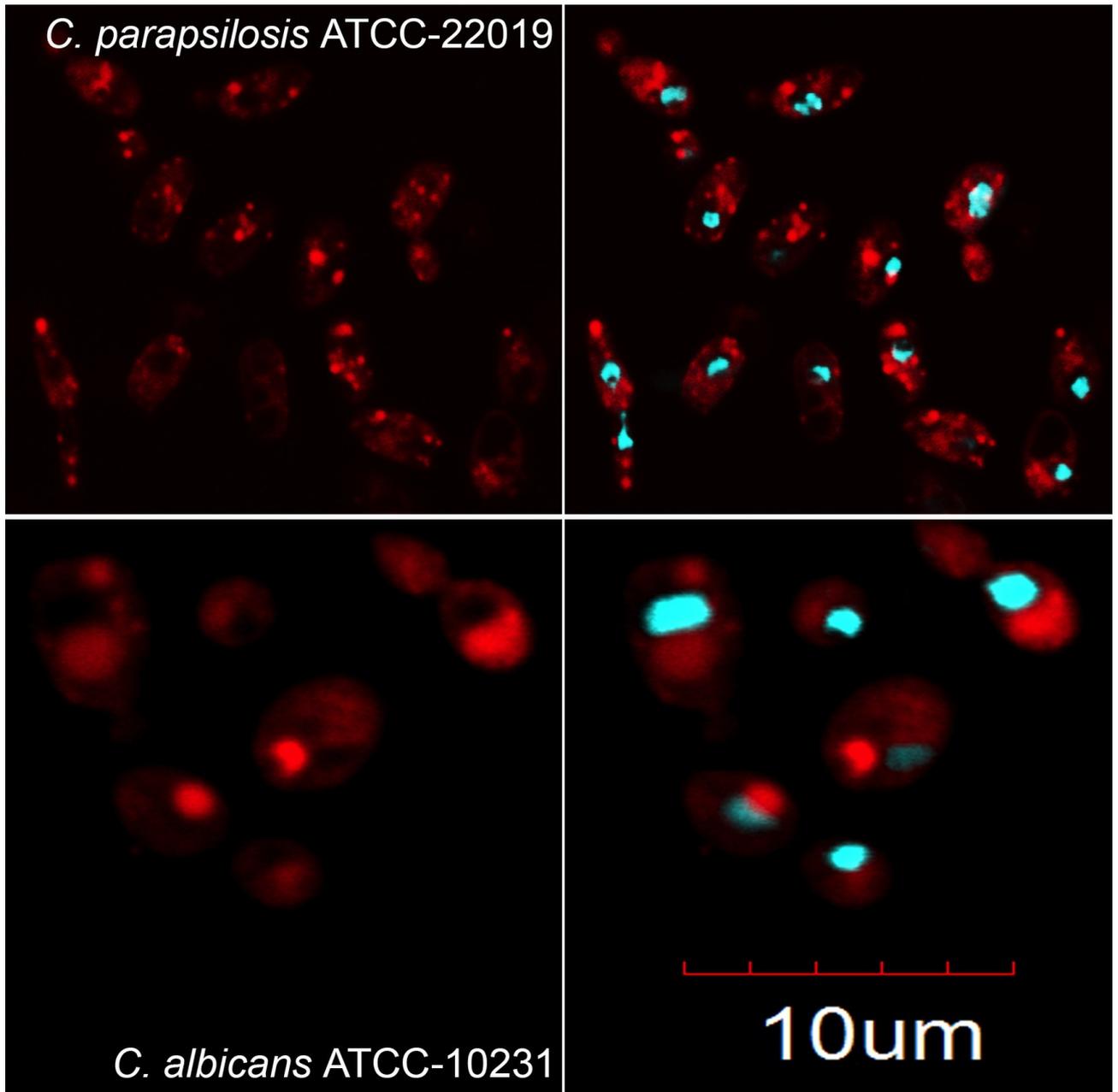


Figura 21: Estudio mediante microscopía confocal de fluorescencia in vitro de la no localización de la HIP (roja) con el marcador nuclear DAPI a tiempo de incubación de 1 min para las cepas *C. albicans* ATCC-10231 y *C. parapsilosis* ATCC-22019.



## Resultados

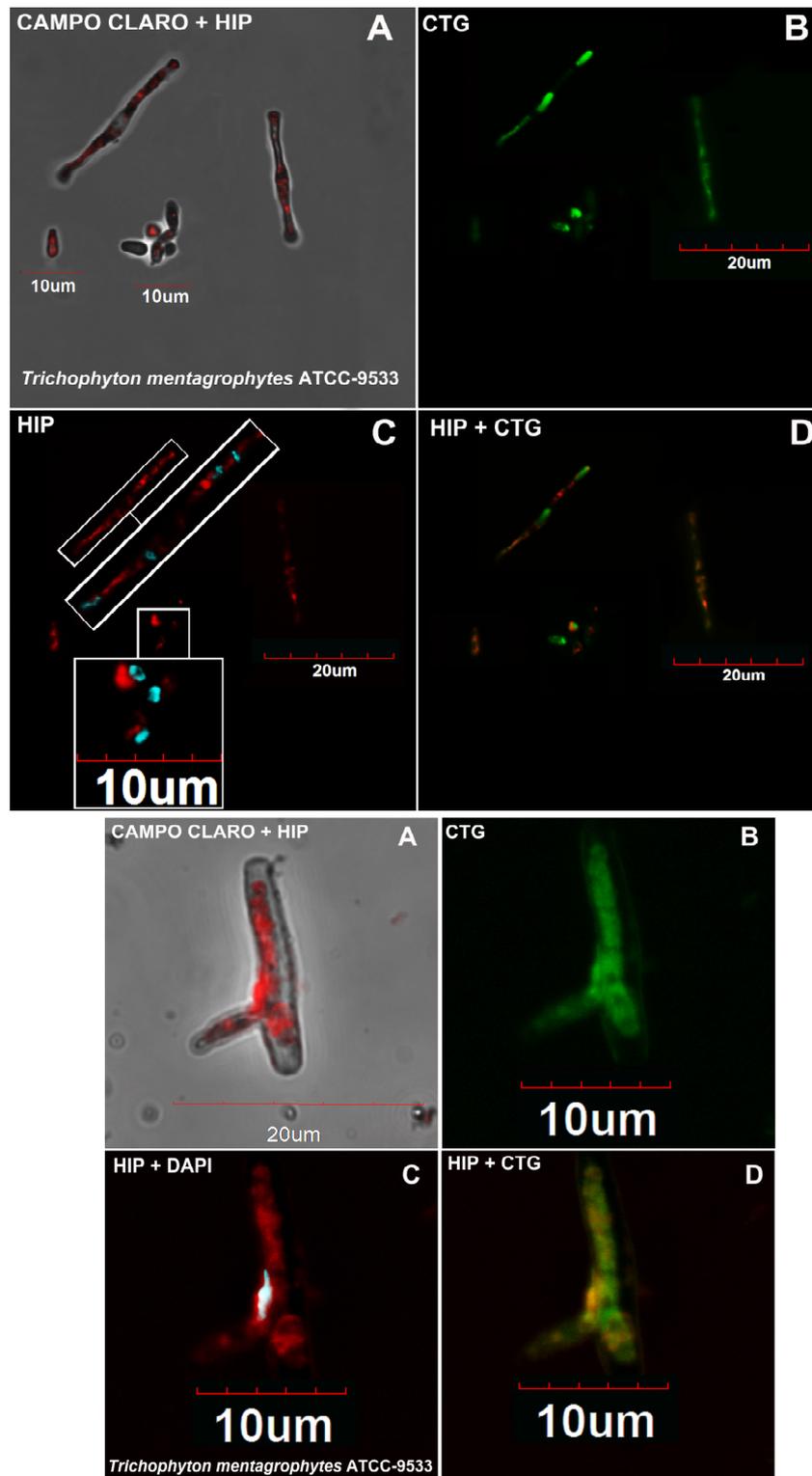


Figura 22: Estudio del patrón de localización de la HIP mediante microscopía confocal de fluorescencia in vitro sobre la cepa *Trichophyton mentagrophytes* ATCC-9533 (hifas y macroconidios arriba; detalle de una hifa abajo) con un tiempo de incubación de la HIP de 30 min en oscuridad y 30°C. Estudio de la colocalización de la HIP con diferentes sondas en un mismo plano focal. A: superposición de microscopía de campo claro con la fluorescencia de la HIP (roja) recogida. B: Fluorescencia de la sonda citoplasmática CTG (verde). C: Fluorescencia de la HIP (roja) con detalle de la no colocalización con la sonda nuclear DAPI (azul). Se observa el detalle de la localización punteada de la HIP. D: Colocalización HIP con la sonda CTG (verde + roja = amarillo/naranja).



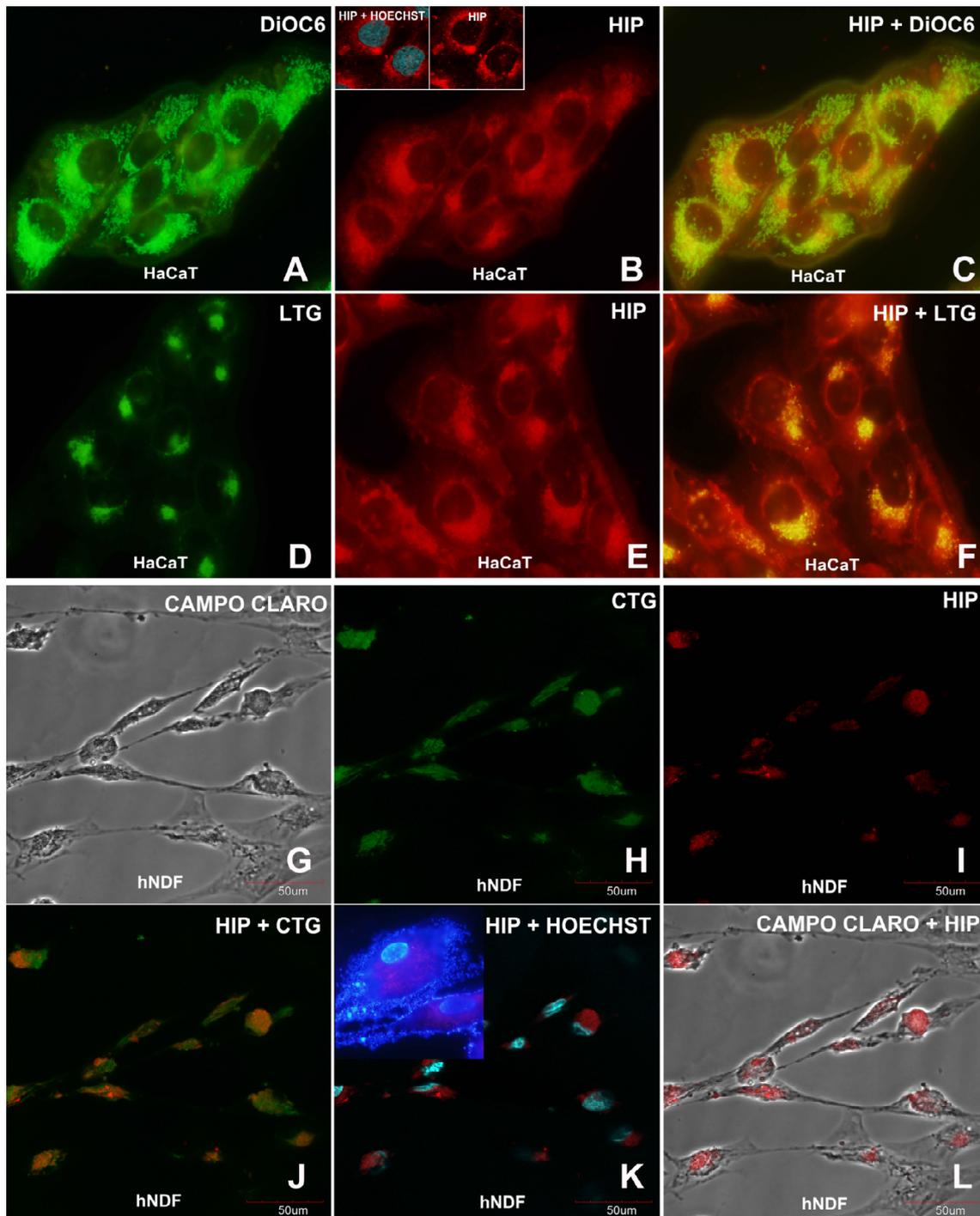


Figura 23: Estudio del patrón de localización de la HIP mediante microscopía invertida de fluorescencia in vivo sobre células dérmicas queratinocitos HaCaT (A/B/C/D/E/F) y fibroblastos dérmicos (G/H/I/J/K/L) con un tiempo de incubación máximo de la HIP de 30 min en oscuridad y 37°C . Estudio de la co-localización de la HIP con diferentes sondas. A: Fluorescencia de la sonda mitocondrial DiOC<sub>6</sub> (verde) recogida. B/E/I/L: Fluorescencia de la HIP (roja) recogida. C: Colocalización parcial de la sonda DiOC<sub>6</sub> con la HIP (verde + roja = amarillo/naranja). D/K: Detalle de la no colocalización de la HIP (roja) con la sonda nuclear Hoechst (azul). E: Fluorescencia de la HIP (roja) recogida. F: Colocalización parcial de la HIP (roja) con la sonda lisosomal LTG (verde no mostrado) combinandose y dando color amarillo/naranja. J: CTG + HIP (verde + roja = amarillo/naranja).



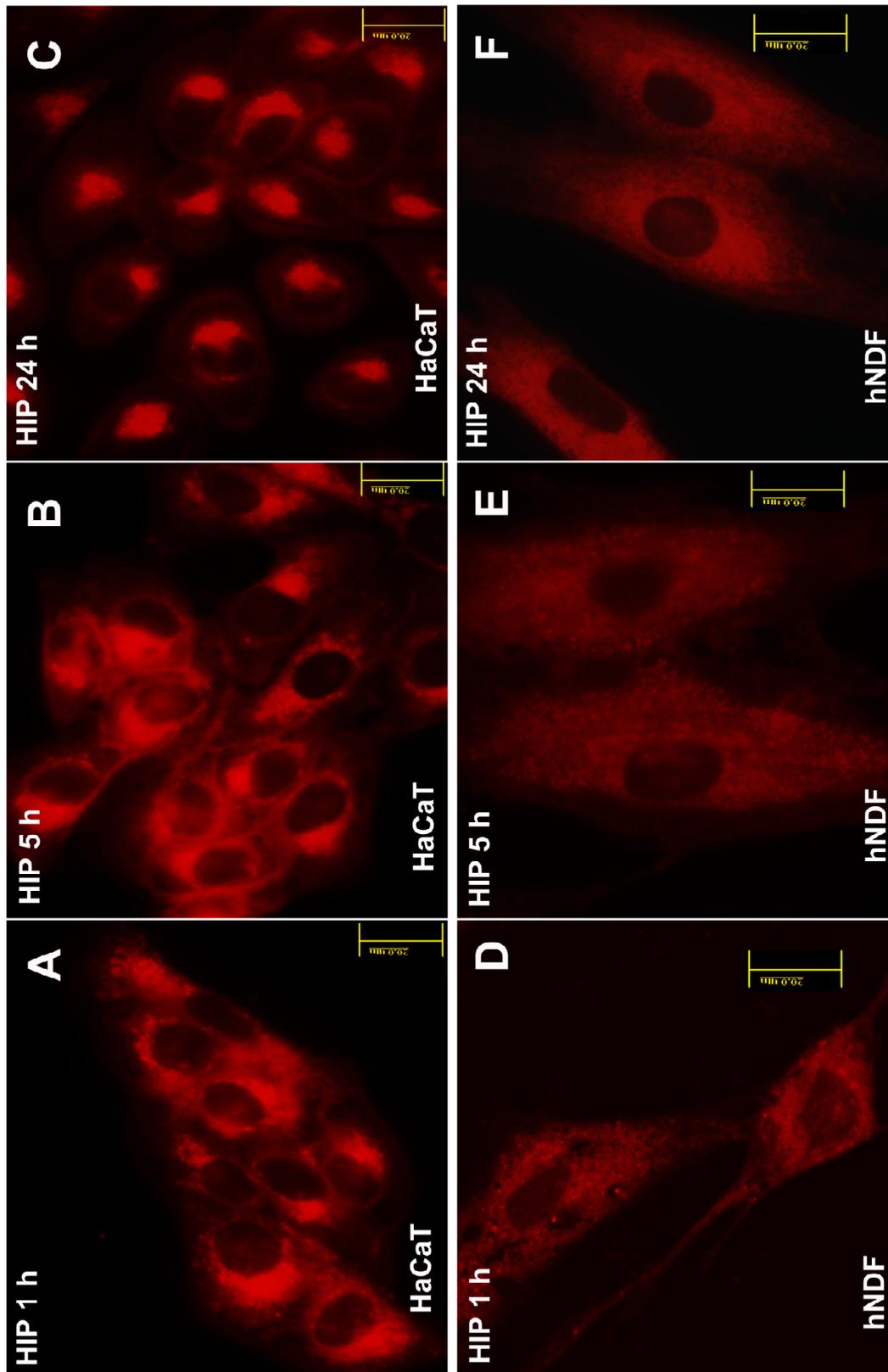


Figura 24: Estudio mediante microscopía invertida de fluorescencia *in vivo* del patrón de localización de la HIP a tiempos de incubación de la HIP de 30 min, 5 y 24h en oscuridad y 37°C sobre células dérmicas queratinocitos HaCaT (A/B/C) y fibroblastos dérmicos hNDF (D/E/F). Se observa que, al aumentar el tiempo de contacto, el PS se focaliza en zonas concretas perinucleares.



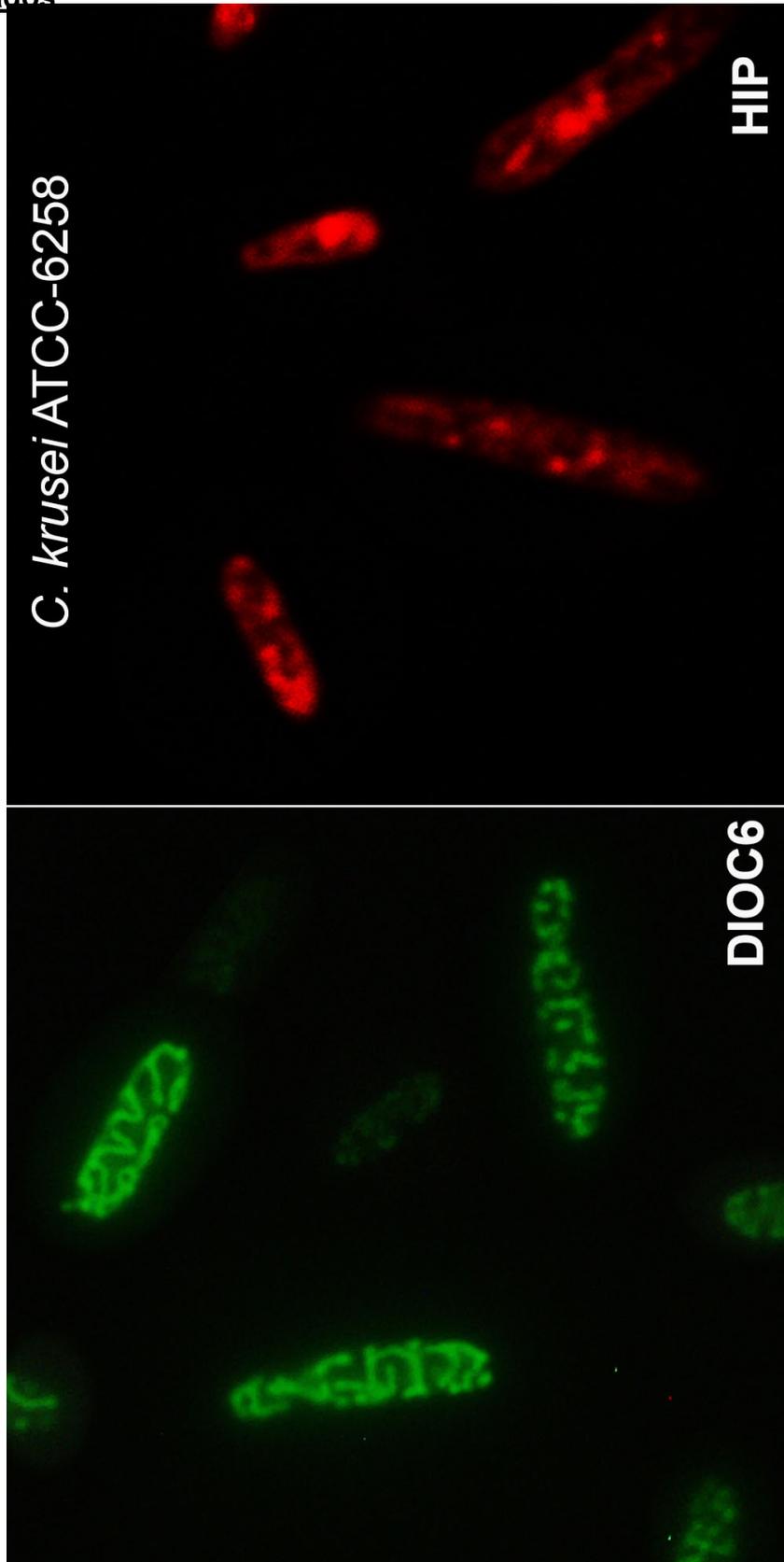


Figura 25: Estudio mediante microscopía de fluorescencia *in vitro* del diferente patrón de localización entre la sonda DIOC<sub>6</sub>® y la HIP en *C. krusei* ATCC-6258.



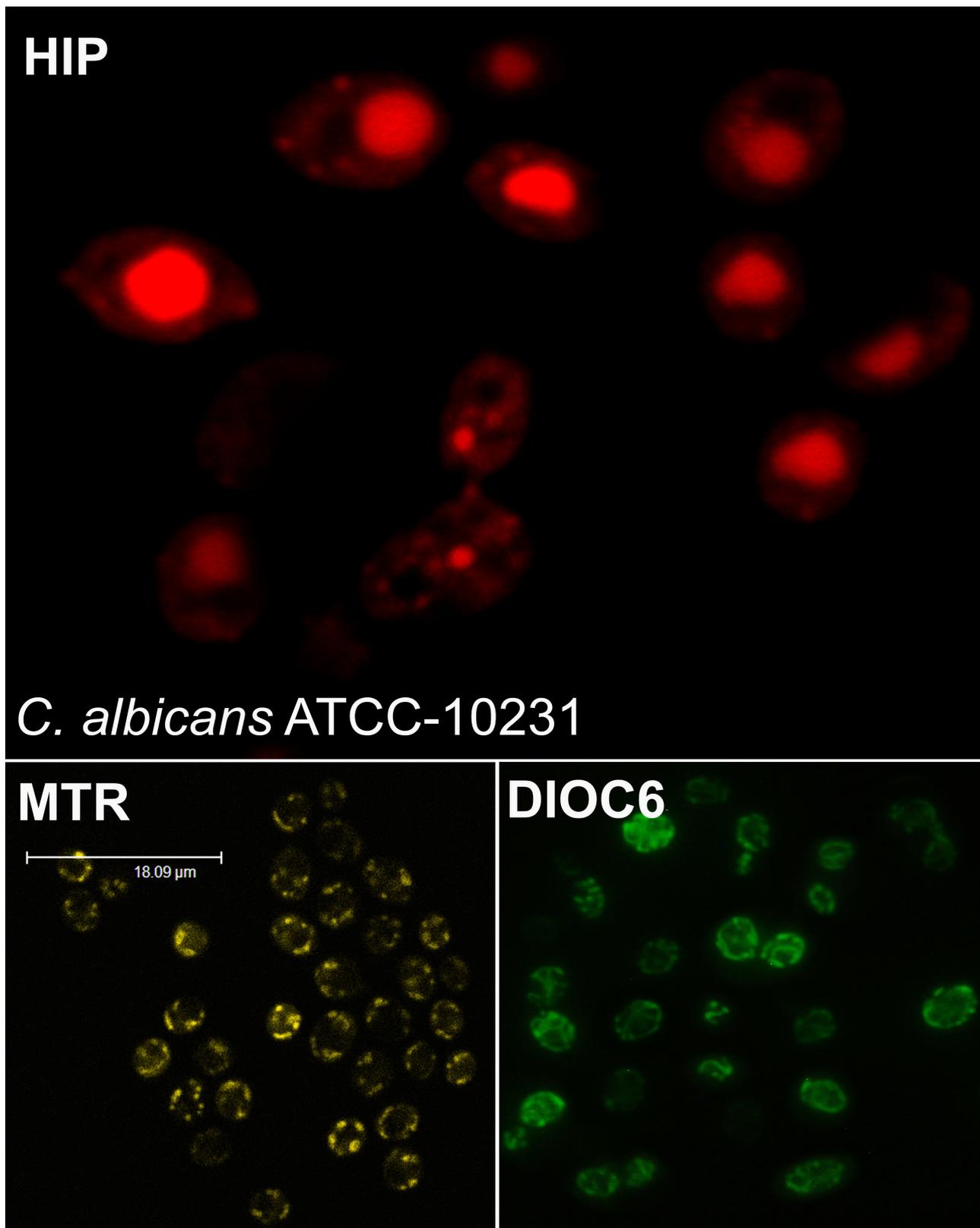


Figura 26: Estudio mediante microscopía de fluorescencia *in vitro* de *C. albicans* ATCC-10231. Comparativa entre los patrones de localización entre la sonda MTR, DIOC<sub>6</sub>® y la HIP.



## Resultados

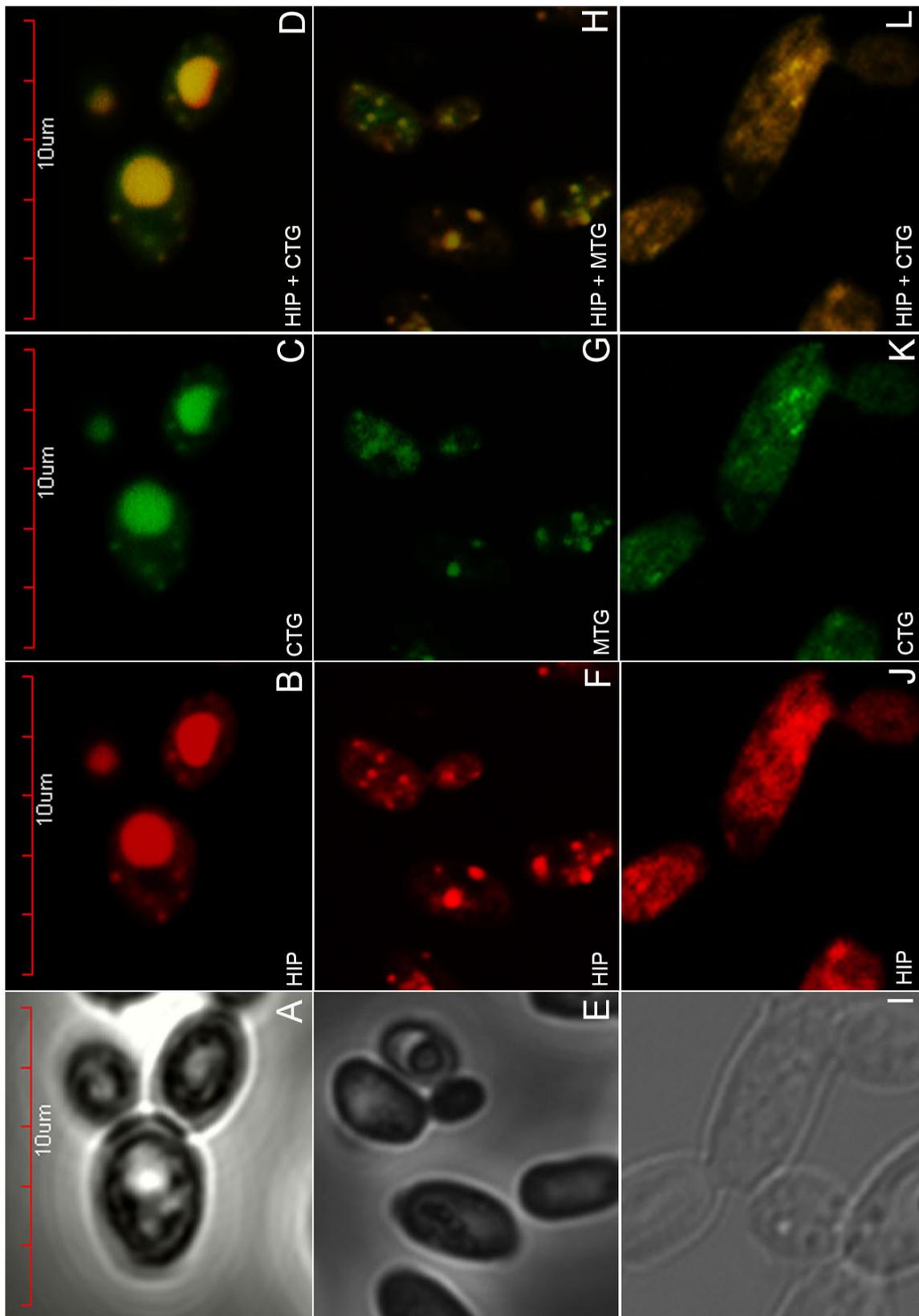


Figura 27: Cuadro resumen de las co-localizaciones de la HIP con MTG o CTG para las cepas *C. albicans* ATCC-10231 (A/B/C/D), *C. parapsilosis* ATCC-22019 (E/F/G/H) y *C. krusei* ATCC-6258 (I/J/K/L). Microscopia confocal de fluorescencia *in vitro*.



# **Discusión**

## **Uptake (incorporación) de HIP en células**

Los resultados obtenidos en nuestros estudios demuestran que la HIP penetra, o se asocia tanto a células humanas como a células de levadura.

### **a. Incorporación en queratinocitos dérmicos humanos HaCaT**

En el ensayo con células HaCaT, las medidas de los valores de fluorescencia del lisado celular mostraron que la incorporación del FS se incrementa gradualmente con el tiempo de contacto hasta alcanzar su pico máximo a las 6 horas (Figura 1). Tras éste punto se observa que con tiempos de contacto mayores hay un descenso

pronunciado en la incorporación de la HIP, probablemente provocado por expulsión o por metabolización del FS por las propias células (Figura 1). Los estudios de Theodossiou et al. [1] con HIP sobre queratinocitos demuestran la existencia del FS en forma monomérica (la forma del FS que mayor fluorescencia produce) permanece hasta las 26 h de incubación empleando la misma concentración que en nuestros experimentos (5 $\mu$ M). En 2008 Wang et al. [2] demostraron que en células cancerosas se producía una saturación en la incorporación de la HIP a las 6 h de incubación.

### **b. Incorporación (uptake) en levaduras**

Los resultados revelan que la incorporación de la HIP por parte de las levaduras aumenta con los tiempos de incubación estudiados (30 min. hasta 24 h) para todas las cepas estudiadas (Figura 2). Teniendo en cuenta que, la HIP disminuye su efecto fototóxico en levaduras al aumentar el tiempo de incubación a más de 5h. y que la incorporación del FS se mantiene constante desde las 5 hasta las 24 h. de incubación, hay que concluir que no existe una relación directa entre la cantidad de HIP internalizada y el efecto de la misma. El hecho de poseer mayor cantidad de FS podría estar relacionado con la fácil asociación de la HIP a membranas lipídicas dada su hidrofobicidad, como fue demostrado por Ho et al. [3]. Este hecho, unido a la redistribución del FS y a una formación masiva de homoasociados podría hacer que la HIP perdiera su efecto fototóxico al aumentar el tiempo de contacto con las levaduras, pese a aumentar su concentración en ellas.

Los resultados demuestran que la captación de la HIP en los tiempos de incubación donde ésta exhibe su mayor efecto antifúngico contra las levaduras ( $t_{\text{incub.}} \leq 60$  min) es superior que en células HaCaT con respecto a las levaduras. Sin embargo, y pese a su gran diferencia de tamaño, la captación de la HIP es superior en el caso de las levaduras con respecto a los fibroblastos hNDF (Figura 3).

## **Fotoinactivación *in vitro* de células con HIP**

---

La técnica empleada en los estudios demuestra que la TFD *in vitro* con HIP posee efecto fototóxico sobre las especies de levaduras (Figura 4, 5) y hongos (Figura 14) testados. Es por ello, por lo que se demuestra la capacidad antifúngica de este tipo de terapia aplicada en hongos causantes de micosis cutáneas frecuentes.

En el género *Candida* se encuentran trabajos con diferentes FSs, algunos tan antiguos como los de Stenstrøm AG et al. [4] en 1981 donde se prueba la fotoinactivación *in vitro* de *C. albicans* empleando hematoporfirina como FS. Estudios posteriores como los de Zeina et al. [5] demuestran la eficacia de la TFD *in vitro* con fenotiazinas frente a *C. albicans*.

En el género *Trichophyton* destacan los estudios de Smijs et al. [6] en *T. rubrum* donde se prueba la alta eficiencia de la porfirina Sylsens B con luz roja en la fotoinactivación de sus microconidias.

Asimismo, los estudios de Amorim et al. [7] sobre el mismo germen descubrieron efecto fungicida de la fenotiazina denominada azul de toulidina O empleando concentraciones de, al menos 25  $\mu\text{M}$  del FS con una fluencia de 75  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$  (nosotros necesitamos la misma concentración de HIP pero la mitad de fluencia) (Tabla 7 y figura 14 ).

En relación a HIP, Hudson et al. [8] y Lavie et al. [9] han demostrado su capacidad fototóxica en virus y Jow et al. [10] y Hager et al. [11] en bacterias con resultados satisfactorios. También se ha probado la viabilidad de células queratinocíticas en presencia de HIP y luz por Schempp et al. [12] y en células de fibroblastos por Hadjur et al. [13]. Sin embargo, a la hora de comparar nuestros resultados con los de la bibliografía nos encontramos con la limitación de que no existen reseñas bibliográficas indexadas en la base de datos PUBMED de experimentos *in vitro* con HIP sobre hongos. Se trataría pues del primer estudio publicado e indexado en PUBMED sobre terapia fotodinámica antifúngica con HIP. En consecuencia, los resultados de nuestra investigación con HIP solo pueden ser comparados con estudios publicados en *Candida* o *Trichophyton* pero empleando otros FSs como referencia.

### **i. Fotoinactivación según el tiempo de incubación con la HIP**

Nuestros estudios demuestran que el tiempo de incubación del FS con las células en oscuridad influye en la capacidad fototóxica del mismo al ser posteriormente irradiadas (Tablas 1, 2, 7). Al emplear tiempos de incubación crecientes (1, 30 min., 1, 3, 5, 24 h. para levaduras y 1, 15, 30, 60 min. para dermatofitos ), y a igualdad de otros factores como la fluencia empleada, el pH y el contenido de sales, para una misma cepa se disminuye la fototoxicidad de la HIP al aumentar el tiempo de incubación en levaduras y aumenta en dermatofitos. Para las primeras, al aplicar tiempos de incubación largos de 24 h., la capacidad fungicida en la disminución de 3 y 6 Log desaparece completamente empleando las concentraciones de FS que eran efectivas a los tiempos de incubación menores.

La complejidad del tipo de célula a tratar en la TFD modifica totalmente el tiempo necesario para que ésta adquiera su efectividad máxima. En 2012 Nakajima y Kawashima [14] han demostrado que al aumentar el tiempo de incubación de la HIP sobre células de leucemia monocítica humana, se produce un aumento en la fototoxicidad. Observaron que el tiempo necesario para que el FS penetrara en las células era de 1 h; sin embargo, el tiempo mínimo que se necesitaba para observar efectos fototóxicos con una lámpara de luz visible era de 3 h. Empleando tiempos de contacto de 5 h la viabilidad celular se aproximaba a cero.

Por otra parte, se constata que, dentro de la complejidad celular, la estructura de las membranas modifica la efectividad de la TFD debido al efecto que ello provoca en la internalización del FS. En esta línea, y empleando otros fotosensibilizantes catiónicos como el Rosa de Bengala, Goulart et al. [15] demostraron que, a igualdad de condiciones, la toxicidad de la TFD sobre una bacteria Gramnegativa era variable si se modificaba el tiempo de incubación con el FS. Empleando 1 min y 30 min de preincubación, obtuvieron mayor fototoxicidad frente a la bacteria empleando 30 min.

La diferencia entre la estructura de membrana y pared celular modifica la sensibilidad de los microorganismos frente a la TFD. Yow et al. [10] probaron la diferencia existente entre las membranas de bacterias Grampositivas y negativas frente a la TFD; la diferencia estructural condicionaba el que las primeras eran sensibles y las segundas resistentes a un ensayo *in vitro* con HIP empleando concentraciones de 0-40 micromolar e irradiando con una lámpara similar a la empleada en nuestro trabajo con fluencias entre 0 y 30 J.cm<sup>-2</sup>.

Estos hechos, hacen pensar en la importancia que juega la complejidad celular y el metabolismo propio de cada tipo de célula a la hora de internalizar los FSs y que con ello, éstos puedan actuar. Es por esto, por lo que se requieren tiempos de incubación mayores para provocar un máximo de actividad fototóxica de la HIP sobre microconidios (esporas) hongos dermatofitos, con mayor capacidad aislante de sustancias externas que sobre células de levadura.

### **ii. Fotoinactivación según la especie de *Candida* o *Trichophyton***

Como se ha establecido en el apartado anterior, nuestros estudios demuestran que la eficacia de la TFD *in vitro* esta influida completamente por el tipo de célula estudiada. Evidentemente, este es el fundamento para poder pensar en aplicarla como tratamiento antifúngico en clínica, ya que este tipo de terapia no tendría ningún sentido si se pudiera eliminar microorganismos en infecciones pero no fuera posible preservar la viabilidad de las células del paciente.

Dentro del género *Candida*, observamos que la eficacia de la TFD con HIP está influida por la especie testada (Figura 4).

La diferencia de sensibilidad entre dos especies diferentes como *C. albicans* y *C. krusei* es elevada en todas las condiciones de fluencia testadas en nuestros ensayos (Tabla 1,2 y figura 4) y resultan ser de diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3). En este aspecto, los trabajos de Dovigo et al. [16] sobre *Candida* fluconazol-resistentes con photogem como FS apoyan nuestros resultados, demostrando que existen variaciones en las sensibilidades del género *Candida* frente a la TFD según la especie. En ellos, se probó que, la especie *C. albicans* resulta ser más sensible que la especie *C. glabrata*.

Sin embargo, los estudios de Bliss et al. [17] realizados con porfímero sódico (Photofrin<sup>®</sup>) como FS se demuestra que existe diferencia de sensibilidad a la TFD entre *C. krusei* y *C. albicans* solo para algunas concentraciones de FS pero no para todas, de tal forma que, al aumentar la cantidad de FS requerida, aumenta también la similitud entre las concentraciones antifúngicas requeridas para ambas cepas. Esto confirma que el FS y su concentración también influyen significativamente de forma independiente a la cepa testada.

El hecho de que las cepas de la especie *C. albicans* sean las más sensibles a la TFD demuestra que este tipo de terapia podría revelarse como una técnica con grandes beneficios sobre las levaduras que con mayor frecuencia provocan infecciones oportunistas [18].

Un estudio conjunto entre *C. albicans* y *T. interdigitale* realizado por Donnelly et al. [19] demostró que, empleando la misma concentración de FS (ALA 10 mM) seguida de una incubación (30 min. para la primera y 6h. para el dermatofito), y a igualdad de otras condiciones, la reducción en la viabilidad celular era aproximadamente el doble en el caso de *C. albicans* con respecto al dermatofito.

### **iii. Fotoinactivación según la concentración inicial del inóculo**

Para el caso de las levaduras, fueron empleados dos inóculos iniciales diferentes, 0.5 y 4 McF para estudiar la reducción de 3 y 6 Log respectivamente (Tabla 1, 2). Realizando una comparación entre ambos inóculos se pudo observar que el valor del inóculo inicial influye en la TFD antifúngica con HIP. Atendiendo a los datos estadísticos se observa que no existe diferencia entre reducir 3 Log empleando sendos inóculos salvo en el caso de *C. albicans* CETC-1001 empleando ambas fluencias, en *C. albicans* ATCC-10231 con 18 J.cm<sup>-2</sup> y con la de *C. krusei* empleando 37 J.cm<sup>-2</sup> (Tabla 4). Demostrado entonces que las cepas de *C. albicans* presentan una relativa homogeneidad en su sensibilidad frente a la TFD con HIP, independientemente de la cantidad de microorganismo existente, podemos establecer que la TFD se desvela como una terapia muy válida a nivel tópico, debido a que las colonizaciones provocadas por la especie *albicans* representan un alto porcentaje de las infecciones tópicas registradas [20].

### **iv. Fotoinactivación según la Fluencia / FS**

#### Influencia del FS

Nuestros estudios realizados con HIP demuestran que, a igualdad de otras condiciones como pH, sales, fluencia, tiempo de incubación óptimo etc, según sea el tipo de FS empleado, se produce una sensibilidad diferente si son aplicados sobre la misma especie de levadura.

Los trabajos realizados en nuestro grupo de investigación con otros fotosensibilizantes como las fenotiazinas, FSs catiónicos de la familia del azul de metileno (datos no publicados) prueban la diferencia existente entre diferentes tipos de fotosensibilizantes. En estos casos, las concentraciones necesarias para provocar reducciones de 3 y 6 Log distan mucho de las necesarias en el caso de la HIP, lo que hace denotar la diferencia entre FS de naturaleza aniónica de los de naturaleza catiónica.

Comparando los efectos fotosensibilizantes de la HIP con otros FSs vemos que: Empleando precursores de fotosensibilizantes porfirínicos como el ALA, Monfrecola G. et al. [21] demuestran que la inhibición total *in vitro* de *C. albicans*, mediante el empleo de lámparas de luz visible con dosis de luz de  $40 \text{ J.cm}^{-2}$  (nosotros usamos luz ámbar a  $37 \text{ J.cm}^{-2}$ ) requiere concentraciones de FS de hasta  $4 \text{ mM}$  ( $600 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) para inhibir un inóculo de  $1 \times 10^4 \text{ UFC / mL}$  (4 Log). Su fluencia es similar a la fluencia máxima empleada por nosotros, sin embargo, en sus estudios se requiere concentraciones mucho más elevadas que las que nosotros necesitamos de HIP para eliminar 6 Log (Tabla 2 y figura 4D, 5D).

Empleando FS porfirínicos como el Photofrin<sup>®</sup>, Bliss et al. [17] demuestran que con  $9 \text{ J.cm}^{-2}$  (la mitad de la fluencia mínima empleada por nosotros con HIP), se requieren concentraciones de FS cercanas a  $10 \text{ }\mu\text{M}$ , para inhibir un 90 % (1 Log)

inóculos de *C. albicans* de  $1 \times 10^5$  UFC / mL. En nuestros estudios la reducción es de 3 Log (99,9 %) con concentraciones más de 10 veces menores de HIP sobre inóculos mayores ( $0,62 \mu\text{M}$  y  $18 \text{ J.cm}^{-2}$  sobre inóculos de  $1 \times 10^6$  UFC / mL) (Tabla 1, 2 y figura 4A, 5A ).

Empleando un FS natural como la curcumina, Dovigo et al. [22], empleando como nosotros una fluencia de  $18 \text{ J.cm}^{-2}$ , obtuvieron una inhibición del 85 % en biofilms de *C. albicans* con una concentración de  $40 \mu\text{M}$  (nosotros  $0,625 \mu\text{M}$  en cultivos planctónicos) (Tabla 1, 2 y figura 4A, 5A ).

Con un FS fullerénico, Mizuno et al. [23] obtuvieron que, empleando una luz blanca irradiando  $40 \text{ J.cm}^{-2}$ , necesitaron una concentración de, al menos  $100 \mu\text{M}$  para eliminar 6 Log de un inóculo de  $1 \times 10^7$  UFC / mL de *C. albicans* sensible a fluconazol. Nosotros obtenemos los mismos resultados empleando  $37 \text{ J.cm}^{-2}$  y empleando concentraciones de HIP de 5 a  $10 \mu\text{M}$ .

A rasgos generales, las diferencias en la capacidad fototóxica entre los FS va a depender, a igualdad de condiciones de reacción, de sus localizaciones celulares. Este punto será discutido en el apartado de la localización celular de la HIP.

### Influencia de la Fluencia

Teniendo en cuenta la luz empleada, se observa que, en los efectos fototóxicos de la TFD frente a levaduras, influye la irradiación de tal forma que, al mantener otros parámetros constantes como la concentración de FS, el pH y el contenido de sales, siempre se observará una similar o superior capacidad fototóxica a fluencias mayores que a menores (Figura 4, 5). Este hecho es respaldado por los estudios *in vitro* sobre diferentes microorganismos realizados por Demidova y Hamblin [24] por un lado y por Dovigo et al. [22] por otro, donde se realizan pruebas de variación de fluencias.

### v. Fotoinactivación según el pH del medio y la presencia de sales

Nuestros estudios demuestran que al variar las condiciones del medio, se modifica la sensibilidad de las levaduras testadas frente a la TFD *in vitro* con HIP.

Las condiciones de trabajo demostraron que las levaduras sufrieron mayor sensibilidad a la TFD en agua destilada sin sales y a un pH aproximado de 5,5 en comparación a trabajar con un medio tamponado con PBS a  $\text{pH} = 7,2-7,3$  que contenía sales de fosfato y cloruro.

La influencia de estos dos parámetros es fundamental en la TFD teniendo en cuenta que la inmensa mayoría de los FS investigados en clínica son de naturaleza iónica, y como tal, modifican su estructura y su actividad dependiendo del equilibrio ácido-base que los rodea. Carvalho et al. [25], empleando sales de calcio para amortiguar el pH, demostraron que la TFD con FSs catiónicos como las fenotiazinas dependía profundamente del pH, disminuyendo su efectividad al disminuir el pH, probablemente influenciado a nivel subcelular por la presencia de calcio.

Shen et al. [26] demostraron que, el poder fototóxico de la HIP, que es un FS aniónico, en soluciones acuosas está mediado por la pérdida de un protón para la formación de un radical aniónico, que es el punto de partida para formar el estado excitado semiquinónico característico de la HIP al ser activada por la luz. Este estado, también de carácter aniónico, será quien actúe como especie reactiva persé o como donante energético para formar EROs.

Siguiendo esta última premisa, teóricamente, al incrementar el pH, y con ello disminuyendo la proporción de hidrogeniones ( $\text{H}^+$ ), debería incrementar la cantidad de anión HIP en la disolución, y por tanto, volverse más tóxica. Sin embargo, en nuestros estudios se produce el mecanismo contrario, por lo que la presencia de sales fosfato y cloruro en las muestras influye, de alguna forma, negativamente en la capacidad fototóxica del FS. Esta influencia negativa podría deberse al poder de amortiguación frente a variaciones de pH que poseen los medios tampón. Este poder es capaz de neutralizar especies iónicas formadas inmediatamente en el medio, como el anión HIP, fundamental en el proceso de activación de la fototoxicidad de la HIP. En el caso de nuestros experimentos en agua destilada, no existe ninguna sustancia que amortigüe la presencia de aniones como el de la HIP, por lo que esta resulta ser más activa.

## Discusión

---

En TFD antifúngica con HIP hay que tener tres cosas más a la hora de juzgar la influencia del pH / sales en el medio:

- las EROs, incluido el anión HIP fototóxico, se forman exactamente donde se encuentra el FS
- la capacidad migratoria de las EROs es muy baja
- las células fúngicas testadas poseen pared celular

Con ello habría que deducir que la variación de pH en el medio externo solo sería capaz de afectar a la HIP que se encuentra fuera de las células o asociada exteriormente a ellas. La amortiguación del radical aniónico de la HIP disminuiría en cierta medida la peroxidación de membrana y aumenta, consecuentemente su integridad. Este hecho estaría respaldado por el estudio de Sattler et al. [27] donde se deduce que la HIP es capaz de asociarse con membranas lipídicas.

Teóricamente, existe la posibilidad de que la presencia de sales fosfato pueda modificar la penetración de la HIP en las células, ya que ésta puede producirse por difusión a través de membrana. Sin embargo, Sattler et al. [27] demostraron que la difusión de la HIP parece ser no-facilitada debido al tamaño de los monómeros o de los homoasociados de HIP y debido a su naturaleza lipofílica, por lo que la penetración parece producirse, según Saw et al. [28], al menos en células eucariotas superiores, sin mediación de canales dependientes de iones.

Los estudios realizados por George y Hamblin [29] parecen demostrar que, en presencia de sales como el  $\text{CaCl}_2$ , los fotosensibilizantes di-aniónicos penetran en células de bacterias grampositivas y negativas por difusión facilitada por medio de proteínas-canal dependientes de iones divalentes que compensarían la entrada de FS en estado anión con la entrada de átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de un simporte. En este estudio, un FS de esta naturaleza como el Rosa de Bengala (RB) aumentaría su capacidad de penetración por la presencia de la sal antes citada. Sin embargo se ha de contar con que, tanto la lipofilia, como el tamaño de la molécula del RB son menores en comparación con la HIP. Teniendo en cuenta que en una disolución tampón de PBS no existen iones divalentes, sino monovalentes, como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , la única forma posible de que estos iones influyan

en la penetración de la HIP por transporte activo sería mediante un simporte de uno de los iones con el FS a través de proteínas canal de tipo transportador-simporte mono-catiónico  $\text{Na}^+$ -azúcares [30] lo cual no parece factible dado el tamaño y la lipofilia de la HIP.

Estudios realizados en por Smijs et al. [31] sobre esporas de *T. rubrum* inyectadas en células de abdomen de mamífero y empleando una porfirina de segunda generación como FS, demuestran que al incrementar el pH, desde 3,5, pasando por 5,2, hasta llegar a 7,2, por modificación del contenido de sales en el medio, empleando siempre soluciones tampón, disminuye el potencial de la TFD sobre el hongo. Además demuestran que al mantener en contacto el FS durante tres periodos de tiempo diferentes (17, 48 y 72 h) se observa una mayor eficacia de la TFD frente al hongo al aumentar el tiempo de contacto del FS con las células.

Teniendo en cuenta estos estudios y quedando demostrado que en un medio tamponado la HIP encuentra mayor incomodidad para conformar sus mecanismos fototóxicos, si se quiere juzgar si la capacidad fototóxica de la HIP es dependiente del pH, deberíamos completar estudios adicionales a diferentes pHs pero empleando en todos los casos medios tamponados.

### **vi. Fotoinactivación de levaduras según la resistencia a azoles**

La TFD con HIP demuestra su eficacia en la inactivación *in vitro* de especies de levaduras resistentes a antibióticos azólicos (Figura 5). Asimismo se demuestra que no existen diferencias significativas en la sensibilidad a la TFD con HIP entre *C. albicans* sensibles y resistentes a azoles (Tabla 1, 2).

Los estudios realizados en por Mang et al. [32] sobre diferentes especies de *Candida* resistentes y sensibles a fluconazol y anfotericina B, haciendo uso de Photofrin<sup>®</sup> *in vitro* coinciden con nuestros resultados.

Sin embargo, Dovigo et al. [16] demuestran que, pese a que la TFD es efectiva sobre *C. albicans* fluconazol-resistente empleando Photogem<sup>®</sup> como FS, existe

una menor actividad de la terapia en comparación con su homóloga fluconazol-sensible.

El hecho de que poseamos un arma efectiva sobre agentes patógenos fúngicos que, con frecuencia presentan resistencia a antibióticos, abre una puerta muy importante a la TFD como tratamiento alternativo al uso de antifúngicos convencionales frente a hongos oportunistas causantes de infecciones localizadas. Esta premisa se junta con la demostrada ausencia de mutagenicidad que demuestran todos los FSs hasta ahora testados [33, 34] y con la ausencia de generación de resistencias a la TFD debido a la multiplicidad de dianas que posee la terapia [35, 36].

### **vii. Resultados de los Controles**

#### Toxicidad de la luz

En cuanto a la toxicidad persé de a luz se encontró que en ningún momento se producía una inhibición superior al 15 % de los inóculos iniciales (Figura 6, 14), por lo que resultó a todos los efectos despreciable. No obstante, al irradiar algunas cepas con una fluencia de  $37 \text{ J.cm}^{-2}$  y sin FS aumentaba el número de colonias frente a los controles no irradiados (Figura 6). Esto pareció dar a entender que la propia luz fomentaba el crecimiento microbiano. Sin embargo, teniendo en cuenta que las suspensiones se encontraban en un medio sin nutrientes, la única explicación coherente era la evaporación de las muestras debido al calor de la luz. Para ello se realizó una prueba del % de evaporación del medio en las muestras debido a la irradiación (resultados no mostrados).

Al trabajar con volúmenes tan pequeños (de 100-250  $\mu\text{L}$  por pocillo), el largo periodo de exposición a la luz empleando la fluencia de  $37 \text{ J.cm}^{-2}$  (60 min), provocó una ligera deshidratación del control irradiado que se comprendió entre el 10 y el 20 % del volumen inicial con lo cual tenemos una suspensión más concentrada de células. Es por ello y debido a que los controles en placa no se siembran en su totalidad, sino haciendo diluciones de las muestras control lo que hace que haya un número mayor de colonias en las placas irradiadas sin FS de las no irradiadas sin FS.

Además de la evaporación existiría la posibilidad de que la luz y el calor de la lámpara fomentasen la separación de las gemas hijas, ofreciendo un número significativamente mayor en los controles.

Mima et al. [37] investigaron toxicidad que provocaba una luz LED roja de aproximadamente  $37 \text{ J.cm}^{-2}$  sobre diversas cepas de *Candida* en comparación con el efecto fototóxico del Photogem<sup>®</sup>. No observaron resultados de toxicidad estadísticamente significativa en comparación con las muestras con luz y FS en la mayoría de los casos.

### Toxicidad del Fotosensibilizante

Si bien no existen estudios comparativos con HIP sobre células fúngicas, la baja toxicidad que se demuestra en condiciones de oscuridad sobre células fúngicas (Figura 7, 15) dérmicas (Figura 16) está respaldada por estudios como los de Davids et al. [38] sobre células de la piel sanas y en células melanómicas donde no se obtienen efectos tóxicos. Este hecho apoya la teoría de ser un buen FS para poder ser empleado en clínica [39, 40]. Aunque, si bien cada tipo de célula tumoral es diferente, existen casos en los que la HIP en oscuridad prueba poseer efectos antimetastáticos y antitumorales en ciertos tipos de cánceres [41].

### Toxicidad / inhibición del disolvente de la HIP

El medio en el que se realizan las soluciones stock del FS (DMSO) ha probado influir en las pruebas fotodinámicas debido a su efecto tóxico; esta influencia se incrementó en proporción al aumento de la cantidad de dicho disolvente en las muestras finales.

Mediante un test de sensibilidad (resultado no mostrado) fue demostrado que el DMSO posee efectos tóxicos apreciables sobre las levaduras a concentraciones superiores a un 8 % (v / v). Estos estudios concuerdan con la capacidad citolítica demostrada por este disolvente frente a *S. cerevisiae* en los estudios de los años 70 realizados por deBruijne [42].

Estudios de inhibición más actuales demuestran que en disoluciones con una

proporción de DMSO superior a un 2 % (v/v) existe una capacidad para reducir considerablemente la cinética de crecimiento de especies de levaduras como *C. parapsilosis* ATCC-22109, *C. krusei* ATCC-6258, *C. albicans* ATCC-64550 y ATCC-64548 y *S. cerevisiae* ATCC-9763. Sin embargo posee efectos inocuos si no supera una proporción de un 1 % [44]. No obstante, estudios posteriores revelan que la inhibición real del DMSO sobre *C. albicans* y artrosporas de *T. mentagrophytes* comienza a ser significativa en disoluciones donde encontramos una proporción de DMSO de entre 2,5 y 7,5 % (v/v) [43].

Hay que denotar que estos estudios [43, 44] hablan de inhibición en el crecimiento, no de toxicidad.

El hecho de requerir concentraciones altas de HIP en algunas cepas (Tabla 2) también supuso el necesitar altas concentraciones de DMSO debido a la forma en la que se realizaron las disoluciones. Esto supone una limitación a la hora de evaluar la toxicidad de la HIP sobre las levaduras que requieren mayores concentraciones de FS (*C. parapsilosis* y *C. krusei*). Teniendo en cuenta la sensibilidad de las células dérmicas a la TFD con HIP (Figura 16), para enfocar el estudio hacia un posible futuro uso clínico, se observa que la TFD no podría ser utilizada a concentraciones tan elevadas de HIP por su toxicidad sobre ellas. Estos datos suponen que el uso clínico viene determinado por la especie de *Candida* y su sensibilidad *in vitro*.

### **viii. Influencia del tipo celular en la sensibilidad a la TFD con HIP**

En líneas generales, al comparar la cantidad de FS necesaria para reducir el crecimiento celular en 3 Log en nuestros resultados, se observa que las levaduras (en forma planctónica) son más sensibles que las células humanas salvo en el caso de *C. krusei* y las especies de *Trichophyton* (microconidios) a igualdad de fluencia, tiempo de incubación y condiciones de disolvente y pH.

Lo primero se ha de tener en cuenta al interpretar estos resultados es que, las especies del género *Candida* son, en líneas generales, hongos dimórficos, capaces de crecer como células gemantes (levaduriformes) o como células ramificadas (pseudohifas) [45]. Las infecciones que provocan llevan asociadas

generalmente a los dos tipos de morfología, teniendo una mayor similitud con los biofilms, que con las suspensiones líquidas [28]. Este hecho, unido a que se ha demostrado en algunos estudios, que la capacidad fototóxica de la TFD es menor en el caso de biofilms que en cultivos líquidos con levaduras en forma planctónica (4) hace necesarios estudios adicionales en biofilm.

Es por ello por lo que nuestros estudios deberían ser ampliados a otros ámbitos más parecidos a la morfología presentada en infecciones antes de considerar como hecho positivo que la sensibilidad de las levaduras frente a HIP sea mayor que la de las células humanas. Asimismo, habría que realizar estudios *in vivo* que aseguraran la toxicidad de la HIP sobre células dérmicas.

Existen otras pruebas realizadas por nuestro grupo que confirman la dependencia de la TFD frente al tipo de célula; dichas pruebas están ceñidas al ámbito bacteriano, donde demuestran cómo un fotosensibilizante fenotiazínico como es el New Methylene Blue (NMB) provoca efectos bactericidas diferentes dependientes de la estructura externa bacteriana (resultados no publicados). En ellos se observa como el efecto fototóxico es más acusado en especies de colección grampositivas (*Staphylococcus aureus* ATCC-29213) que en gramnegativas (*Escherichia coli* ATCC-25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853). Este hecho evidencia que las diferencias entre las envueltas celulares de ambos agentes patógenos influyen en la asociación y posterior penetración del FS, con lo que influyen en su eficacia.

Estudios similares o en este campo han sido también testados con otros FSs, entre ellos la HIP por Bancirova y Lasovsk en 2011 [46], demostrando la diferencia entre ambos tipos de bacterias empleando *S. aureus* y *Enterococcus faecalis* (grampositivas) y *P. aeruginosa* y *E. coli* (gramnegativas).

Es importante pues, tener en cuenta el tipo de microorganismo patógeno que testemos, advirtiendo las diferencias en tasa metabólica, complejidad, tamaño y sobre todo, conociendo su morfología típica en una infección.

Dentro del reino de los hongos, y como se ha explicado antes, la sensibilidad

frente a TFD es diferente entre diferentes familias, en los estudios de Donnelly et al. [19] los cuales incubaron *C. albicans* y *T. interdigitale* durante 30 min y 6 h respectivamente con ALA 10 mM. Se constató una reducción de los inóculos del 87 y del 42 % respectivamente, tras ser irradiados con una luz roja empleando la misma fluencia para ambos dos.

## Patrones de EROs / marcadores de muerte celular en TFD con levaduras

La TFD no es más que un medio de transferencia de energía. Dicha energía sufre una transformación de lumínica a química cuando llega al oxígeno molecular y otros sustratos biológicos mediante el FS para formar las EROs. Dichas especies son capaces de ceder esa energía a los sistemas biológicos circundantes causando daños en ellos. A pesar de que el oxígeno singlete (Via II) se ha destacado como la especie predominante en las reacciones de fotooxidación en muchos fotosensibilizantes, para que se provoque el daño fotodinámico, ambos tipos de reacciones (tipo I y II) parecen ser necesarias [47] y los estudios realizados por medio de la inhibición de las EROs así lo confirman (Figura 8) (el oxígeno singlete no se considera como un radical, pero sí que es una especie reactiva EROs).

Utilizando enzimas y otros sustratos que actúan como desactivadores / inhibidores de las EROs se ofrece un camino de estudio muy útil para averiguar la existencia de especies reactivas formadas en la TFD [47].

Teniendo en cuenta que la transducción de energía en el oxígeno por la vía I sufre el siguiente proceso general:



Considerando además que el anión superóxido es la especie EROs iniciadora y de la cual se forma el peróxido de hidrógeno:



en este esquema de transferencia de energía química intervienen sustratos biológicos que contienen complejos con metales como el hierro, el cobre o el manganeso para dar lugar a reacciones tipo Femton [48, 49].

Como se observa, este tipo de reacciones aumentan su cinética por medio de enzimas como las que empleamos en los estudios de inhibición en levaduras, como la catalasa (CAT) y las superóxido dismutasas (SOD), las cuales, aumentan su expresión cuando se forman las EROs, en momentos correspondientes a estrés celular provocado por el proceso de fotooxidación [50, 51].

A pesar de que nuestros estudios demuestran que todas las especies EROs juegan un papel importante en la TFD *in vitro* con levaduras, los resultados sugieren una interpretación clara:

- En el proceso, la vía I, parece adquirir más importancia que la II, ya que el empleo de inhibidores de las EROs de la primera vía (CAT, SOD y MAN) produce, a su vez, una inhibición en la actividad fototóxica de la TFD con HIP sobre levaduras (Figura 8).
- Dentro de la vía I, el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (inhibido por la CAT) parece ser especie reactiva más influyente y el hidroxilo ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) (inhibido por el MAN) la menos. El resultado inverso se obtiene en el caso de *C. krusei* (Figura 8).
- La formación de oxígeno singlete (inhibido por la  $\text{NaN}_3$ ) parece ser importante en el caso de todas las cepas salvo en el caso de *C. krusei* (Figura 8).
- El diferente patrón que parece manifestar *C. krusei* podría ser la base de su gran diferencia en cuanto a sensibilidad en comparación con el resto de las cepas de levadura, en especial con las cepas *albicans*.

La importancia de la formación de EROs via I está respaldada por los estudios de Thomas [52] sobre células cancerosas en 1992 donde se sugiere que la dependencia de la HIP respecto al oxígeno es influyente pero no total en el proceso, donde intervienen reacciones formadoras de EROs tipo I.

Es interesante apuntar que está demostrado que el DMSO es un agente que inhibe en levaduras los mecanismos de protección celulares contra las EROs, concretamente del peróxido de hidrógeno [53]. Esta peculiaridad podría explicar que en situaciones de estrés oxidativo, el hecho de tener DMSO en el medio, propicie una mayor eficacia de la TFD y que se forme mayor cantidad de superóxido en los casos en los que se emplean mayores cantidades de DMSO, como es el de la especie *C. krusei*.

En estudios foto-físicos con HIP se ha demostrado la presencia de las tres especies reactivas [54] añadiendo la ya citada especie de HIP anión.

En condiciones biológicas, la HIP en TFD ha sido ampliamente estudiado en células humanas de diversos tipos. En estos estudios se ha demostrado la presencia de todas las especies EROs que se presentan en nuestros experimentos. Este FS demuestra peroxidación de membranas lipídicas de células de melanomas (presencia de  $H_2O_2$ ) [13]; además, se estimula la expresión de enzimas que amortiguan el efecto de las EROs como la CAT (presencia de  $H_2O_2$ ) y SOD (presencia de  $O_2^{\cdot-}$ ). Es también capaz de potenciar la síntesis de la glutatión transferasa para evitar la depleción del Glutatión y así mantener la estructura de las membranas celulares. Pese a la inhibición parcial de las EROs, la TFD con HIP acaba por provocar la desorganización de membranas celulares que concluye con una muerte por necrosis de las células fotooxidadas [55].

El papel del oxígeno singlete en la TFD con HIP parece encontrarse en un mecanismo aun no esclarecido, en el que el que provocaría una destrucción de intercambiadores iónicos tipo ATPasas del retículo endoplasmático que provocan la salida del  $Ca^{2+}$  al citoplasma (SERCA2). El desequilibrio del calcio, unido con el daño de proteínas mitocondriales concurre con autofagia [56].

A pesar de todos estos mecanismos, la HIP posee otros diferentes que cursan en apoptosis pero en este proceso la especie reactiva que actúa sería la propia HIP en forma de radical aniónico uniéndose a la cadena de transporte electrónico y deteniéndola, favoreciendo la aparición de los procesos pro-apoptóticos [57].

En nuestros estudios de citometría de flujo se detecta que en la TFD con HIP sobre levaduras existe la presencia de anión superóxido mediante el uso del dihidroxietidio (2HE) (Figura ...), pero no se puede asegurar la formación de peróxido de hidrógeno, puesto que no hubo un correcto funcionamiento de la sonda DCFA. De la misma manera, para la detección de señales que indicaran muerte celular se obtuvo, mediante el empleo de 7AAD, que existía una pérdida en la integridad de la membrana nuclear. Sin embargo, no pudo asegurarse que hubiera una caída de potencial de membrana, puesto que la sonda encargada de detectarlo, la Anexina V FITC, no funcionó correctamente. En este aspecto, se está pensando, que el problema de detección de algunas sondas por citometría es debido, posiblemente, a la pared celular de las levaduras, por lo que se está intentando complementar los estudios con una prueba similar sobre protoplastos o esferoplastos [58] (levaduras sin pared celular) de las cepas empleadas en el estudio.

La prueba de tinción nuclear con Hoechst reveló que la TFD con HIP produce condensación de cromatina como síntoma de muerte celular por apoptosis en células de levadura (Figura 13). Este estudio es comparable al llevado a cabo por Kessel et al. [59] sobre células tumorales y empleando el porfírico CPO como FS donde también se observó la condensación del DNA.

# **Localización de HIP en hongos por microscopía de fluorescencia**

## **a. Localización intracelular**

Los estudios demuestran la presencia de la HIP en el interior de todas las células testadas (Figura 17, 18, 19, 22, 23) mediante el uso de diferentes sondas.

La HIP no penetra en los núcleos de ninguna de las células de hongos por la no colocalización del FS con la sonda nuclear empleada (DAPI<sup>®</sup>) (Figura 19, 21, 22 ). Esto queda demostrado hasta al menos las 24 h de contacto del FS con las levaduras (Figura 20). En el caso de dermatofitos, es necesario realizar pruebas a las 24h de contacto con el FS para aseverar este hecho.

Existe algún hecho aislado en el que el FS parece presentarse en el núcleo por colocalización con el marcador nuclear en hifas de dermatofitos. Sin embargo, teniendo en cuenta el global de los experimentos, no se descarta que fuera un artefacto debido a una combinación de dos planos focales (Figura 22).

La microscopía confocal revela que el plano del marcador celular CellTracker<sup>®</sup> Green (CTG) colocaliza con el del FS, con lo que se asegura su presencia en el interior de todas las células testadas, tanto de dermatofitos, como de levaduras. Esto queda demostrado hasta al menos las 24 h de contacto del FS con las levaduras. En el caso de dermatofitos, es necesario realizar pruebas a las 24h de contacto con el FS para aseverar este hecho.

Existe la necesidad de seguir realizando pruebas de localización celular en dermatofitos, ya que solo se adquirieron imágenes correctas de la cepa *T.*

*mentagrophytes*; en el caso de la especie *T. rubrum* no hubo un correcto funcionamiento de la sonda CTG, por lo que no pudo asegurarse la presencia de HIP en el interior celular.

### **a. Localización mitocondrial**

En la cepa *C. parapsilosis* ATCC-22019 se pudo demostrar la localización de la HIP en las mitocondrias por la colocalización del FS con la sonda MitoTracker® Green (MTG) (Figura 17).

No pudo evidenciarse a ningún tiempo de incubación si la HIP se localizó en las mitocondrias de las cepas de *C. albicans* ATCC-10231, *C. krusei* ATCC-6258, *T. mentagrophytes* ATCC-9533 o *T. rubrum* ATCC-28188 mediante el uso de la sonda MTG debido a su mal funcionamiento en hongos. No se conocen los detalles exactos de éste hecho. Inicialmente, se pensó que el fallo de la sonda pudo ser debido a errores en el protocolo de utilización de la sonda, los cuales fueron corregidos por la compañía meses más tarde, recomendando que se empleara en células sin fijar y pHs fisiológicos y tamponados. Sin embargo, este hecho se descartó al realizar preparaciones sin fijar y a esos pHs sin obtener resultados satisfactorios.

Posteriormente, fue realizado un experimento de fluorescencia convencional en levaduras las sondas MitoTracker® red (MTR) y DIOC6® los cuales ofrecieron un patrón de localización en algunos casos parecido pero no exactamente igual al del FS (Figura 25, 26).

Comparando el patrón de localización de HIP en todas las especies de levadura testadas con el patrón morfológico de las mitocondrias de levaduras presentado en nuestros ensayos con MTR así como el encontrado en algunos estudios como los de Chen et al [60] o los de Aon et al [61], es altamente probable que la HIP se localice parcialmente en las mitocondrias de todas las especies.

En el caso de dermatofitos, aun no se ha demostrado un patrón característico mitocondrial de localización del FS, por lo que se requieren mayor número de

estudios para descubrirlo.

### **c. Evolución de la localización con el tiempo de contacto en levaduras**

El estudio de localización a diferentes tiempos de incubación revela que la HIP permanece en el interior celular por colocalización con sondas celulares. Al emplear tiempos de incubación de hasta 24h, la distribución del FS varía ligeramente en el caso de *C. krusei* ATCC-6258 y se mantiene prácticamente constante en *C. parapsilosis* ATCC-22019 y en *C. albicans* ATCC-10231 (Figura 17, 18, 19, 20). Sin embargo, existe un hecho relevante para las tres especies, y es que el FS parece abandonar parcialmente su multilocalización para centrarse en más espacios concretos del citoplasma.

### **d. Otras localizaciones**

A rasgos generales, no existen pruebas concluyentes que puedan elucidar definitivamente todas las localizaciones de la HIP en células de hongos, debido al alto grado de multilocalización del FS; sin embargo, aceptando que parte del FS pudiera permanecer en las mitocondrias en levaduras, existen otras posibilidades de localización adicionales:

#### **i. Vacuolas**

Tanto en la cepa *C. albicans*, como en las cepas *C. parapsilosis* y *C. krusei*, (las dos últimas a 24h de contacto) se manifiesta un acúmulo del FS en una zona muy concreta (Figura 17, 20), de tamaño, volumen y morfología muy similar a la que presentan las vacuolas en levaduras; primeramente, y mediante el uso de reconstrucción tridimensional de alta resolución, (y descartando el núcleo por la no colocalización del FS con la sonda nuclear) Wei et al. [62] han probado que la vacuola es, sin duda, después de la pared celular, el orgánulo subcelular de mayor volumen.

Además de ello, en estudios como los de Ziegler et al. [63] en 2011, donde se emplea un marcador vacuolar en *C. albicans*, se observa muy claramente que la morfología de la vacuola encaja perfectamente con la zona de localización de la HIP en nuestros estudios de con *C. albicans*. Song et al. [64] demuestran, además, que la HIP es susceptible a localizarse en vacuolas del *Hypericum perforatum*.

Pese a estas deducciones no se puede establecer de forma certera que la HIP acaba por acumularse en la vacuola porque no se conoce exactamente la influencia de este FS en la morfología de los orgánulos subcelulares en células de levaduras. En otros FSs, como la Toulidine Blue se encuentran evidencias de que no puede penetrar en las vacuolas de las levaduras [65].

Debido a todos estos hechos sería necesario el realizar pruebas con marcadores vacuolares para corroborar si la HIP se localiza en este orgánulo subcelular específico.

### **ii. Orgánulos perinucleares**

En todas las cepas estudiadas existe afinidad de la HIP por rodear espacios perinucleares que rodean pero no penetran en el núcleo (Figura 17, 18, 19), que podrían coincidir con retículo endoplasmático, aparato de Golgi o lisosomas. Estas localizaciones podrían ser similares a las que se presentan en células eucariotas superiores, que más tarde discutiremos. Se requieren, no obstante, estudios adicionales con marcadores selectivos a esos orgánulos en levaduras para confirmar este punto.

### **Localización de HIP en células humanas dérmicas por microscopía de fluorescencia**

La HIP no penetra en los núcleos de ninguna de las células humanas por la no colocalización del FS con las sondas nucleares empleadas (Hoechst y DAPI). Este hecho queda demostrado hasta al menos las 24 h de contacto del FS con las células (Figura 23).

El empleo de diferentes sondas en microscopía de fluorescencia invertida permitió demostrar que la HIP se localiza en mitocondrias y lisosomas en las células HaCaT (Figura 23):

- La localización lisosomal fue mucho más clara que la mitocondrial.
- La localización del FS se va acumulando, conforme pasa el tiempo en zonas colindantes al núcleo.

La localización intracelular del FS en células hNDF fue demostrada por colocalización con diferentes sondas mediante microscopía de fluorescencia confocal e invertida.

Los estudios de incubación de HIP en HaCaT y hNDF revelan que el FS permanece en el interior celular hasta, al menos las 24h de incubación. En el caso de células HaCaT, al igual que en levaduras, el FS parece abandonar parcialmente su multilocalización para centrarse en más espacios concretos del citoplasma. Debido al patrón de localización presentado a tiempo de incubación 1 min, y tomando como ejemplo estudios ya publicados, dichos espacios podrían tratarse de lisosomas, golgi y retículo endoplasmático. En el caso de células hNDF, el patrón de localización no sufre modificaciones aparentes.

## **Discusión**

Para poder contrastar estos resultados se puede hacer alusión a los estudios de HIP en la TFD contra el cáncer, campo donde más ha sido estudiada.

En 2001 Uzdensky et al. probaron la presencia de la HIP en zonas perinucleares ricas en Retículo endoplasmático y Golgi de células de Glioblastoma cuando las células eran incubadas con el FS durante periodos de 24 h [66]. Este estudio fue respaldado 7 años después por las investigaciones de Ritz et al [67].

En 2002 Ali y Olivo prueban la presencia de la HIP en células cancerosas. La HIP presentaba colocalización con una sonda mitocondrial y una lisosomal. Además demostraron la no colocalización del FS con el marcador nuclear DAPI, con lo que se asegura capacidad genotóxica nula [68].

Adigbli et al. [69] en 2007 demuestra la presencia de la HIP en el interior de los lisosomas de células de cáncer de vejiga por colocalización con LisoTracker Green.

## **Conclusiones**

- La constatación de que la TFD puede ser empleada como agente antifúngico demuestra que este tipo de terapia posee grandes beneficios sobre infecciones provocadas por las levaduras [70] y dermatofitos [71] que con mayor frecuencia provocan infecciones oportunistas.
- La HIP penetra en células tanto de hongos como dérmicas y provoca un efecto fototóxico sobre ellas. La localización concreta depende tanto del tipo celular como de la especie estudiada. En levaduras, dicha localización parece condicionar el efecto fototóxico y podría estar relacionado con la diferente proporción de EROs para cada especie estudiada formadas en el proceso.
- La aplicabilidad clínica de esta terapia estará condicionada a la selectividad con la que actúe sobre las células diana. En este trabajo se recogen resultados de los que se deduce que empleando concentraciones de HIP y

fluencias concretas podría dañarse a las células diana preservando la viabilidad de las células del huésped

## Referencias

---

- [1] - **Theodossiou T**, Spiro MD, Jacobson J, Hothersall JS, and MacRobert AJ. Evidence for intracellular aggregation of hypericin and the impact on its photocytotoxicity in PAM 212 murine keratinocytes. *J Photochem Photobiol* **2004**; 80:438-43.
- [2] - **Wang X-L**, Liu J, Zhang J, and Yang R. Effect of light wavelength on photodynamic therapy of hypericin and extract from *Hypericum perforatum* L. on HepG2 cancer cell line of human liver *in vitro*. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**.
- [3] - **Calzavara-Pinton PG**, Venturini M, and Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J Photochem Photobiol B* **2005**; 78:1-6.
- [4] - Stenström AG, Moan J, Brunborg G, and Eklund T. Photodynamic Inactivation of Yeast Cells Sensitized by Hematoporphyrin. *J Photochem. Photobiol* **1980**; 2:349-352.
- [5] - **Zeina B**, Greenman J, Purcell WM, and Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol* **2001**; 144:274-278.
- [6] - **Smijs TG**, van der Haas RN, Lugtenburg J, Liu Y, de Jong RL, and Schuitmaker HJ. Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its microconidia with porphyrin photosensitizers. *J Photochem Photobiol* **2004**; 80:197-202.
- [7] - **Amorim JC**, Soares BM, Alves OA, Ferreira MV, Sousa GR, Silveira Lde B, Piancastelli AC, and Pinotti M. Phototoxic action of light emitting diode in the *in vitro* viability of *Trichophyton rubrum*. *An Bras Dermatol* **2012**; 87:250-255.
- [8] - **Hudson JB**, Lopez-Bazzocchi I, and Towers GH. Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res* **1991**; 15:101-112.
- [9] - **Lavie G**, Mazur Y, Lavie D, Prince AM, Pascual D, Liebes L, Levin B, and Meruelo D. Hypericin as an Inactivator of infectious viruses in blood components. *Transfusion* **1995**; 35:392-400.
- [10] - **Yow CM**, Tang HM, Chu ES, and Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *J Photochem Photobiol* **2012**; 88:626-632.
- [11] - **Hager B**, Strauss WS, and Falk H. Cationic hypericin derivatives as novel agents with photobactericidal activity: synthesis and photodynamic inactivation of *Propionibacterium acnes*. *J Photochem Photobiol* **2009**; 85:1201-1206.
- [12] - **Schempp CM**, Simon-Haarhaus B, Heine A, Schöpf E, and Simon JC. *In vitro* and *in vivo* Activation of Hypericin with the Incoherent Light Source PDT 1200 SOA (520-750 nm) and with Solar Simulated Radiation (290-2500 nm). *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **1999**; 15:13-17.
- [13] - **Hadjur C**, Richard MJ, Parat MO, Jardon P, and Favier A. Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *J Photochem Photobiol* **1996**; 64:375-381.

## Discusión

---

- [14] - **Nakajima N, and Kawashima N.** a basic study on hypericin-PDT *in vitro*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2012**; 9:196-203.
- [15] - **Goulart Rde C,** Bolean M, Paulino Tde P, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, and Ciancaglini P. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg* **2010**; Suppl 1:S53-60.
- [16] - **Dovigo LN,** Pavarina AC, Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, and Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses* **2011**; 54:123-130.
- [17] - **Bliss JM,** Bigelow CE, Foster TH, and Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48:2000-2006.
- [18] - **Lyon JP,** Costa SC, Totti VMG, Munhoz MFV, and Resende MA. Predisposing conditions for *Candida* spp. Carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. *Can J Microbiol* **2006**; 52:462-467.
- [19] - **Donnelly RF,** McCarron PA, Lightowler JM, and Woolfson AD. Bioadhesive patch-based delivery of 5-aminolevulinic acid to the nail for photodynamic therapy of onychomycosis. *J Control Release*. **2005**; 3:381-392.
- [20] - **Calzavara-Pinton PG,** Venturini M, and Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J Photochem Photobiol B* **2005**; 78(1):1-6.
- [21] - **Monfrecola G,** Procaccini EM, Bevilacqua M, Manco A, Calabro G, and Santoianni P. *In vitro* effect of 5-Aminolaevulinic acid plus visible light on *Candida albicans*. *J Photochem Photobiol Sci* **2004** ;3:419-422.
- [22] - **Dovigo LN,** Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, and Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med* **2011**; 43:927-934.
- [23] - **Mizuno K,** Zhiyentayev T, Huang L, Khalil S, Nasim F, Tegos GP, Gali H, Jahnke A, Wharton T, and Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy with functionalized fullerenes: quantitative structure-activity relationships. *J Nanomed Nanotechnol* **2011**; 2:1-9.
- [24] - **Demidova TN and Hamblin MR.** Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49:2329-2335.
- [25] - **Carvalho GG,** Felipe MP, Costa MS. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. *J Microbiol* **2009**; 47:619-623.
- [26] - **Shen L,** Ji HF, and Zhang HY. Anion of hypericin is crucial to understanding the photosensitive features of the pigment. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**;16:1414-1717.
- [27]- **Sattler S,** Schaefer U, Schneider W, Hoelzl J, Lehr CM. Binding, uptake, and transport of hypericin by caco-2 cell monolayers. *J Pharm Sci* **1997**; 86:1120-1126.
- [28] - **Saw CL,** Olivo M, Soo KC, and Heng PW. Delivery of hypericin for photodynamic applications. *Cancer Lett* **2006**; 241:23-30.

## Discusión

---

- [29] - **George S**, Hamblin MR, and Kishen A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *J Photochem Photobiol Sci* **2009**; 8:788-795.
- [30] - **Faham S**, Watanabe A, Besserer GM, Cascio D, Specht A, Hirayama BA, Wright EM, and Abramson J. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na<sup>+</sup>/Sugar symport. *Science* **2008**; 321:810-814.
- [31] - **Smijs TG**, Bouwstra JA, Talebi M, and Pavel S. Investigation of conditions involved in the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 60:750-759.
- [32] - **Mang TS**, Mikulski L, and Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2010**; 7:98-105.
- [33] - **Bertoloni G**, Rossi F, Valduga G, Jori G, Ali H, and van Lier JE. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios* **1992**; 71:33-46.
- [34] - **Gleckman RA**, and **Borrego F**. Adverse reactions to antibiotics. clues for recognizing, understanding, and avoiding them. *Postgrad Med* **1997**; 101:97-8, 101-4, 107-8.
- [35] - **Calzavara-Pinton PG**, Venturini M, and Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J Photochem Photobiol B* **2005**; 78:1-6.
- [36] - **Soukos N**, Ximenez-Fyvie L, Hamblin MR, Socransky S, and Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother* **1998**; 42:2595-2601.
- [37] - **Mima EG**, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, and Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: *in vitro* study. *Photomed Laser Surg* **2011**; 29:827-833.
- [38] - **Dauids LM**, Kleemann B, Kacerovská D, Pizinger K, and Kidson SH. Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. *J Photochem Photobiol B* **2008**; 91:67-76.
- [39] - **Allison RR**, and **Sibata CH**. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *photodiagnosis Photodyn Ther* **2010**; 7:61-75.
- [40] - **Allison RR**, Downie GH, MD, Cuenca R, Hu X, Childs CJH, and Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2004**; 1:27-42.
- [41] - **Blank M**, Mandel M, Hazan S, Keisari Y, and Lavie G. Anti-cancer activities of hypericin in the dark. *J Photochem Photobiol* **2001**; 74:120-125.
- [42] - **deBruijne AW**, and **van Steveninck J**. Lysis of yeast cells and erythrocytes by dimethylsulfoxide. *Biochem Pharmacol*. **1972**; 21:153-162.
- [43] - **Akram Randhawa M**. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) inhibits the germination of *Candida albicans* and the arthrospores of *Trichophyton mentagrophytes*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* **2008**; 49:125-128.
- [44] - **Rodríguez-Tudela JL**, Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, and Mellado E. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol* **2001**; 39:2513-2517.
- [45] - **de Hoog GS**, Guarro J, Gené J, and Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi* 2nd Edition, Ascomycetous Yeasts (pgs 178 - 224), CBS, The Netherlands, **2000**.

## Discusión

---

- [46] - **Bancirova M, and Lasovsky J.** The photodynamic effect: the comparison of chemiexcitation by luminol and phthalhydrazide. *Luminescence* **2011**; 26:410-405.
- [47] – **Mroz P, Pawlak A, Satti M, Lee H, Wharton T, Gali H, Sarna T, and Hamblin MR.** Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med* **2007**; 43:711-719.
- [48]- **Barb WG,** Baxendale JH, George J, and Hargrave KR. Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. part i. the ferrous ion reaction. *Trans Faraday Soc* **1951**; 47:462-500.
- [49]- **Prousek J.** Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl Chem* **2007**; 79:2325–2338.
- [50]- **Symons MCR, and Gutteridge JMC.** Free radicals and iron: chemistry, biology, and medicine. *Oxford Sciences Publications* 1st Edition, **1998**.
- [51]- **Halliwell B, and Gutteridge JMC.** Free radicals in biology and medicine, 4d Edition, *Oxford University Press*, Oxford, **2006**.
- [52] - **Thomas C, and Pardini RS.** Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *J Photochem Photobiol* **1992**; 55:831-837.
- [53] - **Kwak GH,** Choi SH, and Kim HY. Dimethyl sulfoxide elevates hydrogen peroxide-mediated cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by inhibiting the antioxidant function of methionine sulfoxide reductase A. *BMB Rep.* **2010**; 43:622-628.
- [54] - **Karioti A, and Bilia AR.** Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int J Mol Sci* **2010**; 11:562-594.
- [55] - **Buytaert E,** Dewaele M, and Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death dathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* **2007**; 1776:86-107.
- [56] - **Buytaert E,** Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, Vandenheede JR, Heirman I, Grooten J, and Agostinis P. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J* **2006**; 20:756-758.
- [57] - **Theodossiou TA,** Papakyriakou A, and Hothersall JS. Molecular modeling and experimental evidence for hypericin as a substrate for mitochondrial complex iii; mitochondrial photodamage as demonstrated using specific inhibitors. *Free Radical Biol Med* **2008**; 45:1581–1590.
- [58] - **Lam M,** Jou PC, Lattif AA, Lee Y, Malbasa CL, Mukherjee PK, Oleinick NL, Ghannoum MA, Cooper KD, and Baron ED. Photodynamic therapy with Pc 4 induces apoptosis of *Candida albicans*. *J Photochem Photobiol* **2011**; 87:904-909.
- [59] - **Kessel D,** Vicente MG, and Reiners JJ Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Autophagy* **2006**; 2:289-90.
- [60] - **Chen S,** Sánchez-Fernández R, Lyver ER, Dancis A, and Rea PA. Functional characterization of AtATM1, AtATM2, and AtATM3, a subfamily of Arabidopsis Half-Molecule ATP-Binding cassette transporters implicated in iron homeostasis. *J Biol Chem* **2007**; 282:21561-21571.
- [61]- **Aon MA,** Cortassa S, Lemar KM, Hayes AJ, and Lloyd D. Single and cell population respiratory oscillations in yeast: a 2-photon scanning laser microscopy study. *FEBS Lett* **2007**; 581:8-14.

## Discusión

---

- [62] - **Wei D**, Jacobs S, Modla S, Zhang S, Young CL, Cirino R, Caplan J, and Czymmek K. High-resolution three-dimensional reconstruction of a whole yeast cell using focused-ion beam scanning electron microscopy. *Biotechniques* **2012**; 53:41-48.
- [63] - **Ziegler L**, Terzulli A, Gaur R, McCarthy R, and Kosman DJ. Functional characterization of the ferroxidase, permease high-affinity iron transport complex from *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **2011**; 81:473-485.
- [64] - **Song X**, Zhu J, Lv HF. The development of secondary cells in the callus of *Hypericum perforatum* L. and hypericins accumulation. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao*. **2007**; 40:49-61.
- [65] - **Paardekooper M**, De Bruijne AW, Van Steveninck J, and Van den Broek PJ. Intracellular damage in yeast cells caused by photodynamic treatment with toluidine blue. *J Photochem Photobiol* **1995**; 61:84-89.
- [66] - **Uzdensky AB**, Ma LW, Iani V, Hjortland GO, Steen HB, and Moan J. Intracellular Localisation of Hypericin in Human Glioblastoma and Carcinoma Cell Lines. *Lasers Med Sci* **2001**; 16:276-283.
- [67] - **Ritz R**, Roser F, Radomski N, Strauss WS, Tatagiba M, and Gharabaghi A. subcellular colocalization of hypericin with respect to endoplasmic reticulum and golgi apparatus in glioblastoma cells. *Anticancer Res* **2008**; 28:2033-2038.
- [68] - **Ali SM, and Olivo M**. Bio-distribution and subcellular localization of hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* **2002**; 21:531-540.
- [69] - **Adigbli DK**, Wilson DG, Farooqui N, Sousi E, Riskey P, Taylor I, MacRobert AJ, and Loizidou M. Photochemical internalisation of chemotherapy potentiates killing of multidrug-resistant breast and bladder cancer cells. *Br J Cancer* **2007**; 97:502-512.
- [70] - **Lyon JP**, Costa SC, Totti VMG, Munhoz MFV, and Resende MA. Predisposing conditions for *Candida* spp. Carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. *Can J Microbiol* **2006**; 52:462-467.
- [71] - **Calzavara-Pinton P**, Rossi MT, Sala R, and Venturini M. Photodynamic antifungal chemotherapy. *J Photochem Photobiol* **2012**; 88:512-522.