



**Universitat Ramon Llull**

## **TESIS DOCTORAL**

Fotoinactivación de especies fungicas patógenas mediante hipericina, TMPyP y NMB como agentes sensibilizantes fotodinámicos

Realizada por Gracia Patrícia López Chicón

en el Centro IQS School of Engineering

y en el Departamento de Bioingeniería

Dirigida por Dra. Montserrat Agut Bonsfills  
Dr. Santi Nonell Marrugat



*A mis padres y a Raúl*



Dar las gracias a la Dra. Montserrat Agut y al Dr. Santi Nonell por darme la posibilidad de hacer la tesis doctoral en sus laboratorios, Microbiología y Fotoquímica, y formar parte de sus grupos de trabajo.

A Raúl, por ser la paz que me falta. Por acompañarme durante estos catorce años desde que entré por primera vez en el IQS y apoyarme en todas mis decisiones. Te quiero mi amor!

A mis padres, los mejores! Que sin ellos esta tesis no sería hoy una realidad y a quienes les hace especialmente ilusión. Y a mis hermanas... por ser las más guapas! A mi hermana Estefanía, por estar siempre a mi lado.

A todas las nenas de Cardedeu por darme mil ánimos este último año de redacción! Us estimo flors!

A las chicas de Microbiología, Anna y Elena, por enseñarme todo lo que necesité cuando comencé toda esta andanza. Igualmente, al equipo de fotoquímica, Rubén, María y Adaya, por explicarme cuantas veces las dudas que me iban surgiendo.

También al Dr. Carlos Semino, por abrirme las puertas de su laboratorio. A las chicas de cultivos, es especial a Mire, que sin ella no sabría todo lo que se sobre el maravilloso mundo de las células. Y a Joan, que sin él los formatos no tendrían sentido.

A los compañeros de comidas, que han ido y venido durante todos estos años y han hecho al medio día el descanso más ameno. Jordi y Pol... sigo echándoos de menos!

A todo el equipo de la Dra. Yolanda Gilaberte y del Dr. Antonio Rezusta del Departamento de microbiología del Hospital universitario Miguel Servet, del Instituto de

Ciencias de la Salud de Aragón y del Departamento de Dermatología del Hospital San Jorge de Huesca por colaborar en esta tesis. En especial a Pablo, que pese a la distancia siempre hemos estado en contacto para debatir lo que fuera necesario.

Dar las gracias a la empresa SORISA y al Dr. Albert Amat por la cesión de la lámpara SORISA Photocare®.

Por último, dar las gracias al laboratorio de Fotoquímica de la IQS School of Engineering por la beca pre-doctoral que me concedió para realizar parte de la tesis doctoral.

Esta tesis se ha realizado mediante las subvenciones PI120 / 09 del Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón y CTQ2010-20870-C03-01 del Ministerio de Economía y Competitividad.

Índice.....	I
Índice de figuras .....	IX
Índice de tablas.....	XIII
Abreviaturas .....	XV
Sumario .....	XIX
Sumari .....	XXI
Abstract .....	XXIII
Capítulo 1    Introducción.....	25
1.1    Infecciones fúngicas .....	3
1.1.1    Definición.....	3
1.1.2    Tipos de micosis superficiales .....	3
1.1.3    Tratamientos clásicos de las infecciones fúngicas.....	7
1.1.4    Necesidad de tratamientos alternativos .....	9
1.2    Microbiología de las infecciones fúngicas .....	12
1.2.1    La célula fúngica.....	12
1.2.2    Levaduras.....	14
1.2.3    Hongos dermatofitos.....	15
1.3    Terapia fotodinámica antimicrobiana .....	17
1.3.1    Terapia fotodinámica antimicrobiana en la práctica clínica .....	17
1.3.2    Fotosensibilizadores y mecanismos de acción .....	20
1.3.3    Fuentes de luz .....	23
1.3.4    Bases moleculares de la TFD.....	25
1.4    Biología Celular .....	30
1.4.1    Queratinocitos .....	30
1.4.2    Fibroblastos.....	32
1.5    Objetivos .....	34
1.6    Referencias .....	35

---

Capítulo 2	Técnicas y métodos.....	47
2.1	Técnicas de microbiología .....	49
2.1.1	Cepas fúngicas.....	49
2.1.2	Preparación de la suspensión de células fúngicas.....	49
2.1.3	Recuento de células viables: unidades formadoras de colonias .....	50
2.1.4	Viabilidad celular .....	52
2.1.5	Incorporación del fotosensibilizador por las levaduras .....	53
2.2	Técnicas de biología celular .....	55
2.2.1	Células epidérmicas humanas.....	55
2.2.2	Preparación celular en dos dimensiones .....	55
2.2.3	Expansión del cultivo celular: tripsinización .....	56
2.2.4	Recuento microscópico directo: hematocitómetro.....	56
2.2.5	Sembrado de células en placas de distintos diámetros.....	57
2.2.6	Preparación de muestras para el microscopio de fluorescencia.....	59
2.2.7	Cuantificación de proteínas .....	61
2.2.8	Recta patrón de concentración de proteínas frente al número de células .....	63
2.2.9	Ensayo de viabilidad con MTT .....	63
2.2.10	Viabilidad celular frente al fotosensibilizador.....	64
2.2.11	Incorporación del fotosensibilizador por las células .....	66
2.3	Técnicas Fotoquímicas.....	68
2.3.1	Espectros de absorción, excitación y emisión.....	68
2.3.2	Cinética de fluorescencia resuelta en el tiempo .....	69
2.3.3	Absorción de los estados transitorios .....	69
2.3.4	Cinética de fosforescencia de oxígeno singlete .....	70
2.4	Referencias .....	73
Capítulo 3	Uso de la hipericina en terapia fotodinámica <i>in vitro</i> aplicada sobre especies de <i>Candida</i> .....	77



3.1	Introducción .....	79
3.2	Parte experimental.....	82
3.2.1	Cepas fúngicas y células humanas.....	82
3.2.2	Reactivos químicos.....	82
3.2.3	Fuentes de luz .....	83
3.2.4	Inactivación fotosensibilizada de las suspensiones celulares fúngicas ..	83
3.2.5	Efectos secundarios: tratamiento fotodinámico en células humanas .....	84
3.2.6	Incorporación de hipericina en levaduras.....	84
3.2.7	Incorporación de hipericina en células humanas .....	85
3.3	Resultados .....	86
3.3.1	Inactivación fotosensibilizada de las suspensiones celulares fúngicas ..	86
3.3.2	Efectos secundarios: tratamiento fotodinámico en células humanas .....	88
3.3.3	Incorporación de hipericina en levaduras.....	90
3.3.4	Incorporación de hipericina en células humanas .....	91
3.4	Discusión .....	92
3.5	Conclusiones .....	96
3.6	Agradecimientos .....	97
3.7	Referencias .....	98
Capítulo 4	Mecanismo de fotoinactivación de especies de <i>Candida</i> por hipericina	105
4.1	Introducción .....	107
4.2	Parte experimental.....	109
4.2.1	Cepas fúngicas.....	109
4.2.2	Reactivos químicos.....	109
4.2.3	Fuentes de luz .....	109
4.2.4	Preparación de la muestra.....	110
4.2.5	Espectros de absorción y fluorescencia.....	110
4.2.6	Cinética de fluorescencia.....	110
4.2.7	Microscopía de fluorescencia .....	111

---

4.2.8	Espectros de absorción de transitorios .....	112
4.2.9	Cinética de oxígeno singlete .....	112
4.2.10	Efecto de los inhibidores de especies EROs .....	112
4.3	Resultados .....	114
4.3.1	Espectros de absorción y fluorescencia.....	114
4.3.2	Cinética de fluorescencia.....	115
4.3.3	Microscopía de fluorescencia .....	117
4.3.4	Experimentos de absorción de transitorios .....	120
4.3.5	Cinéticas de oxígeno singlete .....	121
4.3.6	Efecto de los inhibidores de especies EROs .....	123
4.4	Discusión .....	124
4.5	Conclusiones .....	129
4.6	Agradecimientos .....	130
4.7	Referencias .....	131
Capítulo 5	Uso de TMPyP en terapia fotodinámica <i>in vitro</i> aplicada sobre especies de <i>Candida</i>	137
5.1	Introducción .....	139
5.2	Parte experimental.....	141
5.2.1	Cepas fúngicas y células humanas.....	141
5.2.2	Reactivos químicos.....	141
5.2.3	Fuentes de luz .....	142
5.2.4	Inactivación fotosensibilizada en suspensiones celulares fúngicas.....	142
5.2.5	Efecto del tratamiento fotodinámico en células humanas .....	143
5.2.6	Incorporación de TMPyP en levaduras .....	144
5.2.7	Incorporación de TMPyP en células epidérmicas humanas .....	144
5.3	Resultados .....	145
5.3.1	Inactivación fotosensibilizada en suspensiones celulares fúngicas.....	145
5.3.2	Efecto del tratamiento fotodinámico en células humanas .....	148

---

5.3.3	Incorporación de TMPyP en levaduras .....	151
5.3.4	Incorporación de TMPyP en células epidérmicas humanas .....	152
5.4	Discusión .....	154
5.5	Conclusiones .....	155
5.6	Referencia .....	156
Capítulo 6	Mecanismos de acción de la TMPyP frente a especies de <i>Candida</i> ....	161
6.1	Introducción .....	163
6.2	Parte experimental.....	165
6.2.1	Cepas fúngicas.....	165
6.2.2	Reactivos químicos.....	165
6.2.3	Fuentes de luz .....	165
6.2.4	Preparación de la muestra.....	166
6.2.5	Espectros de absorción y fluorescencia.....	166
6.2.6	Cinética de fluorescencia.....	166
6.2.7	Cinética de oxígeno singlete .....	167
6.3	Resultados .....	168
6.3.1	Espectros de absorción y fluorescencia.....	168
6.3.2	Cinética de fluorescencia.....	169
6.3.3	Cinética de oxígeno singlete .....	172
6.4	Discusión .....	177
6.5	Conclusiones .....	180
6.6	Referencias .....	181
Capítulo 7	Uso del NMB en terapia fotodinámica <i>in vitro</i> aplicada sobre especies de <i>Candida</i> .....	185
7.1	Introducción .....	187
7.2	Parte experimental.....	189
7.2.1	Cepas fúngicas y células humanas.....	189
7.2.2	Reactivos químicos.....	189

---

7.2.3	Fuentes de luz .....	190
7.2.4	Inactivación fotosensibilizada en suspensiones celulares fúngicas.....	190
7.2.5	Efecto del tratamiento fotodinámico en células humanas .....	191
7.2.6	Incorporación del NMB en levaduras .....	191
7.2.7	Incorporación del NMB en células epidérmicas humanas .....	192
7.2.8	Espectros de excitación y de emisión de fluorescencia .....	192
7.3	Resultados .....	194
7.3.1	Inactivación fotosensibilizada en suspensiones celulares fúngicas.....	194
7.3.2	Efecto del tratamiento fotodinámico en células epidérmicas humanas.	196
7.3.3	Incorporación del NMB en levaduras .....	198
7.3.4	Incorporación del NMB en células epidérmicas humanas .....	199
7.3.5	Espectros de excitación y de emisión de fluorescencia .....	200
7.4	Discusión .....	201
7.5	Conclusiones .....	204
7.6	Referencias .....	205
Capítulo 8	Terapia fotodinámica <i>in vitro</i> aplicada sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i> con NMB como fotosensibilizador.....	207
8.1	Introducción .....	209
8.2	Parte experimental.....	210
8.2.1	Cepas fúngicas.....	210
8.2.2	Reactivos químicos.....	210
8.2.3	Fuentes de luz .....	210
8.2.4	Inactivación fotosensibilizada de la suspensión fúngica.....	210
8.3	Resultados .....	213
8.4	Discusión .....	216
8.5	Conclusiones .....	218
8.6	Referencias .....	219
Capítulo 9	Conclusiones .....	223

Anexos: Artículos científicos publicados ..... 227



Figura 1.1. Evolución histórica de los fármacos antifúngicos .....	7
Figura 1.2. Esquema de la pared celular y la membrana celular de una célula fúngica .....	13
Figura 1.3. Infecciones que podrían tratarse con TFA.....	19
Figura 1.4. Fármacos aprobados para su uso en TFD y su nombre comercial.....	21
Figura 1.6. Diagrama de Jablonski: base molecular y mecanismos de acción fotodinámica .....	29
Figura 1.7. Queratinocitos humanos cultivados en dos dimensiones. ....	31
Figura 1.8. Estratificación de la epidermis.....	32
Figura 1.9. Fibroblastos humanos cultivados en dos dimensiones.....	33
Figura 2.1. Cámara de un hematocitómetro.....	57
Figura 3.1. Estructura química de la hipericina .....	81
Figura 3.2. Efecto de la fluencia y la concentración de hipericina sobre la fotoinactivación de especies de <i>Candida</i> .....	87
Figura 3.3. Viabilidad celular de HaCaT (A) y hNDF (C) después de la fotoinactivación .....	89
Figura 3.4. Evolución temporal de la incorporación de hipericina por levaduras. ....	90
Figura 3.5. Evolución temporal de la incorporación de hipericina en HaCaT (verde) y hNDF (rosa).....	91
Figura 4.1. Estructura química de la hipericina .....	108
Figura 4.2. Espectro de absorción (A) y fluorescencia (B) normalizados.....	114
Figura 4.3. Decaimiento de fluorescencia resuelta en el tiempo de la hipericina en levaduras, en PBS y en Etanol. ....	116
Figura 4.4. Microscopia de fluorescencia de la hipericina en las tres especies de <i>Candida</i> .....	119
Figura 4.5. Absorción de los transitorios de hipericina en suspensiones de levadura	121

Figura 4.6. Cinética de $^1\text{O}_2$ observada a 1275 nm y a 1325 nm (control negativo) en PBS y D-PBS.....	122
Figura 4.7. Inhibición por distintos desactivadores de EROs sobre el efecto fototóxico inducido por TFD antifúngica con hipericina sobre <i>Candida</i> spp.....	123
Figura 5.1. Estructura química de la TMPyP .....	140
Figura 5.2. Reducción de unidades logarítmicas post-tratamiento fotodinámico de la suspensión inicial levadura. ....	146
Figura 5.3. Reducción de unidades logarítmicas post-tratamiento fotodinámico de la suspensión inicial ( $10^3$ ufc/mL) levadura. ....	148
Figura 5.4. Viabilidad celular post-tratamiento fotodinámico de hNDF (A, B, C, D) y HaCaT (E, F, G, H) en función de la concentración de TMPyP.....	150
Figura 5.5. Fluorescencia de la TMPyP procedente del lisado celular de levadura a distintos tiempos de incubación. ....	151
Figura 5.6. Fluorescencia de la TMPyP procedente del lisado celular a distintos tiempos de incubación. HaCaT (rojo) y hNDF (azul). ....	152
Figura 6.1. Estructura química de la TMPyP .....	164
Figura 6.2. Espectro de absorción (A) y fluorescencia (B) normalizados de la TMPyP .....	169
Figura 6.3. Decaimiento de fluorescencia resuelta en el tiempo de la TMPyP en PBS (A) y en levaduras.....	170
Figura 6.4. <i>C. albicans</i> CECT: Cinética de $^1\text{O}_2$ .....	173
Figura 6.5. <i>C. albicans</i> ATCC: Cinética de $^1\text{O}_2$ .....	174
Figura 6.6 <i>C. parapsilosis</i> : Cinética de $^1\text{O}_2$ .....	175
Figura 6.7. <i>C. krusei</i> : Cinética de $^1\text{O}_2$ .....	176
Figura 7.1. Estructura química del NMB.....	188
Figura 7.2. Reducción de unidades logarítmicas post-tratamiento fotodinámico de la suspensión inicial de levadura. ....	195



Figura 7.3. Viabilidad celular post-tratamiento fotodinámico de hNDF (A, B, C, D) y HaCaT (E, F, G, H) .....	197
Figura 7.4. Fluorescencia del NMB procedente del lisado celular a distintos tiempos de incubación .....	198
Figura 7.5. Fluorescencia del NMB procedente del lisado celular a distintos tiempos de incubación. HaCaT (rojo) y hNDF (azul). .....	199
Figura 7.6. Espectro de excitación (A) y espectro de emisión de fluorescencia (B) normalizados del NMB (10 $\mu$ M) en levaduras y en PBS (pH= 7.4). .....	200
Figura 8.1. Estructura química del NMB.....	209
Figura 1.2. Reducción logarítmica de las ufc/mL de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> post tratamiento fotodinámico con NMB .....	214



Tabla 1.1. Clasificación de las dermatofitosis en función de la zona infectada.....	4
Tabla 1.3. Antifúngicos tópicos .....	9
Tabla 2.1. Densidad celular que debe sembrarse en función de la microplaca de sembrado.....	58
Tabla 2.2. Esquema de las diluciones de estándares de BSA .....	61
Tabla 2.3. Longitudes de onda de espectros de excitación y emisión .....	68
Tabla 4.1. Resumen de los resultados fotofísicos de la hipericina .....	117
Tabla 6.1. Resumen de los resultados fotofísicos de la TMPyP .....	171
Tabla 8.1. Diseño experimental para cada una de las concentraciones de NMB .....	211



$^1\text{O}_2$  : oxígeno singlete

$^3\text{O}_2$  : oxígeno triplete

$^1\text{TMPyP}_0$ : singlete en estado fundamental de la TMPyP

$^1\text{TMPyP}_1$ : singlete excitado de la TMPyP

$^3\text{Hip}$ : hipericina triplete

$^3\text{TMPyP}_1$ : triplete de la TMPyP

ADN: ácido desoxirribonucleico

$^{\text{Aire}}\tau_s$ : tiempo de vida media en solución saturada de aire

$^{\text{Ar}}\tau_s$ : tiempo de vida media en solución saturada de argón

ATCC: American Type Culture Collection

BCA: ácido bicinconínico

BSA: albumina de suero bobino

CAT: catalasa

CECT: colección española de cultivos tipo

CES: cruce entre sistemas

$C_{\text{Hip}}$ : concentración de hipericina

CMI: concentración mínima inhibitoria

$C_{\text{NMB}}$ : concentración de NMB

$C_{\text{FS}}$ : concentración del fotosensibilizador

CTG: CellTracker Green<sup>®</sup>

$C_{\text{TMPyP}}$ : concentración de TMPyP

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMMB: dimethylmethylene blue

DMSO: dimetil sulfóxido

DO: densidad óptica

$\text{DO}_{600}$ : densidad óptica medida a 600 nm

$DO_{\lambda}$  : densidad óptica a una determinada longitud de onda

D-PBS: tampón salino fosfato deuterado

$D\text{-PBS}_{\tau_{\Delta}}^{1275}$ : tiempo de vida media medido a 1275 nm en PBS deuterado

$D\text{-PBS}_{\tau_s}^{1325}$ : tiempo de vida media medido a 1325 nm en PBS deuterado

EDTA: ácido etilen diamina tetra acético

EROs: especies reactivas de oxígeno

FBS: suero fetal bovino

FS: fotosensibilizador

H: hongo

HaCaT: queratinocitos

Hip: hipericina

hNDF: fibroblastos

Hip<sup>\*</sup>: hipericina radical anión

INCI: International Nomenclature Cosmetic Ingredient

IR: infra rojo

LED: light emitting diode

$\lambda_F$ : onda de fluorescencia

MB:methylene blue

MC: medio de cultivo

MCH: medio de cultivo para células humanas

ME: matriz extracelular

MTG: MitoTracker Green<sup>®</sup>

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

NMB: New Methylene Blue

$O_2^{\cdot-}$ : radical superóxido

$OH^{\cdot}$ : radical hidroxilo

ON: Over Night

$\tau_s$ : tiempo de vida media de la fluorescencia del FS

$\tau_T$ : tiempo de vida media del triplete del FS

$\tau_\Delta$ : tiempo de vida media del oxígeno singlete

ufc/mL: unidades formadoras de colonias por mililitro

ufc: unidades formadoras de colonias

UV: ultra violeta

$\lambda$  : longitud de onda

$\lambda_{\text{abs}}$ : longitud de onda de absorción

$\lambda_{\text{exc}}$ : longitud de onda de excitación

$\lambda_{\text{max}}$ : longitud de onda máxima

$\lambda_{\text{obs}}$ : longitud de onda de observación





Se ha evaluado mediante estudios *in vitro* la viabilidad de la terapia fotodinámica antifúngica para el tratamiento clínico de infecciones causadas por las especies fúngicas patógenas *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Trichophyton mentagrophytes*. El objetivo es optimizar esta técnica para proporcionar una alternativa a los fármacos antifúngicos usados en los tratamientos clásicos actuales y erradicar así las micosis superficiales. Se ha evaluado la capacidad citotóxica de tres fotosensibilizadores con propiedades fotoquímicas distintas, la hipericina, la 5,10,15,20-tetraquis(N-metil-4-piridil)-21H,23H-porfina y el cloruro de 3,7-Bis(etilamino)-2,8-dimetilfenotiacina-5-ilo, induciendo todos la inactivación celular sobre las distintas especies fúngicas. Para evaluar si la técnica produce daños significativos sobre las células epidérmicas humanas se han realizado estudios sobre queratinocitos y fibroblastos humanos.

Se han evaluado los mecanismos de acción de los tres fotosensibilizadores mediante estudios espectroscópicos y cinéticos de formación y desaparición de sus estados excitados y oxígeno singlete. En el caso de la hipericina también se han descrito los intermedios que se forman al irradiar, caracterizándose la accesibilidad de los tripletes al oxígeno.



S'ha avaluat mitjançant estudis *in vitro* la viabilitat de la teràpia fotodinàmica antifúngica per al tractament clínic d'infeccions causades per les espècies fúngiques patògenes *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* i *Trichophyton mentagrophytes*. L'objectiu és optimitzar aquesta tècnica per proporcionar una alternativa als fàrmacs antifúngics utilitzats en els tractaments clàssics actuals i eradicar així les micosis superficials. S'ha avaluat la capacitat citotòxica de tres fotosensibilitzadors amb propietats fotoquímiques diferents, la hipericina, la 5,10,15,20-tetraquis(N-metil-4-piridil)-21H,23H-porfina i el clorur de 3,7-Bis(etilamino)-2,8-dimetilfenotiacina-5-io, induint tots la inactivació cel.lular sobre les diferents espècies fúngiques. Per avaluar si la tècnica produeix danys significatius sobre les cèl.lules epidèrmiques humanes s'han realitzat estudis sobre queratinòcits i fibroblasts humans.

S'han avaluat els mecanismes d'acció dels tres fotosensibilitzadors mitjançant estudis espectroscòpics i cinètics de formació i desaparició dels seus estats excitats i oxigen singlet. En el cas de l'hipericina també s'han descrit els intermedis que es formen en irradiar, caracteritzant l'accessibilitat dels triplets a l'oxigen.



Has been evaluated by *in vitro* viability studies of photodynamic therapy for clinical fungal infections caused by pathogenic fungal species *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Trichophyton mentagrophytes*. The goal is to optimize this technique to provide an alternative to the antifungal drugs used in current classical treatments and thus eliminate superficial mycoses. We assessed the cytotoxic capacity of three photosensitizers with different photochemical properties, the hypericin, 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphine and 3,7-Bis(ethylamino)-2,8-dimethylphenothiazin-5-ium chloride, inducing all cell inactivation on different fungal species. To assess if the technique produces significant damage to human epidermal cells, studies with human fibroblasts and keratinocytes were carried.

We evaluated the mechanisms of action of the three photosensitisers by spectroscopic and kinetic studies of formation and disappearance of excited states and singlet oxygen. In the case of hypericin have also been described intermediates formed by irradiating, characterized accessibility of triplet oxygen.



# Capítulo 1

## *Introducción*





## 1.1 Infecciones fúngicas

### 1.1.1 Definición

Las micosis, superficiales o profundas, es el término general que se utiliza para denominar las infecciones fúngicas producidas por los hongos, organismos saprófitos o parásitos naturales con capacidad patógena frente al hombre. Las micosis superficiales, de localización cutánea y/o mucosa, es una de las enfermedades más comunes en humanos, y con menos incidencia, las infecciones sistémicas graves causadas por estos microorganismos [1]. Estas enfermedades están provocadas por algunas especies de hongos patógenas o con la capacidad de convertirse en patógenas, situación que se da cuando el individuo está bajo la influencia de determinados factores de riesgo, como el uso prolongado de ciertos tipos de fármacos, como antibióticos de amplio espectro, si padece algún tipo de enfermedad (diabetes mellitus, el SIDA, cáncer, etc.), la depresión de las funciones fagocíticas o cuando se dan alteraciones locales del sistema gastrointestinal [2,3]. Se trata de infecciones frecuentes que tienen una elevada repercusión social debido a los problemas estéticos que ocasionan, las molestias que provocan o bien a su capacidad de contagio.

### 1.1.2 Tipos de micosis superficiales

#### 1.1.2.1 Dermatofitosis

Son infecciones cutáneas producidas por dermatofitos, hongos patógenos del tipo queratinofílico y del género anamorfo *Trichophyton*, *Microsporum* o *Epidermophyton*. Estos hongos filamentosos invaden tejidos queratinizados como la piel, uñas y pelo debido a que poseen una enzima, la queratinasa, que les permite degradar este tipo de tejidos y utilizarlos como nutrientes. Las condiciones óptimas para que estos hongos parasiten un tejido y desarrollen una infección se dan cuando

aumenta la temperatura y la humedad, así como si se produce maceración u oclusión cutánea como ocurre en los pies o los pliegues corporales.

En la Tabla 1.1 se detallan las dermatofitosis (tiñas) tal y como se clasifican clínicamente según el tipo de tejido que coloniza el dermatofito, ya que en función de la especie presentan queratinasas específicas que tienen capacidad de invadir los tejidos específicos queratinizados de las diferentes estructuras colonizables [4].

Tabla 1.1 Clasificación de las dermatofitosis en función de la zona infectada

Tipo de tiña	Zona Infectada
<i>Tinea pedis</i>	Pies
<i>Tinea cruris</i>	Inglés
<i>Tinea capitis</i>	cuero cabelludo
<i>Tinea corporis</i>	Cuerpo
<i>Tinea unguium</i>	Uñas
<i>Tinea manuum</i>	Manos
<i>Tinea barbae</i>	Barba
<i>Tinea faciei</i>	Cara
Tiña de la piel lampiña	Cuerpo sin pelo

La respuesta inmunológica frente al hongo provoca en el huésped un proceso inflamatorio, generando lesiones cutáneas que se extienden gradualmente hasta inducir un cuadro descamativo, o ampolloso si se trata de una infección aguda.

### 1.1.2.2 Candidiasis

Las candidiasis cutáneas, mucosas o sistémicas, son infecciones producidas por especies de hongos saprófitos del género *Candida*. De las más de cien documentadas, las especies saprófitas que pasan a ser patógenas con potencial para producir candidiasis son: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* y *C. famata* [5]. En un individuo sano viven como huéspedes en las membranas mucosas de la boca, la garganta, el tracto digestivo y la piel. Sin embargo, estas especies desarrollan su virulencia y causan lesiones en las mucosas, infecciones cutáneas graves o bien difusión sistémica invasiva cuando se dan alguno de los siguientes casos [5-7]:

- Pacientes enfermos: déficit inmunológico, enfermedades endocrinometabólicas, alteración de los fagocitos, linfomas o leucemias.
- Individuos con modificaciones dietéticas: déficit de hierro o vitaminas, dietas extremas, malnutrición.
- Grupos de alto riesgo: ancianos, embarazadas, neonatos o mujeres en etapa premensual.
- Factores extrínsecos: tratamientos antibióticos, corticoides, anticonceptivos o inmunosupresores.

En este tipo de infecciones, la respuesta inmunológica frente a la levadura provoca en el individuo reacciones muy diversas, desde aparición de nódulos blancos-amarillentos, inflamación, picor, dolor, edema o eritema. Las infecciones epidérmicas predominan en zonas húmedas como los pliegues cutáneos, zonas interdigitales o ingles.

Las candidiasis también se pueden clasificar clínicamente según el tipo de tejido que coloniza la especie de *Candida*, tal y como se muestra la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Clasificación de las candidiasis en función de la zona infectada

<b>Tipos</b>	<b>Zona Infectada</b>
Candidiasis oral	boca
Candidiasis de los pliegues	pecho, abdominales, ingles, glúteos, axilas, orejas, dedos
Candidiasis anogenital	genitales, vagina
Paroniquias y oniquias	uña
Foliculitis	folículo piloso
Granuloma candidiósico	superficie corporal

### 1.1.2.3 Pitiriasis versicolor

Son micosis producidas por levaduras lipofílicas basidiosporadas del género *Malassezia*, levaduras que se caracterizan por formar parte de la microbiota normal de la piel. La infección se produce cuando se da un desequilibrio en dicha microbiota cutánea, generando lesiones asintomáticas, a excepción de algún ligero picor. Las infecciones se caracterizan por la aparición de máculas de distinta tonalidad (rosa, blanco, marrón, etc) que al ir extendiéndose forman grandes placas con bordes delimitados y con una descamación tan ligera que en ocasiones no se puede apreciar. Las condiciones óptimas de crecimiento de este hongo se dan cuando simultáneamente aparecen los factores calor y humedad, siendo la zona predominante el tronco del individuo, los hombros y el cuello [8].

### 1.1.3 Tratamientos clásicos de las infecciones fúngicas

Los antifúngicos o antimicóticos son fármacos que se utilizan para el tratamiento de las infecciones fúngicas invasoras, inhibiendo mediante distintos mecanismos las estructuras vitales para la integridad y el desarrollo de la célula fúngica.

A principios de los 50 se sintetizaron por primera vez los antifúngicos tópicos y sistémicos [9] para el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales, cutáneas o mucosas. A lo largo de los años (Figura 1.1) han ido desarrollándose fármacos de administración oral, parenteral o tópica con el fin de mejorar su eficacia, espectro de acción, su tolerabilidad y tiempo de tratamiento.

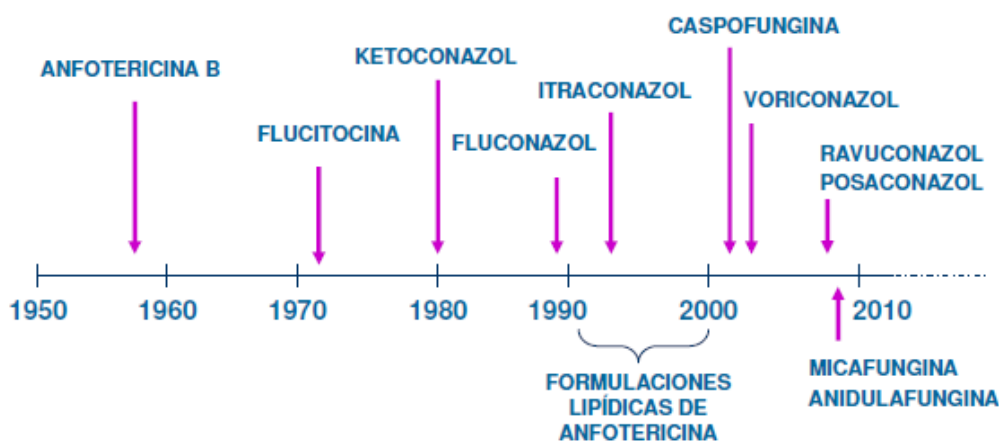


Figura 1.1. Evolución histórica de los fármacos antifúngicos [7]

Estos fármacos actúan bloqueando el crecimiento del hongo, o bien provocándole la muerte celular mediante distintos mecanismos [10]:

- inhibición de la mitosis
- inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
- inhibición de la síntesis de proteínas
- inhibición de la respiración
- inhibición del metabolismo del fosfato
- inhibición de la síntesis del ergosterol

- disrupción de la membrana plasmática
- inhibición de la síntesis de la pared celular

Existen una gran variedad de sustancias que se utilizan como antimicóticas, clasificándose en función de su estructura química, su diana de acción (pared celular, membrana citoplasmática o núcleo), su origen sintético (químico o biológico) o su espectro de acción (amplio o restringido). Estos fármacos pueden tener una acción fungistática y fungicida, es decir, que inhiben el crecimiento del hongo o que provocan la muerte celular, respectivamente [7].

Para tratamientos sistémicos, en dermatología solo se utilizan actualmente cuatro tipos de antifúngicos orales: griseofulvina, fluconazol, itraconazol y terbinafina. Sin embargo, el número de antifúngicos tópicos es mayor. A continuación, en la Tabla 1.3 se muestra un listado de estos antifúngicos tópicos usados en la actualidad [11].

Tabla 1.3. Antifúngicos tópicos

Estructura Química	Compuesto Químico	Nombre Comercial
Polieno	Nistatina	Mycostatin®
Piridonas	Ciclopirox	Ciclochem®
Azoles	Bifonazol	Mycospor®
	Clotrimazol	Canesten®
	Eberconazol	Ebemet®
	Econazol	Pevaryl®
	Flutrimazol	Micetal®
	Ketoconazol	Panfungo®
	Miconazol	Daktarin®
	Oxiconazol	Salongo®
	Sertaconazol	Dermofix®
Tioconazol	Trosid®	
Morfolinas	Amorolfina	Locetar / Odenil®
Alilaminas	Terbinafina	Lamisil®

#### 1.1.4 Necesidad de tratamientos alternativos

Los antifúngicos, al igual que los antibióticos, tienen su principal inconveniente en la resistencia que generan los microorganismos frente a dichos fármacos [12,13]. La resistencia antifúngica se da cuando el hongo no es inhibido por el fármaco o solo es inhibido por una concentración de fármaco superior a la que es

necesaria para inhibir a los miembros de su misma cepa silvestre. Existen tres tipos de resistencia a los antifúngicos [7,14]:

- Resistencia intrínseca: cuando ningún miembro de una especie es sensible a un antifúngico.
- Resistencia adquirida primaria: cuando una cepa de una especie que es sensible al antifúngico tiene una resistencia natural al mismo sin haber estado en contacto con él.
- Resistencia adquirida secundaria: cuando una cepa sensible al antifúngico adquiere resistencia al mismo tras haber estado en contacto con él.

Los mecanismos mediante los cuales los hongos pueden generar resistencia a los antifúngicos pueden ser [15,16]:

- Destrucción o inactivación del fármaco: degradación del antifúngico mediante enzimas que lo hidrolizan o bien lo modifican, produciendo una inactivación o disminución de la actividad del fármaco.
- Alteración de los sistemas de transporte celulares: este mecanismo puede provocar: a) una modificación de la permeabilidad de la pared mediante mutaciones genéticas que codifican para proteínas de membrana encargadas de regular la entrada del fármaco, resultando una disminución de fármaco interiorizado, o bien b) la generación de bombas de eflujo, que se dan cuando se expresan los genes que codifican para proteínas de membrana que regulan la expulsión del fármaco fuera de la célula una vez ha sido incorporado por el microorganismo.
- Modificación del target: la actividad el fármaco depende de su afinidad con el target, así que esta resistencia se da cuando este target (metabolico o estructural) se modifica, o disminuye su expresión por mutaciones genéticas y el fármaco no puede realizar su función. De este modo, si no existe la diana



para la cual el antifúngico está diseñado pues este pierde su utilidad y eficacia.

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

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

Estos fármacos antimicóticos presentan otras desventajas, como la escasa eficacia sobre infecciones de *tinea capitis* y *tinea barbae*. En el caso de las onicomicosis, el uso de antifúngicos debe combinarse con el desbridamiento de la lesión mediante una reducción del grosor de la uña. Además, los antifúngicos generalmente son poco eficaces en tratamientos sobre infecciones extensas de piel o en los tratamientos de larga duración en micosis ungueales [9].

## 1.2 Microbiología de las infecciones fúngicas

### 1.2.1 La célula fúngica

Los hongos pertenecen al reino Fungi y según sus características morfológicas, genéticas y patrones reproductivos se subdividen en cinco phylas: quitridiomicetos, zigomicetos, glomeromicetos, ascomicetos y basidiomicetos. Son organismos eucariotas que, en el caso de ser microorganismos, pueden crecer como filamentos pluricelulares (mohos) o bien como organismos unicelulares (levaduras). Estos microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios facultativos y poseen un metabolismo quimioheterótrofo, ya que necesitan compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono [10,17].

Algunos hongos producen infecciones micóticas graves, pero también pueden ser seres beneficiosos. En general, los hongos son imprescindibles en la cadena alimentaria ya que descomponen, mediante enzimas extracelulares, la materia vegetal muerta reciclando así elementos vitales. También son importantes debido a que la mayoría de las plantas dependen de estos hongos simbióticos para formar las micorrizas, estructuras que contribuyen a que sus raíces absorban minerales y agua del suelo. Por último, los seres humanos utilizan los hongos como alimentos (setas comestibles), para producir productos alimenticios (pan, cerveza, vino, queso, etc) y sustancias farmacológicas (alcohol y antimicrobianos).

En la Figura 1.2 se muestra la estructura de una célula fúngica, desglosando su pared celular y su membrana celular. La función de la pared celular no es solo estructural, es decir, mantener la morfología de la célula, sino que también actúa de reservorio energético, controla la permeabilidad de sustancias, aporta protección frente a cambios osmóticos e interacciona con el medio externo mediante receptores.

La membrana celular regula el paso de sustancias hacia el interior y el exterior de la célula. El factor común en todas las células eucariotas es que esta estructura dinámica y fluida está formada por una bicapa lipídica y por proteínas. Una diferencia fundamental entre las células animales frente a las células fúngicas está en la proporción de esteroides, encargados de aportar rigidez a la célula y modular la permeabilidad de moléculas pequeñas, siendo mayoritario el colesterol en células animales y el ergosterol en células fúngicas [18].

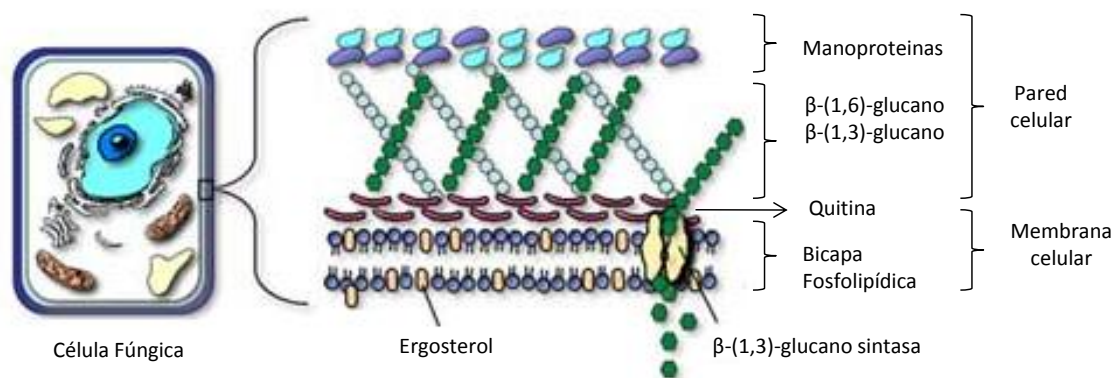


Figura 1.2. Esquema de la pared celular y la membrana celular de una célula fúngica [19].

La pared celular es una estructura esencial para todos los aspectos de la biología y la patogenia del hongo. Estudios llevados a cabo indican que existen variaciones considerables en la composición de la pared celular entre distintos tipos de hongos, aunque en todos los casos, los componentes mayoritarios son los polisacáridos [10]. La quitina, los glucanos y mananoproteínas son mayoritarios en los Ascomicetos (filo que incluye a muchos dermatofitos) y en los Basidiomicetos; el quitosano, la quitina y el ácido poliglucorónico en los Zigomicetos; la celulosa y otros glucanos en los Oomicetos. La quitina es un polisacárido lineal que proporciona a la estructura celular resistencia y rigidez, así como la propiedad de que sea insoluble en agua y en solventes orgánicos. Los glucanos son los polisacáridos ramificados estructurales más importantes, actuado también como reservorio energético [20]. Las

manoproteínas son las responsables de la porosidad e interacción con el medio. Según el equilibrio de Gibbs-Donnan, las proteínas se comportan como polianiones, es decir, los grupos fosfato atraen a moléculas cargadas positivamente para que el equilibrio de carga a ambos lados de la membrana sea neutro.

### 1.2.2 Levaduras

La característica principal de las levaduras es que son hongos unicelulares no filamentosos, con forma oval o esférica y con tamaño celular que generalmente oscila entre 2 y 4  $\mu\text{m}$ . Algunas de ellas se encuentran en la superficie de plantas y animales, actuando frente a las bacterias como potenciales competidores por los nutrientes presentes en el medio, principalmente hidratos de carbono y productos fermentables. En la mayoría de los casos la reproducción es asexual, con una división asimétrica o por gemación a partir de la célula madre. Por el contrario, algunas levaduras poseen reproducción sexual por conjugación, en la que se fusionan dos células para rendir un cigoto que formará esporas sexuales por reducción meiótica [21].

Algunas especies de hongos relevantes clínicamente pertenecen al género *Candida*. La colonización de diferentes tejidos de estas especies puede generar una infección facilitada por la proliferación endógena del microorganismo, provocando desde candidiasis localizadas benignas hasta invasiones sistémicas letales [6,22]. La alta biodiversidad fenotípica de *Candida* spp. y la alteración de las defensas del huésped provocan esta conducta patogénica oportunista, variando así su comportamiento y generando nuevas y amplificadas propiedades invasivas. En este proceso infeccioso sobre el individuo se producen múltiples factores de virulencia como: (1) adherencia a células epiteliales y endoteliales, (2) producción de enzimas hidrolíticas (proteasas), (3) transición dimórfica por conversión morfogénica de la forma levaduriforme a la forma patógena micelial (hifas o tubos germinales), (4) variabilidad antigénica, (5) habilidad de cambiar entre diferentes fenotipos celulares,

(6) adhesión a sustratos biológicos e inertes y (7) inmunomodulación de los mecanismos de defensa del huésped [23,24].

El género *Candida* incluye numerosas especies. Entre ellas destacan por su interés clínico: *C. albicans*, comensal de la biota habitual del tracto intestinal del ser humano, *C. krusei* comensal que se encuentra generalmente en las mucosas [25] y *C. parapsilosis*, levadura que se ha detectado principalmente en las manos de trabajadores sanitarios, siendo la segunda especie de *Candida* más aislada en hemocultivos (cultivo microbiológico en muestras de sangre) [26]. Estas tres especies de *Candida* se distinguen entre ellas por presentar diferencias entre sus características morfológicas, fisiológicas y desde el punto de vista patogénico, por las diferentes enfermedades que producen sobre el individuo. Por orden de frecuencia, de entre las levaduras *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* han sido descritas en la literatura como responsables de estos cuadros clínicos [27,28]. *C. albicans* ha sido descrita como la tercera causa de infecciones del torrente sanguíneo y candidiasis diseminada, asociada a más del 25% de muerte en Inglaterra, en un estudio realizado por la *British Society for Medical Mycology* durante dos años sobre pacientes hospitalizados en cuidados intensivos [29], así como la principal causa de infecciones nosocomiales (infección contraída en hospitales) [30]. Además, estas especies presentan un problema particular ya que tienen la capacidad de crecer en forma de biofilms en los dispositivos médicos implantados, generando así una resistencia casi total a los fármacos antifúngicos [31-33].

### 1.2.3 Hongos dermatofitos

Los dermatofitos, del género *Trichophyton*, *Microsporum* o *Epidermophyton*, son hongos filamentosos de morfología y fisiología parecida. Taxonómicamente se engloban en la división Ascomycota y pertenecen a la clase Plectomycetes, orden Onygenales y familia Arthrodermataceae [34].

Estos hongos están considerados patógenos para el ser humano debido a que tienen la capacidad de invadir el estrato corneo de la epidermis y tejidos queratinizados, como la piel, el pelo o las uñas. Esta colonización causa una variedad de infecciones superficiales en seres humanos y animales, denominadas dermatofitosis o tiñas, la infección cutánea más común en todo el mundo [35,36]. Igual que en las micosis causadas por las levaduras, las tiñas son frecuentes en individuos inmunodeprimidos [37,38]. Se estima que entre el 20 y el 25% de la población mundial está infectada por dermatofitos [39]. El tipo de dermatofitosis, sus agentes etiológicos y el patrón anatómico de la infección es función de la ubicación geográfica, factores ambientales y culturales, viéndose incrementada por la migración, el turismo o la situación socioeconómica de la población. Las dermatofitosis son infecciones que tienen un gran impacto social ya que pueden producir desfiguraciones, teniendo también la desventaja de que son recurrentes y difíciles de eliminar con tratamientos antifúngicos de larga duración. Así que, constituyen un asunto sanitario y social de enorme interés.

Según un estudio realizado por el *Mycology Service of the Dermatology Clinic, University of Bari* (Italia) durante el periodo 2005-2010, los dermatofitos *T. rubrum* (64%), *M. canis* (14%) y *Trichophyton mentagrophytes* (10%) fueron los agentes etiológicos más comunes de la *tinea unguium*, u onicomycosis, en los países de la Europa central, siendo con el 39% del total la dermatofitosis más extendida [40]. Además, *T. mentagrophytes* (50%) es también el dermatofito responsable de causar en mayor proporción la *tinea pedis*, o “pie de atleta” (afecta a los pliegues interdigitales o los laterales o planta del pie), seguido de *T. rubrum* (47%) y *E. floccosum* (3%) [41].

### **1.3 Terapia fotodinámica antimicrobiana**

La terapia fotodinámica antimicrobiana (TFA) surgió hace más de 100 años pero no prosperó debido a la aparición de los antibióticos, ya que se creía que mediante estos se iba a solucionar la problemática de las infecciones bacterianas. Desde la primera publicación en 1970 [42] a lo largo de estos años se ha ido desarrollando la terapia fotodinámica (TFD) en terapia oncológica [43,44] para el tratamiento de algunos tipos de cáncer debido a la necesidad de una alternativa a la cirugía de carcinomas, teniendo como límite la capacidad de penetración en la piel, motivo por el cual la hace inefectiva en el tratamiento de tumores invasivos. Actualmente, existe el problema de la resistencia de hongos y bacterias a los antibióticos y antifúngicos y es en este momento cronológico en el que se retoma la TFD como técnica antimicrobiana. Desde entonces, ha ido incrementando el interés por el desarrollo de la TFA para el tratamiento de infecciones locales, enfatizando sobre el tipo de fotosensibilizador a utilizar y su estructura [45-48]. La TFD ha sido aprobada por la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer cutáneo no melanoma como el carcinoma basocelular, enfermedad de Bowen o la queratosis actínicas. Además, fuera de indicación se ha demostrado su utilidad en el tratamiento del acné[49,50].

#### **1.3.1 Terapia fotodinámica antimicrobiana en la práctica clínica**

La TFD es una técnica terapéutica que mediante irradiación con luz visible sobre el tejido a tratar produce la excitación de un fotosensibilizador (FS), endógeno o exógeno, que en presencia de oxígeno molecular produce la muerte celular. Después de la absorción de luz, el FS excitado puede retornar a su estado fundamental mediante colisiones con el oxígeno, generando especies reactivas del oxígeno (EROs) como el oxígeno singlete. Esta cascada de reacciones fotoquímicas actúan directamente sobre las células produciendo daño tisular, o bien de forma indirecta

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

Las ventajas que ofrece la TFD frente a otros tratamientos son las siguientes: (a) no produce efectos adversos sistémicos. No se han detectado valores significativos de FS en el plasma, pudiéndose aplicar repetidamente; (b) al ser una técnica no invasiva, después del tratamiento se obtiene una minimización en las cicatrices; (c) puede combinarse con la cirugía para obtener resultados exitosos en el tratamiento; (d) especificidad en el tejido a tratar; (e) puede utilizarse como terapia paliativa.

La TFA conceptualmente no difiere de la TFD del cáncer, ya que tiene como fundamento fotooxidar biomoléculas indispensables para la integridad celular. Sin embargo, existen diferencias entre estas dos técnicas: los tipos de FS utilizados y las dianas a tratar. La TFD antifúngica es una modalidad de TFA que se utiliza para el tratamiento de infecciones producidas por hongos patógenos, en concreto los dermatofitos [51] y algunas especies de levaduras, como las del género *Candida* [52]. La Figura 1.3 muestra el amplio espectro de infecciones localizadas que podrían ser tratadas clínicamente con TFA.



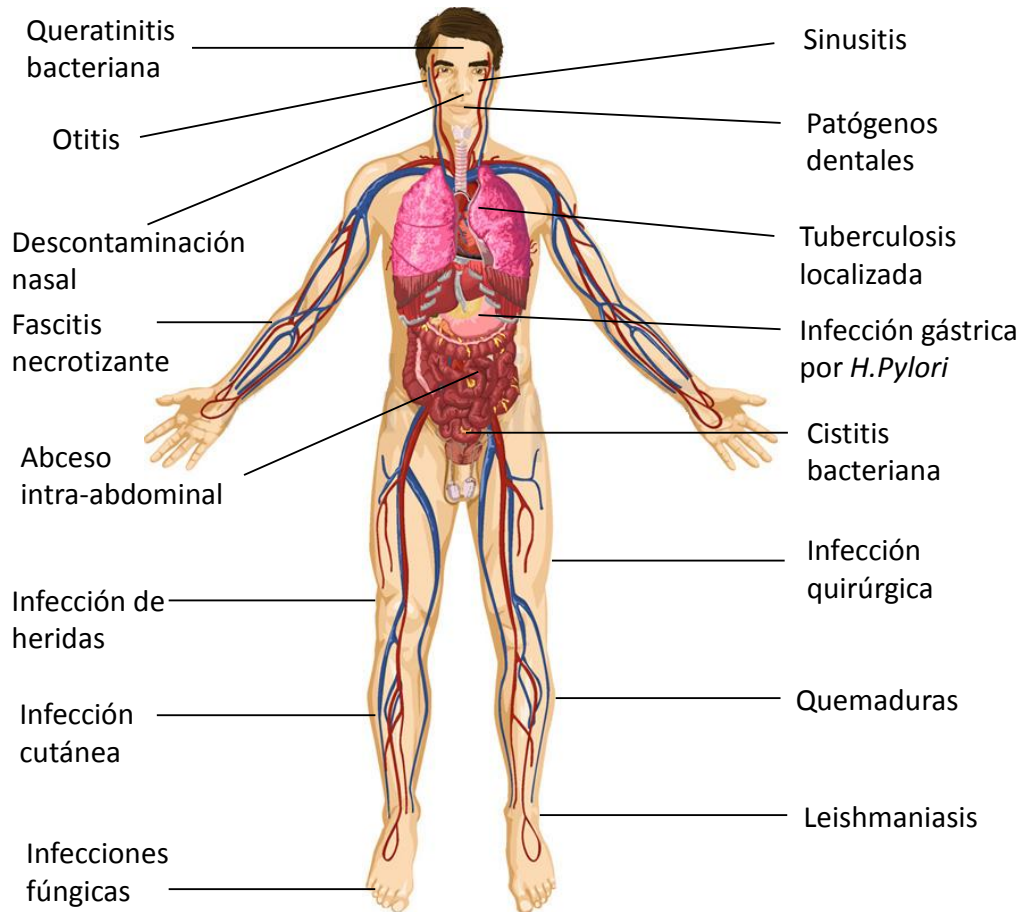


Figura 1.3. Infecciones que podrían tratarse con TFA [53]

En la TFA, los estudios fotodinámicos *in vitro* se realizan en modelos que mimetizan el microambiente de la posible infección clínica, encontrándose ensayos en modelos celulares o proteicos [54], modelos en sangre [55-57], modelos en piel [58], modelos en mucosas estomacales [59] o en dientes [60]. Sin embargo, los modelos *in vivo* se asemejan más a la infección real, realizándose ensayos en modelos animales donde se simulan infecciones en heridas [61,62], quemaduras [63], tejidos blandos [64], infecciones bucales o dentales [65], leishmaniasis [66], infecciones por micobacterias [67] o virus [68], otitis [69] u osteomielitis [70].

### 1.3.2 Fotosensibilizadores y mecanismos de acción

Los FS suelen ser moléculas orgánicas, con un cromóforo central y cadenas auxiliares y con un grado alto de conjugación aromática de dobles enlaces que permite la deslocalización de sus electrones  $\pi$ , características moleculares necesarias para poder realizar los procesos fotoquímicos. Tanto en la TFD del cáncer como en la TFA, los FS que han sido estudiados son estructuras formadas por un núcleo tetrapirrólico (porfirinas, clorinas, bactericlorinas, ftalocianinas, porficonos, porfinas y texafirinas) [71-73], moléculas halogenadas de xanteno [74] (Rosa de Bengala, poly-L-lisina clorina, *coryngated PI-ce6*), sales de fenotiacina (azul de toluidina y azul de metileno) [52,75-77], conjugados de poly-L-lisina clorina [78], quinonas (hipericina, hypocrellin A) [79-81], fullerenos catiónicos ( $C_{60}$ ) [82,83] o psoralenos (furanocumarinas) [84]. Sin embargo, en la actualidad, solo hay cinco FS autorizados por la Agencia Europea del Medicamento para su uso clínico en TFD oncológica, siendo el metil aminolevulinato el único aprobado para aplicaciones dermatológicas (Figura 1.4) [49].

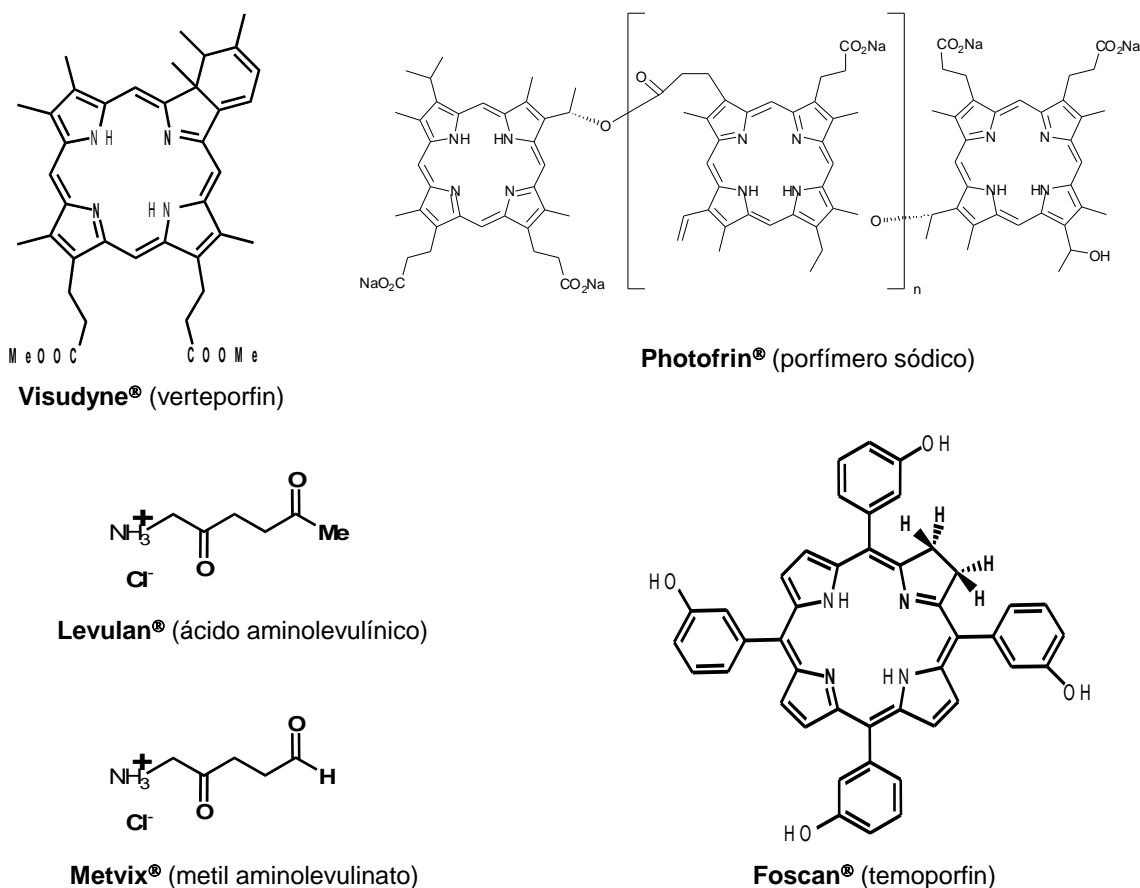


Figura 1.4. Fármacos aprobados para su uso en TFD y su nombre comercial. Entre paréntesis el nombre INCI (International Nomenclature Cosmetic Ingredient).

En función de las características físico-químicas del FS (tamaño, distribución de carga y solubilidad), este se acumulará en un orgánulo o en otro, produciendo de este modo distinta efectividad en la TFD en función de la estructura biológica que fotooxide. En TFD oncológica, se han estudiado los mecanismos de captación intracelular que se pueden dar en el proceso de incorporación del FS por la célula, siendo distintos en función de la polaridad o la distribución de carga del FS. En el caso de FS lipofílicos (eg. hipericina) son incorporados a través de la membrana celular mediante transporte pasivo por difusión, y en el caso de los FS hidrofílicos (eg. TMPyP o NMB) son interiorizados mediante transporte en masa por endocitosis, del tipo pinocitosis. La

distribución de carga provoca que FS catiónicos se acumulen preferentemente en mitocondrias, induciendo apoptosis, mientras que los aniónicos se acumulan en los lisosomas, produciendo los primeros mayor daño celular. En el caso en que el FS se acumule en la membrana plasmática causaría la muerte celular por necrosis y la formación de un proceso inflamatorio. En función de su localización intracelular, los FS producen distintos daños celulares, así que, lo FS lipofílicos producen inactivación de enzimas de membrana, aumentan la permeabilidad o rompen las membranas, detienen la división celular, interrumpen el proceso respiratorio y producen la lisis celular. En cambio, los FS hidrofílicos producen la liberación de hidrolasas lisosomales y si el FS se libera antes o durante la irradiación, pueden dañar otros orgánulos celulares [49].

En resumen, la efectividad del tratamiento fotodinámico depende de las características y cualidades físico-químicas del FS. A continuación se muestran los requisitos del FS idóneo para TFD [49,85]:

- Fotoestable y de síntesis simple
- Lipofilia; para buena difusión a través de las membranas biológicas
- Activación con una  $\lambda$  de alta penetración para tratar lesiones profundas
- Alto rendimiento fotodinámico para una máxima producción de EROs
- Capacidad de localizarse específicamente en el tejido o las células diana
- Distribución homogénea en el tejido diana
- Mínimo tiempo de incubación y concentración
- Vida media corta y rápida eliminación de los tejidos sanos
- Administración versátil: tópica, oral, inhalada o intravenosa
- Ausencia o minimización del dolor durante o después del tratamiento y escasos efectos adversos
- Combinable con otros tratamientos como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia

- Ausencia de toxicidad sin exposición a la luz
- No mutagénico ni carcinógeno

### 1.3.3 Fuentes de luz

La elección del FS fijará tanto la penetración de la luz en el tejido a tratar como la fuente de luz que se deberá utilizar en el tratamiento de la infección. Esto es debido a que en función de la zona del espectro donde se excite el FS se necesitará una mayor o menor longitud de onda, lo que fijará la distinta capacidad de penetración de la luz en el tejido tisular. En TFD del cáncer los fármacos pueden estar localizados en el interior del tumor si se han administrado vía intravenosa (disuelto, o si es poco soluble emulsionado o en liposomas) o bien intralesional. En cambio, en TFA si la lesión es profunda el FS puede ser inyectado pero por lo general se aplica tópicamente y su localización es más externa.

La penetración de la luz en el tejido depende de la morfología de dicho tejido y de la longitud de onda de la luz a la que se irradia la zona, ya que a mayor longitud de onda mayor penetración, aunque a mayor penetración la intensidad disminuye de forma exponencial. La penetración real de la luz en el tejido es menor a la luz emitida por la lámpara debido a tres factores [86]:

(a) la absorción de cromóforos endógenos, como la hemoglobina (absorbe por debajo de 600 nm), el agua (absorbe por encima de 1200 nm) o la melanina (absorbe en todo el espectro visible).

(b) la dispersión óptica de la luz que produce el propio tejido, obteniéndose valores de penetración de 1-2 mm entre 400-500 nm, de 5-10 mm a 630 nm y de 10-20 mm entre 700-850 nm. Así, con lámparas no coherentes se obtiene una penetración real en el tejido de unos 5 mm si se irradia a 630 nm o de 1-2 cm si se irradia entre 700-800 nm.

(c) la absorción del propio FS impide que toda la luz emitida por la lámpara penetre en el tejido.

Si a estos factores se le suma que a longitudes de onda superiores a 850 nm el FS no genera estados triplete suficiente energéticos para producir  $^1O_2$ , la ventana terapéutica óptima para una buena eficacia de la TFD estaría acotada en un rango de longitudes de onda comprendidas entre 600 y 850 nm. Si el FS no absorbe en el margen de longitudes de onda comprendidas dentro de la ventana terapéutica óptima para producir el mayor rendimiento de la luz emitida por la lámpara, entonces aquellos FS que absorban en la zona del azul tendrán un alto rendimiento energético pero poca penetración tisular o bien aquellos FS que absorban en la zona del rojo serán menos energéticos pero podrá penetrar mejor en el tejido colonizado por el microorganismo (Figura 1.5).

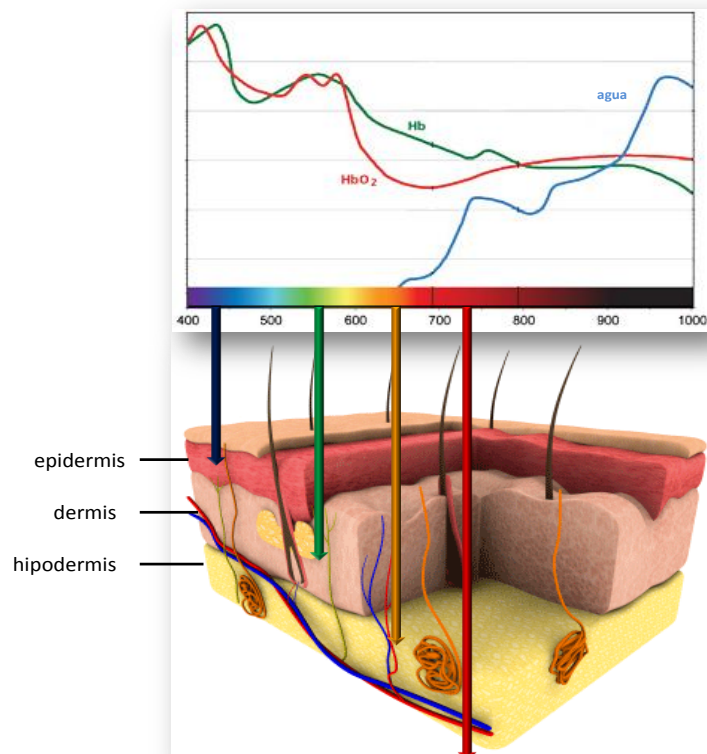


Figura 1.5. Esquema del tejido subcutáneo y la penetración de la luz en función de la longitud de onda con la que se irradie.

Una vez detallados los parámetros que vienen fijados por el FS, puede seleccionarse la fuente de luz óptima para la fotoinactivación fúngica en función de la longitud de onda de absorción del FS, el proceso clínico a tratar y su localización, o el número y tamaño de las lesiones. En dermatología, para tratar lesiones cutáneas se utilizan dos tipos de fuentes de luz: láseres o lámparas de luz no-coherente, subdividiéndose estas últimas en lámparas fluorescentes, lámparas de haluro metálico a alta presión, de luz pulsada intensa o de diodos emisores de luz. Los láseres permiten seleccionar la longitud de onda a la que absorbe el FS y las luces no-coherentes permiten tratar áreas más extensas, aunque son de menor intensidad. Así mismo, la efectividad de la TFD también depende del tiempo de irradiación, de la intensidad de la luz a la que emita la lámpara y de la distancia a la que esta se coloque de la lesión [49].

#### 1.3.4 Bases moleculares de la TFD

A continuación, se muestran las bases moleculares que explican las reacciones fotoquímicas que producen el  $^1\text{O}_2$  y otras EROs, especies encargadas de producir la muerte celular por fotooxidación de biomoléculas vitales para la vida del individuo, como proteínas, lípidos insaturados o ácidos nucleicos.

##### 1.3.4.1 Creación y desactivación de estados excitados

Inicialmente el FS se encuentra en su estado fundamental, es decir, en estado singlete con todos sus electrones con espines apareados y en orbitales de baja energía. Al ser irradiado a su longitud de onda de absorción, el FS absorbe un fotón y se promueve a un estado electrónicamente excitado, pudiéndose desactivar y regresar a su estado fundamental retornando su energía en forma de calor, mediante los siguientes procesos no radiativos:

- Relajación vibracional: el FS excitado disminuye su energía vibracional dentro de un mismo estado electrónico.
- Conversión interna: el FS excitado disminuye su energía vibracional mediante una transición entre dos estados electrónicos con la misma multiplicidad de espín, generalmente seguida de una relajación vibracional.
- Cruce entre sistemas: el FS excitado disminuye su energía vibracional mediante una transición entre dos estados electrónicos con distinta multiplicidad de espín, generalmente seguida de una relajación vibracional.

Sin embargo, después de que el FS absorba un fotón y se promueva en un estado electrónicamente excitado este también puede desactivarse para regresar a su estado fundamental retornando su energía en forma de radiación electromagnética, mediante los siguientes procesos radiativos:

- Fluorescencia: emisión espontánea de radiación durante la transición entre dos estados electrónicos con la misma multiplicidad de espín.
- Fosforescencia: emisión espontánea de radiación durante la transición entre dos estados electrónicos con distinta multiplicidad de espín.

#### 1.3.4.2 Generación de formas activas de oxígeno

Quando el FS no se desactiva por procesos radiativos ni en forma de calor, este puede liberar su energía de excitación transfiriéndola a otra molécula presente en el medio por transferencia de energía triplete-triplete, por sensibilización del oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) o bien por reacciones fotoquímicas, como la transferencia de carga o abstracción de H en el estado excitado [87].

La fotosensibilización es un proceso por el cual una alteración fotoquímica o fotofísica de una entidad molecular ocurre como resultado de una inicial absorción de

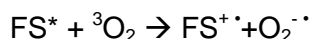


radiación por otra entidad molecular, el FS. El proceso que se da en TFD es un caso particular de la fotosensibilización, donde la entidad que sufre la alteración fotoquímica o fotofísica es el oxígeno molecular ( $^3\text{O}_2$ ), pudiendo ocurrir dos posibles mecanismos:

- Mecanismo tipo I: el FS en su estado excitado singlete o triplete reacciona con un substrato (R) para formar radicales libres vía (a) transferencia electrónica o (b) abstracción de hidrogeno. Estos rápidamente reaccionarán con el oxígeno molecular para formar radicales peróxidos que iniciaran reacciones en cadena y formaran EROs.



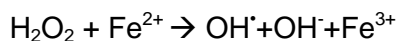
Es el caso de la formación del anión radical superóxido:



El superóxido por sí mismo no es muy reactivo debido a que vuelve a oxidarse fácilmente a oxígeno molecular. Sin embargo, la forma protonada, el radical hidroperóxido, sufre una dismutación espontánea que genera oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno:

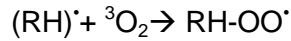
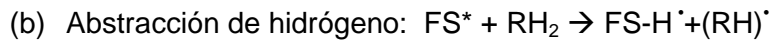


,y a su vez, el peróxido de hidrógeno puede formar el radical hidroxilo en sistemas biológicos a través de la reacción de Fenton:

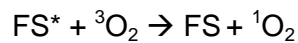


Las EROs tienen la capacidad de extraer electrones de macromoléculas biológicas, siendo el  $\text{OH}^{\bullet}$  el radical más reactivo. Sin embargo, en estos sistemas biológicos se reduce su reactividad debido a la presencia de enzimas como la superóxido dismutasa (que desactiva el  $\text{O}_2^{\bullet -}$ ), la catalasa (que desactiva el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) o bien por péptidos antioxidantes como el glutatión o

azúcares antioxidantes como el ácido ascórbico (ambos desactivan el OH<sup>•</sup>) [88].



- Mecanismo tipo II: el FS, en su estado excitado, transfiere su energía al oxígeno molecular dando lugar al FS en su estado fundamental y a <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, una de las especies más reactivas del oxígeno cuando en el medio se encuentra substratos ricos en electrones como los alquenos, anillos aromáticos, fenoles, aminas y tioéteres que se encuentran en biomoléculas como los lípidos insaturados, colesterol, α-aminoácidos, proteínas, ADN y ARN.



El <sup>1</sup>O<sub>2</sub> es un reactivo muy tóxico para la célula pero tiene una limitación: su vida corta y su radio de acción (5-20 nm), lo que provoca que solo pueda recorrer distancias pequeñas en la célula fúngica (diámetro levaduras: 2-4 μm).

A continuación, en la Figura 1.6, se muestra mediante el diagrama de Jablonski un resumen de los procesos fotoquímicos radiativos, no radiativos y mecánicos (tipo I y tipo II) que pueden darse durante el proceso de TFD [87].

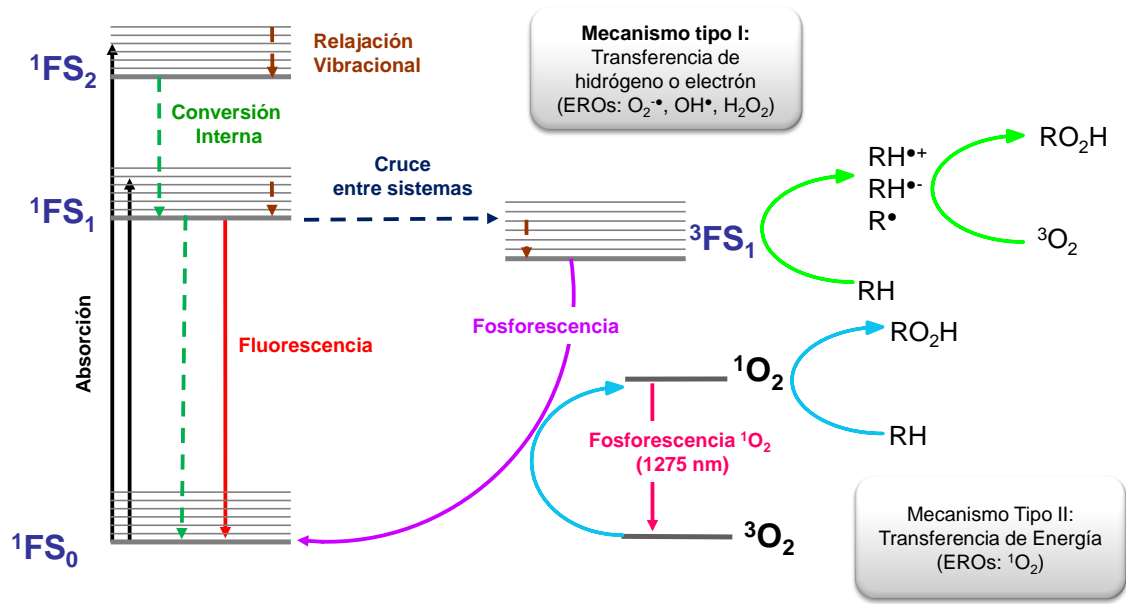


Figura 1.6. Diagrama de Jablonski: base molecular y mecanismos de acción fotodinámica

Por último, en estudios de TFD tiene que tenerse en cuenta el proceso de fotoblanqueamiento que puede sufrir el FS cuando está expuesto a irradiaciones de larga duración, mecanismo por el cual el FS puede ser descompuesto tanto por el  $1O_2$  como los productos de oxidación celulares, produciendo una disminución en la efectividad de la terapia.

## 1.4 Biología Celular

La TFD antifúngica pretende ser una técnica selectiva frente a células fúngicas, pero el tratamiento de la infección cutánea produce también un efecto adverso sobre la zona colindante al tejido a tratar, es decir, sobre las células humanas de la epidermis, de entre ellas, los queratinocitos y fibroblastos. Por este motivo, en la presente tesis doctoral se han realizado estudios para evaluar sobre estas células humanas cómo afecta la dosis del FS, el tiempo de contacto del FS y el tiempo de irradiación, requeridos para producir la muerte celular fúngica mediante TFD antifúngica.

### 1.4.1 Queratinocitos

El queratinocito es el tipo celular predominante en las múltiples capas de la epidermis interfolicular, y en menor proporción se encuentran melanocitos, células de Langerhans y células de Merckel. Los queratinocitos se originan en el estrato epidérmico basal, y al abandonar este estrato y localizarse en el estrato corneo pasan a cumplir dos actividades esenciales [89]:

- Producen queratina, la principal proteína estructural de la epidermis. La queratina constituye casi el 85% de los queratinocitos diferenciados por completo. Esta proteína es la fuente de alimento de dermatofitos como el *T. mentagrophytes*.
- Participan en la formación de la barrera de la epidermis contra el agua.

En la Figura 1.7 puede observarse queratinocitos humanos cultivados en 2 dimensiones:

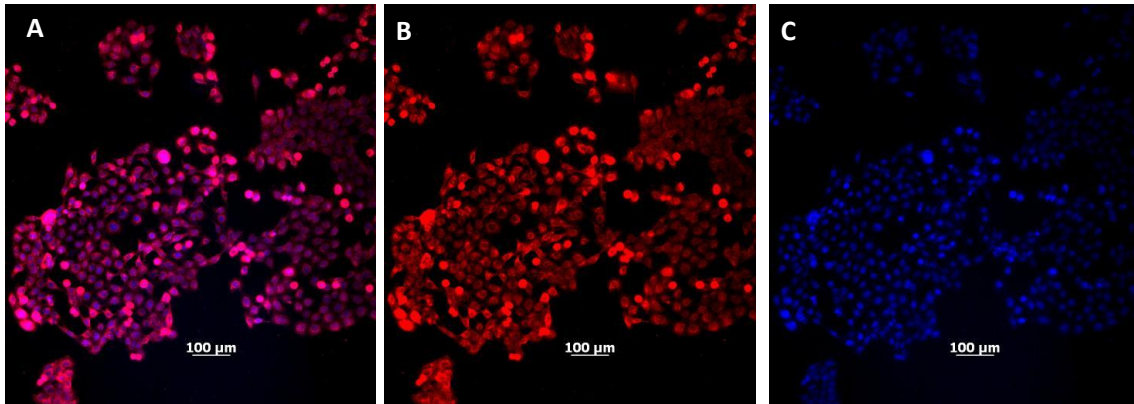


Figura 1.7. Queratinocitos humanos cultivados en dos dimensiones. A: superposición de A y B, B: tinción con faloidina (rojo; tiñe las fibras de actina) y C: tinción con Dapi (azul; tiñe el núcleo).

Las características de estas células son distintas según en el estrato de la epidermis en el que se encuentren; basal, espinoso, granuloso, lúcido, córneo y disyuntivo (Figura 1.8). Las células migran desde el estado germinativo hasta el disyuntivo, la descamación, en aproximadamente 4 semanas. Los queratinocitos del estado basal contienen abundantes ribosomas libres, filamentos intermedios de queratina, aparato de Golgi, mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso. La diferenciación entre células pertenecientes a cada capa está causada por los ribosomas, encargados de sintetizar la queratina; en el estado basal sintetizan moléculas de queratina que posteriormente se ensamblarán en filamentos de queratina y estos en gránulos de queratina. Conforme aumenta la cantidad de gránulos en el citoplasma, se inicia la conversión de las células granulosas en células cornificadas, caracterizadas por la desintegración de su núcleo y el engrosamiento de la membrana plasmática. Por último las células se exfolian de la superficie del estrato córneo [90].

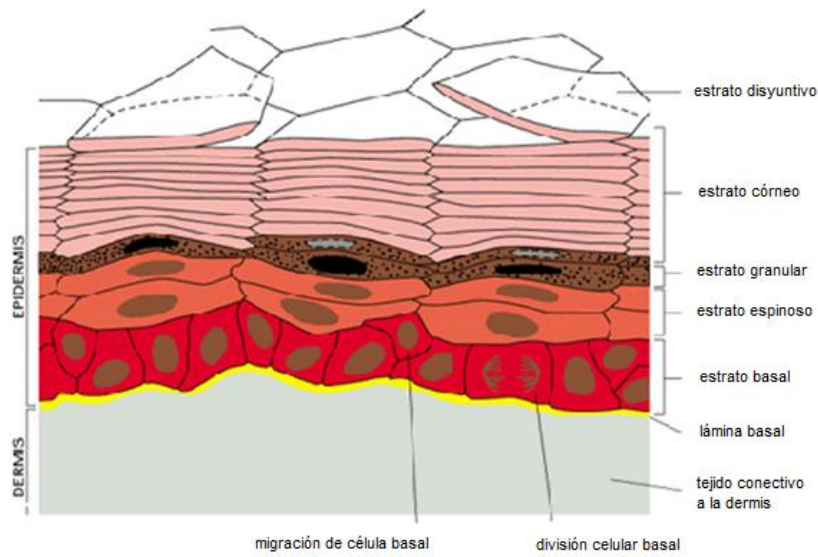


Figura 1.8. Estratificación de la Epidermis [91]

#### 1.4.2 Fibroblastos

Los fibroblastos son las células principales del tejido conjuntivo. Son basófilas, grandes, fusiformes o aplanadas, con numerosas prolongaciones que se extienden entre haces de fibras extracelulares que la misma célula sintetiza, aunque su morfología varía según su estado funcional. Si el fibroblasto se encuentra en su forma activa, sus componentes celulares están compuestos de un núcleo de cromatina laxa, un retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi. Si se encuentra en estado de reposo, denominado célula reticular o elastocito, tiene un desarrollo menor de sus orgánulos y la cromatina nuclear se torna heterocromática. En este estado se especializa en sintetizar fibras de reticulina a partir de tropocolágeno, proteína fibrosa que su polimerización extracelular da origen a fibras colágenas y de reticulina [92].

En la Figura 1.9 puede observarse un cultivo en dos dimensiones de fibroblastos humanos:

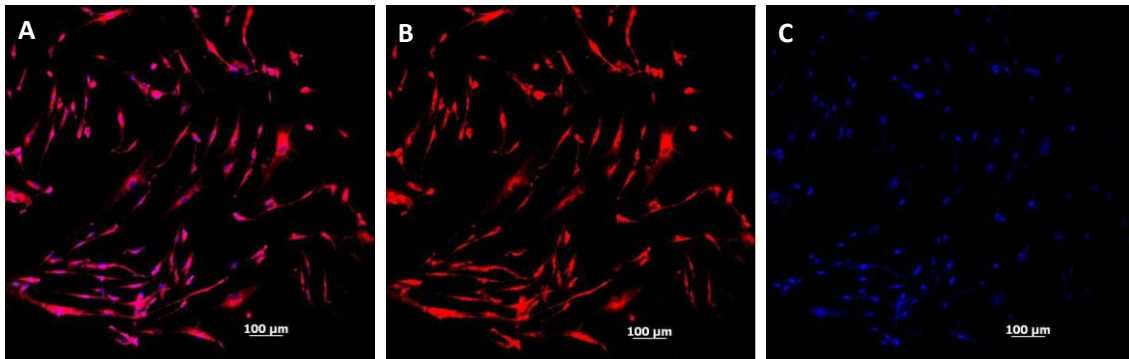


Figura 1.9. Fibroblastos humanos cultivados en dos dimensiones. A: superposición de A y B, B: tinción con faloidina (rojo; tiñe las fibras de actina) y C: tinción con Dapi (azul; tiñe el núcleo).

Cuando está activo, su función es sintetizar compuestos que formaran la matriz extracelular, como tropocolágeno, elastina, fibrilina, glucoproteínas y proteoglicanos. De este modo participan en la remodelación de la matriz extracelular, ya sea endocitando y destruyendo los componentes estructurales o transformándose en células cargadas de filamentos contráctiles para favorecer los mecanismos de cicatrización.

## 1.5 Objetivos

El principal objetivo de esta tesis es evaluar la capacidad de la TFD para su uso en el tratamiento de micosis superficiales causadas por diferentes especies de hongos patógenos para el ser humano: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Trichophyton mentagrophytes*. Para ello se pretende estudiar los siguientes aspectos:

- Evaluar la eficacia de la hipericina, TMPyP y NMB como FS para su uso en TFD antifúngica sobre cepas de levadura, mediante ensayos de viabilidad celular e incorporación del fármaco.
- Estudiar el mecanismo de los procesos fotoquímicos intracelulares con hipericina, TMPyP y NMB incorporados en las levaduras con la finalidad de describir el proceso y obtener datos de localización del FS. Se realizará mediante espectroscopías de absorbancia y fluorescencia, fosforescencia del oxígeno singlete y del FS, fluorescencia resuelta en el tiempo del FS, absorción de los estados transitorios del FS, desactivadores de EROs y microscopía de fluorescencia confocal de hipericina incubada en levaduras.
- Evaluar, mediante ensayos de incorporación del fármaco y viabilidad celular si el protocolo de TFD antifúngica optimizado para erradicar levaduras afecta a los queratinocitos y fibroblastos humanos.
- Evaluar la eficacia del NMB como FS para su uso en TFD antifúngica sobre *T. mentagrophytes*, mediante ensayos de viabilidad celular.



## 1.6 Referencias

[1] L.E. Castrillón, A. Palma, C. Padilla, Factores de virulencia en *Candida* sp, Dermatología Rev Mex. 49 (2005) 12-27.

[2] M. Weig, U. Grob, F. Muhischlegel, Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection, Trends Microbiol. 6 (1998) 468-470.

[3] R.L. Castrillón, R.A. Palma, D.C. Padilla, Reacción inmunológica en infecciones por *Candida* sp, Dermatología Rev Mex. 48 (2004) 140-150.

[4] F. Caballero-Martínez, Tiñas, in: Anonymous Guía De Buenas Prácticas Clínicas En Infecciones Fúngicas, International Marketing & Communication, Madrid, 2005, pp. 13-45.

[5] J. Jurado-Moreno, Pitiriasis versicolor, in: Anonymous Guía De Buenas Prácticas Clínicas En Infecciones Fúngicas, International Marketing & Communication, Madrid, 2005, pp. 67-76.

[6] J. Rex, T. Walsh, J. Sobel, S. Filler, P. Pappas, W. Dismukes, J. Edwards, Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America, Clin. Infect. Dis. 30 (2000) 662-678.

[7] S. Chapman, D. Sullivan, J. Cleary, In search of the holy grail of antifungal therapy, Trans Am Clin Climatol Assoc. 119 (2008) 197-216.

[8] J. Jurado-Moreno, Pitiriasis versicolor, in: Anonymous Guía De Buenas Prácticas Clínicas En Infecciones Fúngicas, International Marketing & Communication, Madrid, 2005, pp. 67-71.

[9] J.R. Maestre, L. Alou, Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. Rev Esp Quimioter. 14 (2001) 17-21.

[10] M.J. Carlile, S.C. Watkinson, G.W. Cooday, *The Fungi*, Ed Elsevier Academic Press, 2006.

[11] J. Jurado-Moreno, Tratamiento de las micosis cutáneas, in: Anonymous *Guía De Buenas Prácticas Clínicas En Infecciones Fúngicas*, International Marketing & Communication, Madrid, 2005, pp. 77-95.

[12] M.A. Ghannoum, L.B. Rice, Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance, *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (1999) 501-517.

[13] A. Espinel-Ingroff, Mechanisms of resistance to antifungal agents. Yeasts and filamentous fungi, *Rev Iberoam Micol.* 25 (2008) 101-106.

[14] R.M. Daza-Perez, Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria, *Inf Ter Sist Nac Salud.* 22 (1998) 57-67.

[15] M.A. Pfaller, Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment, *The American Journal of Medicine.* 125 (2012) S3-S13.

[16] J.L. Ingraham, C.A. Ingraham, Introducción a la microbiología, in: Editorial Reverté (Ed.), , 1998, pp. 491-494.

[17] J. Kane, R. Summerbell, L. Sigler, S. Kraiden, G. Land, *Laboratory Handbook of Dermatophytes. A clinical guide and laboratory handbook or dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair and nails*, *Mycopathologia.* 147 (1999) 113-114.

[18] H. Curtis, N. Barnes, A. Schnek, A. Massarini, *Curtis Biología*, Ed Médica Panamericana, 2008.

[19] R.E. Lewis, *Antifungal Pharmacology: Fungal Cell Structure and Targets*, 2012 (2011).

[20] F. Kanetsuna, L.M. Carbonell, R.E. Moreno, J. Rodriguez, Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*, *J Bacteriol.* 97 (1969) 1036-1041.

[21] G. Beltrana, M.J. Torijaa, M. Novoa, N. Ferrera, M. Pobleta, M.J. Guillamóna, N. Rozèsa, A. Mas, Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study, *Systematic and Applied Microbiology.* 25 (2002) 287-293.

[22] L. Castrillón, A. Palma, C. Padilla, Factores de virulencia en *Candida* sp, *Dermatología Rev Mex.* 49 (2005) 12-27.

[23] J.M. Senet, Risk factors and physiopathology of candidiasis, *Rev Iberoam Micol.* 14 (1997) 6-13.

[24] M.M. Panizo, V. Reviákina, Adhesinas y receptores involucrados en el fenómeno de adherencia de *Candida albicans* a las células epiteliales, *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 21 (2001) 5-11.

[25] Y.H. Samaranayake, L.P. Samaranayake, *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen, *J. Med. Microbiol.* 41 (1994) 295-310.

[26] M. De Toro, Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área hospitalaria del H. U. Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009, (2011) 147.

[27] N. Zaias, B. Glick, G. Rebill, Diagnosing and treating onychomycosis. *J Fam Pract.* 42 (1996) 513-518.

[28] J. Larruskain, P. Idígoras, J. Mendiola, Onicomicosis: diagnóstico y tratamiento, *Inf Ter Sist Nac Salud.* 32 (2008) 83-92.

[29] C.C. Kibbler, S. Seaton, R.A. Barnes, W.R. Gransden, R.E. Hollimann, E.M. Johnson, Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. *J Hosp Infect.* 54 (2003) 18-24.

[30] G.J. Alangaden, Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention, *Infect Dis Clin N Am.* 25 (2011) 201-225.

[31] S. Garcia-Sanchez, S. Aubert, I. Iraqui, G. Janbon, J.M. Ghigo, C. Enfert, *Candida albicans* Biofilms: a Developmental State Associated With Specific and Stable Gene Expression Patterns, *Eukaryotic Cell.* 3 (2004) 536-545.

[32] D.M. Kuhn, J. Chandra, P.K. Mukherjee, M.A. Ghannoum, Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces, *Infection and immunity.* 70 (2002) 878-888.

[33] L.I. Brugnoli, M.A. Cubitto, J.E. Lozano, *Candida krusei* development on turbulent flow regimes: Biofilm formation and efficiency of cleaning and disinfection program, *Journal of Food Engineering.* 111 (2012) 546-552.

[34] M.F. Simpanya, Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity, *Revista Iberoamericana de Micología.* 17 (2000) 1-12.

[35] M. Ameen, Epidemiology of superficial fungal infections, *Clin Dermatol.* 28 (2010) 197-201.

[36] E.I. Nweze, J.I. Okafor, Prevalence of dermatophytic fungal infections in children: a recent study in Anambra state, Nigeria., *Mycopathologia.* 160 (2005) 239-243.

[37] J.C. Berg, K.L. Hamacher, G.D. Roberts, Pseudomycetoma caused by *Microsporium canis* in an immunosuppressed patient: a case report and review of the literature, *J Cutan Pathol.* 34 (2007) 431-434.

[38] R. Nir-Paz, H. Elinav, G.E. Pierard, D. Walker, A. Maly, M. Shapiro, R.C. Barton, I. Polacheck, Deep Infection by *Trichophyton rubrum* in an Immunocompromised Patient, *Journal of clinical microbiology.* 41 (2003) 5298-5301.

[39] B. Havlickova, V.A. Czaika, M. Friedrich, Epidemiological trends in skin mycoses worldwide, *Mycoses.* 51 (2008) 2-15.

[40] G.A. Vena, P. Chieco, F. Posa, A. Garofalo, A. Bosco, N. Cassano, Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975, *New Microbiologica.* 35 (2012) 207-213.

[41] M. Pau, L. Atzori, N. Aste, R. Tamponi, N. Aste, Epidemiology of *Tinea pedis* in Cagliari, Italy, *G Ital Dermatol Venereol.* 145 (2010) 1-5.

[42] T.J. Dougherty, J.E. Kaufman, A. Goldfarb, K.R. Weishaupt, D. Boyle, A. Mittleman, Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 38 (1978) 2628-2635.

[43] L.R. Braathen, R.M. Szeimies, N. Basset-Seguin, R. Bissonnette, P. Foley, D. Pariser, R. Roelandts, A.M. Wennberg, C.A. Morton, Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: An international consensus, *J Am Acad Dermatol.* 56 (2007) 125-143.

[44] P. Lehmann, Methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer, *Br J Dermatol.* 156 (2007) 793-801.

[45] M.R. Hamblin, T. Hasan, Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?, *Photochemical & Photobiological Sciences*. 3 (2004) 436-450.

[46] G. Jori, S.B. Brown, Photosensitized inactivation of microorganisms, *Photochemical & Photobiological Sciences*. 3 (2004) 403-405.

[47] M. Wainwright, Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), *J. Antimicrob. Chemother.* 42 (1998) 13-28.

[48] T. Maisch, R.M. Szeimies, G. Jori, C. Abels, Antibacterial photodynamic therapy in dermatology, *Photochemical & Photobiological Sciences*. 3 (2004) 907-917.

[49] Y. Gilaberte, *Terapia Fotodinámica*, Grupo Aula Medica, Madrid, 2008.

[50] T. Dai, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy for localized infections: state of the art, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 6 (2009) 170-188.

[51] P.G. Calzavara-Pinton, M. Venturini, R. Capezzer, R. Sala, C. Zane, Photodynamic therapy of interdigital mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 20 (2004) 144-147.

[52] M.C. Teichert, J.W. Jones, M.N. Usacheva, M.A. Biel, Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model, *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*. 93 (2002) 155-160.

[53] G.B. Kharkwal, S.K. Sharma, Y.Y. Huang, T. Dai, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy for infections: clinical applications, *Lasers Surg. Med.* 43 (2011) 755-767.

[54] S.A. Lambrechts, M.C. Aalders , F.D. Verbraak, J.W. Lagerberg, J.B. Dankert, J.J. Schuitmaker, Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin, *J Photochem Photobiol B.* 79 (2005) 51-57.

[55] H. Mohr, J. Knuver-Hopf, U. Gravemann, A. Redecker-Klein, T.H. Muller, West Nile virus in plasma is highly sensitive to methylene blue-light treatment, *Transfusion.* 44 (2004) 886-890.

[56] H. Mohr, B. Bachmann, A. KleinStruckmeier, B. Lambrecht, Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light, *Photochem. Photobiol.* 65 (1997) 441-445.

[57] H. Mohr, A. Redecker-Klein, Inactivation of pathogens in platelet concentrates by using a two-step procedure, *Vox Sang.* 84 (2003) 96-104.

[58] T. Maisch, C. Bosl, R.M. Szeimies, B. Love, C. Abels, Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin-based photosensitizer against MRSA *ex vivo*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 (2007) 545-551.

[59] C.E. Millson, M. Wilson, A.J. MacRobert, S.G. Bown, Ex-vivo treatment of gastric *Helicobacter* infection by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 32 (1996) 59-65.

[60] I.N. Rôças, J.F.J. Siqueira, K.R. Santos, Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases, *J Endod.* 30 (2004) 315-320.

[61] M.R. Hamblin, D.A. O'Donnell, N. Murthy, C.H. Contag, T. Hasan, Rapid control of wound infections by targeted photodynamic therapy monitored by in vivo bioluminescence imaging, *Photochem. Photobiol.* 75 (2002) 51-57.

[62] M.R. Hamblin, T. Zahra, C.H.M. Contag A.T., T. Hasan, Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections in vivo. *J Infect Dis.* 187 (2003) 1717-1725.

[63] A. Orenstein, D. Klein, J. Kopolovic, E. Winkler, Z. Malik, N. Keller, Y. Nitzan, The use of porphyrins for eradication of *Staphylococcus aureus* in burn wound infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 19 (1997) 307-314.

[64] F. Berthiaume, S.R. Reiken, M. Toner, R.G. Tompkins, M.L. Yarmush, Antibody-targeted photolysis of bacteria in vivo. *Biotechnology.* 12 (1994) 703-706.

[65] J.A. Shibli, M.C. Martins, F.H.J. Nociti, V.G. Garcia, E.J. Marcantonio, Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol.* 74 (2003) 338-345.

[66] O.E. Akilov, S. Kosaka, K. O'Riordan, T. Hasan, Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci.* 6 (2007) 1067-1075.

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

[68] Z. Smetana, Z. Malik, A. Orenstein, E. Mendelson, E. Ben-Hur, Treatment of viral infections with 5-aminolevulinic acid and light. *Lasers Surg Med.* 21 (1997) 351-358.



[69] J.Y. Jung, P.S. Kwon, J.C. Ahn, R. Ge, M.W. Suh, C.K. Rhee, *In vitro* and *in vivo* photodynamic therapy of otitis media in gerbils. *Laryngoscope*. 2009. 119 (2009) 1781-1787.

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

[71] Y.Y. Huang, P. Mroz, T. Zhiyentayev, S.K. Sharma, T. Balasubramanian, C. Ruzie, M. Krayer, D. Fan, K.E. Borbas, E. Yang, H.L. Kee, C. Kirmaier, J.R. Diers, D.F. Bocian, D. Holten, J.S. Lindsey, M.R. Hamblin, *In vitro* photodynamic therapy and quantitative structure-activity relationship studies with stable synthetic near-infrared-absorbing bacteriochlorin photosensitizers, *J. Med. Chem*. 53 (2010) 4018-4027.

[72] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 1 (2004) 279-293.

[73] R.F. Donnelly, P.A. McCarron, M.M. Tunney, Antifungal photodynamic therapy, *Microbiol. Res*. 163 (2008) 1-12.

[74] M. Schäfer, C. Schmitz, R. Facius, G. Horneck, B. Milow, K.H. Funken, J. Ortner, Systematic study of parameters influencing the action of Rose Bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production. *Photochem Photobiol*. 71 (2000) 514-523.

[75] M.N. Usacheva, M.C. Teichert, C.E. Sievert, M.A. Biel, Effect of Ca<sup>2+</sup> on the photobactericidal efficacy of methylene blue and toluidine blue against gram-negative bacteria and the dye affinity for lipopolysaccharides, *Lasers Surg. Med*. 38 (2006) 946-954.

[76] M.N. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel, The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria, *J. Photochem. Photobiol. B.* 71 (2003) 87-98.

[77] M.N. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel, Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms, *Lasers Surg. Med.* 29 (2001) 165-173.

[78] M.R. Hamblin, D.A. O'Donnell, N. Murthy, K. Rajagopalan, N. Michaud, M.E. Sherwood, T. Hasan, Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria, *J. Antimicrob. Chemother.* 49 (2002) 941-951.

[79] S. Chio-Srichan, N. Oudrhiri, A. Bennaceur-Griscelli, A.G. Turhan, P. Dumas, M. Refregiers, Toxicity and phototoxicity of Hypocrellin A on malignant human cell lines, evidence of a synergistic action of photodynamic therapy with Imatinib mesylate, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology.* 99 (2010) 100-104.

[80] S.M. Ali, S.K. Chee, G.Y. Yuen, M. Olivo, Hypocrellins and hypericin induced apoptosis in human tumor cells: a possible role of hydrogen peroxide, *Int J Mol Med.* 9 (2002) 461-472.

[81] A. Rezusta, P. López-Chicón, M.P. Paz-Cristobal, M. Alemany-Ribes, D. Royo-Díez, M. Agut, C. Semino, S. Nonell, M.J. Revillo, C. Aspiroz, Y. Gilaberte, *In vitro* fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species, *Photochem Photobiol.* 88 (2012) 613-619.

[82] G.P. Tegos, T.N. Demidova, D. Arcila-Lopez, H. Lee, T. Wharton, H. Gali, M.R. Hamblin, Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers, *Chem. Biol.* 12 (2005) 1127-1135.

[83] L. Huang, M. Terakawa, T. Zhiyentayev, Y.Y. Huang, Y. Sawayama, A. Jahnke, G.P. Tegos, T. Wharton, M.R. Hamblin, Innovative cationic fullerenes as broad-spectrum light-activated antimicrobials. *Nanomedicine*. 6 (2010) 442-452.

[84] W.G. Fisher, W.P. Partridge Jr, C. Dees, E.A. Wachter, Simultaneous two-photon activation of type-I photodynamic therapy agents, *Photochem. Photobiol.* 66 (1997) 141-155.

[85] R.A. Ron, H.D. Gordon, R. Cuenca, X. Hu, C.J. Childs, H.S. Claudio, Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 1 (2004) 27-42.

[86] Y. Gilaberte, C. Serra-Guillén, M.E. Heras, R. Ruiz-Rodríguez, M. Fernández-Lorente, C. Benvenuto-Andrade, S. González-Rodríguez, C. Guillén-Barona, Terapia fotodinámica en dermatología, *Actas Dermosifiliogr.* 97 (2006) 83-102.

[87] R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam, 2000.

[88] T.G. St Denis, T. Dai, L. Izikson, C. Astrakas, R.R. Anderson, M.R. Hamblin, G.P. Tegos, All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease, *Virulence*. 2 (2011) 509-520.

[89] D.R. Marshak, R.L. Gardner, D. Gottlieb, *Stem Cell Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, London, 2001.

[90] H. Ross, W. Pawlina, *Histología. Texto y Atlas Color Con Biología Molecular y Celular*, Ed Médica Panamericana, Buenos Aires, 2007.

[91] Marvistavet, *pemphigus foliaceus*, 2012 (2011).

[92] A. Eynard, M. Valentich, R. Rovasi, Histología y Embriología Del Ser Humano: Bases Celulares y Moleculares, Editorial Medica Panamericana, Argentina, 2008.

## **Capítulo 2**

***Técnicas y métodos***



## 2.1 Técnicas de microbiología

### 2.1.1 Cepas fúngicas

Las cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida albicans* ATCC 10231 fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD, USA). La cepa de *Candida albicans* CECT 1001 y del dermatofito *Trichophyton mentagrophytes* CECT 2956 fueron obtenidos de la *Colección Española de Cultivos Tipo* (CECT; Universidad de Valencia, España).

### 2.1.2 Preparación de la suspensión de células fúngicas

Los microorganismos se almacenan en cultivos stock. Estos consisten en cepas estándares que cumplen las características bioquímicas, morfológicas y fisiológicas de la especie a la que representan. Para mantener su integridad genética, estas cepas deben conservarse en neveras a 4° C, durante periodos cortos, o bien congeladas a -80° C, con glicerol al 15% (v/v) en PBS pH=7.4 (composición: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O 0.01 M, NaCl 0.138 M y KCl 0.0027 M.), durante periodos largos.

#### 2.1.2.1 Preparación de las suspensiones de levaduras

Se siembra un loop de cultivo stock, en una placa de petri con agar de caldo Sabouraud glucosado al 2% (w/v) (SB; pepona de carne 5.0 g/L, peptonas de caseína 5.0 g/L, D(+) glucosa 20.0 g/L) estéril y se incuba a 26° C durante 2 días. Una vez crecidas las colonias, se prepara el cultivo Over Night (ON) inoculando una de ellas en 3 mL de caldo SB estéril y se incuba a 26° C y en agitación a 120 rpm. Pasadas 16 horas se prepara el subcultivo del ON transfiriendo 1 mL del cultivo ON a 50 mL de caldo SB estéril y se incuba en las mismas condiciones. Cuando el valor de densidad óptica (DO), medido con el espectrofotómetro, es de 0.6 se detiene la incubación y se retira el medio de cultivo. Para ello se realizan 3 lavados con PBS de pH=7.4,

centrifugando a 1398 g durante 5 minutos. La suspensión de levadura que se obtiene tiene una concentración de aproximadamente  $10^6$  unidades formadoras de colonia por mL (ufc/mL).

#### 2.1.2.2 Preparación de la suspensión de hongo filamentoso

Se siembra un loop de cultivo stock en un matraz de erlenmeyer con agar Sabouraud glucosado al 2% (v/w) y se incuba a 26° C durante 14 días. Una vez crecidas las colonias, estas se desprenden de la superficie del medio de cultivo sólido por agitación manual mediante 20 mL de solución salina estéril (SSE; NaCl 0.85% (w/v)) que contiene bolas de cristal de 2 mm de diámetro. Posteriormente, se transfiere la suspensión por decantación a un recipiente estéril y se obtiene la suspensión fúngica de trabajo.

#### 2.1.3 Recuento de células viables: unidades formadoras de colonias

Una célula viable es aquella capaz de dividirse y originar descendencia, sobre un medio sólido adecuado, creciendo y dividiéndose hasta formar una colonia; siendo el número de colonias proporcionales al número de células o de ufc. A partir del número de colonias, y mediante el cálculo que se muestra a continuación (Ecuación 2.1) se obtienen el número de ufc/mL:

$$\frac{ufc}{mL} = \frac{\#colonias * factor\ de\ dilución}{mL\ sembrados}$$

(Ecuación 2.1)

Se han utilizado dos métodos de siembra para el recuento de viables:

- *Método de siembra de superficie mediante asa de Digrafsky*: consiste en sembrar 100  $\mu$ L de suspensión celular sobre una placa de petri y agotar el volumen por fricción entre el asa y el MC. El número de colonias debe oscilar



entre 30 y 300 ya que así se asegura que el cálculo estadístico es significativo y se evitan estimaciones erróneas por fusión de colonias

- *Método de siembra de superficie mediante pipeta multicanal:* se realiza un banco de diluciones seriadas de la suspensión celular en una placa de 96 pocillos y se pipetea 10  $\mu$ L simultáneamente de todas las diluciones con una pipeta multicanal. Se siembran en una placa de petri cuadrada que contiene medio de cultivo y que se encuentra inclinada, provocando que la muestra se agote por gravedad.

#### 2.1.3.1 En levaduras: Curva de crecimiento

Con la finalidad de conocer las ufc/mL se realiza una curva de crecimiento. Consiste en medir la turbidez de la suspensión celular mediante un espectrofotómetro, a 600 nm, en función del tiempo. Cuando la luz pasa a través de la muestra, se detecta el descenso de luz no dispersada causada por la suspensión celular, expresado en unidades de DO. Como resultado, se obtiene un gráfico de DO frente a las ufc/mL, donde la función exponencial ajustada retorna valores de ufc/mL en función de la DO que se mida en ese instante de tiempo. De este modo, se conoce la zona de crecimiento de la levadura y se asegura estar trabajando siempre en ella, excluyendo las zonas de latencia y de envejecimiento.

Se prepara la suspensión de levadura. A diferentes tiempos de incubación, se van tomando alícuotas del subcultivo ON y se mide la  $DO_{600}$ . Para obtener las ufc/mL a cada tiempo se siembra cada una de las alícuotas sobre placas de agar de SB estéril, se incuban a 26° C durante 2 días y se cuentan las colonias mediante el *Método de siembra de superficie mediante asa de Digrafsky*. A partir del valor de DO y del número de ufc/mL se construye la función que describe el comportamiento de crecimiento de la levadura.

### 2.1.3.2 En hongos filamentosos: Método de diluciones de suspensiones celulares

En organismos unicelulares, como las levaduras, la DO es proporcional al número de células debido a que su tamaño permite que la dispersión de la luz se produzca a partir de una sola célula. En el caso de los mohos, al ser pluricelulares, su mayor tamaño no permite utilizar este método turbidimétrico para realizar el recuento de células viables. El motivo es que la luz dispersada por una célula no llega al detector ya que resulta redispersada por otra, provocando medidas erróneas e incluso la saturación de la fotocélula del equipo. El recuento de viables en hongos pluricelulares se realiza mediante el método de las diluciones seriadas de suspensiones celulares. Consiste en determinar el número de células de la muestra que es capaz de crecer y dividirse hasta formar una colonia sobre un medio sólido adecuado. De este modo el número de colonias y el número de células son proporcionales.

Consiste en realizar diluciones decimales seriadas de la muestra a estudio. Para realizar la dilución  $10^{-1}$  se introduce 1 mL de la suspensión fúngica de trabajo en un tubo que contiene 9 mL de SSE. Posteriormente, la dilución de  $10^{-2}$  se prepara introduciendo 1 mL de la dilución de  $10^{-1}$  en otro tubo con 9 mL de SSE. Del mismo modo, se va realizando diluciones sucesivas hasta alcanzar el número de diluciones deseadas. A continuación, se siembran 0.1 mL de cada dilución en placas de agar de SB estéril utilizando un asa de extensión. Cada placa se incuba a  $26^{\circ}$  C y pasados 14 días se cuentan las colonias.

### 2.1.4 Viabilidad celular

Las distintas experiencias para evaluar la viabilidad celular se diseñan con la finalidad de conocer qué efecto tienen las variables, y sus interacciones, sobre la respuesta de viabilidad celular después del tratamiento fotodinámico. Las variables a

estudio que se han seleccionado como relevantes en la optimización de la TFD antifúngica son: la concentración del FS ( $C_{FS}$ ), el tiempo contacto entre el FS y el hongo ( $t_{\text{contacto}}$ ) y el tiempo de irradiación ( $t_{\text{irradiación}}$ ).

Se introduce la suspensión fúngica en una placa de petri estéril de 3 cm de diámetro y posteriormente se adiciona el FS a la concentración deseada. Se deja a 37° C, con agitación y a oscuras durante diferentes periodos de tiempo de incubación. Posteriormente se irradia mediante una fuente de LEDs durante el tiempo de irradiación seleccionado para la prueba. Se siembran 0.1 mL de la suspensión en una placa de agar de SB estéril y se incuba a 37° C durante 2 días. La viabilidad celular se determina por recuento de las colonias formadas después del tratamiento fotodinámico. La toxicidad a oscuras del FS se evalúa del mismo modo, pero eliminando el paso de irradiación de la muestra.

Para definir la actividad bactericida se ha adoptado la definición de la actividad fungicida, es decir, una reducción de ufc/mL del inóculo inicial del 99.9% o 3  $\log_{10}$  [1]. Con el fin de evaluar el alcance de la técnica, se adoptó también un criterio más estricto con una reducción del 99.9999% o de 6  $\log_{10}$  de las ufc/mL del inóculo inicial.

El tratamiento matemático de los resultados experimentales consiste en calcular las ufc/mL a partir del recuento de colonias (Ecuación 2.1). Se grafican los resultados como logaritmo de las ufc/mL en función de la concentración de FS.

#### 2.1.5 Incorporación del fotosensibilizador por las levaduras

El proceso de incorporación celular del FS en la levadura se obtiene mediante medidas de fluorescencia del FS en función del tiempo. Se introduce la suspensión fúngica, que se encuentra disuelta en PBS pH=7.4, en un tubo *falcon* estéril, se adiciona el FS a la concentración deseada y se incuba, a 37° C con agitación y a oscuras, durante los distintos tiempos a los que se quiere estudiar la incorporación. Se

retira el FS en exceso mediante centrifugaciones de 5 minutos a 1398 g y lavados con PBS. Con la finalidad de lisar las células y liberar en el medio el FS incorporado se añade SDS (2% (w/v) en H<sub>2</sub>O) al pellet, se agita durante 24 h y se mide la fluorescencia del FS con un espectrofluorímetro a la  $\lambda$  de emisión del FS.

El tratamiento matemático de los resultados experimentales consiste en calcular, para cada tiempo de incorporación, el área bajo la curva de cada espectro de fluorescencia mediante el software Graphpad Prism. Se grafican los resultados como fluorescencia del lisado celular frente al tiempo.

## 2.2 Técnicas de biología celular

### 2.2.1 Células epidérmicas humanas

Las células humanas que se han utilizado en la presente tesis doctoral son queratinocitos (HaCaT: human adult high calcium low temperature) y fibroblastos (hNDF: human normal dermal fibroblasts). Son células primarias obtenidas de la Universidad Autónoma de Madrid y del Hospital Central de Asturias, respectivamente.

### 2.2.2 Preparación celular en dos dimensiones

Los hNDF y los HaCAT se encuentran congelados en criotankes de N<sub>2</sub> líquido a -196° C. El proceso de descongelación consiste en introducir el criobial que contiene las células en un baño a 37° C durante 5 minutos. Una vez descongelado se trasvasa todo el contenido a un tubo *falcon* estéril con 10 mL de medio de cultivo (MC) equilibrado previamente a 37° C. Se centrifuga a 60 g durante 5 minutos, se resuspende el pellet en 1 mL de MC y se traspasa a un *flask* (frasco de cultivo de tejidos) T-25 para queratinocitos o un T-75 para los fibroblastos, que contiene MC previamente equilibrado a 37° C. Se cultivan a 37° C y a 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 días, que es el tiempo necesario para que se dé una división celular y obtenerse un cultivo confluyente para ser utilizado en el experimento que se desee.

Composición del medio de cultivo:

- 44 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x; Glucosa, Piruvato, Rojo Fenol)
- 5 mL FBS (10% Fetal Bovine Serum; Lonza, South American Origin)
- 500 mL L-Glutamina (200 mM, 100 x, PAA)
- 500 mL Penicilina / Estreptomicina (100 x, Penicilina 10000 unidades/mL, Estreptomicina 10 mg/ML, PAA)

### 2.2.3 Expansión del cultivo celular: tripsinización

Pasados 2 días del sembrado celular, el cultivo confluyente se encuentra listo para realizar otra división celular y así aumentar el número de células mediante la expansión. Las células se encuentran adheridas en la base del *flask* y mediante el proceso de tripsinización se disociarán de éste. La tripsina, una enzima peptidasa producida en el páncreas, rompe los enlaces entre las proteínas de membrana y la base de *flask*. De este modo las células se desprenden del recipiente.

El procedimiento experimental consiste en aspirar el MC del interior del *flask* y realizar un lavado con 1 mL de tripsina-EDTA (0.05% (v/v)), volver a aspirar, añadir 1 o 2 mL de tripsina-EDTA al *flask* T-25 o T-75, respectivamente, e incubar a 37° C durante 4 minutos. Se monitoriza el desprendimiento de las células mediante un microscopio, y una vez se han desadherido de la base del *flask* se añaden 4 o 8 mL de FBS (T-25 y T-75 respectivamente) para bloquear el efecto de la tripsina, ya que ésta con el tiempo degradaría la célula por completo. Se introduce la suspensión en un tubo *falcon* estéril y se centrifuga a 60 g durante 5 minutos. Posteriormente se aspira el sobrenadante, se resuspende el pellet en 2 mL de MC, se introduce 1 mL en cada *flask* y se incuba a 37° C durante 2 días.

### 2.2.4 Recuento microscópico directo: hematocitómetro

Para controlar la cantidad de células que se siembran en cada pocillo, es necesario contarlas previamente y obtener así la densidad celular. Para ello es necesario un hematocitómetro: porta-objetos con dos cámaras de superficie 1x1 mm que contienen una cuadrícula para facilitar el recuento de células. La cámara está dividida en 9 subcuadrículas, donde las 4 de los extremos están divididas en 16 cuadrados y la central en 256 cuadrados (Figura 2.1).

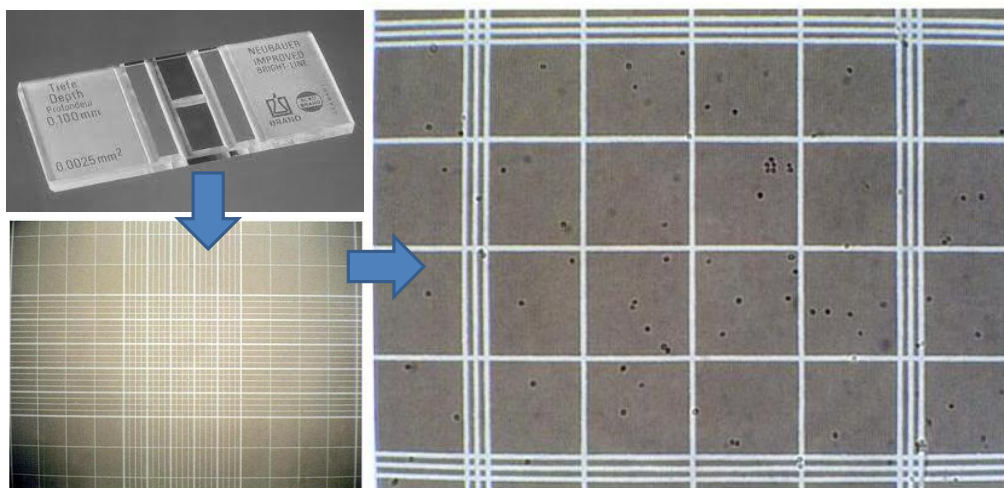


Figura 2.1. Cámara de un hematocitómetro con zoom en la subcuadrícula central.

Se coloca un cubre objetos sobre el hematocitómetro y se introducen 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular (pellet obtenido de la expansión de la suspensión celular, apartado 2.2.3.) en cada una de las cámaras. Con un microscopio y un contador manual mecánico se cuentan el número de células de las subcuadrículas de los 4 extremos y la central, para cada cámara. De este modo se obtienen 10 valores, se calcula su promedio y se obtiene estadísticamente el número de células (Ecuación 2.2).

$$\text{Densidad Celular} = \overline{\#células} * V_{alícuota} * V_{suspensión}$$

(Ecuación 2.2)

Donde,

$\overline{\#células}$ : promedio del número de células contadas en las 2 cámaras

$V_{alícuota}$ : volumen introducido en la cámara (10  $\mu\text{L}$ )

$V_{suspensión}$ : volumen total de la suspensión celular

### 2.2.5 Sembrado de células en placas de distintos diámetros

En función del experimento que se quiere realizar, el sembrado celular se cultivará en microplacas con pocillos de distintos tamaños. Para calcular la densidad celular que debe sembrarse en cada pocillo, debe tenerse en cuenta el diámetro de

éste. Si en un *flask* T-25 (superficie de 25 cm<sup>2</sup>) de hNDF hay 1·10<sup>6</sup> células y en un T-75 (superficie de 75 cm<sup>2</sup>) de HaCaT hay 2·10<sup>6</sup> células, sabiendo el diámetro del pocillo se calcula cuantas células crecerán con la misma densidad celular que un *flask*. Posteriormente se divide el número de células que se ha obtenido por 2, ya que cada célula realizará una división celular y originará dos células idénticas a ella. En la Tabla 2.1 se muestra la densidad celular que debe sembrarse en función del diámetro del pocillo.

Tabla 2.1 Densidad celular que debe sembrarse en función de la microplaca de sembrado

Microplaca	Área pocillo /cm <sup>2</sup>	hNDF		HaCaT	
		# células /pocillo	(# células /pocillo)/2	# células /pocillo	(# células /pocillo)/2
6 pocillos	9.62	128000	64000	769000	300000
24 pocillos	1.77	23600	11800	141600	70800
48 pocillos	1.13	15066	7533	45200	22600

Una vez conocido el total de células requeridas para el experimento se tripsinizan los *flasks* necesarios, se centrifuga la suspensión celular, se resuspende el pellet en MC y se realiza un recuento de células. Sabiendo el número de células que deben sembrarse en cada pocillo, el número de células obtenido en el recuento y el volumen de suspensión celular que se añadirá en cada pocillo, se calcula el MC que debe añadirse al pellet para obtener la densidad celular deseada. Posteriormente se añade la suspensión celular en cada pocillo y se incuba a 37° C y a 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 días



### 2.2.6 Preparación de muestras para el microscopio de fluorescencia

Para observar la localización del FS en las células por microscopía de fluorescencia, confocal o de campo claro, deben prepararse las muestras siguiendo los protocolos estipulados de fijación de células. Esta microscopía de contraste se basa en utilizar distintos tintes en función del orgánulo que se quiera monitorizar ya que cada sonda se une específicamente a un tipo de estructura celular y al ser excitada provoca una emisión de luz que se detecta por microscopía de fluorescencia.

La preparación de la muestra consiste en incubar las células sobre cubreobjetos durante 2 días a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se fijan al cubreobjetos debido a que ha sido tratado previamente con glicerina durante 30 minutos a 37° C. Cuando las células están confluentes, se realizan 3 lavados con PBS pH= 7.4 para retirar el MC. Se añade la sonda celular a la concentración de trabajo establecida y se incuba con agitación orbital a la temperatura de incubación y tiempo establecido según el protocolo, siempre a oscuras. Se vuelven a realizar 3 lavados con PBS pH= 7.4, 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.

Si el tinte necesita una etapa, previa o posterior de fijado celular, se realiza añadiendo al cubreobjetos p-formaldehído al 2% (v/v) durante 30 minutos, con posterior lavado con PBS pH= 7.4. En el caso de que se quiera permeabilizar la membrana celular, se añade Tritón X-100® al 0.1% (v/v) en PBS pH= 7.4, durante 30 minutos, con posterior lavado con PBS pH= 7.4.

A continuación se describen las características de cada sonda celular:

#### 2.2.6.1 Tinción de DAPI [2]

El DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) es una sonda fluorescente azul que tiñe el núcleo celular debido a que al unirse a los ácidos nucleicos del ADN de doble cadena aumenta su fluorescencia unos 20 ordenes de magnitud. La concentración de trabajo del DAPI es de 300 nM en PBS y el tiempo de incubación a oscuras de 5 minutos. La longitud de onda de excitación en el UV es de 358 nm y la de emisión en el visible de 461 nm.

#### 2.2.6.2 Tinción de Mitotraker<sup>®</sup> Green FM [3]

El Mitotraker es una sonda fluorescente verde que tiñe las mitocondrias. Una vez ha difundido a través de la membrana plasmática, éste se acumula en las mitocondrias, se oxida y posteriormente reacciona con las proteínas o péptidos para formar un complejo que emite fluorescencia verde. La concentración de trabajo del Mitotraker es de 100 nM en PBS y el tiempo de incubación es de 30 minutos a 37° C y a oscuras. La longitud de onda máxima de excitación es de 490 nm y la de emisión de 516 nm.

#### 2.2.6.3 Tinción de LysoTracker<sup>®</sup> Green [4]

El LysoTracker es una sonda fluorescente verde que tiñe los lisosomas. Es una amina débilmente básica unida a un fluoróforo, que una vez en el interior celular se acumula selectivamente en orgánulos ácidos, como los lisosomas. La concentración de trabajo del Lyso Tracker es de 75 nM en PBS y el tiempo de incubación es de 30 minutos, a 37° C y a oscuras. La longitud de onda máxima de excitación es de 504 nm y la de emisión de 511 nm.

## 2.2.7 Cuantificación de proteínas [5]

El método “Pierce BCA Protein Assay Kit” (Thermo Scientific) permite cuantificar el número de proteínas totales en muestra por detección colorimétrica. El fundamento consiste en la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  realizada por las proteínas presentes en la muestra en un medio alcalino. El complejo púrpura entre el catión cuproso y el ácido bicinconínico (BCA) se detecta por absorbancia a 562 nm, en un rango de linealidad que se encuentra entre 20 y 2000  $\mu\text{g/mL}$  de proteína. La concentración de proteínas se determina frente a una proteína estándar de referencia, la BSA (Albumin from Bovine Serum) mediante una serie de diluciones de concentración conocida de ésta.

Preparación de los estándares de BSA

Se prepara el banco de diluciones de BSA mediante la tabla que se muestra a continuación (Tabla 2.2). El diluyente debe ser el mismo con el que estarán disueltas las muestras celulares, SDS al 2% (w/v) en agua.

Tabla 2.2. Esquema de las diluciones de estándares de BSA

vial	Volumen	Volumen y fuente	Concentración Final
	Diluyente/ $\mu\text{l}$	de BSA / $\mu\text{L}$	BSA/ $\mu\text{g/mL}$
<b>A</b>	0	300 BSA stock	2000
<b>B</b>	1.25	375 BSA stock	1500
<b>C</b>	3.25	325 BSA stock	1000
<b>D</b>	175	175 vial B	750
<b>E</b>	325	325 vial C	500
<b>F</b>	325	325 vial E	250
<b>G</b>	325	325 vial F	125
<b>H</b>	400	100 vial G	25
<b>I</b>	400	0	0

### Preparación de Reactivo de trabajo BCA

El kit para realizar el ensayo está formado por dos reactivos de composición no publicada por el fabricante el *BCA Reagent A* y el *BCA Reagent B*, que se mezclaran en la proporción 50:1, respectivamente, dando como resultado el reactivo de trabajo (RT). Mediante la Ecuación que se muestra a continuación (Ecuación 2.3) se calcula el volumen total de este reactivo de trabajo:

$$V_{RT} = [(\#estándares \text{ BSA} * \#repeticiones) + (\#muestras * \#repeticiones)] * V_{RT/pocillo}$$

(Ecuación 2.3)

, siendo el número de repeticiones 3 y el volumen del RT introducido en cada pocillo 200  $\mu\text{L}$ .

### Procedimiento experimental

Debe medirse la absorbancia de las 8 diluciones de estándar de BSA y del total de muestras celulares a determinar la cantidad de proteína. Para ello, se introducen 25  $\mu\text{L}$  de cada estándar y de la muestra celular en una microplaca de 96 pocillos, así como sus tres repeticiones. Posteriormente se añaden 200  $\mu\text{L}$  del RT a cada pocillo y se incuban mediante agitación orbital a 37° C durante 30 minutos o 2 horas, para concentraciones celulares elevadas o para concentraciones diluidas, respectivamente. Una vez la microplaca está a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 562 nm con un espectrofotómetro de microplacas (ELx808, Biotek).

Se representa la recta patrón de los estándares de BSA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente a la absorbancia, restándole previamente la absorbancia del blanco (vial I de la Tabla 2.2). En la Ecuación de la recta que se obtiene se interpola la concentración de proteína ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de la muestra celular para cada valor de absorbancia experimental.

### 2.2.8 Recta patrón de concentración de proteínas frente al número de células

El objetivo de este experimento es obtener una Ecuación que describa la relación entre la concentración de proteínas, mediante el método de *Cuantificación de proteínas* (apartado 2.2.7) frente al número de células, mediante el método *Recuento microscópico directo* (apartado 2.2.4).

Se tripsinizan el número de *flasks* necesarios, se resuspende el pellet en 10 mL de medio de cultivo y se cuentan las células en el microscopio. Posteriormente se realiza el siguiente banco de diluciones de esta suspensión celular:

- hNDF:  $10^6 / 5 \cdot 10^5 / 10^5 / 4 \cdot 10^4 / 10^4$  células
- HaCaT:  $5 \cdot 10^6 / 10^6 / 5 \cdot 10^5 / 10^5 / 5 \cdot 10^4$  células

Se centrifuga cada tubo a 60 g durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y se añade al pellet 10 mL de SDS al 2% (w/v) que lisa las células y libera su contenido proteico. En este momento se realiza el método de *Cuantificación de proteínas* y se representa el valor de concentración de proteína obtenido frente al número de células que contiene cada dilución. La Ecuación de la recta que resulta de graficar los valores se utilizará en posteriores experimentos para interpolar el número de células a partir de un valor de proteína obtenido experimentalmente.

### 2.2.9 Ensayo de viabilidad con MTT [6,7]

El objetivo de este ensayo es determinar el efecto citotóxico del FS sobre el cultivo celular que se produce después del tratamiento fotodinámico. Este ensayo colorimétrico consiste en la reducción metabólica de la MTT realizada por una enzima mitocondrial, la succinato-deshidrogenasa, a formazán (púrpura). El resultado de esta prueba es una medida de viabilidad celular ya que solo las células con actividad mitocondrial serán capaces de formar los cristales de formazán.

El experimento se realiza del siguiente modo: se aspira el MC, se adiciona medio de cultivo fresco y pasadas 24 horas se incuban las células con MTT (0.5 mg mL<sup>-1</sup> en PBS) durante 3 horas a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Se aspira la MTT, se añaden 500 µL de DMSO y se agita a oscuras durante 15 minutos para asegurar el lisado completo de las células y la disolución de los cristales de formazán. Posteriormente se transvasan 200 µL a una microplaca de 96 pocillos y se realiza la lectura de la absorbancia, a 550 nm, espectrofotómetro de microplacas (ELx808, Biotek). Por último, se calcula la viabilidad celular mediante la siguiente Ecuación (Ecuación 2.4):

$$\%Viabilidad\ celular = \frac{Abs_{muestra} - ABS_{blanco}}{Abs_{control} - ABS_{blanco}} * 100$$

(Ecuación 2.4)

, siendo:

*Abs<sub>muestra</sub>*: absorbancia de la muestra celular a la que se le ha añadido FS

*Abs<sub>blanco</sub>*: absorbancia del DMSO

*Abs<sub>control</sub>*: absorbancia de la muestra celular a la que no se le ha añadido FS

#### 2.2.10 Viabilidad celular frente al fotosensibilizador

La viabilidad celular de los hNDF y los HaCaT frente al FS con posterior irradiación se realiza debido a la necesidad de conocer si las condiciones de TFD antifúngica que se han optimizado para eliminar las levaduras afectan tóxicamente a dichas células. La cantidad de células vivas que se obtiene después del tratamiento fotodinámico se evalúa mediante el ensayo de la MTT. El diseño experimental consiste en evaluar las distintas concentraciones del FS, los distintos tiempos de contacto del FS en las células y los distintos tiempos de irradiación.

En los ensayos con TMPyP y NMB se tiene en cuenta una cuarta variable, el lavado o no del FS antes de la irradiación. A continuación se muestra la metodología experimental en función del caso:

### Irradiación sin lavado previo del FS

Se cultivan las células en microplacas de 48 pocillos a 37° C durante 2 días. Se aspira el MC y se añaden 200 µL del FS a la concentración deseada disuelto en MC sin FBS. Se elimina el FBS debido a que las proteínas que contiene podrían interaccionarían con el FS y desactivarlo, dando como resultado una menor incorporación de éste por parte de las células. Se adiciona el FS, se incuban las células a 37°C durante 15 minutos (o sin incubación a tiempo 0), a la longitud de onda de excitación del FS y durante el tiempo establecido según el diseño experimental. Posteriormente se realizan 3 lavados con PBS, se incuban a 37 °C durante 24 h y se realiza el ensayo de la MTT.

### Irradiación con lavado previo del FS

Se cultivan las células en microplacas de 48 pocillos a 37° C durante 2 días. Se aspira el MC y se añaden 200 µL del FS disuelto en MC sin FBS. Se incuban a 37° C durante el tiempo establecido según el diseño experimental (0 o 15 minutos). Se realizan 3 lavados con PBS para retirar el FS en exceso y se irradian las células, a la longitud de onda de excitación del FS, durante el tiempo establecido según el experimento. Posteriormente, se incuba a 37° C durante 24 h y se realizar en ensayo de la MTT.

Para realizar la toxicidad a oscuras del FS, se cultivan las células en microplacas de 48 pocillos a 37° C durante 2 días. Se aspira el MC y se añaden 200 µL del FS disuelto en MC sin FBS. Se incuban a 37° C durante 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Posteriormente, se realizan 3 lavados con PBS para retirar el FS en exceso, se incuba a 37° C durante 24 h y se realiza en ensayo de la MTT.

Por último, para cada uno de los casos descritos anteriormente se grafica el % *viabilidad celular* (Ecuación 4) frente a la concentración de FS, mostrándose como desviaciones estándares de las tres repeticiones.

#### 2.2.11 Incorporación del fotosensibilizador por las células

Mediante medidas de fluorescencia se describe el proceso de incorporación celular del FS en función del tiempo. Se cultivan las células en microplacas de 6 pocillos a 37° C durante 2 días. Se aspira el MC y se añaden 700 µL del FS disuelto en MC sin FBS y se incuban a 37° C durante los distintos tiempos a los que se quiere evaluar la incorporación del FS. Se realizan 3 lavados con PBS para retirar el FS en exceso y, sin retirar el PBS del último lavado, se rascan las células con la ayuda de una rasqueta. Durante el raspado, se comprueba con el microscopio que estas se han desprendido de la base del pocillo. Se transvasa la suspensión celular a un tubo *falcon* estéril, se limpia el pocillo con 1 mL más de PBS y se centrifuga a 60 g durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante, se añade al pellet 1 mL de SDS al 2% (w/v) y se sónica durante 10 minutos para que se dé la lisis celular completa y se libere el FS que había sido incorporado por las células. De esta suspensión se retiran 100 µL para realizar el ensayo de *Cuantificación de proteínas* (apartado 2.2.6) y el resto se utiliza para medir la fluorescencia del FS mediante un espectrofluorímetro (*Jobin Yvon-Spex FLUOROMAX-4*).

El tratamiento matemático de los resultados experimentales consiste en calcular, para cada tiempo de incorporación, el área bajo la curva de cada espectro de fluorescencia mediante el software Graphpad. Paralelamente se ha calculado también, para cada tiempo de incorporación, la cantidad de proteína total en muestra. Mediante la Ecuación de la recta patrón que relaciona el contenido proteico con el número de células (apartado 2.2.7), se realiza una conversión de los datos para obtener valores de número de células. Por último se divide el área bajo la curva por el número de



células y se grafican los resultados como *Fluorescencia del lisado celular* normalizada por el número de células, frente al tiempo.

## 2.3 Técnicas Fotoquímicas

Las suspensiones de cultivo ON de levadura fueron cultivadas aeróbicamente a 37° C en medio de cultivo caldo de SB hasta una DO de 0.6 (~10<sup>6</sup> ufc/mL). Se retiró el medio de cultivo con lavados de PBS pH=7.4 mediante centrifugados de 5 minutos a 1398 g y se resuspendieron en PBS estéril. Se adicionó el FS a las suspensiones de levadura justo antes de las mediciones espectroscópicas con hipericina o bien con 1 h de incubación para mediciones con TMPyP o NMB. Para realizar las medidas en PBS deuterado (D-PBS), las suspensiones de levadura se centrifugaron dos veces a 1398 g durante 5 min y se resuspendieron en D-PBS. Las mediciones espectroscópicas se llevaron a cabo en cubetas de 1 cm de cuarzo (Hellmut, Alemania) a temperatura ambiente bajo agitación suave.

### 2.3.1 Espectros de absorción, excitación y emisión

El espectro de absorción del estado fundamental, tanto del FS solo como del FS incorporado en levaduras, fue obtenido realizando un barrido desde 300 a 800 nm mediante un espectrofotómetro Varian Cary 6000i (Varian Inc., Palo Alto, CA). Los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorómetro Spex Fluoromax 4 (Horiba Jobin-Yvon, Edison, NJ) a las siguientes longitudes de onda siguientes (Tabla 2.3):

Tabla 2.3. Longitudes de onda de espectros de excitación y emisión

	Espectro Excitación		Espectro Emisión	
	Excitación	Emisión	Excitación	Emisión
<b>Hipericina</b>	320-570	600	530	550-750
<b>TMPyP</b>	350-620	650	430	600-800
<b>NMB</b>	400-730	750	590	600-800

### 2.3.2 Cinética de fluorescencia resuelta en el tiempo

Los decaimientos de fluorescencia resueltos en el tiempo son ensayos que consisten en irradiar el FS incorporado en las levaduras y recoger la cinética de esta fluorescencia a una longitud de onda constante, su longitud de onda de emisión, en vez de realizar un barrido de longitudes de onda. La cinética y el tiempo de vida del FS excitado serán distintos en función de si el FS está incorporado en las células o bien si se encuentra disuelto en un disolvente. Además, si se obtiene más de un tiempo de vida del FS excitado significa que existen diferentes poblaciones de FS, lo que indica que este se acumula en zonas distintas dentro de la célula.

Para ello, se incubó el FS en las levaduras durante 1 hora, con agitación y a oscuras. Posteriormente se realizan tres lavados con PBS mediante centrifugaciones de 5 minutos a 1398 g para eliminar el FS en exceso que se encuentra en el sobrenadante. Los decaimientos de fluorescencia resueltos en el tiempo del FS incorporado en las levaduras fueron obtenidos con un sistema de conteo de fotones individuales (Fluotime 200, PicoQuant GmbH, Berlin, Alemania) equipado con un fotomultiplicador sensible al rojo. La fluorescencia fue excitada a 596 nm para la hipericina y 405 nm para la TMPyP, mediante LEDs pulsados con una tasa de repeticiones de 10 MHz, y fue observada a 655 nm tanto para la hipericina como para la TMPyP y, manteniendo la frecuencia de conteo por debajo del 1%. El decaimiento de fluorescencia fue analizado usando el software de análisis de datos PicoQuant FluoFit 4.0.

### 2.3.3 Absorción de los estados transitorios

El estudio de la absorción de las especies transitorias de la hipericina, el estado triplete ( $^3\text{Hip}$ ) o el radical anión ( $\text{Hip}^{\cdot-}$ ), formadas en las levaduras se realiza mediante experimentos de absorción transitoria, aprovechando los diferentes espectros de absorción que presentan ambos intermedios [8].

El objetivo es producir estos intermedios en muestras saturadas de argón, ya que cuando el oxígeno se encuentra en el sistema las señales desaparecen por completo porque desactiva al reaccionar con ellos. Una vez incubadas las levaduras con hipericina se desgasifica la muestra mediante una corriente de argón y se detectan los transitorios de la hipericina mediante un equipo de flash fotólisis provisto de un láser de nanosegundos [9]. La longitud de onda de excitación de la hipericina es 532 nm y la absorción de los transitorios se detecta a las longitudes de onda de absorción del estado triplete (520 nm) o del radical anión (740 nm), con la finalidad de realizar el seguimiento de estas especies [8]. Debe tenerse en cuenta que la monitorización del decaimiento a 740 nm no solo muestra la absorción del radical anión, sino que muestra dos componentes: una de tiempo de vida corta correspondiente al estado triplete y una segunda componente de tiempo de vida larga (orden milisegundos) correspondiente al radical anión.

#### 2.3.4 Cinética de fosforescencia de oxígeno singlete

La detección de la luminiscencia en el infrarrojo cercano resuelta en el tiempo del  $^1\text{O}_2$  formado en las células puede monitorizarse mediante su fosforescencia a 1275 nm [10-16]. La fosforescencia de  $^1\text{O}_2$  fue detectada mediante un sistema customizado, el Fluotime 200 (PicoQuant GmbH, Berlin, Alemania) [10]. Para la excitación de la muestra se utilizó un laser pulsado Nd:Yag de bombardeo de diodos (FTSS355-Q, Crystal Laser, Berlin, Alemania) trabajando con una tasa de repeticiones de 10 kHz y a 532 nm (12 mW, 1.2  $\mu\text{J}$  por pulso). Se colocó un filtro de corte de 1064 nm (Edmund Optics, UK) en el puerto de salida del laser para eliminar cualquier componente residual de la emisión fundamental en la región del IR cercano. La luminiscencia emitida por la muestra se filtró mediante un espejo frío (IVC Melles Griot, USA) y un filtro de interferencia a  $1273 \pm 86$  nm (Interferenzop-tik Elektronik GmbH, Alemania), y se focalizó en un tubo fotomultiplicador sensible al IR cercano (H9170-45, de

Hamamatsu Fotónica, Hamamatsu, Japón). El conteo de fotones se realizó con un multicanal NanoHarp Escalador 250 (PicoQuant, Alemania). Las señales de emisión resueltas en el tiempo fueron analizadas usando el programa de análisis de datos FluoFit 4.0 con la finalidad de extraer los valores de vida media de las especies.

Se incubaba el FS (disuelto en PBS) en las levaduras (disueltas en PBS) durante 1 hora (con agitación y a oscuras) y posteriormente mediante lavados con PBS (centrifuga a 1398 g durante 5 minutos) se elimina el FS en exceso que se encuentra en el sobrenadante. Se irradia la muestra mediante un láser pulsado a 532 nm y se recoge la señal emitida de luminiscencia a 1275 nm, correspondiente al  $^1\text{O}_2$ . Para asignar esta señal de forma inequívoca al  $^1\text{O}_2$  se realizan los siguientes controles:

- Se recoge la señal a 1325 nm, dando como resultado la desaparición de la señal ya que a esta longitud de onda el  $^1\text{O}_2$  no emite fosforescencia.
- Se centrifuga a 1398 g durante 5 minutos y se mide el sobrenadante a 1275 nm, dando como resultado la desaparición de la señal, pudiendo asignar que la señal obtenida se debe al  $^1\text{O}_2$  intracelular o unido a la pared celular de la levadura.
- Se centrifuga a 1398 g durante 5 minutos y se resuspende el pellet en PBS deuterado (D-PBS). Se recoge la señal a 1275 nm y el tiempo de vida de emisión obtenido en D-PBS aumenta en relación al obtenido en PBS [17].
- A la muestra disuelta en D-PBS se le añade BSA 0.75 mM (albúmina de suero bovino en D-PBS) y se realiza la medida a 1275 nm. Se obtiene una disminución del tiempo de vida media del  $^1\text{O}_2$  (relativo a la medida en D-PBS) producido por el FS unido a la pared celular ya que esta proteína solo desactiva el  $^1\text{O}_2$  extracelular debido a que su gran tamaño (65 kDa) no le permite penetrar la célula [18], desactivando así el  $^1\text{O}_2$  extracelular pero no el intracelular.

- En el caso de la TMPyP se realiza la medida de la muestra en PBS y a 960 nm con el objetivo de monitorizar la fosforescencia de este FS.

## 2.4 Referencias

[1] E. Ernst, K. Yodoi, E. Roling, M. Klepser, Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitanae* determined by microdilution, Etest, and time-kill methods, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 578-581.

[2] Invitrogen, Invitrogen Protocols,  
<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01306.pdf>, 2011 (2011)., 2011 (2006).

[3] Invitrogen, Invitrogen Protocols,  
<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07510.pdf>, 2011 (2008).

[4] Invitrogen, Invitrogen Protocols,  
<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07525.pdf>, 2011 (2007).

[5] Thermo Scientific, Thermo Scientific Protocols,  
<http://www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf>, 2011 (2011).

[6] M.G. Ordóñez, Ensayos farmacológicos *in vitro* para evaluar actividad antiangiogénica, *Revista Cubana de Farmacia.* 35 (2001) 66-73.

[7] T. Mosmann, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55-63.

[8] A.P. Darmanyán, W.S. Jenks, D. Eloy, P. Jardon, Quenching of excited triplet state hypericin with energy acceptors and donors and acceptors of electrons, *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 3323-3331.

[9] N. Rubio, A. Jimenez-Banzo, T. Torres, S. Nonell, Spectral and kinetic properties of the radical ions of chloroboron(III) subnaphthalocyanine, *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*. 185 (2007) 214-219.

[10] A. Jimenez-Banzo, X. Ragàs, P. Kapusta, S. Nonell, Time-resolved methods in biophysics. 7. Photon counting vs. analog time-resolved singlet oxygen phosphorescence detection, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008) 1003-1010.

[11] M. Niedre, M.S. Patterson, B.C. Wilson, Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells *in vitro* and tissues *in vivo*, *Photochem. Photobiol.* 75 (2002) 382-391.

[12] C. Schweitzer, R. Schmidt, Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen, *Chem. Rev.* 103 (2003) 1685-1757.

[13] A. Baier, M. Maier, R. Engl, M. Landthaler, W. Baumler, Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells, *J Phys Chem B.* 109 (2005) 3041-3046.

[14] J.W. Snyder, E. Skovsen, J.D.C. Lambert, L. Poulsen, P.R. Ogilby, Optical detection of singlet oxygen from single cells, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 4280-4293.

[15] J. Schlothauer, S. Hackbarth, B. Roder, A new benchmark for time-resolved detection of singlet oxygen luminescence - revealing the evolution of lifetime in living cells with low dose illumination, *Laser Physics Letters*. 6 (2009) 216-221.

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



[17] P.R. Ogilby, C.S. Foote, Chemistry of singlet oxygen. 36. Singlet molecular oxygen ( $^1\Delta_g$ ) luminescence in solution following pulsed laser excitation - solvent deuterium-isotope effects on the lifetime of singlet oxygen, J. Am. Chem. Soc. 104 (1982) 2069-2070.

[18] J.W. Snyder, E. Skovsen, J.D.C. Lambert, P.R. Ogilby, Subcellular, time-resolved studies of singlet oxygen in single cells, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 14558.



## **Capítulo 3**

### ***Uso de la hipericina en terapia fotodinámica in vitro aplicada sobre especies de Candida***

Capítulo versionado del artículo publicado: A. Rezusta, P. López-Chicón, M.P. Paz-Cristobal, M. Alemany-Ribes, D. Royo-Díez, M. Agut, C. Semino, S. Nonell, M.J. Revillo, C. Aspiroz, Y. Gilaberte, *In vitro* fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species, *Photochem Photobiol.* 88 (2012) 613-619



### 3.1 Introducción

*Candida* spp. es un habitante común de la boca, la garganta, el tracto digestivo, los genitales y la piel. Sin embargo, al ser un hongo oportunista puede convertirse en patógeno en presencia de determinados factores, produciendo infecciones que provocan desde lesiones cutáneas leves hasta candidiasis sistémicas severas [1]. De hecho, en pacientes inmunocomprometidos la candidiasis orofaríngea es una de las infecciones oportunistas más comunes [2,3].

Muchos fármacos antifúngicos, como el fluconazol, las equinocandinas o la anfotericina-B, están actualmente disponibles en el mercado, utilizándose uno u otro en función de la especie de *Candida* patógena a tratar y de la metodología clínica que se desee realizar. Se conoce que *Candida albicans* es la especie más susceptible a todas las familias de agentes antifúngicos y *Candida parapsilosis* es la que tiene los mayores índices de CMI (concentración mínima inhibitoria) en fármacos del tipo equinocandinas (antifúngicos que inhiben la síntesis de glucano en la pared celular) [4-6]. En cambio, *Candida krusei* es la especie más susceptible al fluconazol y a la flucitosina [3,7]. Estas terapias son eficaces, pero la recurrencia de la candidiasis es común. Otra problemática de estas terapias son los efectos adversos, como la resistencia a los antifúngicos, las interacciones de estos fármacos con otros tratamientos médicos y el deterioro de algunos órganos debido a la toxicidad que estos producen. Por ejemplo, la anfotericina-B es conocida por causar graves y letales efectos secundarios cuando se administra por vía intravenosa. La reducción de la toxicidad, mejorar la biodisponibilidad y la resistencia a los antifúngicos son problemáticas aún por solucionar de este tipo de tratamientos.

La TFD antifúngica se basa en el uso de un fármaco fotosensible que en presencia de oxígeno produce especies reactivas del oxígeno, mediante previa activación con luz de longitud de onda correspondiente a su espectro de absorción [8].

Debido a su naturaleza altamente oxidante, una vez generadas las EROs estas pueden posteriormente reaccionar con moléculas de su entorno directo causando la destrucción de las células diana [9,10]. La TFD antifúngica es un alternativa muy prometedora frente a los tratamientos antimicrobianos convencionales en infecciones tópicas [11], así como en el desarrollo de nuevos y eficaces fotosensibilizadores [12]. La TFA es un área de la medicina en constante investigación [13] ya que los FS aprobados actualmente han sido diseñados principalmente para aplicaciones en tratamientos oncológicos. Varios estudios han demostrado que *Candida* spp. puede ser sensibilizada de modo efectivo *in vitro* mediante la administración de fotosensibilizadores como fenotiazinas, porfirinas, ftalocianinas o el ácido aminolevulínico (precursor del FS protoporfirina IX, en el que acaba transformándose metabólicamente) [14-17]. Además de su eficacia contra los hongos en general, la TFD antifúngica ha puesto de manifiesto otros beneficios. En primer lugar, los FS utilizados son altamente selectivos. En segundo lugar, todos los FS investigados no tienen actividad genotóxica y mutagénica. Por último, aún no se ha dado ningún caso de cepas fúngicas resistentes a los FS [18-20].

La hipericina (Figura 3.1) es una naftodiantrona aromática policíclica aislada de ciertas especies de plantas del género *Hypericum* [21]. Las soluciones de hipericina en disolventes orgánicos muestran bandas de absorción en el espectro visible con máximos a 550 y 588 nm y bandas de emisión de fluorescencia alrededor de 600 nm, ambos en etanol [22]. En cambio, en soluciones acuosas la hipericina no se disuelve y forma agregados de alto peso molecular que no son fluorescentes debido a que las moléculas de hipericina empaquetadas pierden la posibilidad de rotar y emitir energía en forma de fluorescencia. Además, este FS puede asociarse a macromoléculas, como la polivinilpirrolidona o varios tipos de proteínas (ej. albúmina, fibras amiloides y lipoproteínas de baja densidad), produciendo monómeros fluorescentes en la región del rojo [23,24]. La hipericina es un prometedor agente oncológico en TFD, de hecho

se ha demostrado su utilidad en el diagnóstico o en la terapia de células tumorales de vejiga urinaria [25], cáncer nasofaríngeo [26], cáncer de piel de tipo no melanoma [27] o linfoma cutáneo [28] entre otros. Relacionado con su actividad antimicrobiana, se ha demostrado que varias especies de extractos de *Hypericum* tienen un efecto inhibitorio contra bacterias gram positivas, bacterias gram negativas y *C. albicans*, aunque sin activación previa del FS mediante luz [29]. La actividad de la hipericina como agente antiviral también ha sido estudiada en virus con envuelta, como el virus del herpes simple, en citomegalovirus o el VIH [30].

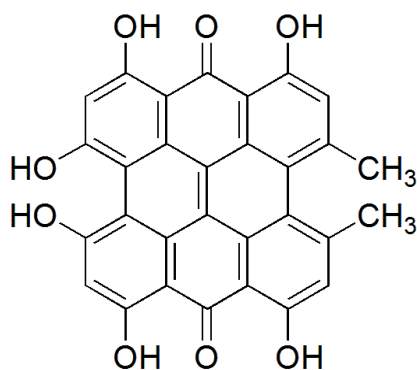


Figura 3.1. Estructura química de la hipericina

Debido a que el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la hipericina como antifúngico para TFD antifúngica *in vitro* contra varias especies patógenas de *Candida* que pueden provocar micosis superficiales, se evalúan también los posibles efectos secundarios sobre queratinocitos y fibroblastos humanos. Los queratinocitos son el tipo de célula predominante en la capa más externa de la epidermis y los fibroblastos son los principales componentes celulares de los tejidos conectivos y órganos del cuerpo. La capacidad de los fibroblastos para producir y organizar la matriz extracelular y, de comunicarse con otras células, las convierte en uno de los componentes principales del tejido dérmico [31].

## 3.2 Parte experimental

### 3.2.1 Cepas fúngicas y células humanas

Las cepas de levadura estudiadas en este capítulo son *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, y *Candida albicans* ATCC 10231, obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC: American Type Culture Collection; Rockville, MD) y *Candida albicans* CECT 1001 procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Universidad de Valencia, España).

Las células humanas que se han utilizado son queratinocitos (HaCaT: human adult high calcium low temperature) y fibroblastos (hNDF: human normal dermal fibroblasts), que se obtuvieron de la Universidad Autónoma de Madrid y del Hospital Central de Asturias, respectivamente.

### 3.2.2 Reactivos químicos

La hipericina (Hypericin<sup>®</sup>), el PBS (*Sterile dulbecco's Phosphate Buffered Saline* pH 7.4), el DMSO (dimetil sulfóxido) y el SDS (dodecil sulfato sódico) fueron comprados en SIGMA-Aldrich. La MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) fue adquirida en HWI Analytik GMBH (Ruelzheim, Alemania). El DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* 4.5 g/L glucosa), el FBS (*Fetal Bovine Serum*), la Penicilina Estreptomina, la L-glutamina para los ensayos biológicos con células humanas fueron obtenidos en Lonza (Sur América). El "Pierce BCA Protein Assay Kit" fue proporcionada por Thermo Scientific.

El medio de cultivo fúngico, agar de Sabouraud (SB), fue preparado a partir de Sabouraud Dextrose Agar<sup>®</sup>, comercializado por Oxoid. El medio de cultivo de células humanas (MCH) fue preparado a partir de DMEM suplementado con FBS 10%, Penicilina estreptomina 1% (v/v) y L-glutamina 2 mM. La hipericina stock fue



preparada en etanol (Alcohoce<sup>®</sup> 70<sup>o</sup>) o DMSO (Dimetilsulfóxido, Panreac<sup>®</sup>) y diluida con PBS (para experimentos con levaduras) o con MCH sin FBS (para experimentos con células humanas), hasta la concentración deseada. Las concentraciones de trabajo de hipericina se prepararon entre 0.032 hasta 640  $\mu\text{M}$  y se almacenaron a 4<sup>o</sup> C y a oscuras.

### 3.2.3 Fuentes de luz

Las distintas especies de *Candida* fueron irradiadas en el laboratorio microbiológico con una lámpara LED con emisión a  $602 \pm 10$  nm y una irradiancia de  $10.3 \text{ mW cm}^{-2}$ . Las células humanas fueron irradiadas en el laboratorio de cultivos celulares con una lámpara LED con una emisión a  $593 \pm 10$  nm y con una irradiancia de  $9 \text{ mW cm}^{-2}$ . Dado el amplio espectro de absorción de la hipericina, las pequeñas diferencias entre las dos fuentes de luz no tienen ninguna influencia sobre los resultados de las dos series de experimentos.

### 3.2.4 Inactivación fotosensibilizada de las suspensiones celulares fúngicas

Este ensayo (Figura 3.2) fue realizado por Manuel P. Paz-Cristobal<sup>b</sup> y dirigido por el Dr. Antonio Rezusta<sup>a,b</sup> y la Dra. Yolanda Gilaberte<sup>b,c</sup>, del Departamento de microbiología del Hospital universitario Miguel Servet<sup>a</sup>, del Instituto de Ciencias de la Salud de Aragón<sup>b</sup> y del Departamento de Dermatología del Hospital San Jorge de Huesca<sup>c</sup>.

Las suspensiones de cultivo ON de levadura cultivadas hasta alcanzar una turbidez de valor 0.5 o 4 en la escala de McFarland en agua destilada, fueron incubadas con diferentes concentraciones de hipericina (entre 0.325 a 640  $\mu\text{M}$ ) a oscuras y a 35<sup>o</sup> C durante diferentes períodos de tiempo (0, 15, 30 y 60 min, 3 y 24 h) para evaluar la influencia del tiempo de contacto en el tratamiento fotodinámico. Posteriormente, las células fueron irradiadas durante 30 o 60

minutos (18 o 37 J cm<sup>-2</sup>, respectivamente) y, posteriormente incubadas a 35° C durante 48 h. La viabilidad celular de las levaduras después del tratamiento fotodinámico con hipericina se evaluó mediante el recuento de las colonias para poder transformar los datos en ufc/mL [32]. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada condición. Los resultados se expresan como logaritmo de las cfu/mL frente a la concentración de hipericina, mediante la media ± desviación estándar. Los valores de concentración de hipericina se expresan como la media ± la desviación estándar. Las diferencias entre las medias se analizan mediante el test estadístico Mann-Whitney U-test. La significancia estadística se asume a P<0.05.

### 3.2.5 Efectos secundarios: tratamiento fotodinámico en células humanas

La viabilidad celular se evalúa mediante el ensayo de la MTT. Se cultivan los HaCaT y hNDF (~2·10<sup>6</sup> y 1·10<sup>6</sup> células respectivamente) durante 2 días a 37° C y 5% CO<sub>2</sub> en placas de 48 pocillos. Se adicionan concentraciones crecientes de hipericina (0, 0.5, 1, 5 y 10 µM) y se irradian durante 15, 30 y 60 min (fluencia de 8, 18 y 37 J cm<sup>-2</sup>, respectivamente). Se elimina el exceso de FS, se adiciona medio de cultivo fresco y pasadas 24 horas se incuban las células con MTT (0.5 mg mL<sup>-1</sup> en PBS) durante 3 horas a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Se aspira la MTT, se añaden 500 µL de DMSO y se agita durante 15 min para posteriormente leer la absorbancia a 550 nm mediante un lector de microplacas (Biotek ELx808).

### 3.2.6 Incorporación de hipericina en levaduras

La evaluación de la incorporación de la hipericina en las levaduras se obtiene mediante medidas de fluorescencia del lisado celular. Se centrifuga la suspensión stock de levadura (~10<sup>6</sup> ufc/mL) a 1398 g durante 3 min y se lava con PBS para eliminar el medio de cultivo. Se adiciona hipericina 2.5 µM y se incuban las muestras, con agitación y a oscuras, a distintos periodos de tiempo (de 30 minutos a 24 horas) a

37° C. Para cada tiempo de incorporación, se realizan tres lavados con PBS para eliminar el exceso de hipericina y posteriormente se adiciona al pellet 1 mL de SDS (2% (w/v) en agua) y se agita durante 24 horas, a oscuras y a temperatura ambiente para obtener el lisado celular. La cantidad de hipericina incorporada por las células se obtiene por espectroscopia de fluorescencia del lisado celular, excitando a 530 nm y registrando la señal de emisión entre 550 y 750 nm (espectrofluorímetro FluoroMax Jobin Yvon-Spex 4). Para obtener la fluorescencia del lisado celular se calcula el área bajo la curva del espectro de emisión por integración. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada condición.

### 3.2.7 Incorporación de hipericina en células humanas

Del mismo modo que en levaduras, la incorporación de la hipericina en células humanas se obtuvo mediante medidas de fluorescencia del lisado celular. Se cultivan los queratinocitos y los fibroblastos durante dos días a 37° C y 5% CO<sub>2</sub> hasta obtener una densidad celular de  $\sim 2 \cdot 10^6$  y  $1 \cdot 10^6$  células por pocillo, respectivamente. Se retira el medio de cultivo mediante lavados con PBS, se adiciona hipericina 2.5  $\mu$ M en DMEM y se incuban a oscuras durante distintos periodos de tiempo (de 30 minutos a 24 horas) a 37 ° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para cada tiempo de incorporación, se realizan tres lavados con PBS para eliminar el exceso de hipericina. Posteriormente se desprenden las células mediante raspado, se resuspenden en 1 mL de SDS (2% (w/v) en agua) y se agitan durante 24 horas a oscuras y a temperatura ambiente. La cantidad de hipericina incorporada por las células se obtiene por espectroscopia de fluorescencia como se ha descrito anteriormente en levaduras. Con la finalidad de corregir las variaciones entre las muestras debido al crecimiento celular independiente entre pocillos, se normalizan los valores de intensidad de fluorescencia obtenida para cada muestra por el número total de células en cada pocillo (Pierce BCA Protein Assay Kit [33]). Los experimentos se realizaron por triplicado para cada condición.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Inactivación fotosensibilizada de las suspensiones celulares fúngicas

Para este ensayo, se adoptó el criterio que define la actividad bactericida para definir la actividad fungicida, es decir, se considera un efecto fungicida cuando se logra una reducción del 99.9% o de  $3 \log_{10}$  de las ufc/mL. Así, si se parte de un inoculo inicial de células fúngicas de turbidez equivalente al número 0.5 McFarland ( $\sim 10^6$  ufc/mL) se obtiene una reducción del 99.9% o de  $3 \log_{10}$  ufc/mL cuando tras el tratamiento ninguna colonia se desarrolla sobre el agar de cultivo. Este criterio ha sido utilizado previamente para evaluar la actividad antifúngica de fotosensibilizadores frente a *Candida* spp. [34]. Con el fin de evaluar el alcance de la técnica, se adoptó también un criterio más estricto con una reducción del 99.9999% o de  $6 \log_{10}$  de las ufc/mL, partiendo de un inoculo inicial de 4 McFarland ( $\sim 10^7$  ufc/mL) de las células fúngicas.

El tratamiento fotodinámico con hipericina inhibió el crecimiento de las diferentes cepas de *Candida* produciendo un efecto fungicida. El control de citotoxicidad de la hipericina realizado en ausencia de luz dio como resultado una inactivación menor al 10% en todas las levaduras, exceptuando el experimento realizado con *C. krusei* a la concentración mayor de hipericina debido a la alta cantidad de DMSO procedente de la disolución stock de FS.

El efecto del tiempo de preincubación de las células de *Candida* spp. con hipericina antes de irradiar demostró que un tiempo de incubación corto (<1 min) es suficiente para producir fotoinactivación en todas las cepas (Figura 3.2). Los tiempos de incubación que fueron estudiados (0, 15, 30, 60 min, 3 y 24 h) no provocaron aumento en la eficacia del tratamiento fotodinámico.

En la Figura 3.2 puede observarse el efecto fototóxico que presenta la hipericina frente a todas las especies de *Candida*, siendo el grado de fotoinactivación celular dependiente de la especie de *Candida* que se desea inactivar, la concentración del FS o en algún caso la dosis de luz recibida.

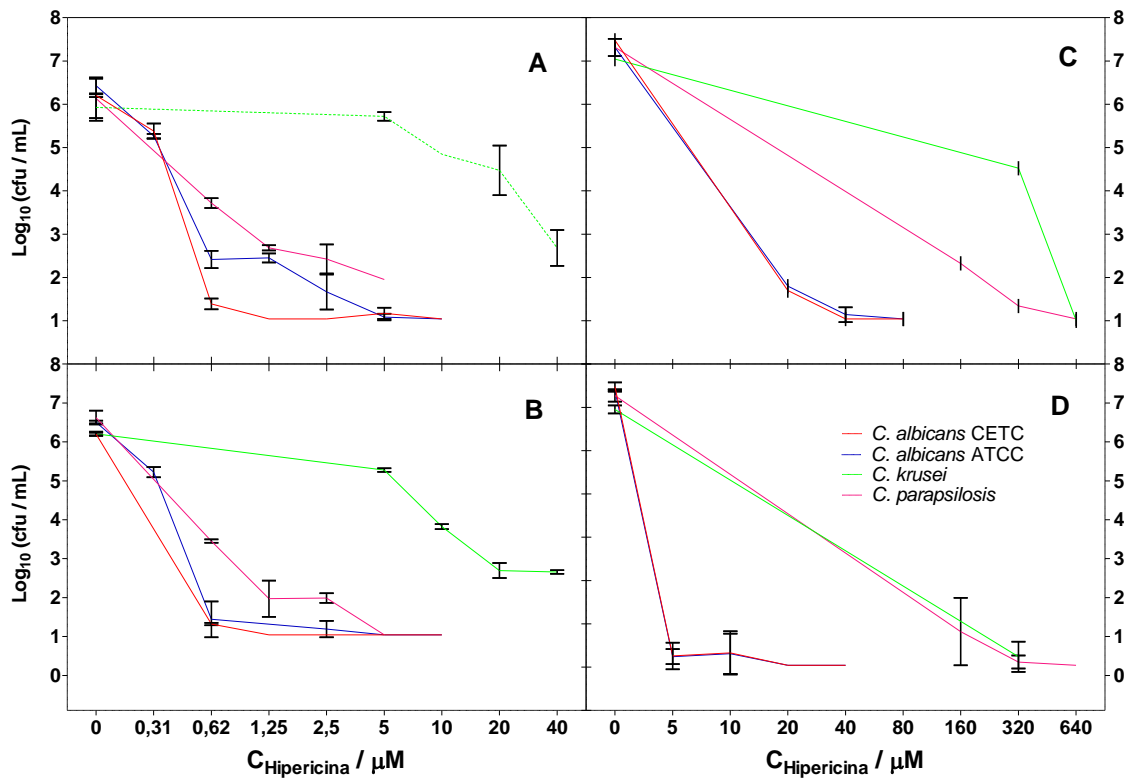


Figura 3.2. Efecto de la fluencia y la concentración de hipericina sobre la fotoinactivación de especies de *Candida*. Los gráficos (A) y (B) se refieren a los experimentos con valores iniciales de 0.5 McFarland (A:  $18 \text{ J cm}^{-2}$ , B:  $37 \text{ J cm}^{-2}$ ), mientras que los paneles (C) y (D) se refieren a los experimentos a partir de los valores iniciales de 4.0 McFarland (C:  $18 \text{ J cm}^{-2}$ , D:  $37 \text{ J cm}^{-2}$ )

A partir de valores iniciales de 0.5 McFarland, se obtuvo un efecto fungicida de 3  $\text{log}_{10}$  en las dos cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, a concentraciones de hipericina inferiores a 0.625 y 1.25  $\mu\text{M}$ , respectivamente, y tanto para fluencias de luz

de 18 y 37 J cm<sup>-2</sup>. Una mayor concentración de hipericina, 40 µM con una fluencia de 18 J cm<sup>-2</sup> o 20 µM con 37 J cm<sup>-2</sup>, fue necesaria para producir un efecto fungicida de 3 log<sub>10</sub> en *C. krusei*. La concentraciones de hipericina necesarias para obtener un efecto fungicida de 3 log<sub>10</sub> para valores de 0.5 y 4.0 McFarland no fueron significativamente diferentes para ambas cepas de *C. albicans* ( $P > 0,1$ ) pero si lo fueron para *C. parapsilosis* ( $P < 0,002$ ) y *C. krusei* ( $P < 0,05$ ), tanto a 18 y 37 J cm<sup>-2</sup> para todas las cepas.

Para producir un efecto fungicida de 6 log<sub>10</sub> en de la viabilidad celular de las levaduras, a partir de valores iniciales de 4.0 McFarland, fue necesario aumentar la concentración de hipericina, así como la dosis de luz (Figura 3.2). Este incremento fue menor para ambas cepas de *C. albicans*. (5 µM y 37 J cm<sup>-2</sup>) que para *C. parapsilosis* (320 µM y 37 J cm<sup>-2</sup>) o *C. krusei* (320 µM y 37 J cm<sup>-2</sup>). Las concentraciones de hipericina necesarias para producir una reducción en la viabilidad celular de 3 o 6 log<sub>10</sub> a partir de valores de 4.0 McFarland fueron significativamente diferentes para todas las cepas, tanto para fluencias de 18 o 37 J cm<sup>-2</sup> ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.2 Efectos secundarios: tratamiento fotodinámico en células humanas

Una vez identificadas las condiciones que producen la muerte celular en las levaduras, se evalúa el efecto del tratamiento fotodinámico en HaCaT y hNDF (Figura 3.3). Los resultados muestran que la viabilidad en células humanas es superior al 90% en las mismas condiciones que se necesitan para fotoinactivar las dos cepas de *C. albicans*. En el caso de *C. krusei* y *C. parapsilosis*, si se aplican las mismas condiciones de fotoinactivación de estas especies, se produce inevitablemente daño celular sobre los hNDF y los HaCaT. Sin embargo, la toxicidad a oscuras de la hipericina sobre estas células es prácticamente insignificante.

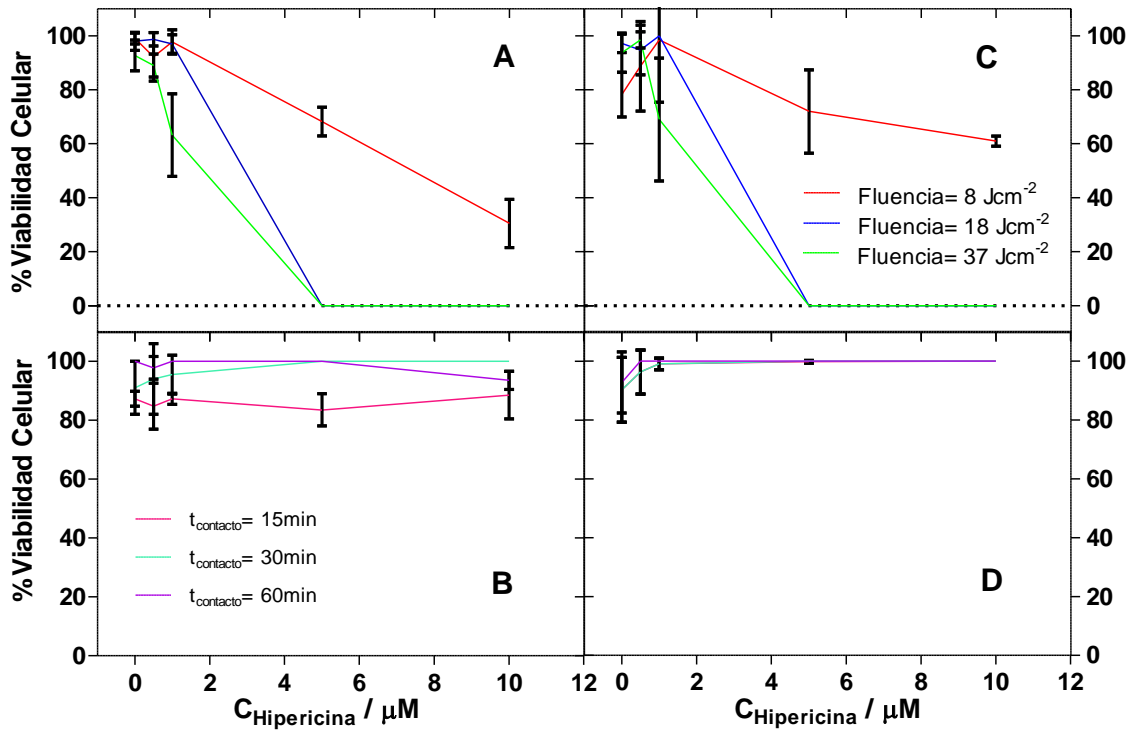


Figura 3.3. Viabilidad celular de HaCaT (A) y hNDF (C) después de la fotoinactivación a diferentes concentraciones de hipericina y a diferentes fluencias (rojo: 8  $\text{J cm}^{-2}$ ; azul: 18  $\text{J cm}^{-2}$ ; verde: 37  $\text{J cm}^{-2}$ ). También se muestra la toxicidad a oscuras en las mismas condiciones para los HaCaT (B) y hNDF (D) durante distintos tiempos de contacto (rosa: 15 min, turquesa: 30 min, lila: 60 min)

Para cada ensayo, los controles de toxicidad del FS (sin luz) y de la luz (sin FS) se realizaron con la misma concentración de hipericina y dosis de luz, respectivamente. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada condición. Los resultados se expresan como logaritmo de las cfu/mL frente a la concentración de hipericina, mediante la media  $\pm$  desviación estándar.

### 3.3.3 Incorporación de hipericina en levaduras

A continuación (Figura 3.4) se muestran los gráficos de incorporación de hipericina en función del tiempo obtenidos para todas las especies de *Candida* estudiadas:

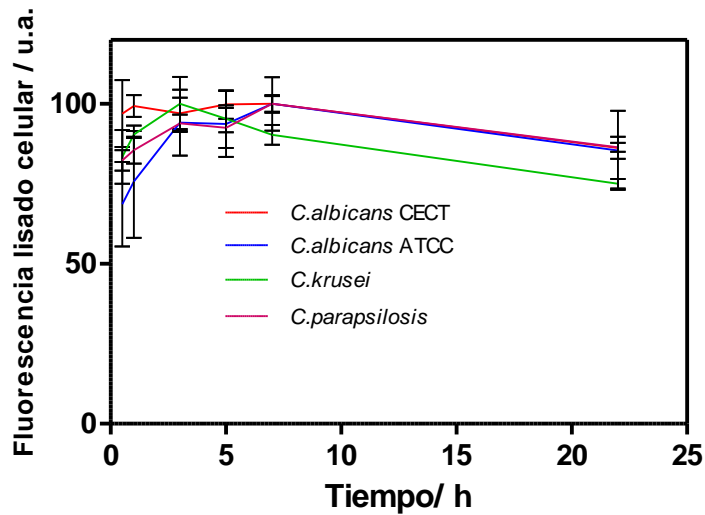


Figura 3.4. Evolución temporal de la incorporación de hipericina por levaduras. *C. albicans* CECT 1001 (rojo), *C. albicans* ATCC 10231 (azul), *C. krusei* (verde) y *C. parapsilosis* (rosa), expresado como fluorescencia del lisado celular normalizada.

Tal y como muestra la Figura 3.4, la absorción para todas las levaduras va aumentando de manera constante hasta las 7 h, donde se produce un máximo y a partir del cual va disminuyendo levemente la incorporación de hipericina hasta las 22 h monitorizadas.



### 3.3.4 Incorporación de hipericina en células humanas

A continuación (Figura 3.5) se muestran los gráficos de incorporación de hipericina en función del tiempo obtenidos para ambas líneas celulares humanas:

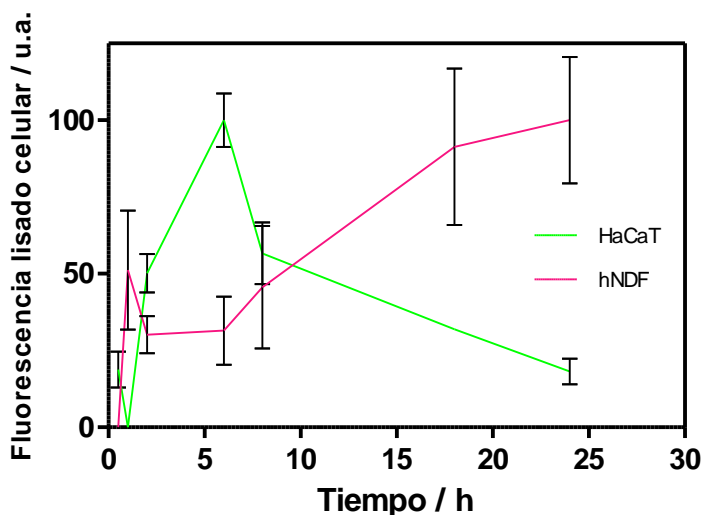


Figura 3.5. Evolución temporal de la incorporación de hipericina en HaCaT (verde) y hNDF (rosa), expresado como fluorescencia del lisado celular normalizado por el número de células.

Tal y como muestra la Figura 3.5, la incorporación de hipericina por las células humanas HaCaT muestra un aumento gradual en la absorción hasta las 6 horas, momento en el que se observa un máximo. Posteriormente, la incorporación del FS disminuye con el tiempo, probablemente debido a la expulsión o metabolización del FS por las células. Para los hNDF, la absorción aumenta de modo constante con el tiempo de contacto, con un máximo transitorio alrededor de 1 hora.

### 3.4 Discusión

La utilidad de la TFD en la inactivación de microorganismos patógenos está siendo reconocida cada vez más, siendo la evaluación de distintos FSs el objeto de este estudio. La hipericina es interesante debido a que es un producto natural ya utilizado en la medicina tradicional y conocido por sus propiedades fotosensibilizantes. Este trabajo demuestra que todas las especies de *Candida* que se han estudiado pueden ser fotoinactivadas con éxito utilizando hipericina como FS. Sin embargo se dan diferencias en la susceptibilidad entre las especies, siendo *C. albicans* las más susceptibles y *C. krusei* la más resistente. Por otra parte, el presente estudio también demuestra que la hipericina fotosensibiliza las levaduras rápidamente, es decir, inmediatamente después de la adición de este FS a las células. Así que, aumentar el tiempo de preincubación no aumenta la eficiencia en el tratamiento, de acuerdo con las observaciones de otros FS [35].

En cuanto a la dosis de luz fungicida, la fluencia efectiva mínima necesaria para alcanzar un efecto fungicida de  $3 \log_{10}$  fue de  $18 \text{ J cm}^{-2}$ , tanto para *C. albicans* como para *C. parapsilosis*, tal y como sucede en otros estudios bibliográficos con otros FS [36]. El control realizado solo con luz (602 nm) y sin FS no provocó ningún efecto considerable sobre las levaduras, de acuerdo con otros trabajos [20,36], a pesar de que Souza *et al.* [17] encontró que a energías de irradiación bajas ( $15.8$  y  $39.5 \text{ J cm}^{-2}$ ) a 660 nm se producía un efecto antimicótico en *C. albicans*.

Los estudios biológicos *in vitro* demuestran que la hipericina induce un efecto fototóxico considerable sobre los queratinocitos y fibroblastos humanos en función de la concentración del FS y dosis de luz. Sin embargo, es posible utilizar la hipericina en TFD antifúngica siempre y cuando la concentración y la dosis de luz se mantengan por debajo de  $1 \text{ }\mu\text{M}$  y  $37 \text{ J cm}^{-2}$ , respectivamente. Estos resultados *in vitro* son consistentes con datos clínicos [28] obtenidos en pacientes sanos tratados con

hipericina administrada vía tópica, donde la dosis de luz fototóxica mínima fue de  $4 \text{ J cm}^{-2}$ .

El tratamiento fotodinámico debe preservar el tejido del paciente y los procesos inflamatorios locales de las zonas infectadas, siendo la función de éstos últimos la de proteger y reparar las áreas dañadas. Dicha función la desempeñan los leucocitos [37], en particular los neutrófilos (glóbulos blancos del tipo granulocito que se encargan de fagocitar bacterias y hongos). En este sentido, se ha demostrado recientemente que algunos FS, como el azul de toluidina-O o el azul de metileno, no dañan a los neutrófilos, obteniéndose un efecto terapéutico considerable *in vivo* en infecciones microbianas localizadas [38]. En el caso de hipericina, otros estudios han demostrado que la formación de superóxido, procedente del mecanismo tipo I, no afecta a los neutrófilos porque es inhibido mediante mecanismos de fotosensibilización oxígeno-dependientes [39]. Por lo tanto, queda por comprobar si las condiciones necesarias para impedir la función de los neutrófilos impide un efecto fungicida eficaz.

En el presente estudio se compara por primera vez la capacidad fungicida de la hipericina en TFD usando el criterio de valoración microbiológica de reducción de  $3 \log_{10}$  de ufc/mL [34] con el criterio aún más estricto de reducción de  $6 \log_{10}$ . Las diferencias en las concentraciones de hipericina necesarias para lograr cada uno de los valores de reducción logarítmica son estadísticamente significativas para todas las cepas y para todas las fluencias de luz. Según los datos obtenidos, las infecciones producidas por *C. albicans*, la especie más frecuente implicada en infecciones clínicas causadas por levaduras, podría ser tratada mediante TFD antifúngica con hipericina reduciendo *in vitro*  $3 \log_{10}$ , pero no  $6 \log_{10}$ , causando un daño mínimo sobre las células cutáneas humanas. En el caso de la especie *C. parapsilosis*, sólo la reducción de  $3 \log_{10}$  a partir de los valores de 0.5 McFarland, podría obtenerse sin inducir fototoxicidad significativa sobre las células cutáneas. Es discutible si es realmente necesario eliminar por completo toda la infección fúngica aplicando un solo tratamiento

de TFD antifúngica o si es mejor usar dosis más bajas en sucesivos tratamientos de esta terapia, con la finalidad de preservar el tejido dérmico del paciente

En el presente estudio, se compara el efecto fungicida *in vitro* de la hipericina aplicando TDF sobre especies de *Candida* a partir de inóculos iniciales de levadura de distinto valor, 0.5 y 4 McFarland. Según los resultados obtenidos, el valor del inóculo inicial a partir del cual se realizan los experimentos es una variable que influye en la eficacia de la TFD antifúngica. Sin embargo, las especies de *C. albicans* parecen ser especialmente sensibles a la hipericina sin diferencias significativas en la concentración de FS cuando se da una reducción de  $3 \log_{10}$  tanto partiendo de un inóculo inicial de 0.5 o bien de 4 McFarland. Este resultado podría ser un valor añadido para apoyar el uso clínico de la hipericina en TFD antifúngica para las infecciones causadas por *C. albicans*.

Anteriormente se ha publicado para otros FSs la distinta susceptibilidad a la TFD antifúngica que presentan diversas especies de *Candida*, siendo *C. albicans* la especie más sensible [36]. Por ejemplo, Bliss *et al.* [40] encontró que la *C. glabrata* muestra menor sensibilidad a la fotoinactivación que *C. albicans*. Esto se ha atribuido a la limitación del área de contacto entre las células de *C. glabrata* y el FS [3,41] debido al fenómeno de la coadhesión de los blastoconidios.

En cuanto a la incorporación celular del FS, el tiempo de incubación con hipericina antes de la irradiación no aumenta el efecto fungicida de la TFD, aunque la incorporación va aumentando en todas las levaduras antes de las 24 h de incubación. Así que, según estos datos, la incorporación de hipericina no se correlaciona con su fototoxicidad. Teniendo en cuenta que la localización subcelular del FS es fundamental para el resultado terapéutico de la TFD antifúngica y que la hipericina es capaz de focalizarse en la membrana celular rápidamente, podrían también afectar factores relacionados con los cambios en la distribución intracelular del FS [42].

Por otro lado, también se ha observado que a pesar de que la incorporación de hipericina por *C. parapsilosis* fue superior a la de cepas de *C. albicans*, el efecto fototóxico fue mayor en esta última. Estos resultados son consistentes con los publicados por Mikeš *et al.* [43], quien demostró que a pesar de la mayor acumulación de hipericina en células epiteliales de colon humanas respecto a las células de adenocarcinoma de colon HT-29, los efectos citotóxicos fueron más pronunciados en esta última línea celular.

Anteriormente, otros estudios han demostrado la actividad *in vitro* de distintos FS contra *Candida* spp. [15,17, 20, 35, 36, 44-46]. Sin embargo, es difícil comparar los resultados obtenidos en este capítulo con los de estos estudios anteriores ya que las especies o cepas de *Candida* y las condiciones de fotoactivación fueron distintas [17,36]. Otros FS con reconocido efecto fotodinámico antimicrobiano, tales como azul de metileno [17], el azul de toluidina [47], el ALA [15] o el BAM-SiPc [35] requieren concentraciones más altas y mayores tiempos de incubación para lograr el mismo efecto fungicida (reducción de 3 log<sub>10</sub>) en *C. albicans* que lo que se requiere en el presente estudio utilizando hipericina como FS [20]. Por lo tanto, la hipericina parece responder a muchas de las cualidades necesarias para poder ser utilizada en PDT contra algunas levaduras.

### 3.5 Conclusiones

Este estudio muestra que la hipericina, como FS para TFD antifúngica, está dotada de potencial antifúngico frente a *Candida* spp., aunque la susceptibilidad depende de la especie. Teniendo en cuenta la selectividad de esta terapia y de acuerdo con los experimentos obtenidos *in vitro*, sólo *C. albicans* puede ser efectivamente dañada sin causar daño considerable sobre las células epidérmicas humanas, como los queratinocitos y los fibroblastos. Por ello, la investigación con este fármaco en infecciones experimentales o ensayos clínicos queda justificada para evaluar su potencial en el tratamiento de infecciones causadas por esta levadura *in vivo*.

### **3.6 Agradecimientos**

Agradecimientos al Dr. Antonio Rezusta<sup>a,b</sup>, a Manuel P. Paz-Cristobal<sup>b</sup>, a David Royo Díez<sup>b</sup>, a la Dra. M<sup>a</sup> José Reville<sup>a</sup>, a la Dra. Carmen Aspiroz<sup>b,c</sup> y a la Dra. Yolanda Gilaberte<sup>b,d</sup>, del Departamento de microbiología del Hospital universitario Miguel Servet<sup>a</sup>, del Instituto de Ciencias de la Salud de Aragón<sup>b</sup>, del Departamento de Microbiología del Hospital Royo Villanova de Zaragoza<sup>c</sup> y del Departamento de Dermatología del Hospital San Jorge de Huesca<sup>d</sup>, quienes aportaron a este trabajo los resultados de viabilidad celular en levaduras.

### 3.7 Referencias

[1] J. Rex, T. Walsh, J. Sobel, S. Filler, P. Pappas, W. Dismukes, J. Edwards, Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America, Clin. Infect. Dis. 30 (2000) 662-678.

[2] B. Lasker, C. Elie, T. Lott, A. Espinel-Ingroff, L. Gallagher, R. Kuykendall, M. Kellum, W. Pruitt, D. Warnock, D. Rimland, M. McNeil, E. Reiss, Molecular epidemiology of *Candida albicans* strains isolated from the oropharynx of HIV-positive patients at successive clinic visits, Med. Mycol. 39 (2001) 341-352.

[3] J. Vazquez, Invasive oesophageal candidiasis: current and developing treatment options, Drugs. 63 (2003) 971-989.

[4] B. Almirante, D. Rodríguez, B. Park, M. Cuenca-Estrella, A. Planes, M. Almela, J. Mensa, F. Sanchez, J. Ayats, M. Gimenez, P. Saballs, S. Fridkin, J. Morgan, J. Rodriguez-Tudela, D. Warnock, A. Pahissa, Group, B. C. P. S., Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from population-based surveillance, J. Clin. Microbiol. 43 (2005) 1829-1835.

[5] M. Pfaller, D. Diekema, R. Jones, H. Sader, A. Fluit, R. Hollis, S. Messer, S.P. Group, International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. J. Clin. Microbiol. 39 (2001) 3254-3259.

[6] J. Vazquez, M. Lynch, J. Sobel, *In vitro* activity of a new pneumocandin antifungal agent, L-733,560 against azole-susceptible and resistant *Candida* and *Torulopsis* species, Antimicrob. Agents Chemother. 39 (1995) 2689-2691.



[7] S. Yoon, J. Vazquez, P. Steffan, J. Sobel, R. Akins, High-frequency, *in vitro* reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 836-845.

[8] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889-905.

[9] G. Jori, C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppellotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti, G. Roncucci, Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications, *Lasers Surg. Med.* 38 (2006) 468-481.

[10] T. Wustrow, Mechanisms of phototoxic effects in photodynamic therapy *Adv. Otorhinolaryngol.* 49 (1995) 31-35.

[11] R.F. Donnelly, P.A. McCarron, M.M. Tunney, Antifungal photodynamic therapy, *Microbiol. Res.* 163 (2008) 1-12.

[12] S.K. Sharma, T. Dai, G.B. Kharkwal, Y.Y. Huang, L. Huang, V.J. De Arce, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models, *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 1303-1319.

[13] T. Demidova, M. Hamblin, Photodynamic therapy targeted to pathogens, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 17 (2004) 245-254.

[14] Z. Jackson, S. Meghji, A. MacRobert, B. Henderson, M. Wilson, Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial, *Lasers Med. Sci.* 14 (1999) 150-157.

[15] G. Monfrecola, E. Procaccini, M. Bevilacqua, A. Manco, G. Calabro, P. Santoianni, *In vitro* effect of 5-aminolaevulinic acid plus visible light on *Candida albicans*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (2004) 419-422.

[16] M. Paardekooper, A. De Bruijne, A. Van Gompel, R. Verhage, D. Averbeck, T. Dubbelman, P. Van den Broek, Single strand breaks and mutagenesis in yeast induced by photodynamic treatment with chloroaluminum phthalocyanine, J. Photochem. Photobiol. B. 40 (1997) 132-140.

[17] R. Souza, J. Junqueira, R. Rossoni, C. Pereira, E. Munin, A. Jorge, Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*, Lasers Med. Sci. 25 (2009) 385-389.

[18] P. Calzavara-Pinton, M. Venturini, R. Sala, A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin J Photochem. Photobiol. B: Biology. 78 (2005) 1-6.

[19] N.S. Soukos, L.A. Ximenez-Fyvie, M.R. Hamblin, S.S. Socransky, T. Hasan, Targeted antimicrobial photochemotherapy, Antimicrob. Agents Chemother. 42 (1998) 2595-2601.

[20] B. Zeina, J. Greenman, W.M. Purcell, B. Das, Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy, Br. J. Dermatol. 144 (2001) 274-278.

[21] N. Durán, P. Song, Hypericin and its photodynamic action, Photochem. Photobiol. 43 (1986) 677-680.

[22] T. Kiesslich, B. Krammer, K. Plaetzer, Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy Curr. Med. Chem. 13 (2006) 2189-2204.

[23] A. Kubin, P. Meissner, F. Wierrani, U. Burner, A. Bodenteich, A. Pytel, N. Schmeller, Fluorescence diagnosis of bladder cancer with new water soluble hypericin

bound to polyvinylpyrrolidone: PVP-hypericin. *Photochem. Photobiol.* 84 (2008) 1560-1563.

[24] A. Sgarbossa, D. Buselli, F. Lenci, *In vitro* perturbation of aggregation processes in beta-amyloid peptides: a spectroscopic study, *FEBS Lett.* 582 (2008) 3288-3292.

[25] M. Olivo, W. Lau, V. Manivasager, R. Bhuvanewari, Z. Wei, K. Soo, C. Cheng, P. Tan, Novel photodynamic diagnosis of bladder cancer: ex vivo fluorescence cytology using hypericin, *Int. J. Oncol.* 23 (2003) 1501-1504.

[26] M. Olivo, H. Du, B. Bay, Hypericin lights up the way for the potential treatment of nasopharyngeal cancer by photodynamic therapy, *Curr. Clin. Pharmacol.* 1 (2006) 217-222.

[27] D. Kacerovská, K. Pizinger, F. Majer, F. Smíd, Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical hypericum perforatum extract, *Photochem. Photobiol.* 84 (2008) 779-785.

[28] A.H. Rook, G.S. Wood, M. Duvic, E.C. Vonderheid, A. Tobia, B. Cabana, A phase II placebo-controlled study of photodynamic therapy with topical hypericin and visible light irradiation in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and psoriasis *J. Am. Acad. Dermatol.* 63 (2010) 984-990.

[29] L. Pistelli, A. Bertoli, S. Zucconelli, I. Morelli, L. Panizzi, F. Menichini, Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*, *Fitoterapia.* 71 (2000) S138-S140.

[30] G. Lavie, Y. Mazur, D. Lavie, A. Prince, D. Pascual, L. Liebes, B. Levin, D. Meruelo, Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components, *Transfusion.* 35 (1995) 392-400.

[31] J.M. Sorrell, A.I. Caplan, Fibroblasts-a diverse population at the center of it all, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 276 (2009) 161-214.

[32] T.C. Pagonis, J. Chen, C.R. Fontana, H. Devalapally, K. Ruggiero, X. Song, F. Foschi, J. Dunham, Z. Skobe, H. Yamazaki, R. Kent, A.C. Tanner, M.M. Amiji, N.S. Soukos, Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy *J. Endod.* 36 (2010) 322-328.

[33] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76-85.

[34] E. Ernst, K. Yodoi, E. Roling, M. Klepser, Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitanae* determined by microdilution, Etest, and time-kill methods., *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 578-581.

[35] C. So, P. Tsang, P. Lo, C. Seneviratne, L. Samaranayake, W. Fong, Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by BAM-SiPc, *Mycoses.* 53 (2010) 215-220.

[36] L. Dovigo, A. Pavarina, E. de Oliveira Mima, E. Giampaolo, C. Vergani, V. Bagnato, Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*, *Mycoses.* 54 (2009) 123-130.

[37] K. Moghissi, Can Surgical Site Infection (SSI) be treated by photodynamic therapy (PDT)? *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 7 (2010) 1-2.

[38] M. Tanaka, M. Kinoshita, Y. Yoshihara, N. Shinomiya, S. Seki, K. Nemoto, Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils, *Photochem Photobiol.* 88 (2012) 227-232.

[39] T. Nishiuchi, T. Utsumi, T. Kanno, Y. Takehara, H. Kobuchi, T. Yoshioka, A.A. Horton, T. Yasuda, K. Utsumi, Inhibition of neutrophil superoxide generation of hypericin, an antiretroviral agent, *Arch Biochem Biophys.* 323 (1995) 335-342.

[40] J.M. Bliss, C.E. Bigelow, T.H. Foster, C.G. Haidaris, Susceptibility of *Candida* Species to photodynamic effects of Photofrin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 2000-2006.

[41] A. Espinel-Ingroff, M. Pfaller, S.A. Messer, C.C. Knapp, N. Holliday, S.B. Killian, Multicenter comparison of the Sensititre Yeast: One colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp., *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 718-721.

[42] Y.F. Ho, M.H. Wu, B.H. Cheng, Y.W. Chen, M.C. Shih, Lipid-mediated preferential localization of hypericin in lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1788 (2009) 1287-1295.

[43] J. Mikeš, M. Hýždřalová, L. Kočí, R. Jendželovský, J. Kovař, A. Vaculová, J. Hofmanová, A. Kozubík, P. Fedoročko, Lower sensitivity of FHC fetal colon epithelial cells to photodynamic therapy compared to HT-29 colon adenocarcinoma cells despite higher intracellular accumulation of hypericin. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10 (2011) 626-632.

[44] M.P. Cormick, M.G. Alvarez, M. Rovera, E.N. Durantini, Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1592-1599.

[45] M. Lam, P.C. Jou, A.A. Lattif, Y. Lee, C.L. Malbasa, P.K. Mukherjee, N.L. Oleinick, M.A. Ghannoum, K.D. Cooper, E.D. Baron, Photodynamic therapy with Pc 4 induces apoptosis of *Candida albicans*, *Photochem. Photobiol.* 87 (2011) 904-909.

[46] S.A. Lambrechts, M.C. Aalders , J. Van Marle, Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. Antimicrob. Agents. Chemother. 49 (2005) 2026-2034.

[47] G. Carvalho, M. Felipe, M. Costa, The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions J. Microbiol. 47 (2009) 619-623.

# Capítulo 4

## ***Mecanismo de fotoinactivación de especies de Candida por hipericina***

Capítulo versionado del artículo publicado: P. López-Chicón, M.P. Paz-Cristobal, A. Rezusta, C. Aspiroz, M. Royo-Cañas, E. Andres-Ciriano, YI Gilaberte, M. Agut, S. Nonell, On the mechanism of *Candida* spp photoinactivation by hypericin, Photochem Photobiol Sci. 11 (2012) 1099-107





## 4.1 Introducción

La hipericina se ha estudiado como posible fármaco para el tratamiento de diversos tipos de cáncer [1-4], como agente antiviral [5] o como antibacteriano [6,7]. Recientemente, en la presente tesis doctoral también se han realizado estudios que demuestran que mediante la TFD antifúngica algunas especies patógeno-oportunistas de *Candida*, como *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, pueden ser inactivadas por este FS [8].

La hipericina (Figura 4.1) en estado monomérico tiene un alto rendimiento cuántico de formación de estado triplete (0.5 - 0.7) [9,10] y, consecuentemente, la capacidad de foto-oxidar sustratos biológicos a través de mecanismos de tipo I y tipo II [11]. Mediante distintas técnicas fotoquímicas o de microscopía es posible monitorizar los intermedios radicales generados tanto en reacciones de hidrógeno o transferencia de electrones, la formación de oxígeno singlete molecular ( $^1\text{O}_2$ ) mediante el proceso de transferencia de energía [12] o bien los procesos de desactivación de los estados excitados del FS.

De este modo, estas técnicas permiten el estudio y la comprensión del mecanismo que sucede al aplicar la TFD antifúngica, la posible localización del FS intracelular debido a que la cinética del proceso es función del microambiente o bien que tipo de radical libre es el responsable del daño celular durante el proceso de fotosensibilización del microorganismo.

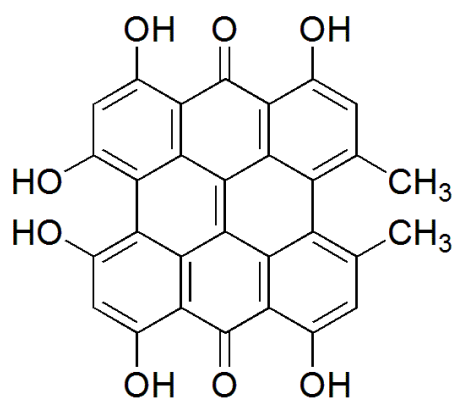


Figura 4.1. Estructura química de la hipericina

El objetivo de este capítulo es describir y profundizar en el mecanismo de la fotoinactivación de *Candida* spp. utilizando hipericina como FS, con el fin de identificar las especies intermedias implicadas en el proceso y los factores que podrían explicar la diferente susceptibilidad de las especies de *Candida* a la TFD antifúngica.

## 4.2 Parte experimental

### 4.2.1 Cepas fúngicas

Las cepas de levadura que se han utilizado en este capítulo son *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida albicans* ATCC 10231), que fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC: American Type Culture Collection; Rockville, MD).

### 4.2.2 Reactivos químicos

La hipericina (Hypericin<sup>®</sup>), el PBS (*Sterile Dulbecco's phosphate-buffered saline* pH 7.4), el DMSO (dimetilsulfóxido), la catalasa y el superóxido dismutasa fueron comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), mientras que la azida sódica, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el etanol (Alcohocel<sup>®</sup> 70<sup>o</sup>) en Panreac (España). El MitoTracker Green<sup>®</sup> (MTG, Ref. M7514), el CellTracker Green<sup>®</sup> (CTC, Ref. C2925) y el DAPI (Ref. D3571) fueron comprados en Molecular Probes (InvitrogenT, USA).

El medio de cultivo fúngico, Sabouraud (SB), fue preparado a partir de Sabouraud Dextrose Agar<sup>®</sup> (Merck). El óxido de deuterio (D<sub>2</sub>O, 99.9%) fue comprado en Solvents Documentation Synthesis (Peypin, Francia). El PBS deuterado fue preparado disolviendo el PBS en el óxido de deuterio. La hipericina stock fue preparada en etanol o DMSO, y diluida con PBS hasta la concentración deseada. Las disoluciones de trabajo de hipericina se prepararon a oscuras y se almacenaron a 4<sup>o</sup> C.

### 4.2.3 Fuentes de luz

Los estudios de fotoinactivación fueron realizados con una lámpara LED con una emisión a 602 ± 10 nm y una irradiancia de 10.3 mW cm<sup>-2</sup>.

#### 4.2.4 Preparación de la muestra

Las suspensiones de cultivo O.N. de levadura fueron cultivadas aeróbicamente a 37° C en medio de cultivo SB hasta una densidad óptica de 0.6. Las suspensiones de inóculo stock fueron preparadas en PBS estéril.

Se adicionó hipericina, en un rango de concentración de 10-60  $\mu\text{M}$  a las suspensiones de levadura en PBS pH=7.4 ( $\sim 10^6$  ufc/mL) inmediatamente antes de las mediciones espectroscópicas. Para mediciones en PBS deuterado (D-PBS), las suspensiones se centrifugaron dos veces a 1398 g durante 5 min y se resuspendieron en D-PBS. Las mediciones espectroscópicas se llevaron a cabo en cubetas de 1 cm de cuarzo (Hellmut, Alemania) a temperatura ambiente bajo agitación suave.

#### 4.2.5 Espectros de absorción y fluorescencia

El espectro de absorción del estado fundamental fue obtenido mediante un espectrofotómetro Varian Cary 6000i (Varian Inc., Palo Alto, CA). Los espectros de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{\text{excitación}} = 530$  nm) se realizaron con un espectrofluorómetro Spex Fluoromax 4 (Horiba Jobin-Yvon, Edison, NJ).

#### 4.2.6 Cinética de fluorescencia

Los decaimientos de fluorescencia resueltos en el tiempo fueron obtenidos con un sistema de conteo de un solo fotón (Fluotime 200, PicoQuant GmbH, Berlin, Alemania) equipado con un fotomultiplicador sensible al rojo. La fluorescencia fue excitada a 596 nm, mediante un LED pulsado y fue observada a 655 nm. El decaimiento de fluorescencia fue analizado usando el software de análisis de datos PicoQuant FluoFit 4.0.

#### 4.2.7 Microscopía de fluorescencia

Estos estudios fueron realizados por Manuel P. Paz-Cristobal en la unidad de Microscopía e Imagen del Instituto de ciencias de la salud de Aragón y dirigidos por María Royo Cañas.

Los experimentos fueron realizados primero, con hipericina 5  $\mu\text{M}$  y posteriormente a la concentración de hipericina fungicida para cada cepa (*C. albicans* 1.25  $\mu\text{M}$ , *C. parapsilosis* 2.5  $\mu\text{M}$  y *C. krusei* 40  $\mu\text{M}$ ). Las suspensiones de levadura ( $\sim 10^6$  ufc/mL) fueron incubadas 1 y 30 minutos, centrifugadas a 10 000 rpm durante 5 minutos y lavadas usando solución salina fisiológica a 37° C. Después de repetir este procedimiento de lavado tres veces, los pellets fueron resuspendidos en medio SB líquido a 37° C y se añadieron las sondas fluorescentes MTG o CTG (5  $\mu\text{M}$ ). Después de la incubación a oscuras durante 40 min a 37° C, las muestras se lavaron tres veces. Los pellets obtenidos se resuspendieron en una solución de p-formaldehído al 3% y se incubaron en la oscuridad durante 15 min a 37° C. Posteriormente, se eliminó el p-formaldehído mediante dos lavados con solución salina fisiológica. Finalmente, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de las suspensiones finales en un pozo que contenían un cubreobjetos de vidrio tratado con polilisina y se centrifugó durante 30 min a 3000 rpm con el fin de fijar las células sobre los cubreobjetos. A continuación se montaron sobre 2 placas de vidrio, utilizando medio de montaje Mowiol que contiene DAPI (5  $\mu\text{M}$ ) para la tinción nuclear. Las muestras se visualizaron con un microscopio de fluorescencia confocal de barrido FV10i Olympus o Leica SP2 AOBS. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio en modo secuencial 60x o 100x con una lente de inmersión en aceite (Plan de S-APO 60xO, NA y HCX PL APO 100 x, NA 1.40, respectivamente) y un promedio de línea de 8 y un formato de 1024 x 1024 píxeles. El orificio confocal fue de 1 unidad Airy.

#### 4.2.8 Espectros de absorción de transitorios

Los experimentos de absorción de las especies transitorias de la hipericina ( $^3\text{Hip}$  y  $\text{Hip}^{\cdot-}$ ) se realizaron con un equipo de flash fotólisis provisto de un láser pulsado de nanosegundos [13]. Para generar los estados transitorios se irradió la muestra con un láser pulsado a la longitud de onda de excitación de la hipericina (532 nm). Para monitorizar el decaimiento los estados transitorios se detectó la absorción del estado triplete ( $^3\text{Hip}$ ) a 520 nm o del radical anión ( $\text{Hip}^{\cdot-}$ ) a 740 nm [14].

#### 4.2.9 Cinética de oxígeno singlete

La fosforescencia de oxígeno singlete fue detectada mediante un sistema customizado, el Pico Quant Fluotime 200 [15], tal y como se detalla en el apartado 2.3.4 del capítulo 2 de técnicas y métodos.

#### 4.2.10 Efecto de los inhibidores de especies EROs

Estos estudios fueron realizados por Manuel P. Paz-Cristobal en el departamento de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet de la Universidad de Zaragoza y dirigidos por el Dr. Antonio Rezusta.

A las suspensiones de levadura ( $\sim 10^3$  ufc/mL), se adicionó azida sódica 80 mM (desactivador de  $^1\text{O}_2$ ), Catalasa 1880 U/mL (CAT, desactivador de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) o superóxido dismutasa 200 U/mL (SOD, desactivador de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y se mantuvieron a oscuras durante 15 min a 37° C (levaduras y desactivadores en tampón PBS a pH 7.4). Posteriormente, se añadió hipericina a la concentración requerida para producir una reducción de 3  $\log_{10}$  en las ufc (*C. albicans* ATCC 1.25  $\mu\text{M}$ , *C. parapsilosis* 2.5  $\mu\text{M}$  y *C. krusei* 40  $\mu\text{M}$ ) [8] y se irradiaron las células durante 30 min ( $18 \text{ J cm}^{-2}$ ). Los cultivos de levadura que crecieron bajo las mismas condiciones, pero sin atenuadores, se utilizaron como controles. Después del

tratamiento, las muestras y controles se incubaron en agar de SB a 37° C durante 48 h, determinándose el efecto antifúngico contando el número de ufc presentes en la placa de cultivo.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Espectros de absorción y fluorescencia

Los espectros de absorción y fluorescencia de la hipericina en diferentes disolventes y suspensiones de levadura se muestran en la Figura 4.2. Comparando con los espectros en etanol, la absorción de las suspensiones de las especies de *Candida* resultaron más amplios, con las bandas desplazadas hacia el rojo y con diferentes máximos y amplitudes relativas.

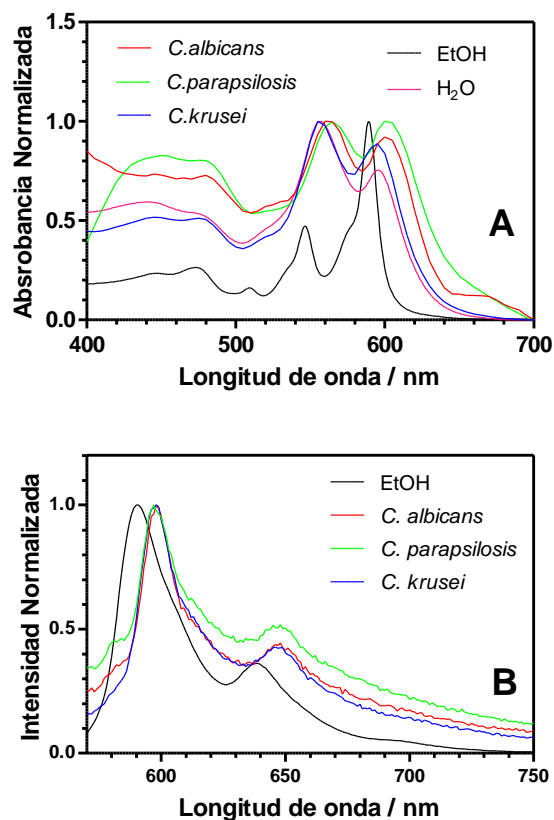


Figura 4.2. Espectro de absorción (A) y fluorescencia (B) normalizados. Se muestra el espectro de absorción de la hipericina (10  $\mu$ M) en levaduras, en etanol y en agua, y el espectro de fluorescencia de la hipericina en levaduras y en etanol ( $\lambda_{\text{excitación}} = 530$  nm).



La fluorescencia también se desplazó hacia el rojo respecto al espectro en etanol. Apenas no se detectó fluorescencia en PBS debido a la formación de agregados no fluorescentes de la hipericina [16]. Estas observaciones, similares a las obtenidas recientemente en células HeLa [17], indican que la hipericina se une a las levaduras y se localiza en dominios lipófilos, como se confirma posteriormente por microscopía de fluorescencia confocal. No se observaron, sobre los espectros, efectos notables de concentración en un intervalo de hipericina de 10-60  $\mu\text{M}$  debido a que el comportamiento espectral fue similar en las distintas concentraciones de FS.

#### 4.3.2 Cinética de fluorescencia

El decaimiento de fluorescencia en etanol (Figura 4.3) muestra una cinética de primer orden con un tiempo de vida media de 5.0 ns, resultado que coincide con lo que se reporta en la literatura [16]. No se detectó decaimiento en PBS a pH 7.4, confirmando que los agregados de hipericina en medio acuoso no son fluorescentes [18]. En presencia de levaduras, el decaimiento de fluorescencia es multiexponencial, los tiempos de vida y las amplitudes relativas de los componentes varían entre las distintas levaduras (Tabla 4.1). El promedio de los tiempos de vida media siguen la siguiente tendencia: *C. parapsilosis* < *C. albicans*  $\ll$  *C. krusei*, lo que sugiere diferentes patrones de localización de la hipericina en cada una de las especies de *Candida*.

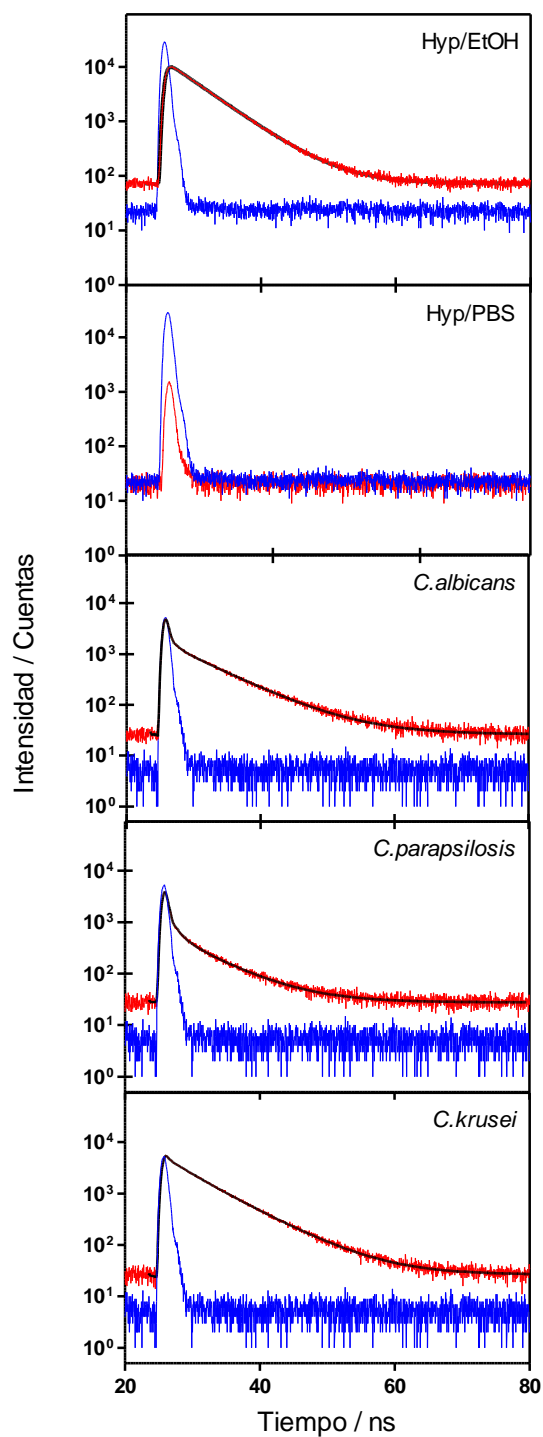


Figura 4.3. Decaimiento de fluorescencia resuelta en el tiempo de la hipercina en levaduras, en PBS y en etanol. Las muestras fueron irradiadas a 596 nm y la fluorescencia fue observada a 655 nm. La curva roja es la señal, la azul es la función de respuesta del instrumento y la negra encima de la señal es el ajuste de la función.

Tabla 4.1 Resumen de los resultados fotofísicos de la hipericina. Longitud de onda de emisión de fluorescencia de la hipericina ( $\lambda_F$ ), tiempo de vida media de la hipericina ( $\tau_S$ ); tiempo de vida media de la hipericina triplete en soluciones saturadas en argón ( $^{Ar}\tau_T$ ) y en aire ( $^{Aire}\tau_T$ ); tiempo de vida media del oxígeno singlete en PBS ( $^{PBS}\tau_{\Delta}$ ) y en PBS deuterado ( $^{D-PBS}\tau_{\Delta}$ ); tiempo de vida media del anión radical anión de la hipericina ( $\tau_{Hip^{\cdot-}}$ ) en suspensiones de levadura saturadas en argón.

	EtOH	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>
$\lambda_F / \text{nm}^a$	590	598	597	598
$\tau_S / \text{ns}^b$ (% Amplitud)	5.0 (100)	0.25 (59) 4.1 (11) 7.3 (30)	0.37 (61) 2.0 (21) 6.6 (18)	-- 3.1 (23) 6.4 (77)
$\tau_S(\text{promedio}) / \text{ns}^b$	5.0	2.8	1.9	5.7
$^{Ar}\tau_T / \mu\text{s}^c$ (% Amplitud)	--	4.8 (5) 57 (95)	2.1 (20) 40 (80)	2.9 (42) 46 (58)
$^{Aire}\tau_T / \mu\text{s}^c$ (% Amplitud)	--	0.9 (100)	0.8 (100)	0.2 (85) 2.4 (15)
$^{Aire}\tau_T / \mu\text{s}^d$	--	1.2	0.7	0.2
$^{PBS}\tau_{\Delta} / \mu\text{s}^d$	--	4.3	4.8	4.0
$^{D-PBS}\tau_{\Delta} / \mu\text{s}^d$	--	27	40.0	28
$\tau_{Hip^{\cdot-}} / \mu\text{s}^e$	--	800	890	1100

Procedencia experimental de los valores mostrados en la tabla:

<sup>a</sup>  $\lambda_{exc} = 530 \text{ nm}$ .

<sup>b</sup>  $\lambda_{exc} = 596 \text{ nm}$  and  $\lambda_{obs} = 655 \text{ nm}$ ; incerteza del  $\pm 10\%$ .

<sup>c</sup> Medidas de absorción de transitorios a  $\lambda_{obs} = 520 \text{ nm}$ ; incerteza del  $\pm 20\%$ .

<sup>d</sup> Fosforescencia de  $^1\text{O}_2$  a  $\lambda_{obs} = 1275 \text{ nm}$ ; incerteza del  $\pm 10\%$ .

<sup>e</sup> Medidas de absorción de transitorios a  $\lambda_{obs} = 740 \text{ nm}$  en suspensiones saturadas de argón; incerteza del  $\pm 20\%$ .

#### 4.3.3 Microscopía de fluorescencia

La Figura 4.4 compara la distribución de hipericina en las tres especies de *Candida* mediante imágenes de microscopía confocal. Las imágenes mostraron que la hipericina se localiza en el interior de las tres especies de levadura después de 1 min de incubación, y su distribución se mantiene estable durante 30 minutos de incubación.

Las muestras control, levaduras sin hipericina, no mostraron fluorescencia residual de color rojo. Utilizando la concentración fungicida para cada cepa, la distribución de la fluorescencia dentro de la célula fue la misma que si se incuban todas las levaduras con hipericina 5  $\mu$ M. La hipericina mostró una localización similar a la sonda CTG (verde), que se localiza en el citoplasma, pero distinta al DAPI (azul), una sonda nuclear. Sin embargo, la distribución en el citoplasma fue diferente en las tres cepas. En *C. albicans*, la hipericina se acumula principalmente en una única mancha y en menor cantidad en pequeños puntos, mientras que *C. parapsilosis* muestra un patrón de fluorescencia puntuado que colocaliza con la sonda MTG mitocondrial. En *C. krusei* se distribuye de manera difusa en el citoplasma, claramente más que en *C. albicans* y en *C. parapsilosis*.

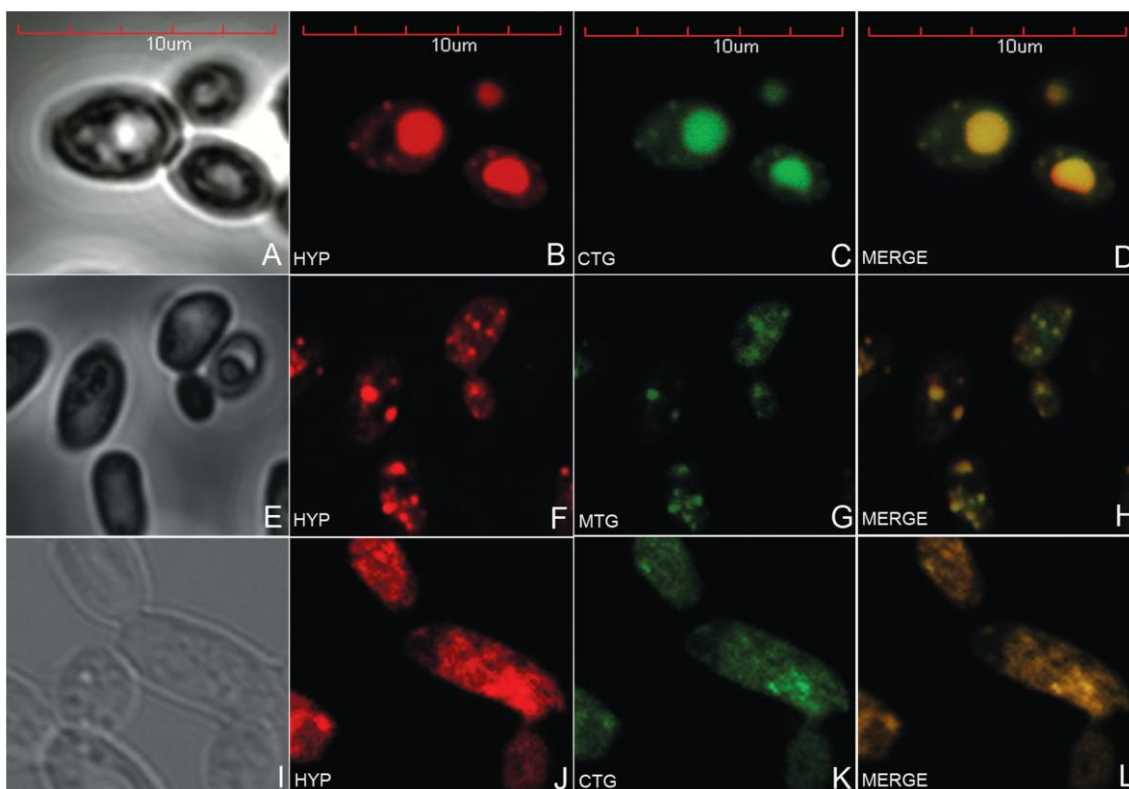


Figura 4.4. Microscopia de fluorescencia de la hipericina en las tres especies de *Candida* estudiadas. *C. albicans*: (A) Imagen de contraste de fase; (B) fluorescencia de la hipericina (rojo) se localiza dentro de las células, principalmente como una mancha y algunos puntos; (C) fluorescencia de la sonda citoplasmática CTG (verde); (D) imagen fusionada (naranja); *C. parapsilosis*: (E) Imagen de contraste de fase; (F) fluorescencia de la hipericina (rojo), distribuida en forma de puntos; (G) fluorescencia de la sonda mitocondrial MTG (verde); (H) imagen fusionada (naranja); *C. krusei*: (I) Imagen de contraste de fase; (J) la fluorescencia de la hipericina (rojo) es más difusa que en las otras especies y no muestra un determinado patrón intracelular; (K) fluorescencia de la sonda citoplasmática CTG (verde); (L) imagen fusionada (naranja).

#### 4.3.4 Experimentos de absorción de transitorios

La producción del triplete y de anión radical de la hipericina en levaduras se detectó con experimentos de absorción transitoria, aprovechando los diferentes espectros de absorción que presentan ambos intermedios [14]. En muestras saturadas de argón, todas las levaduras produjeron dos intermedios (Figura 4.5). El decaimiento del  $^3\text{Hip}$  puede ajustarse adecuadamente a una función biexponencial en todas las levaduras (Tabla 4.1). Los decaimientos de la Figura 4.5 muestran que la contribución del componente de menor vida media sigue la siguiente tendencia: *C. albicans* < *C. parapsilosis* < *C. krusei*. En muestras aeróbicas, todos los estados triplete de *C. albicans* y *C. parapsilosis* se desactivan y decaen rápidamente, sin embargo la componente de 2.9  $\mu\text{s}$  en *C. krusei* no se inactivó (Tabla 4.1). Asimismo, los decaimientos a 740 nm mostraron dos componentes. El tiempo de vida de la componente rápida coincide con el del estado triplete y es atribuido a esa especie. La segunda, se atribuye al radical  $\text{Hip}^{\cdot-}$ , con una vida media mucho más larga en el intervalo de los milisegundos en soluciones saturadas de argón. Cuando el oxígeno se encuentra en el sistema, las señales desaparecen por completo.

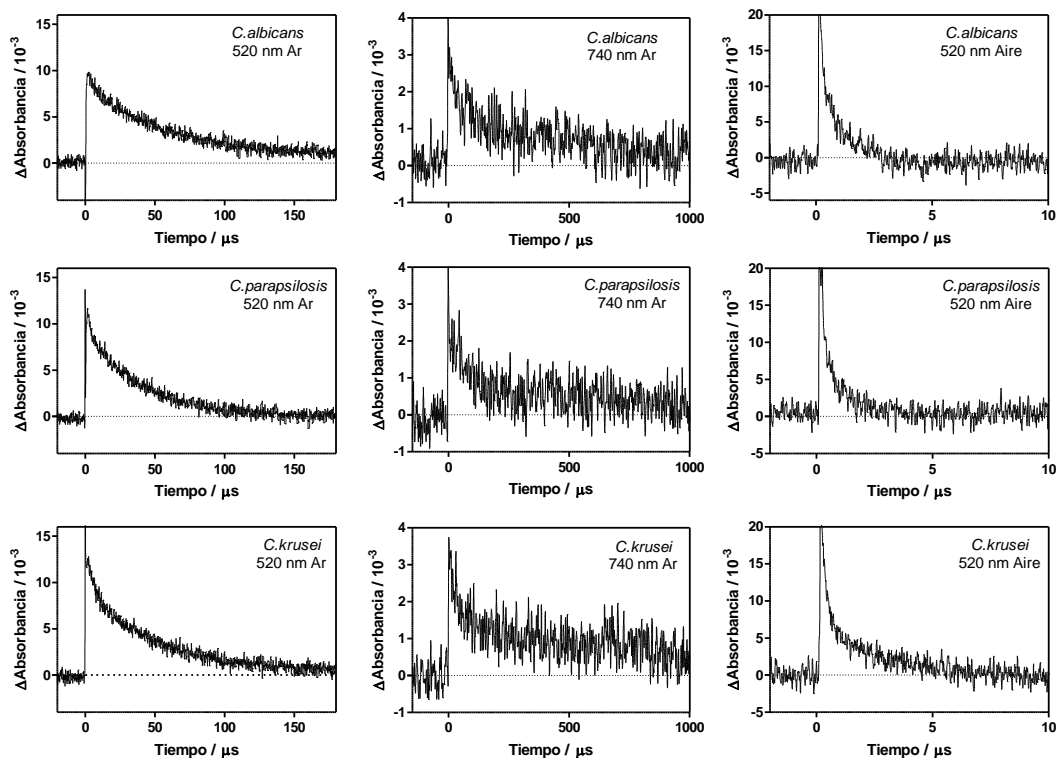


Figura 4.5. Absorción de los transitorios de hipericina en suspensiones de levadura saturadas de argón o de aire. Las señales obtenidas a 520 nm corresponden al  $^3\text{Hip}$ , mientras que las obtenidas a 740 nm corresponden al  $^3\text{Hip}$  (componente corta) y al  $\text{Hip}^*$  (componente larga).

#### 4.3.5 Cinéticas de oxígeno singlete

La detección de luminiscencia en el infrarrojo cercano resuelta en el tiempo es una poderosa herramienta para estudiar el proceso de fotosensibilización del  $^1\text{O}_2$  en células ya que éste puede ser directamente monitorizado mediante su fosforescencia a 1275 nm [15,19-24]. La Figura 4.6 muestra que la irradiación de levaduras con hipericina incorporada, mediante un láser pulsado a 532 nm, produce señales inequívocas de luminiscencia a 1275 nm en todas las levaduras. La emisión se asigna al  $^1\text{O}_2$  debido a la desaparición de la señal a 1325 nm, ya que el  $^1\text{O}_2$  a esta longitud de onda no emite fosforescencia, y por el incremento del tiempo de vida de emisión en PBS deuterado (D-PBS), relativo al PBS [25]. Estos datos cinéticos están recogidos en

la Tabla 4.1. Una clara diferencia puede observarse entre *C. krusei* y las otras especies ya que la señal de subida es muy rápida y no puede resolverse.

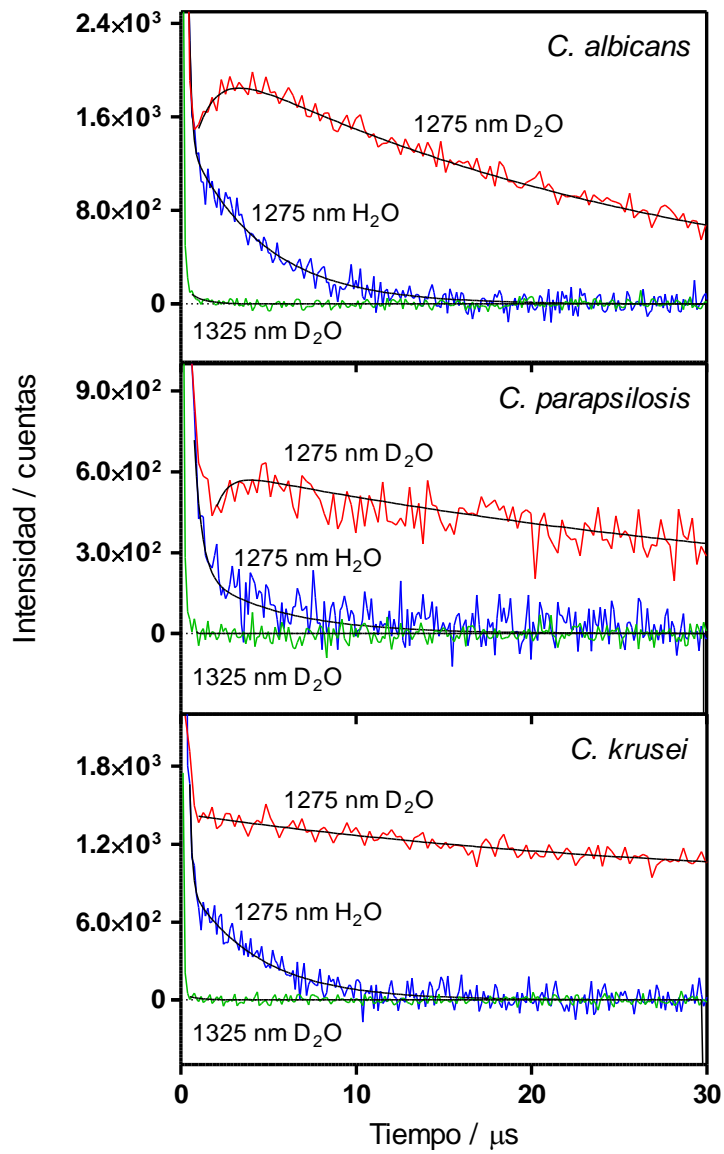


Figura 4.6. Cinética de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> observada a 1275 nm y a 1325 nm (control negativo) en PBS y D-PBS.



#### 4.3.6 Efecto de los inhibidores de especies EROs

El objetivo de este ensayo es evaluar el efecto de los desactivadores de EROs ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) producidos al aplicar la TFD antifúngica sobre la viabilidad celular con el fin de conocer el mecanismo que se produce durante el proceso de la terapia. Los estudios de fotoinactivación en condiciones de reducción de  $3 \log_{10}$  de ufc/mL [8] se llevaron a cabo en presencia de desactivadores específicos de EROs, tal y como se muestra en la Figura 4.7. La catalasa inhibe completamente la fototoxicidad de la hipericina en *C. albicans* y *C. parapsilosis*. El efecto protector de este desactivador sobre la viabilidad celular es menos importante en *C. krusei*, ya la supervivencia todavía podría aumentar en relación con suspensiones que no contienen desactivador. Los otros desactivadores de EROs, la azida sódica y el superóxido dismutasa, son menos eficaces que la Catalasa, aunque pueden aumentar la supervivencia de la levadura en aproximadamente 2 log (*C. albicans* y *C. parapsilosis*) y 1 log (*C. krusei*).

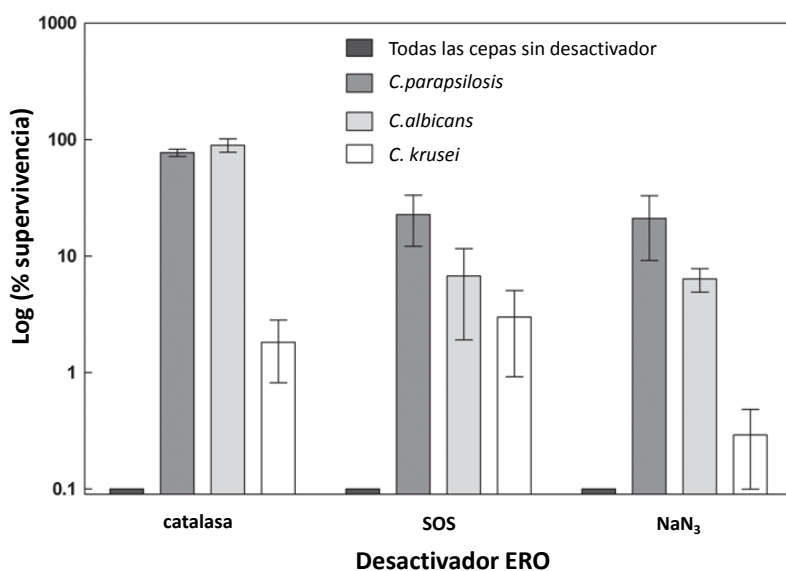


Figura 4.7. Inhibición por distintos desactivadores de EROs sobre el efecto fototóxico inducido por TFD antifúngica con hipericina sobre *Candida* spp.. También se muestra el nivel de supervivencia en ausencia de desactivadores de EROs.

#### 4.4 Discusión

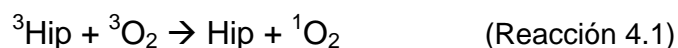
Los detalles mecanísticos de la fotoinactivación de *Candida* spp. han sido estudiados para documentar los fotoprocesos que ocurren en la TFD antifúngica utilizando hipericina como FS, así como determinar las diferencias observadas previamente en la susceptibilidad de las distintas especies (capítulo 3) [8].

Los espectros de absorción (Figura 4.2) revelan la presencia de agregados de hipericina en las suspensiones de levadura, así como en agua, tal y como indica el ensanchamiento de las bandas y los cambios en su amplitudes relativas en comparación con el etanol. Los agregados no son fluorescentes tal y como muestra la falta de fluorescencia en PBS. Estas observaciones son consistentes con artículos anteriores, que reflejan la naturaleza hidrófoba de hipericina [16]. La fluorescencia en las suspensiones de levadura después de 1 minuto de incubación y las diferencias entre los espectros de absorción y fluorescencia indican que la hipericina es incorporada por las levaduras y que la internalización de este FS restaura la fluorescencia roja de su forma monomérica [26,27]. La fluorescencia resuelta en el tiempo revela la presencia de diferentes poblaciones de hipericina, lo que sugiere un patrón de localización complejo dentro de las células y diferentes microambientes en las distintas especies de *Candida*. El decaimiento de fluorescencia multiexponencial de la hipericina ha sido observado también en otras células eucariotas [28], como así en lipoproteínas de baja densidad [29].

La microscopía de fluorescencia confocal confirma que la hipericina es incorporada por todas las especies de *Candida* y que se localiza en orgánulos citosólicos y no en el núcleo. Estos resultados están en concordancia con los publicados recientemente para el ftalocianina PC 4 [30]. La distribución es diferente en las tres especies y no se ve afectada por la concentración o el tiempo de incubación. La mancha grande en *C. albicans* podría corresponder a la vacuola, un orgánulo

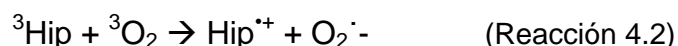
específico bastante grande en *C. albicans* que tiene una función similar al lisosoma de los mamíferos [31]. Así, la acumulación de hipericina en la vacuola correspondería a la acumulación lisosomal descrita en algunas células de mamíferos [32,33]. En cuanto a *C. parapsilosis*, la colocalización parcial con la sonda mitocondrial MTG podría indicar una localización preferente en las mitocondrias, también descrita para la hipericina en otros tipos de células [34]. En células de mamíferos, las mitocondrias y lisosomas son los orgánulos más eficaces para desencadenar la muerte celular después de un tratamiento fotodinámico. La fluorescencia de la hipericina en *C. krusei* fue más difusa comparada con las otras especies de *Candida*. La hipótesis del presente trabajo es que esto refleja la ultraestructura particular de *C. krusei*, que consiste en orgánulos citosólicos como pequeñas vesículas, gotas de lípidos, ribosomas y grupos de defensa de gránulos intracitoplasmáticos [35].

Los experimentos de absorción de los transitorios mostraron la formación de las diferentes poblaciones del estado excitado triplete de la hipericina en todas las levaduras (Figura 4.5) proporcionando la evidencia adicional de su compleja localización. En el caso de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, el oxígeno es capaz de desactivar todos los tripletes, mientras que en el caso de *C. krusei*, una fracción de tripletes no pudo ser desactivado por el oxígeno, obteniéndose un valor de 2.4  $\mu$ s (Figura 4.5 y Tabla 4.1). La fosforescencia característica del  $^1\text{O}_2$  en el infrarrojo cercano y el aumento de los tiempos de decaimiento del triplete (Figura 4.6 Tabla 4.1) y indican que se da una desactivación, al menos parcial, por transferencia de energía al oxígeno (Reacción 4.1) [36,37]:



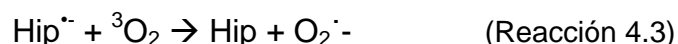
La situación para *C. krusei* es diferente. Por un lado, una fracción de los tripletes no son desactivados por el oxígeno, lo que indica su ubicación en compartimentos no accesibles al oxígeno. Así, estos tripletes son inefectivos para producir oxígeno

singlete. Por otro lado, para los tripletes que se encuentran accesibles, la descomposición es mucho más rápida que en *C. albicans* y *C. parapsilosis*, 0.2  $\mu\text{s}$  vs 0,9  $\mu\text{s}$  (Tabla 4.1), lo que sugiere contribuciones adicionales al proceso de desactivación. La observación de que la superóxido dismutasa es un desactivador de EROs más eficaz en *C. krusei* (Figura 4.7), sugiere que se dan procesos adicionales en la formación de superóxido mediante transferencia de electrones (Reacción 4.2):



En cuanto al papel del  ${}^1\text{O}_2$  en el proceso de fotoinactivación, puede obtenerse una visión adicional mediante la evaluación de los tiempos de vida media del  ${}^1\text{O}_2$  (Tabla 4.1). Por un lado, el tiempo de vida media del  ${}^1\text{O}_2$  en las suspensiones de levadura en PBS es un poco más largo que en PBS puro (4-4.8  $\mu\text{s}$  vs 3.3  $\mu\text{s}$ ). [38] Sin embargo, cuando las levaduras son suspendidas en D-PBS el tiempo de vida aumenta, pero sigue siendo más corto que en  $\text{D}_2\text{O}$  puro (27-40  $\mu\text{s}$  vs 67 $\mu\text{s}$ ) [25]. Estos resultados indican que  ${}^1\text{O}_2$  gasta una parte importante de su vida útil dentro de las células y en regiones hidrofóbicas [29]. Por lo tanto, no es de extrañar que la azida sódica, un desactivador soluble en agua, tenga un efecto protector de la viabilidad celular limitado.

La absorción de transitorios también muestra la formación del radical anión de la hipericina con una vida media cercana a 1 ms en las suspensiones desoxigenadas de las levaduras (Tabla 4.1). La formación del radical anión de la hipericina mediante fotoactivación se ha documentado previamente [34] mediante resonancia paramagnética de electrones, aumentado en presencia de donadores de electrones. En soluciones saturadas de aire, el anión radical se inactiva totalmente por el oxígeno, de acuerdo con su constante de velocidad de desactivación ( $3.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  en acetonitrilo) [14]. Esto sugiere la formación de superóxido (Reacción 4.3):



y es coherente con la observación de que el superóxido dismutasa ejerce un efecto protector (Figura 4.7). La producción de superóxido por hipericina fotoactivada es un proceso documentado en células de mamíferos [34].

Además del estudio del  $^1\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , los resultados muestran que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  también se produce después de la fotoactivación de la hipericina en levaduras y, de hecho, la catalasa muestra el mayor efecto protector (Figura 4.7). Otros estudios revelan que la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 1 hora de fotosensibilización de la hipericina produce una reducción de GSH (Glutati6n), un trip6ptido localizado entre una ciste6na y un glutamato que tiene la funci6n de antioxidante, protegiendo as6 a las c6lulas de las especies reactivas del ox6geno como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  o los radicales libres [39]. Las v6as que conducen a la producci6n de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en levaduras a partir de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $^1\text{O}_2$  no son claras, a pesar de que ha sido reconocido que el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  produce una r6pida dismutaci6n, es decir, se oxida y reduce en las c6lulas, para formar  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $^3\text{O}_2$ , e incluso  $^1\text{O}_2$  dependiendo de la condiciones [40]. Asimismo, tambi6n se ha demostrado que la producci6n de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un subproducto de la reacci6n entre el  $^1\text{O}_2$  con la metionina [41] y tirosina [42], o bien como el resultado de la activaci6n de la NADPH-oxidasa por  $^1\text{O}_2$  [43]. Todas estas EROs pueden interconvertirse mediante complejos mecanismos, siendo sus cantidades relativas dependientes del sitio donde se generan. El hallazgo de que los desactivadores de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $^1\text{O}_2$  tienen un efecto relativamente menos pronunciado en la viabilidad celular que la catalasa, sugiere que la producci6n de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o de sus precursores inmediatos, debe ser m6s r6pida que la desactivaci6n de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $^1\text{O}_2$  y / o se producen en sitios con baja accesibilidad para los desactivadores. Hay que tener en cuenta que  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $^1\text{O}_2$  son reactivos intermedios con un tiempo de vida corto y por lo tanto, m6s dif6cil de atrapar que el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Finalmente, es interesante observar que la especie menos susceptible, *C. krusei*, es tambi6n aquella en la que el ox6geno es menos capaz de atrapar a todos los estados triplete y tambi6n donde los desactivadores de EROs muestran un efecto protector menor. Esto sugiere que la

muerte celular se produce, al menos parcialmente, por otros mecanismos menos eficientes. Tomado en conjunto todos los resultados, estos son consistentes con la menor susceptibilidad de *C. krusei* en TFD antifúngica con hipericina.

## 4.5 Conclusiones

Se han estudiado los fotoprocesos involucrados en la TFD antifúngica con hipericina sobre las tres especies de *Candida* ensayadas. Se ha documentado la formación de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$  y  $H_2O_2$  en las tres especies. Las diferencias significativas que se han encontrado en los fotoprocesos que ocurren en *C. krusei*, en relación a las otras especies de *Candida*, son debidas a que estos se producen en un patrón de distribución intracelular distinto de la hipericina en esta levadura.

## 4.6 Agradecimientos

Agradecimientos al Dr. Antonio Rezusta<sup>a,b</sup>, a Manuel P. Paz-Cristobal<sup>b</sup>, a la Dra. Carmen Aspiroz<sup>b,c</sup>, a María Royo Cañas<sup>b</sup>, a Elena Andres Ciriano<sup>b</sup> y a la Dra. Yolanda Gilaberte<sup>b,d</sup>, del Departamento de microbiología del Hospital universitario Miguel Servet<sup>a</sup>, del Instituto de Ciencias de la Salud de Aragón<sup>b</sup>, del Departamento de Microbiología del Hospital Royo Villanova de Zaragoza<sup>c</sup> y el Departamento de dermatología del Hospital San Jorge de Huesca<sup>d</sup>, quienes aportaron a este trabajo los resultados de microscopía de fluorescencia confocal y desactivadores EROs.



## 4.7 Referencias

- [1] M. Olivo, W. Lau, V. Manivasager, R. Bhuvanewari, Z. Wei, K. Soo, C. Cheng, P. Tan, Novel photodynamic diagnosis of bladder cancer: ex vivo fluorescence cytology using hypericin, *Int. J. Oncol.* 23 (2003) 1501-1504.
- [2] M. Olivo, H. Du, B. Bay, Hypericin lights up the way for the potential treatment of nasopharyngeal cancer by photodynamic therapy, *Curr. Clin. Pharmacol.* 1 (2006) 217-222.
- [3] D. Kacerovská, K. Pizinger, F. Majer, F. Smíd, Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical hypericum perforatum extract, *Photochem. Photobiol.* 84 (2008) 779-785.
- [4] A.H. Rook, G.S. Wood, M. Duvic, E.C. Vonderheid, A. Tobia, B. Cabana, A phase II placebo-controlled study of photodynamic therapy with topical hypericin and visible light irradiation in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and psoriasis *J. Am. Acad. Dermatol.* 63 (2010) 984-990.
- [5] G. Lavie, Y. Mazur, D. Lavie, A. Prince, D. Pascual, L. Liebes, B. Levin, D. Meruelo, Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components, *Transfusion.* 35 (1995) 392-400.
- [6] L. Pistelli, A. Bertoli, S. Zucconelli, I. Morelli, L. Panizzi, F. Menichini, Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*, *Fitoterapia.* 71 (2000) S138-S140.
- [7] W. Cecchetti, Antimicrobial activity of sever *Hypericum* entities from Central Italy, *Planta Med.* 73 (2007) 564-566.

- [8] A. Rezusta, P. López-Chicón, M.P. Paz-Cristobal, M. Alemany-Ribes, D. Royo-Díez, M. Agut, C. Semino, S. Nonell, M.J. Reville, C. Aspiroz, Y. Gilaberte, *In vitro* fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species, *Photochem Photobiol.* 88 (2012) 613-619.
- [9] M.J. Fehr, M.A. McCloskey, J.W. Petrich, Light-induced acidification by the antiviral agent hypericin, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 1833-1836.
- [10] A. Michaeli, A. Regev, Y. Mazur, J. Feitelson, H. Levanon, Triplet State Reactions of Hypericin. Time Resolved Laser Photolysis and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 9154-9160.
- [11] J. Rex, T. Walsh, J. Sobel, S. Filler, P. Pappas, W. Dismukes, J. Edwards, Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis.* 30 (2000) 662-678.
- [12] C.S. Foote, Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.* 54 (1991) 659.
- [13] N. Rubio, A. Jimenez-Banzo, T. Torres, S. Nonell, Spectral and kinetic properties of the radical ions of chloroboron(III) subnaphthalocyanine, *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry.* 185 (2007) 214-219.
- [14] A.P. Darmany, W.S. Jenks, D. Eloy, P. Jardon, Quenching of excited triplet state hypericin with energy acceptors and donors and acceptors of electrons, *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 3323-3331.
- [15] A. Jimenez-Banzo, X. Ragàs, P. Kapusta, S. Nonell, Time-resolved methods in biophysics. 7. Photon counting vs. analog time-resolved singlet oxygen phosphorescence detection, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008) 1003-1010.

- [16] T. Yamizaki, N. Ohta, I. Yamazaki, Pill-Song, Excited-state properties of hypericin: electronic spectra and fluorescence decay kinetics, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 7870-7875.
- [17] T. Breitenbach, M.K. Kuimova, P. Gbur, S. Hatz, N.B. Schack, B.W. Pedersen, J.D.C. Lambert, L. Poulsen, P.R. Ogilby, Photosensitized production of singlet oxygen: spatially-resolved optical studies in single cells, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 442-452.
- [18] G. Bánó, J. Staničová, D. Jancura, J. Marek, M. Bánó, J. Uličný, A. Strejčková, P. Miškovský, On the diffusion of hypericin in dimethylsulfoxide/water mixtures-the effect of aggregation, *J Phys Chem B.* 115 (2011) 2417-2423.
- [19] M. Niedre, M.S. Patterson, B.C. Wilson, Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells *in vitro* and tissues *in vivo*, *Photochem. Photobiol.* 75 (2002) 382-391.
- [20] C. Schweitzer, R. Schmidt, Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen, *Chem. Rev.* 103 (2003) 1685-1757.
- [21] A. Baier, M. Maier, R. Engl, M. Landthaler, W. Baumler, Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells, *J Phys Chem B.* 109 (2005) 3041-3046.
- [22] J.W. Snyder, E. Skovsen, J.D.C. Lambert, L. Poulsen, P.R. Ogilby, Optical detection of singlet oxygen from single cells, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 4280-4293.

- [23] J. Schlothauer, S. Hackbarth, B. Roder, A new benchmark for time-resolved detection of singlet oxygen luminescence - revealing the evolution of lifetime in living cells with low dose illumination, *Laser Physics Letters*. 6 (2009) 216-221.
- [24] X. Ragàs, M. Agut, S. Nonell, Singlet oxygen in *Escherichia coli*: New insights for antimicrobial photodynamic therapy, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 770-776.
- [25] P.R. Ogilby, C.S. Foote, Chemistry of Singlet Oxygen .36. Singlet Molecular-Oxygen ( $^1\Delta_g$ ) Luminescence in Solution Following Pulsed Laser Excitation - Solvent Deuterium-Isotope Effects on the Lifetime of Singlet Oxygen, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 2069-2070.
- [26] A. Kubin, P. Meissner, F. Wierrani, U. Burner, A. Bodenteich, A. Pytel, N. Schmeller, Fluorescence diagnosis of bladder cancer with new water soluble hypericin bound to polyvinylpyrrolidone: PVP-hypericin. *Photochem. Photobiol.* 84 (2008) 1560-1563.
- [27] A. Sgarbossa, D. Buselli, F. Lenci, *In vitro* perturbation of aggregation processes in beta-amyloid peptides: a spectroscopic study, *FEBS Lett.* 582 (2008) 3288-3292.
- [28] P. Taroni, G. Valentini, D. Comelli, C. D'Andrea, R. Cubeddu, Dan-Ning Hu, J.E. Roberts, Time-resolved microspectrofluorimetry and fluorescence lifetime imaging of hypericin in human retinal pigment epithelial cells, *Photochem. Photobiol.* 81 (2005) 524-528.
- [29] P. Gbur, R. Dedic, D. Chorvat Jr, P. Miskovsky, J. Hala, D. Jancura, Time-resolved luminescence and singlet oxygen formation alter illumination of the hypericin-low-density lipoprotein complex, *Photochem. Photobiol.* 85 (2009) 816-823.

- [30] M. Lam, P.C. Jou, A.A. Lattif, Y. Lee, C.L. Malbasa, P.K. Mukherjee, N.L. Oleinick, M.A. Ghannoum, K.D. Cooper, E.D. Baron, Photodynamic therapy with Pc 4 induces apoptosis of *Candida albicans*, *Photochem. Photobiol.* 87 (2011) 904-909.
- [31] V. Veses, M. Casanova, A. Murgui, A. Dominguez, N.A.R. Gow, J.P. Martínez, ABG1, a novel and essential *Candida albicans* gene encoding a vacuolar protein involved in cytokinesis and hyphal branching. *Eukaryotic Cell.* 4 (2005) 1088-1101.
- [32] A.B. Uzdensky, L.W. Ma, V. Iani, G.O. Hjortland, H.B. Steen, J. Moan, Intracellular localization of hypericin in human glioblastoma and carcinoma cell lines, *Lasers Med Sci.* 16 (2001) 276-283.
- [33] T. Theodossiou, M.D. Spiro, J. Kacobson, J.S. Hothersall, A.J. MacRobert, Evidence for intracellular aggregation of hypericin and the impact on its photocytotoxicity in PAM 212 murine keratinocytes. *Photochem Photobiol.* 80 (2004) 438-443.
- [34] T.A. Theodossiou, J.S. Hothersall, P.A. De Witte, A. Pantos, P. Agostinis, The multifaceted photocytotoxic profile of hypericin, *Mol. Pharm.* 6 (2009) 1775-1789.
- [35] Y.H. Samaranayake, L.P. Samaranayake, *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen, *J Med Microbiol.* 41 (1994) 295-310.
- [36] H. Racinet, P. Jardon, Formation d'oxygene singlet  $^1\Delta_g$  photosensibilisee par l'hypericine. Etude cinetique en millieu micellaire non ionique. , *J Chim Phys.* 85 (1988) 971-977.
- [37] M. Roslaniec, H. Weitman, D. Freeman, Y. Mazur, B. Ehrenberg, Liposome binding constants and singlet oxygen quantum yields of hypericin, tetrahydroxy

helianthrone and their derivatives: studies in organic solutions and in liposomes, *J Photochem Photobiol B.* 57 (2000) 149-158.

[38] A.A. Krasnovsky Jr., Quantum yield of photosensitized luminescence and radiative lifetime of singlet ( $^1\Delta_g$ ) molecular oxygen in solutions, *Chem. Phys. Lett.* 81 (1981) 443-445.

[39] S.M. Ali, S.K. Chee, G.Y. Yuen, M. Olivo, Hypocrellins and hypericin induced apoptosis in human tumor cells: A possible role of hydrogen peroxide, *Int J Mol Med.* 9 (2002) 461-472.

[40] R. Konaka, E. Kasahara, W.C. Dunlap, Y. Yamamoto, K.C. Chien, M. Inoue, Ultraviolet irradiation of titanium dioxide in aqueous dispersion generates singlet oxygen, *Free Radic. Biol. Med.* 6 (2001) 321-325.

[41] P.K. Sysak, C.S. Foote, T. Ching, Chemistry of singlet oxygen-XXV. Photooxygenation of methionine, *Photochem Photobiol.* 26 (1977) 19-27.

[42] Y. Fang, J. Liu, Reaction of Protonated Tyrosine with Electronically Excited Singlet Molecular Oxygen ( $^1\Delta_g$ ): An Experimental and Trajectory Study, *J. Phys. Chem. A.* 113 (2009) 11250-11261.

[43] N. Rubioa, A. Rajaduraia, K.D. Heldb, K.M. Prisec, H.L. Liberd, R.W. Redmond, Real-time imaging of novel spatial and temporal responses to photodynamic stress, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 283-290.

## **Capítulo 5**

***Uso de TMPyP en terapia fotodinámica in vitro aplicada sobre especies de Candida***





## 5.1 Introducción

Actualmente, se considera que la TFD antifúngica es una alternativa interesante para erradicar las micosis superficiales, una de las enfermedades más comunes en humanos causadas por estos microorganismos [1], siendo algunas especies de *Candida* las responsables de estos procesos [2,3]. Existen varios estudios que demuestran la capacidad fotodinámica de estos FS catiónicos frente a un amplio espectro de microorganismos. Por ejemplo, se conoce su actividad antibacteriana frente bacterias gram positivas y gram negativas [5-9], como agentes antivirales [10], como inhibidores de levaduras [11,12] u hongos filamentosos [13], así como su actividad frente a protozoos [14] u otros parásitos [15,16].

La TMPyP (Figura 5.1) es un fotosensibilizador tetra-catiónico del tipo porfirínico con elevada eficiencia fotodinámica ya que tiene un alto rendimiento cuántico de producción de  $^1\text{O}_2$  de 0.77 [17]. Es importante conocer la localización celular del FS una vez internalizado ya que en función del orgánulo en el que se acumule será más eficaz produciendo la muerte celular de la especie que se desee tratar. Existen estudios de localización intracelular de TMPyP en células humanas como fibroblastos [18], células HeLa [19-21] o bien en neuronas del hipocampo de ratas Wistar [22-24] que demuestran que este FS una vez internalizado se localiza en el núcleo.

Las soluciones de TMPyP en agua tamponada (PBS a pH=7.4) muestran bandas de absorción en el espectro visible, bandas Soret a 420 nm y bandas Q a 530 nm, así como bandas de emisión de fluorescencia a 680 nm. La longitud de onda de absorción de la TMPyP se encuentra dentro del rango de longitud de onda óptima de la ventana terapéutica ( $600 < \lambda_{\text{max}} \text{ (nm)} < 850$ ) que proporciona una máxima penetración de la luz en el tejido tisular [25,26].

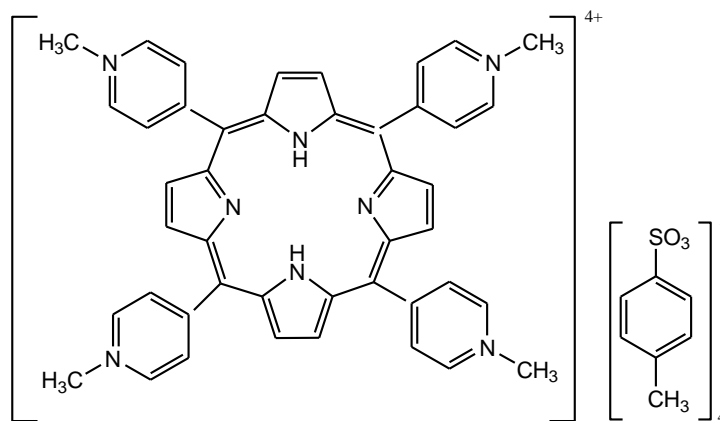


Figura 5.1. Estructura química de la TMPyP

El objetivo de este capítulo es estudiar el efecto antifúngico que tiene la TMPyP en la TFD antifúngica *in vitro* contra especies de *Candida* patógenas para el ser humano, así como los efectos adversos que produce dicha técnica sobre los queratinocitos y fibroblatos humanos.

## 5.2 Parte experimental

### 5.2.1 Cepas fúngicas y células humanas

Las cepas de levadura que se han utilizado en este capítulo son *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida albicans* ATCC 10231, todas ellas obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC: American Type Culture Collection; Rockville, MD) y *C. albicans* CECT 1001 procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, España).

Las células humanas que se han utilizado son queratinocitos (HaCaT: human adult high calcium low temperature) y fibroblastos (hNDF: human normal dermal fibroblasts), que se obtuvieron de la Universidad Autónoma de Madrid y del Hospital Central de Asturias, respectivamente.

### 5.2.2 Reactivos químicos

La TMPyP (5,10,15,20-tetraquis(*N*-metil-4-piridil)-21*H*,23*H*-porfina), el PBS (*Sterile Dulbecco's phosphate-buffered saline* pH 7.4), el DMSO (dimetil sulfóxido) y el SDS (dodecil sulfato sódico) fueron comprados en SIGMA-Aldrich. La MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) fue comprada en HWI Analytik GMBH (Ruelzheim, Alemania). El DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* 4.5 g/L glucosa), el FBS (*Fetal Bovine Serum*), la Penicilina Estreptomina, la L-glutamina para los ensayos biológicos con células humanas fueron comprados en Lonza (Sur América). El "Pierce BCA Protein Assay Kit" fue comprado en Thermo Scientific.

El medio de cultivo fúngico, Sabouraud (SB), fue preparado a partir de Sabouraud Dextrose Agar<sup>®</sup>, comprado en Merck. El medio de cultivo de células humanas (MCH) fue preparado a partir de DMEM suplementado con FBS 10%,

penicilina estreptomicina 1% (v/v) y L-glutamina 2 mM. La disolución stock de TMPyP 1 mM fue preparada en agua tamponada estéril (PBS a pH=7.4). Las disoluciones de trabajo de TMPyP se disolvieron en PBS (para experimentos con levaduras) o con DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM y penicilina estreptomicina 1% (v/v) (para experimentos con células humanas). Las disoluciones fueron preparadas a oscuras y almacenadas a 4° C.

### 5.2.3 Fuentes de luz

Las especies de *Candida* y las células humanas (HaCaT y hNDF) fueron irradiadas con la lámpara LED Sorisa Photocare® con una emisión entre 520 y 550 ± 10 nm y una irradiancia de 15 mW cm<sup>-2</sup>.

### 5.2.4 Inactivación fotosensibilizada en suspensiones celulares fúngicas

#### 5.2.4.1 Sin lavado pre-irradiación de la TMPyP

Se adiciona TMPyP (7.5, 12.5 y 25 µM en PBS) a la suspensión de levadura (~10<sup>6</sup> ufc/mL) y se incuba a oscuras durante 15, 30 o 45 minutos a 37° C y 120 rpm. Para excitar la banda-Q a 530 nm de la TMPyP, se irradia la muestra entre 520 y 550 nm mediante la fuente de LEDs Sorisa Photocare® a 15 mW cm<sup>-2</sup> y durante 15, 30 o 45 minutos, correspondiente a una fluencia de 14, 27 y 41 J cm<sup>-2</sup> respectivamente. Se siembra la suspensión, se incuba a 37° C durante 2 días y se realiza el recuento de las colonias formadas después del tratamiento fotodinámico. Para cada ensayo se realiza un control de toxicidad de la luz (sin FS) y toxicidad del FS (sin luz) en las mismas condiciones en que se realizan todos los ensayos. Los experimentos realizan por triplicado, dando los valores de viabilidad celular como desviaciones estándares.

#### 5.2.4.2 Con lavado pre-irradiación de la TMPyP

Se adiciona TMPyP (2, 5 y 7.5  $\mu\text{M}$  en PBS) a la suspensión de levadura y se incuba a oscuras durante 15 minutos a 37° C y 120 rpm. Se realizan 3 lavados con PBS mediante centrifugaciones a 1398 g durante 3 minutos. Se irradia la muestra entre 520 y 550 nm mediante la fuente de LEDs Sorisa Photocare® de 15 mW  $\text{cm}^{-2}$ , durante 15, 30 o 45 minutos, correspondiente a una fluencia de 14, 27 y 41 J  $\text{cm}^{-2}$  respectivamente. Se siembra la suspensión, se incuba a 37° C durante 2 días y se realiza el recuento de las colonias formadas después del tratamiento fotodinámico. Los experimentos se realizaron por triplicado, dando los valores de viabilidad celular como desviaciones estándares. El tratamiento fotodinámico se realiza tanto para suspensiones iniciales de levadura de  $10^6$  o de  $10^3$  ufc/mL.

#### 5.2.5 Efecto del tratamiento fotodinámico en células humanas

La viabilidad celular de los queratinocitos y fibroblastos después del tratamiento fotodinámico se evalúa mediante el ensayo de MTT. Se adiciona TMPyP (2, 5 y 7.5  $\mu\text{M}$  en MCH sin FBS) a los hNDF y HaCaT ( $\sim 1 \cdot 10^6$  y  $2 \cdot 10^6$  células, respectivamente) y se incuba a oscuras durante 15 min a 37° C y 5%  $\text{CO}_2$ . Se irradia la muestra entre 520 y 550 nm mediante la fuente de LEDs Sorisa Photocare® de 15 mW  $\text{cm}^{-2}$ , durante 15, 30 o 45 minutos (fluencia de 14, 27 y 41 J  $\text{cm}^{-2}$ , respectivamente). Se retira la TMPyP en exceso mediante dos lavados con PBS, se adiciona medio de cultivo fresco y pasadas 24 horas se incuban las células con MTT (0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$  en PBS) durante 3 horas a 37° C y 5%  $\text{CO}_2$ . Se aspira la MTT, se añaden 500  $\mu\text{L}$  de DMSO y se agita durante 15 min para posteriormente leer la absorbancia a 550 nm mediante un lector de microplacas (Biotek ELx808). Se retira la MTT mediante dos lavados con PBS y se adicionan 500  $\mu\text{L}$  de DMSO para lisar las células. Se agita a oscuras durante 15 minutos y se lee la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas (Biotek ELx808).

### 5.2.6 Incorporación de TMPyP en levaduras

La incorporación de la TMPyP en las levaduras en función del tiempo se realiza mediante medidas de fluorescencia del lisado celular. Se adiciona a la suspensión fúngica TMPyP 2.5  $\mu\text{M}$  y se incuba a 37° C, con agitación y a oscuras durante 1, 2, 4, 6 y 24 h. Se retira la TMPyP en exceso mediante lavados con PBS con centrifugaciones de 5 minutos a 1398 g. Se añade SDS (2% (w/v) en H<sub>2</sub>O) al pellet, se agita a oscuras durante 24 h y se mide la fluorescencia del FS con un espectrofluorímetro (*Jobin Yvon-Spex FLUOROMAX-4*), excitando a 430 nm y registrando la emisión de la TMPyP entre 600 y 800 nm.

### 5.2.7 Incorporación de TMPyP en células epidérmicas humanas

Del mismo modo que en levaduras, la incorporación de la TMPyP en función del tiempo se realiza mediante medidas de fluorescencia del lisado celular. Se añade TMPyP 2.5  $\mu\text{M}$  al cultivo celular y se incuba a distintos tiempos (0.5, 1, 2, 6, 8, 18 y 24 h). Para cada tiempo de incorporación, se rascan las células, se transvasan a un tubo y al pellet resultante se le añade SDS (2% (w/v) en H<sub>2</sub>O) que lisará las células, liberando así la TMPyP que había sido incorporado por las estas. Para cada tiempo, se realiza el ensayo de *Cuantificación de proteínas* (apartado 2.2.7 del Materiales y Métodos) y se mide la fluorescencia de la TMPyP (*Jobin Yvon-Spex FLUOROMAX-4*), excitando a 430 nm y registrando la emisión en un rango entre 600 y 800 nm.

### 5.3 Resultados

#### 5.3.1 Inactivación fotosensibilizada en suspensiones celulares fúngicas

##### 5.3.1.1 Sin lavado pre-irradiación de la TMPyP

En la Figura 5.2 se muestra la respuesta al tratamiento fotodinámico en función de la especie, extraíéndose que *C. krusei* y *C. parapsilosis* son las especies más susceptibles, ya que se obtiene un efecto fungicida de  $6 \log_{10}$  en prácticamente todas las concentraciones de TMPyP y tiempos de irradiación ensayados. Sin embargo, para *C. albicans* ATCC y *C. albicans* CECT si que se observa que el grado de fotoinactivación celular depende de la concentración del FS y de la dosis de luz. En cambio, la respuesta fungicida en función del tiempo de incubación tiene un comportamiento muy similar para cada cepa a medida que va aumentando el tiempo de incubación.

Para el tiempo mayor de irradiación, 45 minutos ( $41 \text{ J cm}^{-2}$ ), se observa que para cualquier concentración de TMPyP el efecto fungicida es de  $6 \log_{10}$  para las cuatro cepas de *Candida*. Esto indica que cuando se trabaja a esta dosis de luz la respuesta fotodinámica es independiente del tiempo de incubación previo. En *C. krusei* no hay prácticamente diferencia en cuanto al efecto fungicida entre las distintas fluencias aplicadas y en *C. parapsilosis* se observa un comportamiento similar a  $14$  y  $27 \text{ Jcm}^{-2}$ . Sin embargo, para las dos cepas de *C. albicans*, a medida que aumenta el tiempo de irradiación se obtiene mayor efecto fungicida. Para *C. albicans* CECT se obtiene que a  $14 \text{ Jcm}^{-2}$  y  $15$  o  $30$  minutos de incubación se reducen aproximadamente  $4 \log_{10}$ , siendo necesario aumentar la fluencia de luz a  $27$  o  $41 \text{ Jcm}^{-2}$  para obtener una reducción de  $5$  o  $6 \log_{10}$  a una concentración de TMPyP de  $7.5$  o  $12.5 \mu\text{M}$ , respectivamente. Para *C. albicans* ATCC se obtienen resultados muy similares ya que a  $14 \text{ Jcm}^{-2}$  se reducen  $4$  o  $5 \log_{10}$  a  $15$  o  $30$  minutos de incubación, respectivamente

A continuación se muestran los resultados obtenidos para este ensayo:

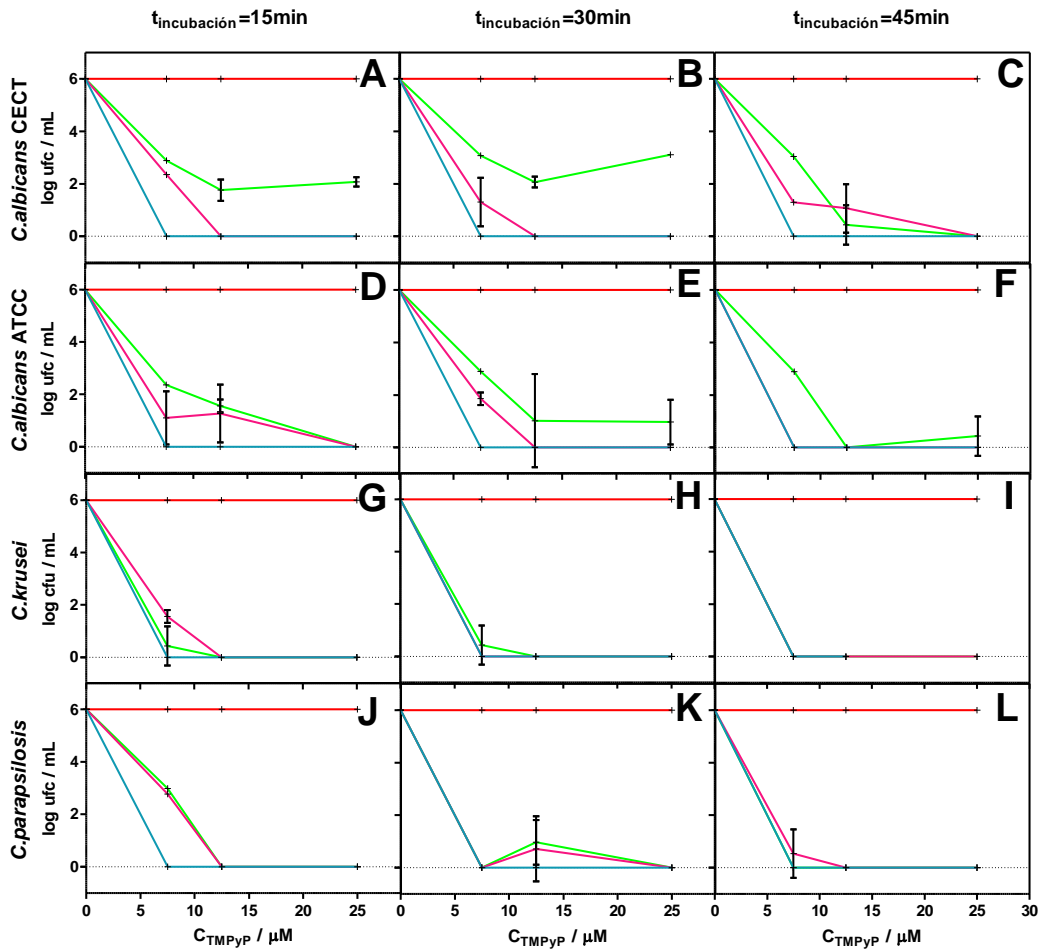


Figura 5.2. Reducción de unidades logarítmicas post-tratamiento fotodinámico de la suspensión inicial levadura. *C. albicans* CECT (A, B, C), de *C. albicans* ATCC (D, E, F), de *C. krusei* (G, H, I) y de *C. parapsilosis* (J, K, L) a distintos tiempos de incubación: 15 (A, D, G, J), 30 (B, E, H, K) y 45 (C, F, I, L) minutos. Se grafican cuatro tipos de experimentos en función del tiempo de irradiación: muestra sin irradiar (toxicidad de la TMPyP; rojo), fluencia de 14 J cm<sup>-2</sup> (t<sub>irradiación</sub>=15 min; verde), fluencia de 27 J cm<sup>-2</sup> (t<sub>irradiación</sub>=30 min; rosa), fluencia de 41 J cm<sup>-2</sup> (t<sub>irradiación</sub>=45 min; azul).



En todos los casos se observa que la muestra sin irradiar (Figura 5.2, función roja) no produce efecto fungicida significativo ya que no se obtiene reducción logarítmica de las ufc/mL a lo largo de todo el rango de concentraciones de TMPyP ensayadas, así que, este FS es tóxico solo si combina con irradiación.

#### 5.3.1.2 Con lavado pre-irradiación de la TMPyP

El resultado obtenido tras el tratamiento fotodinámico sobre suspensiones iniciales de levadura de  $10^6$  ufc/mL es un cultivo totalmente confluyente, así que, si se realiza un lavado pre-irradiación la respuesta a la irradiación no produce muerte celular para este rango de las concentraciones estudiadas de TMPyP (los resultados no se muestran). Sin embargo, si que se obtiene un efecto fungicida para suspensiones iniciales de levadura de  $10^3$  ufc/mL.

Tal y como se muestra en la Figura 5.3, en suspensiones iniciales de levadura de  $10^3$  ufc/mL se produce una respuesta citotóxica después del tratamiento fotodinámico con TMPyP, aunque para ninguna de las levaduras y para ninguno de los tiempos de irradiación se produce una muerte celular total de  $3 \log_{10}$ . Solo en el caso de *C. albicans* ATTC y *C. parapsilosis* se observa una disminución de alrededor de  $1 \log_{10}$ , siendo insuficiente para producir una respuesta fungicida del 9.99% sobre las levaduras.

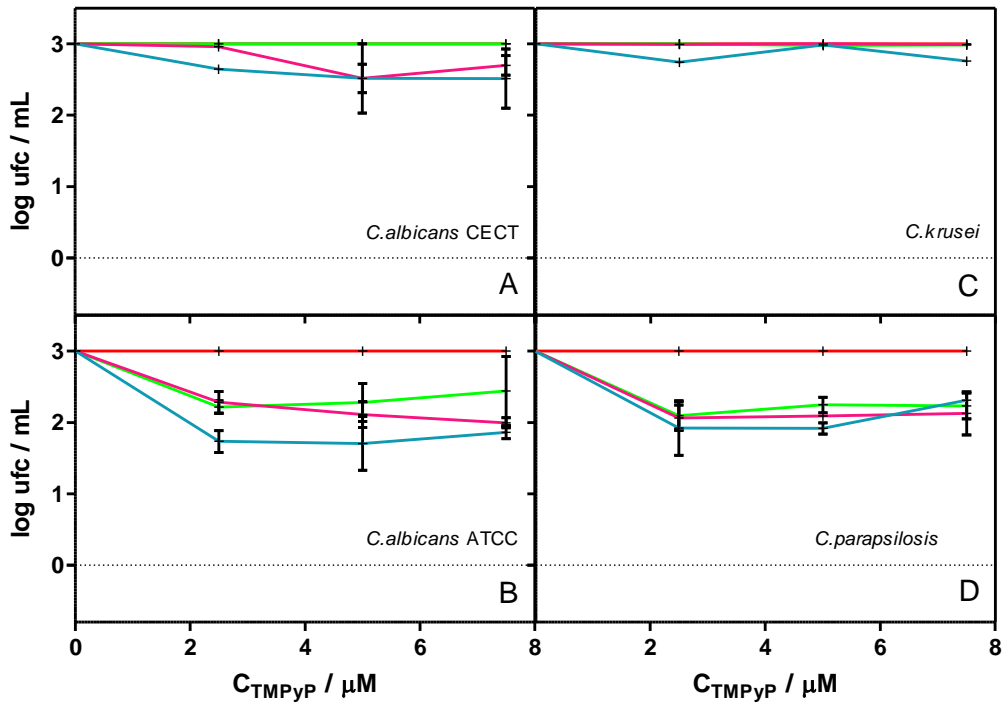


Figura 5.3. Reducción de unidades logarítmicas post-tratamiento fotodinámico de la suspensión inicial ( $10^3$  ufc/mL) levadura. *C. albicans* CECT (A), de *C. albicans* ATCC (B), de *C. krusei* (C) y de *C. parapsilosis* (D) a 15 min de tiempo de incubación. Se grafican cuatro tipos de experimentos en función del tiempo de irradiación: muestra sin irradiar (toxicidad de la TMPyP; rojo), fluencia de  $14 \text{ J cm}^{-2}$  ( $t_{\text{irradiación}}=15 \text{ min}$ ; verde), fluencia de  $27 \text{ J cm}^{-2}$  ( $t_{\text{irradiación}}=30 \text{ min}$ ; rosa), fluencia de  $41 \text{ J cm}^{-2}$  ( $t_{\text{irradiación}}=45 \text{ min}$ ; azul).

### 5.3.2 Efecto del tratamiento fotodinámico en células humanas

Para cada tipo de célula y tiempo de irradiación se realizan dos pruebas distintas que difieren en si se realiza o no una etapa de lavado previa a irradiar la muestra, con la finalidad de eliminar la TMPyP en exceso que no ha sido incorporada por las células. Para cada ensayo se realiza un control de toxicidad de la luz y toxicidad a

oscuras del FS en las mismas condiciones. Los experimentos se realizaron por triplicado, dando los valores de viabilidad celular como desviaciones estándares.

La Figura 5.4 muestra la viabilidad celular de los hNDF y de los HaCaT después de recibir el tratamiento fotodinámico durante 15, 30 y 45 minutos. Cuando las pruebas se realizan con la etapa de lavado antes de la irradiación (verde), la viabilidad celular de los hNDF se mantiene alrededor del 90% cuando se irradian 15 minutos (A) y del 80% cuando se irradia 30 y 45 minutos (B, C). Los HaCaT tienen un comportamiento similar, siendo su viabilidad del 95% cuando se irradian 15 y 30 minutos (E, F) y del 85% cuando se irradian 45 minutos (G).

En los resultados de viabilidad celular con la etapa de lavado después de la irradiación (rojo) se aprecia un comportamiento claramente diferenciado entre hNDF y HaCaT. Mientras que las hNDF muestran una viabilidad celular entre el 70-80% a 15 min de irradiación y 60% a 30 y 45 min de irradiación, los HaCaT sufren una muerte celular donde solo el 20% son viables después del tratamiento fotodinámico, ambos tipos de células mantienen este comportamiento para todas las concentraciones de TMPyP ensayadas.

En la Figura 5.4 también se puede observar los resultados de viabilidad celular para la toxicidad a oscuras de la TMPyP a distintos tiempos de incubación (0,15, 30, 45 y 60 min), obteniéndose para las hNDF (D) una viabilidad del 90% y para las HaCaT (H) alrededor del 95%. Este resultado de citotoxicidad de la TMPyP indica que para que este FS sea tóxico debe combinarse necesariamente con luz, produciéndose así las especies tóxicas que producen la muerte celular.

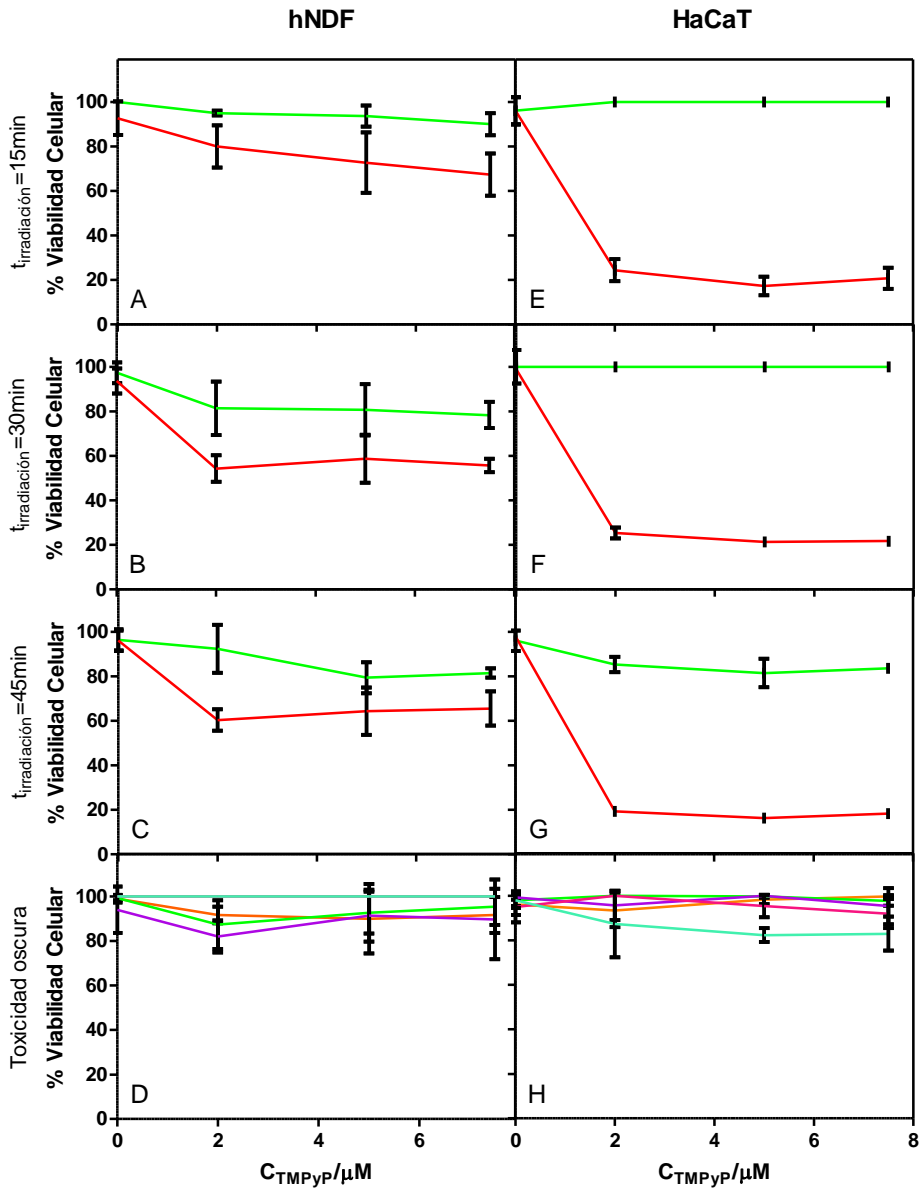


Figura 5.4. Viabilidad celular post-tratamiento fotodinámico de hNDF (A, B, C, D) y HaCaT (E, F, G, H) en función de la concentración de TMPyP. Ensayos incubando 15 minutos a oscuras, irradiando 15 min (A, E), 30 min (B, F) o 45 min (C, G) y lavando el exceso de FS antes de la irradiación (verde) o lavando el exceso de FS después de la irradiación (rojo). Toxicidad a oscuras de hNDF (D) y HaCaT (H) a distintos tiempos de incubación (0 min, naranja; 15 min, verde; 30 min, lila; 45 min, rosa; 60 min, turquesa)

### 5.3.3 Incorporación de TMPyP en levaduras

Se calcula para cada tiempo de incorporación el área bajo la curva de cada espectro de fluorescencia y se grafican los resultados fluorescencia del lisado celular normalizada frente al tiempo (Figura 5.5). Los experimentos se realizaron por triplicado, mostrando valores de incorporación del FS como desviación estándar.

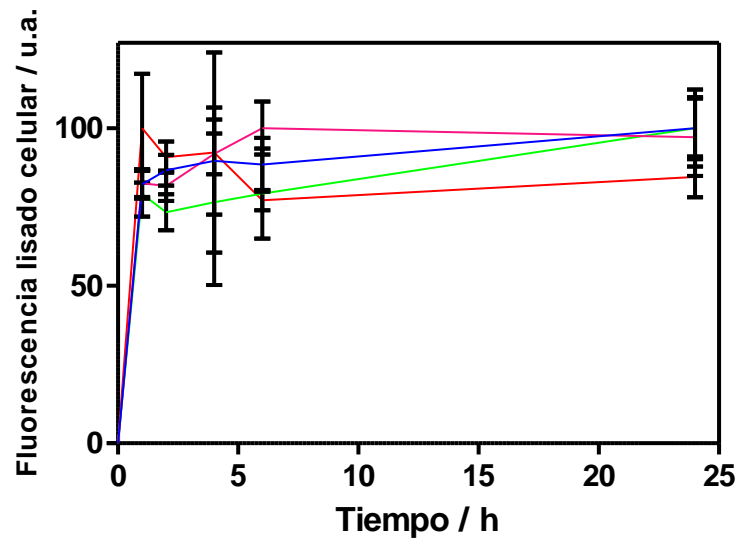


Figura 5.5. Fluorescencia de la TMPyP procedente del lisado celular de levadura a distintos tiempos de incubación. *C. albicans* CECT (rojo), *C. albicans* ATCC (verde), *C. krusei* (lila) y *C. parapsilosis* (azul).

De los resultados obtenidos se observa que las cuatro levaduras siguen un mismo patrón ya que tras 1h de incubación han incorporado alrededor del 80% de TMPyP y posteriormente todas ellas evolucionan hacia una meseta, dejando de incorporar FS hacia el medio intracelular.

### 5.3.4 Incorporación de TMPyP en células epidérmicas humanas

Se calcula el área bajo la curva de cada espectro de fluorescencia obtenido para cada tiempo. Paralelamente se calcula también la cantidad de proteína total en muestra. Mediante la Ecuación de la recta patrón que relaciona el contenido proteico con el número de células (apartado 2.2.8 del Materiales y Métodos) se realiza una conversión de los datos para obtener valores de número de células. Por último se divide el área bajo la curva del espectro de fluorescencia por el número de células y se grafican los resultados como *Fluorescencia del lisado celular* (normalizado por el número de células) frente al tiempo.

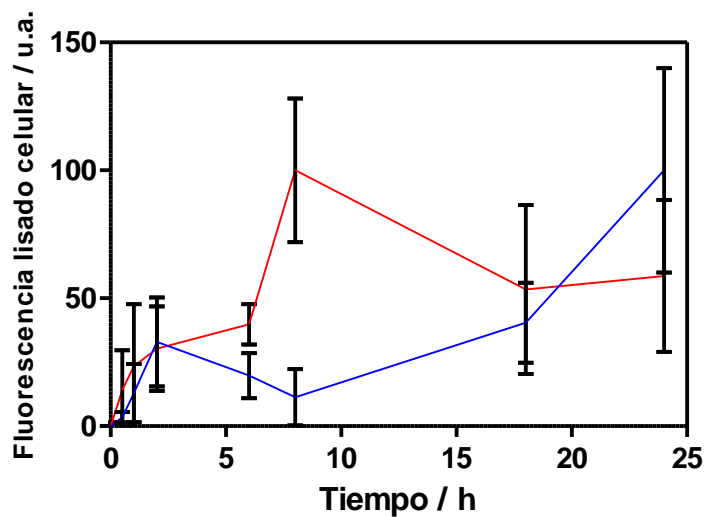


Figura 5.6. Fluorescencia de la TMPyP procedente del lisado celular a distintos tiempos de incubación. HaCaT (rojo) y hNDF (azul).

Tal y como puede observarse en la Figura 5.6 los queratinocitos van incorporando TMPyP con el tiempo hasta se da un máximo a las 6 h y a partir de este punto la incorporación del FS va disminuyendo gradualmente como consecuencia de la metabolización o expulsión de la TMPyP del medio celular. En cambio, para la

misma cantidad de TMPyP 2.5  $\mu$ M adicionada en muestra, las HaCaT incorporan el FS gradualmente con el tiempo, encontrándose un máximo al inicio alrededor de 1 h.

## 5.4 Discusión

La TMPyP es un FS eficiente en TFD, debido a su alto rendimiento cuántico de formación de  $^1\text{O}_2$  [27-30]. Sin embargo, esta eficiencia puede verse disminuida por la localización del FS en el sistema biológico, ya que el orgánulo celular donde se acumula el FS puede tener distinta disposición de  $\text{O}_2$  disuelto en el medio, produciendo que el rendimiento cuántico de producción el  $^1\text{O}_2$  disminuya.

Estudios recientes de Cormick *et al* [31] han demostrado que la TMPyP es un FS eficaz en la fotoinactivación *in vitro* de *C. albicans*, ya que obtienen una muerte celular mayor al 99.999% (reducción de 5  $\log_{10}$ ) a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , después de 30 min de irradiación y sin lavado del FS. Quiroga *et al* [32] muestra resultados similares de fotoinactivación de *C. albicans in vitro*. Estos no obtienen la reducción total del 99.99999% del cultivo, pero si irradian la muestra ( $\sim 10^6$  ufc/mL) sin previa etapa de lavado durante 30 minutos con TMPyP 5  $\mu\text{M}$  y con una lámpara de 90  $\text{mW cm}^{-2}$  logran una reducción de 5  $\log_{10}$ . Además, los estudios de Quiroga también apuntan que la inactivación fotosensibilizada aumenta con la concentración del FS y con el tiempo de irradiación, pero disminuye con las etapas de lavado del FS debido a que disminuye la cantidad de TMPyP unida a la pared celular. Si se comparan ambos resultados, a 30 minutos de tiempo de irradiación y sin etapa de lavado, se observa que en el presente trabajo se obtiene una mortalidad total del 99.99999% del cultivo (reducción de 6  $\log_{10}$  de una suspensión inicial  $10^6$  ufc/mL) de las cuatro especies de *Candida* con TMPyP 7.5  $\mu\text{M}$ , probablemente una concentración mayor debido a que la lámpara que se ha utilizado de 15  $\text{mW cm}^{-2}$  es de potencia menor que la utilizada en los estudios de Cormick [31] y Quiroga [32] de 90  $\text{mW cm}^{-2}$ .



## 5.5 Conclusiones

Los resultados de TFD antifúngica muestran que la TMPyP es un FS que produce efectos antifúngicos con distinta susceptibilidad y eficacia fotodinámica en función del tipo de especie de levadura, de la concentración celular de la suspensión inicial de levadura ( $10^6$  o  $10^3$  ufc/mL) y de si existe o no una etapa de lavado previa a la irradiación, ya que se obtienen resultados de viabilidad distintos en función de estas variables. Los experimentos realizados *in vitro* sobre queratinocitos y fibroblastos no causan daño significativo después del tratamiento fotodinámico solo en el caso de que se retire el exceso de TMPyP antes de irradiar la muestra. En estas condiciones, para suspensiones iniciales de  $10^6$  ufc/mL no se produce efecto citotóxico y en suspensiones iniciales de  $10^3$  ufc/mL solo se produce una disminución de  $1 \log_{10}$  en *C. albicans* ATTC y *C. parapsilosis*, siendo insuficiente para producir un efecto fungicida en el individuo.

## 5.6 Referencia

- [1] L.E. Castrillón, A. Palma, C. Padilla, Factores de virulencia en *Candida* sp, Dermatología Rev Mex. 49 (2005) 12-27.
- [2] M. Weig, U. Grob, F. Muhischlegel, Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection, Trends Microbiol. 6 (1998) 468-470.
- [3] R.L. Castrillón, R.A. Palma, D.C. Padilla, Reacción inmunológica en infecciones por *Candida* sp, Dermatología Rev Mex. 48 (2004) 140-150.
- [4] S.K. Sharma, T. Dai, G.B. Kharkwal, Y.Y. Huang, L. Huang, V.J. De Arce, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models, Curr. Pharm. Des. 17 (2011) 1303-1319.
- [5] A. Minnock, D.I. Vernon, J. Schofield, J. Griffiths, J.H. Parish, S.T. Brown, Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria, J Photochem Photobiol B. 32 (1996) 159-164.
- [6] M. Merchat, G. Bertolini, P. Giacomini, A. Villanueva, G. Jori, Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria., J Photochem Photobiol B. 32 (1996) 153-157.
- [7] Z. Malik, J. Hanania, Y. Nitzan, Bactericidal effects of photoactivated porphyrins: an alternative approach to antimicrobial drugs, J Photochem Photobiol B. 5 (1990) 281-293.
- [8] X. Ragàs, M. Agut, S. Nonell, Singlet oxygen in *Escherichia coli*: New insights for antimicrobial photodynamic therapy, Free Radic. Biol. Med. 49 (2010) 770-776.

- [9] X. Ragàs, T. Dai, G.P. Tegos, M. Agut, S. Nonell, M.R. Hamblin, Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: *in vitro* and *in vivo* studies, *Lasers Surg. Med.* 42 (2010) 384-390.
- [10] M. Wainwright, Photoinactivation of viruses, *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (2004) 406-411.
- [11] B.B. Fuchs, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, E. Mylonakis, Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity, *Antimicrob Agents Chemother.* 51 (2007) 2929-2936.
- [12] J.M. Bliss, C.E. Bigelow, T.H. Foster, C.G. Haidaris, Susceptibility of *Candida* Species to photodynamic effects of Photofrin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 2000-2006.
- [13] F.P. Gonzales, S.H. da Silva, D.W. Roberts, G.U. Braga, Photodynamic inactivation of conidia of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nidulans* with methylene blue and toluidine blue, *Photochem Photobiol.* 86 (2010) 653-661.
- [14] K. Kassab, D. Dei, G. Roncucci, G. Jori, O. Coppellotti, Phthalocyanine-photosensitized inactivation of a pathogenic protozoan, *Acanthamoeba palestinensis*, *Photochem Photobiol Sci.* 2 (2003) 668-672.
- [15] P. Gottlieb, L.G. Shen, E. Chimezie, S. Bahng, M.E. Kenney, B. Horowitz, E. Ben-Hur, Inactivation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms in blood components by photodynamic treatment with phthalocyanines., *Photochem Photobiol.* 62 (1995) 869-874.
- [16] O.E. Akilov, S. Kosaka, K. O'Riordan, X. Song, M. Sherwood, T.J. Flotte, J.W. Foley, T. Hasan, The role of photosensitizer molecular charge and structure on the

efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites, *Chem. Biol.* 13 (2006) 839-847.

[17] F. Wilkinson, W.P. Helman, A.B. Ross, Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution, *J. Phys. Chem.* 22 (1993) 113-262.

[18] A. Jimenez-Banzo, M.L. Sagrista, M. Mora, S. Nonell, Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 1926-1934.

[19] A. Villanueva, A. Juarranz, V. Díaz, J. Gómez, M. Cañete, Photodynamic effects of a cationic mesosubstituted porphyrin in cell cultures, *Anticancer Drug Des.* 7 (1992) 297-303.

[20] A. Juarranz, A. Villanueva, M. Cañete, J.C. Stockert, Fluorescent porphyrin counterstaining of chromatin DNA in conjunction with immunofluorescence methods using FITC-labelled antibodies, *J. Microsc.* 182 (1996) 46-49.

[21] T. Breitenbach, M.K. Kuimova, P. Gbur, S. Hatz, N.B. Schack, B.W. Pedersen, J.D.C. Lambert, L. Poulsen, P.R. Ogilby, Photosensitized production of singlet oxygen: spatially-resolved optical studies in single cells, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 442-452.

[22] J.W. Snyder, E. Skovsen, J.D.C. Lambert, L. Poulsen, P.R. Ogilby, Optical detection of singlet oxygen from single cells, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 4280-4293.

[23] J.W. Snyder, E. Skovsen, J.D.C. Lambert, P.R. Ogilby, Subcellular, time-resolved studies of singlet oxygen in single cells, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 14558.

- [24] E. Skovsen, J.W. Snyder, J.D.C. Lambert, P.R. Ogilby, Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell, *J Phys Chem B*. 109 (2005) 8570-8573.
- [25] K.P. Nielsen, A. Juzeniene, P. Juzenas, K. Stamnes, J.J. Stamnes, J. Moan, Choice of optimal wavelength for PDT: the significance of oxygen depletion *Photochem. Photobiol.* 81 (2005) 1190-1194.
- [26] B.C. Wilson, M.S. Patterson, The physics of photodynamic therapy, *Phys. Med. Biol.* 31 (1986) 327-360.
- [27] D.A. Caminos, E.N. Durantini, Interaction and photodynamic activity of cationic porphyrin derivatives bearing different pattern of charge distribution with GMP and DNA, *J. Photochem. Photobiol. A*. 198 (2008) 274-281.
- [28] D. Lazzeri, M. Rovera, L. Pascual, E.N. Durantini, Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution, *Photochem. Photobiol.* 80 (2004) 286-293.
- [29] M.B. Spesia, D. Lazzeri, L. Pascual, M. Rovera, E.N. Durantini, Photoinactivation of *Escherichia coli* using porphyrin derivatives with different number of cationic charges, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44 (2005) 289-295.
- [30] D.A. Caminos, M.B. Spesia, E.N. Durantini, Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups, *Photochem. Photobiol. Sci.* 5 (2006) 56-65.
- [31] M.P. Cormick, E.D. Quiroga, S.G. Bertolotti, M.G. Alvarez, E.N. Durantini, Mechanistic insight of the photodynamic effect induced by tri- and tetra-cationic

porphyrins on *Candida albicans* cells, Photochem. Photobiol. Sci. 10 (2011) 1556-1561.

[32] E.D. Quiroga, M.G. Alvarez, E.N. Durantini, Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic action of 5,10,15,20-tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrin in different media., FEMS Immunol. Med. Microbiol. 60 (2012) 123-131.

## **Capítulo 6**

***Mecanismos de acción de la TMPyP frente a especies  
de Candida***





## 6.1 Introducción

Uno de los parámetros que modulan la eficacia de la TFA es la cantidad del FS acumulado en las células microbianas así como el lugar donde se acumule, ya que las especies tóxicas que se forman, las EROs, presentan en general una baja movilidad dando como resultado que el daño producido por la fotooxidación de estructuras celulares[1-3] sea principalmente local. La importancia de la localización del FS es sin embargo relativa ya que se ha demostrado frente a bacterias que la TFA es capaz de producir daño celular desde el exterior sin que el FS sea necesariamente internalizado por la célula [4].

Después de la fotoactivación del FS, las EROs se pueden producir mediante dos mecanismos oxidativos simultáneos, siendo la proporción entre ambos función del tipo de FS, el sustrato y la naturaleza del medio. Estudios recientes demuestran mediante técnicas de desactivación de EROs que el  $^1\text{O}_2$  es la principal especie tóxica implicada en el proceso de fotoinactivación de *C. albicans* cuando se usa TMPyP como FS [5]. Mediante técnicas espectroscópicas pueden evaluarse el comportamiento fotoquímico de la TMPyP y la cinética de formación y desaparición de  $^1\text{O}_2$  para obtener así información sobre la localización intracelular del FS [4,6-8].

La TMPyP (Figura 6.1), cuando se encuentra disuelta en agua tamponada (PBS a pH=7.4), muestra bandas de absorción en el espectro visible- bandas Soret ( $\lambda_{\text{max}} = 420\text{nm}$ ) y bandas Q ( $\lambda_{\text{max}} = 530\text{nm}$ )- y bandas de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{\text{max}} = 680\text{nm}$ ). La longitud de onda de absorción de la TMPyP se encuentra dentro del rango de longitud de onda óptima ( $\lambda_{\text{max}} = 600\text{-}850\text{ nm}$ ) de la ventana terapéutica [9,10], aquella que proporciona una máxima penetración de la luz en el tejido tisular. La TMPyP es un eficiente FS, siendo su rendimiento cuántico de formación de  $^1\text{O}_2$  de 0.77 [11].

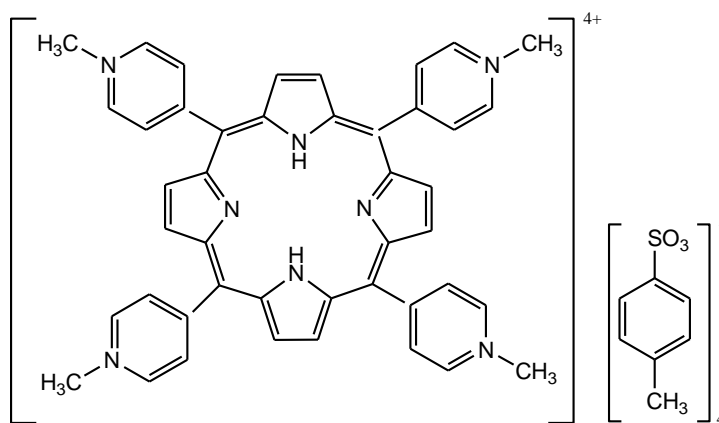


Figura 6.1. Estructura química de la TmPyP

A modo de obtener información complementaria al Capítulo 5, el objetivo de este capítulo es documentar los procesos fotoquímicos que se producen al aplicar la TFD antifúngica, utilizando TmPyP como FS, mediante estudios de localización de la TmPyP sobre especies de *Candida* utilizando técnicas espectroscópicas y fotofísicas.

## 6.2 Parte experimental

### 6.2.1 Cepas fúngicas

Las cepas de levadura que se han utilizado en este capítulo son *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, y *Candida albicans* ATCC 10231, obtenidas a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC: American Type Culture Collection; Rockville, MD) y *C. albicans* CECT 1001 adquirida en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Universidad de Valencia, España).

### 6.2.2 Reactivos químicos

La TMPyP (5,10,15,20-tetraquis(*N*-metil-4-piridil)-21*H*,23*H*-porfina) y el PBS (*Sterile dulbecco's Phosphate Buffered Saline* pH 7.4) fueron comprados en SIGMA-Aldrich El medio de cultivo fúngico, Sabouraud (SB), fue preparado a partir de Sabouraud Dextrose Agar<sup>®</sup>, comprado en Oxoid. El óxido de deuterio (D<sub>2</sub>O 99.9%) fue comprado en Solvents Documentation Synthesis (Peypin, Francia). El PBS deuterado fue preparado disolviendo el PBS en el óxido de deuterio. Se preparó la disolución stock de TMPyP 1 mM en agua tamponada estéril (PBS, pH=7.4). Las disoluciones de trabajo de TMPyP se prepararon a oscuras y se almacenaron a 4° C.

### 6.2.3 Fuentes de luz

Los estudios de fotoinactivación fueron realizados con una lámpara LED Sorisa Photocare<sup>®</sup> con una emisión entre 520 y 550 ± 10 nm y una irradiancia de 15 mW cm<sup>-2</sup>.

#### 6.2.4 Preparación de la muestra

Las suspensiones de cultivo O.N. de levadura fueron cultivadas aeróbicamente a 37° C en medio de cultivo SB hasta una densidad óptica de 0.6 correspondiente a 10<sup>6</sup> ufc/mL. Se retiró el medio de cultivo mediante una centrifugación a 1398 g durante 5 min y se resuspendió en PBS estéril (pH 7.4). Se adicionó TMPyP 10 μM y se incubó durante 1 hora a oscuras. Se retiró el FS en exceso con seis lavados con PBS, mediante centrifugaciones a 1398 g durante 5 min. Para mediciones en PBS deuterado (D-PBS), las suspensiones se centrifugaron dos veces a 1398 g durante 5 min y se resuspendieron en D-PBS. Las mediciones espectroscópicas se llevaron a cabo en cubetas de 1 cm de cuarzo (Hellmut, Alemania) a temperatura ambiente y bajo agitación suave.

#### 6.2.5 Espectros de absorción y fluorescencia

El espectro de absorción del estado fundamental fue obtenido mediante un espectrofotómetro Varian Cary 6000i (Varian Inc., Palo Alto, CA). Los espectros de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{\text{excitación}} = 430 \text{ nm}$ ) se realizaron con un espectrofluorómetro Spex Fluoromax 4 (Horiba Jobin-Yvon, Edison, NJ).

#### 6.2.6 Cinética de fluorescencia

Los decaimientos de fluorescencia resueltos en el tiempo fueron obtenidos con un sistema de conteo de un solo fotón (Fluotime 200, PicoQuant GmbH, Berlin, Alemania) equipado con un fotomultiplicador sensible al rojo. La fluorescencia fue excitada a 405 nm, mediante un LED pulsado y fue observada a 655 nm. El decaimiento de fluorescencia fue analizado usando el software de análisis de datos PicoQuant FluoFit 4.0.

### 6.2.7 Cinética de oxígeno singlete

La fosforescencia de oxígeno singlete fue detectada mediante un sistema customizado, el Pico Quant Fluotime 200 [12], tal y como se detalla en el apartado 2.3.4 del capítulo 2 de técnicas y métodos.

## 6.3 Resultados

### 6.3.1 Espectros de absorción y fluorescencia

En la Figura 6.2 se muestran los espectros de absorción y excitación de fluorescencia de la TMPyP en PBS (pH= 7.4) y en las suspensiones de levadura. Si se comparan los espectros de absorción de la TMPyP en PBS frente a los obtenidos en suspensiones de levadura, se observa que resultaron más amplios en las levaduras y que las bandas Soret a 430 nm mostraron un desplazamiento batocrómico poco pronunciado, de tan solo 2 nm. El espectro de emisión de fluorescencia de la TMPyP en PBS muestra una banda ancha sin estructura, característica de la TMPyP monomérica en soluciones acuosas [13,14], mientras que la emisión de este FS en suspensiones de levadura forma dos bandas, a 657 nm y 707 nm para *C. albicans* CECT, 657 nm y 705 nm para *C. albicans* ATCC, 660 nm y 700 nm para *C. krusei*, y 660 nm y 709 nm para *C. parapsilosis*, correspondientes a las transiciones vibrónicas (0-0) y (0-1) de la TMPyP, respectivamente. Estas dos bandas surgen del impedimento estérico de la rotación de los grupos piridinio respecto al macrociclo de porfirina y/o al descenso de polaridad del microentorno cuando la TMPyP se encuentra asociada con la levadura.

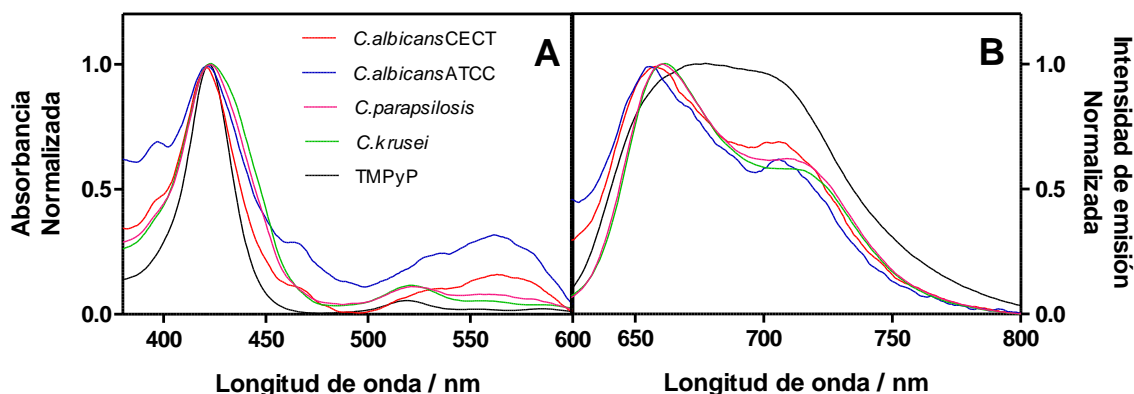


Figura 6.2. Espectro de absorción (A) y fluorescencia (B) normalizados de la TMPyP (10 μM). Se muestra el espectro de absorción en levaduras y en PBS, y el espectro de fluorescencia normalizado en levaduras y en PBS ( $\lambda_{\text{excitación}} = 430 \text{ nm}$ ).

### 6.3.2 Cinética de fluorescencia

El decaimiento de fluorescencia de la TMPyP en PBS (pH=7.4) muestra una función monoexponencial con un tiempo de vida media de 4.8 ns. Si se realiza la medida de la TMPyP en una suspensión de levaduras en PBS, el decaimiento de fluorescencia pasa de una cinética de 1er orden a una cinética de 2do orden, con una componente de tiempo de vida corto entre 3.1 y 3.3 ns y una componente de tiempo de vida largo entre 9.9 y 10.9 ns. Se realizaron controles sobre el sobrenadante y resultó no obtenerse señal alguna, lo que indica que la señal obtenida está producida por TMPyP unida o internalizada en la célula. Los resultados experimentales para la fluorescencia resuelta en el tiempo de la TMPyP se encuentran graficados en la Figura 6.3 y tabulados en la Tabla 6.1.

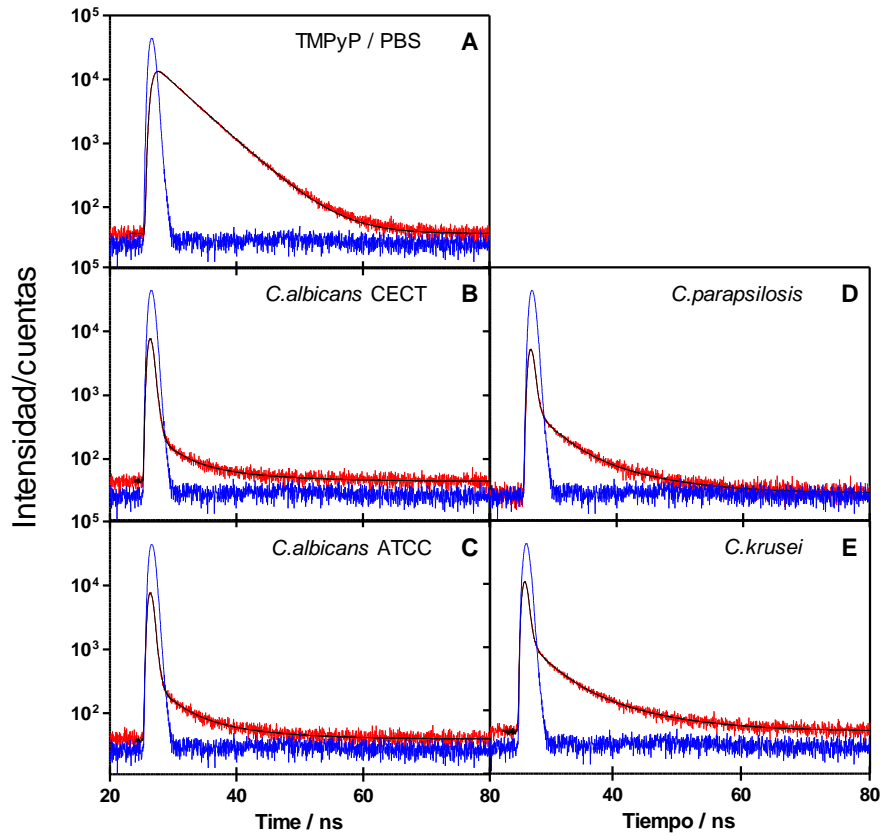


Figura 6.3. Decaimiento de fluorescencia resuelta en el tiempo de la TMPyP en PBS (A) y en levaduras (B, C, D, E). Las muestras fueron irradiadas a 405 nm y la fluorescencia fue observada a 655 nm. La curva roja es la señal, la azul la función de respuesta del instrumento y la negra encima de la señal es el ajuste de la función.



Tabla 6.1 Resumen de los resultados fotofísicos de la TMPyP. Longitud de onda de fluorescencia de la TMPyP en PBS ( $\lambda_F$ ), tiempo de vida media de la fluorescencia resuelta en el tiempo de la TMPyP en PBS ( $\tau_S$ ), tiempo de vida media del triplete de la TMPyP en PBS medido a 960 nm ( $^{PBS}\tau_T^{960}$ ), tiempo de vida media del oxígeno singlete en PBS medido a 1275 nm ( $^{PBS}\tau_{\Delta}^{1275}$ ), tiempo de vida media del oxígeno singlete en PBS deuterado medido a 1275 nm ( $^{D-PBS}\tau_{\Delta}^{1275}$ ) y tiempo de vida media del oxígeno singlete en PBS deuterado medido a 1275 nm y con BSA en el medio ( $^{D-PBS+BSA}\tau_{\Delta}^{1275}$ ).

	PBS	<i>C. albicans</i> CECT	<i>C. albicans</i> ATCC	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>
$\lambda_F/nm^a$	668	657	657	660	660
	701	707	705	709	700
$\tau_S / ns^b$		10.9 (25)	10.0 (35)	10.0 (26)	9.9 (25)
(% Amplitud)	4.8 (100)	3.1 (75)	3.2 (65)	3.2 (74)	3.3 (75)
$^{PBS}\tau_T^{960} / \mu s^c$	--	2.3	2.9	2.9	3.5
	--	21	27	22	18
$^{PBS}\tau_{\Delta}^{1275} / \mu s^c$	--	3.6	3.7	2.8	3.2
$^{D-PBS}\tau_{\Delta}^{1275} / \mu s^c$	--	65	65	68	68
$^{D-PBS+BSA}\tau_{\Delta}^{1275} / \mu s^c$	--	55	50	49	64

Procedencia experimental de los valores mostrados en la tabla:

<sup>a</sup> Espectro de excitación de fluorescencia a  $\lambda_{exc} = 430$  nm.

<sup>b</sup> Cinética de fluorescencia resuelta en el tiempo a  $\lambda_{exc} = 405$  nm y  $\lambda_{obs} = 655$  nm; incertidumbre del  $\pm 10\%$ .

<sup>c</sup> Cinéticas de  $^1O_2$ : fosforescencia de la  $^3TMPyP$  a  $\lambda_{obs} = 960$  nm; incertidumbre del  $\pm 10\%$ .

<sup>c</sup> Cinéticas de  $^1O_2$ : fosforescencia del  $^1O_2$  a  $\lambda_{obs} = 1275$  nm; incertidumbre del  $\pm 10\%$ .

### 6.3.3 Cinética de oxígeno singlete

Como se ha descrito ya anteriormente, la monitorización del  $^1\text{O}_2$  mediante su fosforescencia resuelta en el tiempo a 1275 nm es una técnica valiosa que se utiliza para estudiar procesos de fotosensibilización del  $^1\text{O}_2$  en células [4, 12, 15-19].

La irradiación de suspensiones de levaduras ( $\sim 10^6$  ufc/mL) con TMPyP incorporada se realizó con un láser pulsado a 532 nm, produciendo señales de luminiscencia a 1275 nm y 960 nm en todas las especies de *Candida*, tanto en PBS como en D-PBS. La fosforescencia obtenida de la emisión a 1275 nm siguió una cinética típica de subida y bajada (Figura 6.4 (A), Figura 6.5 (A), Figura 6.6(A), Figura 6.7(A)), con un tiempo de vida media de 3.6  $\mu\text{s}$  para *C. albicans* CECT, 3.7  $\mu\text{s}$  para *C. albicans* ATCC, 2.8  $\mu\text{s}$  para *C. parapsilosis* y de 3.2 para *C. krusei*. Al retirar el PBS y resuspender las levaduras en D-PBS aumentó el tiempo de vida media del  $^1\text{O}_2$  (relativo a su valor en PBS (3.3  $\mu\text{s}$ )) hasta valores de 65-68  $\mu\text{s}$  típicos de  $^1\text{O}_2$  en medio deuterado (66  $\mu\text{s}$ ), tal y como puede observarse en la Figura 6.4 (C), Figura 6.5 (C), Figura 6.6(C) y Figura 6.7(C). Al adicionar la proteína BSA (albúmina de suero bovino 0.75 mM en D-PBS) disminuyó el tiempo de vida media del  $^1\text{O}_2$  (relativo a la medida en D-PBS) hasta valores de 49-64  $\mu\text{s}$  (Figura 6.4 (D), Figura 6.5 (D), Figura 6.6(D), Figura 6.7(D)). Los controles a 1325 nm no produjeron ninguna señal debido a que a esta longitud de onda el  $^1\text{O}_2$  no emite fosforescencia (no se presentan graficados). El sobrenadante del pellet celular no mostró señal a 1275 nm, lo que indica que las señales obtenidas en todas las medidas son producidas por el  $^1\text{O}_2$  incorporado en las levaduras.

La emisión de fosforescencia a 960 nm sigue una cinética biexponencial (Figura 6.4 (B), Figura 6.5 (B), Figura 6.6(B), Figura 6.7(B)), lo cual indica una doble localización de la TMPyP en la célula fúngica. Esta función biexponencial está formada por una componente corta que se desactiva con un tiempo de vida media de

2.3-3.5  $\mu\text{s}$  y una componente larga que decae con un tiempo de vida media mayor, de 18-27  $\mu\text{s}$ . El sobrenadante del pellet celular no mostró señal a 960 nm, lo que indica que las señales obtenidas en todas las medidas son producidas por el  $^1\text{O}_2$  incorporado en las levaduras. Estos datos cinéticos están recogidos en la tabla 1.1.

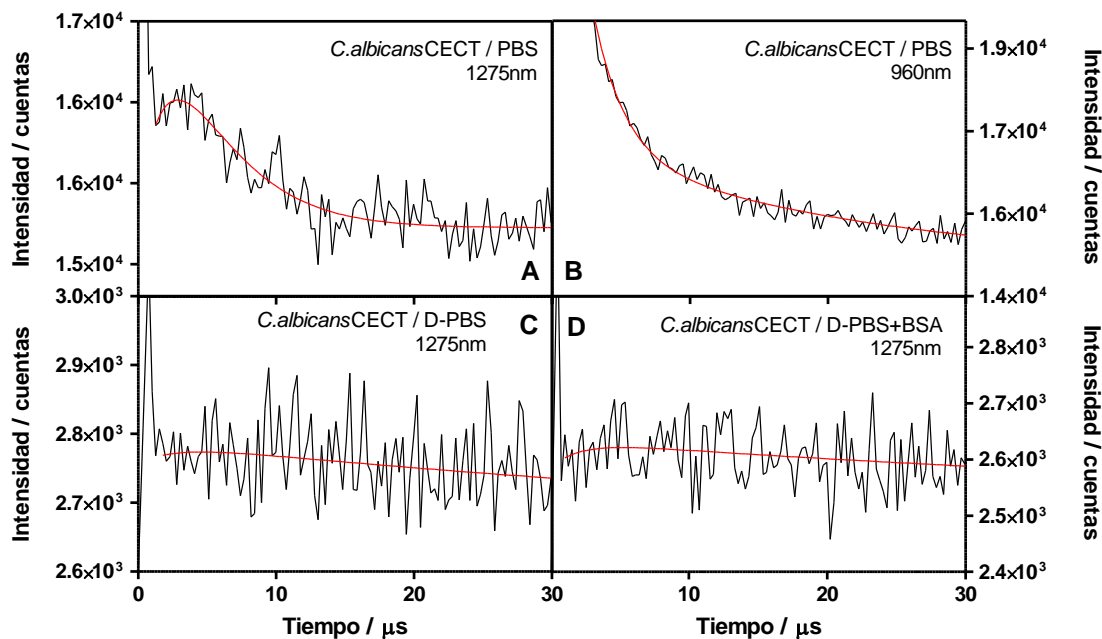


Figura 6.4. *C. albicans* CECT: Cinética de  $^1\text{O}_2$  observada a 1275 nm en PBS (A), en D-PBS (C) y con la proteína BSA en D-PBS (D). Fosforescencia de la TMPyP a 960 nm (B). En negro se observa la señal y en rojo el ajuste de dicha señal.

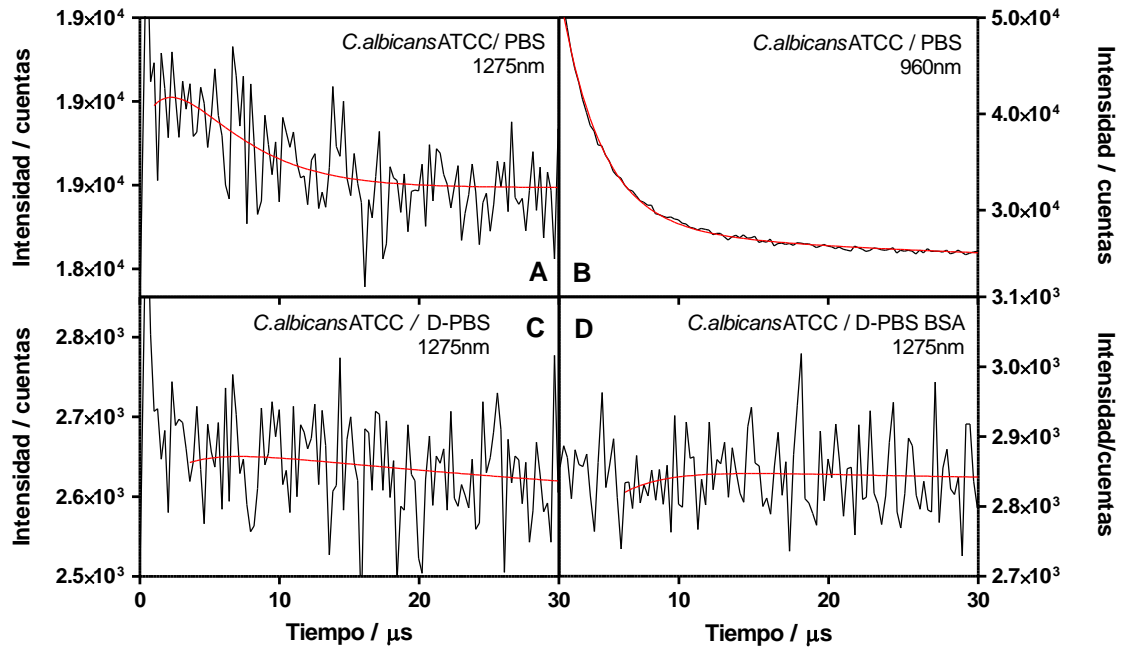


Figura 6.5. *C. albicans* ATCC: Cinética de  $^1\text{O}_2$  observada a 1275 nm en PBS (A), en D-PBS (C) y con la proteína BSA en D-PBS (D). Fosforescencia de la TMPyP a 960 nm (B). En negro se observa la señal y en rojo el ajuste de dicha señal.

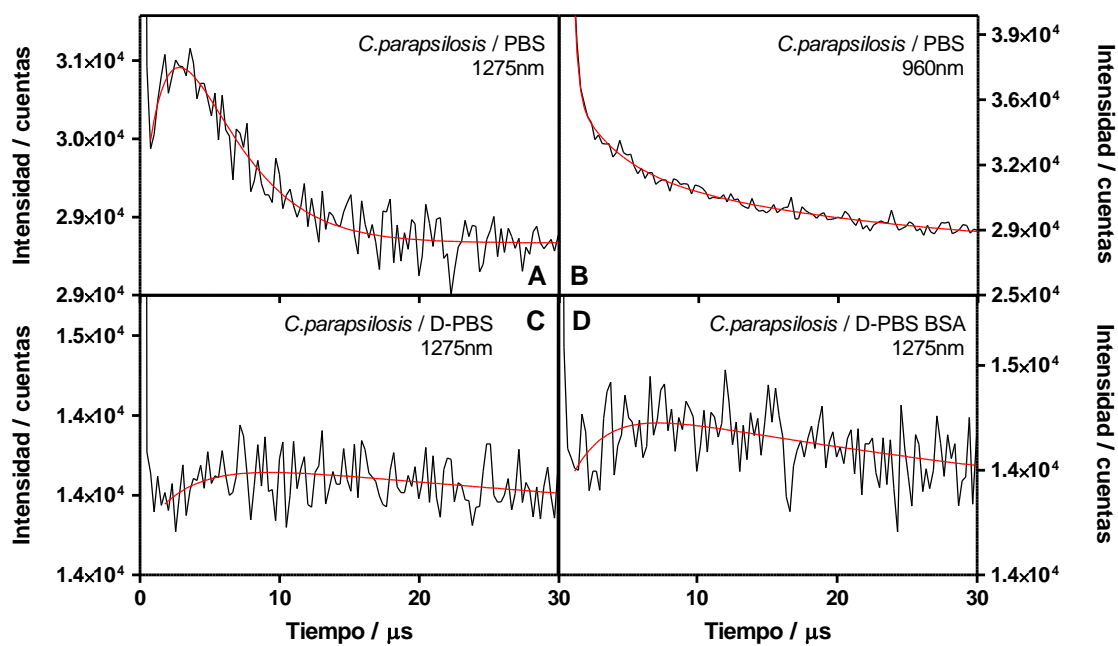


Figura 6.6 *C. parapsilosis*: Cinética de  $^1\text{O}_2$  observada a 1275 nm en PBS (A), en D-PBS (C) y con la proteína BSA en D-PBS (D). Fosforescencia de la TMPyP a 960 nm (B). En negro se observa la señal y en rojo el ajuste de dicha señal.

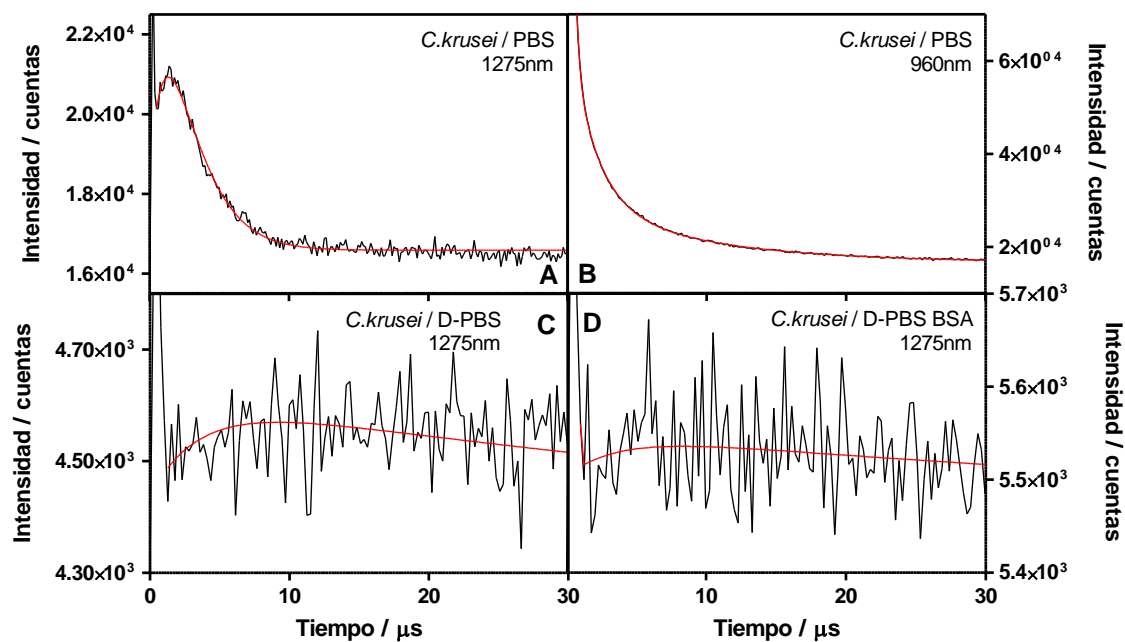


Figura 6.7. *C. krusei*: Cinética de  $^1\text{O}_2$  observada a 1275 nm en PBS (A), en D-PBS (C) y con la proteína BSA en D-PBS (D). Fosforescencia de la TmPyP a 960 nm (B). En negro se observa la señal y en rojo el ajuste de dicha señal.

## 6.4 Discusión

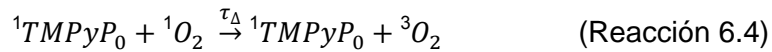
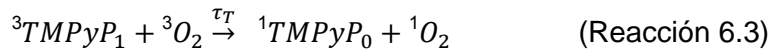
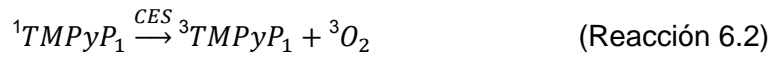
El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la fotoquímica que ocurre al aplicar la TFD, utilizando TMPyP como FS, sobre especies de *Candida*. Mediante estas medidas espectroscópicas y fotofísicas se pretende determinar la localización de la TMPyP y, por consiguiente, el lugar donde se producen las EROs. De este modo se procura entender el mecanismo de fotosensibilización que ocurre al producirse la fotoinactivación de las levaduras que posteriormente causará la muerte celular.

Los espectros de absorción y emisión de fluorescencia de la TMPyP en PBS o en las suspensiones de levadura (Figura 6.2) muestran un cambio en el microambiente de la TMPyP, indicando la incorporación de este FS por las células fúngicas. Este cambio en la polaridad del microambiente de la TMPyP se refleja tanto en el cambio de forma del espectro como en el desplazamiento hacia el rojo. Resultados similares se han obtenido en estudios anteriores de nuestro grupo, sobre fibroblastos humanos [8] y sobre *Escherichia coli* [4], indicando esta incorporación y localización intracelular de la TMPyP.

La fluorescencia resuelta en el tiempo revela la presencia de diferentes poblaciones de TMPyP formadas en las levaduras, ya que el decaimiento de fluorescencia pasa de una cinética monoexponencial en PBS (4.8 ns) a una cinética biexponencial en levaduras, donde el tiempo de vida de la TMPyP excitada y las amplitudes relativas de los componentes apenas varían entre las distintas especies de *Candida* (Tabla 6.1). Esta cinética biexponencial indica que existen moléculas de TMPyP unidas en distintas zonas de la célula, ya que se desactivan con distintos tiempos de vida media. La componente de tiempo de vida corta (3.1-3.3 ns) indica que parte de la TMPyP no incorporada por las células está en medio acuoso [14], es decir, unida a la pared celular. La componente de tiempo de vida larga (9.9-10.9 ns) sugiere que el resto de la TMPyP está unida a ácidos nucleicos (probablemente en

zona adenina-timina del ADN) [20,21]. Que los valores de tiempo de vida media de la TMPyP incorporada sean tan parecidos entre todas las especies de *Candida* (tabla 1.1), indica que este FS, se localiza de forma similar en todas las especies, probablemente la pared celular y el núcleo.

Los experimentos de fosforescencia resuelta en el tiempo muestran las cinéticas de formación de  $^1O_2$  a 1275 nm y de las diferentes poblaciones del estado excitado triplete del FS ( $^3TMPyP_1$ ) a 960 nm, en todas las especies de *Candida* (tanto en PBS como en D-PBS), según refleja la siguiente cascada de reacciones fotoquímicas:



De este modo se proporciona una evidencia adicional de su localización y de la formación de una especie citotóxica, el  $^1O_2$ , debido a la transferencia de energía que se da entre el oxígeno molecular y la TMPyP excitada, para volver así a su estado fundamental. La fosforescencia obtenida de la emisión a 1275 nm sigue una cinética de primer orden con un tiempo de vida media de 2.8-3.7  $\mu$ s, siendo del mismo orden de magnitud al tiempo tabulado en la bibliografía [22] de 3.3  $\mu$ s el que se asigna al  $^1O_2$  en medio acuoso. Los motivos que corroboran que esta señal está producida por el  $^1O_2$  son los siguientes:

(a) no se obtiene señal a 1325 nm, ya que el  $^1O_2$  a esta longitud de onda no emite fosforescencia

(b) aumenta el tiempo de vida media del  $^1O_2$  en D-PBS (relativo a su valor en PBS (66  $\mu$ s)) debido a los efectos isotópicos del deuterio [16,23] que producen que el  $^1O_2$  se desactive más lentamente.



(c) la disminución del tiempo de vida media del  $^1\text{O}_2$  (relativo a la medida en D-PBS) al adicionar la proteína BSA (albúmina de suero bovino 0.75 mM en PBS deuterado) ya que esta ejerce una función de desactivador de  $^1\text{O}_2$  debido a que su gran tamaño (65 kDa) no le permite penetrar la célula [6], desactivando así el  $^1\text{O}_2$  extracelular pero no el intracelular.

La fosforescencia a 960 nm indica que existe una doble localización de la TMPyP en levaduras debido a que los datos experimentales de decaimiento de este FS incorporado en células fúngicas se ajustan una función biexponencial. La emisión de esta fosforescencia se asigna al triplete de la TMPyP ya que a esta longitud de onda no emite el  $^1\text{O}_2$  pero sí este FS. Esta cinética biexponencial está formada por una componente corta de 2.3-3.5  $\mu\text{s}$ , siendo la reportada en la bibliografía de 2.5  $\mu\text{s}$  para la fosforescencia de la TMPyP en ambientes aeróbicos acuosos [24,25]. Este dato indica que hay parte de la TMPyP unida a la pared celular de la levadura, reafirmando así el resultado obtenido en los experimentos de fluorescencia resuelta en el tiempo (apartado 3.2). A 960 nm, la componente larga decae con un tiempo de vida media de 18-27  $\mu\text{s}$  y se asigna a moléculas de TMPyP unidas a ácidos nucleicos, en concordancia con los datos reportados en la bibliografía ( $\sim 20 \mu\text{s}$ ) [4, 8, 14, 25].

Estudios de microscopía de fluorescencia realizados en neuronas de hipocampo de rata [6,7,26], células HeLa [27,28], o fibroblastos humanos [8] aseguran que la localización preferencial de la TMPyP se da en el núcleo, lo que estaría en concordancia con los resultados obtenidos en los presentes experimentos de fluorescencia resuelta en el tiempo, cinéticas de oxígeno singlete y fosforescencia de la TMPyP, es decir, este FS es incorporado por todas las especies de *Candida* y que se colocaliza en el núcleo, además en la pared celular.

## 6.5 Conclusiones

Para concluir, los hongos son dianas complejas debido a su envoltura de pared celular externa, compuesta por una mezcla de glucano, manano, quitina y lipoproteínas, y separada de la membrana plasmática por un espacio periplasmático [29]. Sin embargo, los resultados indican que parte de la TMPyP difunde hacia el interior de la célula y el resto queda unida a la pared celular, produciendo ambas poblaciones que se activan los procesos fotodinámicos que producirán  $^1\text{O}_2$ , inactivando así la pared celular y oxidando a los ácidos nucleicos. De este modo, al no ser necesario que la TMPyP sea incorporada por las células para producir daño sobre estructuras vitales celulares y debido a que el  $^1\text{O}_2$  es un agente oxidante no específico, la TFD antifúngica es una técnica que no causaría la resistencia del microorganismo, tal y como se ha observado en TFD frente a bacterias [30,31].

En este capítulo se han estudiado los fotoprocesos involucrados al aplicar la TFD *in vitro* con TMPyP sobre las cuatro especies de *Candida* ensayadas. Se ha documentado la fluorescencia de la TMPyP, la fosforescencia del  $^1\text{O}_2$  formado por transferencia de energía del triplete de la TMPyP, así como los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de este FS en las levaduras. Como resultado de estos ensayos espectroscópicos y fotofísicos, se ha obtenido dicha doble localización de este FS: en la pared celular y unida a los ácidos nucleicos, lo cual produce especies tóxicas del oxígeno que inducen la muerte celular por oxidación de estructuras celulares de todas las especies de *Candida* que se han estudiado.

## 6.6 Referencias

- [1] G. Stark, Functional consequences of oxidative membrane damage, *J. Membr. Biol.* 205 (2005) 1-16.
- [2] A. Michaeli, J. Feitelson, Reactivity of singlet oxygen toward large peptides, *Photochem. Photobiol.* 61(3) (1995) 255-260.
- [3] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J.L. Ravanat, Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, *Mutat. Res.* 531 (2003) 5-23.
- [4] X. Ragàs, M. Agut, S. Nonell, Singlet oxygen in *Escherichia coli*: New insights for antimicrobial photodynamic therapy, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 770-776.
- [5] M.P. Cormick, E.D. Quiroga, S.G. Bertolotti, M.G. Alvarez, E.N. Durantini, Mechanistic insight of the photodynamic effect induced by tri- and tetra-cationic porphyrins on *Candida albicans* cells, *Photochem. Photobiol. Sci.* 10 (2011) 1556-1561.
- [6] J.W. Snyder, E. Skovsen, J.D.C. Lambert, P.R. Ogilby, Subcellular, time-resolved studies of singlet oxygen in single cells, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 14558.
- [7] E. Skovsen, J.W. Snyder, J.D.C. Lambert, P.R. Ogilby, Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell, *J Phys Chem B.* 109 (2005) 8570-8573.
- [8] A. Jimenez-Banzo, M.L. Sagrista, M. Mora, S. Nonell, Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 1926-1934.
- [9] K.P. Nielsen, A. Juzeniene, P. Juzenas, K. Stamnes, J.J. Stamnes, J. Moan, Choice of optimal wavelength for PDT: the significance of oxygen depletion *Photochem. Photobiol.* 81 (2005) 1190-1194.

[10] B.C. Wilson, M.S. Patterson, The physics of photodynamic therapy, *Phys. Med. Biol.* 31 (1986) 327-360.

[11] F. Wilkinson, W.P. Helman, A.B. Ross, Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution, *J. Phys. Chem.* 22 (1993) 113-262.

[12] A. Jimenez-Banzo, X. Ragàs, P. Kapusta, S. Nonell, Time-resolved methods in biophysics. 7. Photon counting vs. analog time-resolved singlet oxygen phosphorescence detection, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008) 1003-1010.

[13] K. Kano, T. Miyake, K. Uomoto, T. Sato, T. Ogawa, S. Hashimoto, Evidence for Stacking of Cationic Porphyrin in Aqueous-Solution, *Chem. Lett.* (1983) 1867-1870.

[14] F.J. Vergeldt, R.B.M. Koehorst, A. Vanhoek, T.J. Schaafsma, Intramolecular Interactions in the Ground and Excited-State of Tetrakis(N-Methylpyridyl)Porphyrins, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 4397-4405.

[15] M. Niedre, M.S. Patterson, B.C. Wilson, Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells *in vitro* and tissues *in vivo*, *Photochem. Photobiol.* 75 (2002) 382-391.

[16] C. Schweitzer, R. Schmidt, Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen, *Chem. Rev.* 103 (2003) 1685-1757.

[17] A. Baier, M. Maier, R. Engl, M. Landthaler, W. Baumler, Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells, *J Phys Chem B.* 109 (2005) 3041-3046.

[18] J.W. Snyder, E. Skovsen, J.D.C. Lambert, L. Poulsen, P.R. Ogilby, Optical detection of singlet oxygen from single cells, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 4280-4293.

[19] J. Schlothauer, S. Hackbarth, B. Roder, A new benchmark for time-resolved detection of singlet oxygen luminescence - revealing the evolution of lifetime in living cells with low dose illumination, *Laser Physics Letters*. 6 (2009) 216-221.

[20] R.F. Pasternack, A. Antebi, B. Ehrlich, D. Sidney, E.J. Gibbs, S.L. Bassner, L.M. Depoy, Interactions of Porphyrins with Nucleotides and Nucleic-Acids, *Journal of Molecular Catalysis*. 23 (1984) 235-242.

[21] V.M. De Paoli, S.H. De Paoli, L.E. Borissevitch, A.C. Tedesco, Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH<sub>2</sub> associated with micelles and DNA, *J. Alloys Compounds*. 344 (2002) 27-31.

[22] J.W. Snyder, J.D.C. Lambert, P.R. Ogilby, 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphine (TMPyP) as a sensitizer for singlet oxygen imaging in cells: Characterizing the irradiation-dependent behavior of TMPyP in a single cell, *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 177-184.

[23] P.R. Ogilby, C.S. Foote, Chemistry of Singlet Oxygen .36. Singlet Molecular-Oxygen (1-Delta-G) Luminescence in Solution Following Pulsed Laser Excitation - Solvent Deuterium-Isotope Effects on the Lifetime of Singlet Oxygen, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 2069-2070.

[24] N.N. Kruk, S.I. Shishporenok, A.A. Korotky, V.A. Galievsky, V.S. Chirvony, P.Y. Turpin, Binding of the cationic 5,10,15,20-tetrakis(4-N-methylpyridyl) porphyrin at 5' CG3' and 5' GC3' sequences of hexadeoxyribonucleotides: triplet-triplet transient absorption, steady-state and time-resolved fluorescence and resonance Raman studies, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. 45 (1998) 67-74.

[25] A. Eichner, F.P. Gonzales, A. Felgenträger, J. Regensburger, T. Holzmann, W. Schneider-Brachert, W. Bäumlner, T. Maisch, Dirty hands: photodynamic killing of human pathogens like EHEC, MRSA and *Candida* within seconds. *Photochem Photobiol Sci.* (2012).

[26] J.W. Snyder, E. Skovsen, J.D.C. Lambert, L. Poulsen, P.R. Ogilby, Optical detection of singlet oxygen from single cells, *Phys.Chem.Chem.Phys.* 8 (2006) 4280-4293.

[27] T. Breitenbach, M.K. Kuimova, P. Gbur, S. Hatz, N.B. Schack, B.W. Pedersen, J.D.C. Lambert, L. Poulsen, P.R. Ogilby, Photosensitized production of singlet oxygen: spatially-resolved optical studies in single cells, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 442-452.

[28] S. Hatz, J.D. Lambert, P.R. Ogilby, Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability, *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 (2007) 1106-1116.

[29] R.F. Donnelly, P.A. McCarron, M.M. Tunney, Antifungal photodynamic therapy, *Microbiol. Res.* 163 (2008) 1-12.

[30] M. Wainwright, Photoantimicrobials--so what's stopping us? *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 6 (2009) 167-169.

[31] T. Dai, Y.Y. Huang, M.R. Hamblin, Photodynamic therapy for localized infections--state of the art, *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 6 (2009) 170-188.

## **Capítulo 7**

***Uso del NMB en terapia fotodinámica in vitro aplicada  
sobre especies de Candida***





## 7.1 Introducción

La incidencia de infecciones fúngicas superficiales han aumentado notablemente en los últimos 25 años, tal y como se recoge en diferentes publicaciones [1-3]. Entre los factores que han intervenido en este hecho, destacan por su incidencia el uso de fármacos inmunosupresores y antineoplásicos que facilitan las infecciones causadas por patógenos oportunistas, la utilización de antibióticos de amplio espectro que conducen a sobreinfecciones fúngicas [4].

En este capítulo, se pretende evaluar el potencial de la TFD como técnica para la eliminación selectiva de las células fúngicas [5,6]. Es conocido que la eficacia de ciertos tipos de FS frente a bacterias está basada en la capacidad de penetración en la célula bacteriana, siendo más eficaces los FS catiónicos en bacterias Gram negativas debido a que la membrana externa cargada negativamente dificulta la entrada de FS aniónicos y no facilita la entrada de FS neutros, a diferencia de las bacterias Gram positivas [7]. Sin embargo, en el caso de la levaduras la carga del FS no juega un papel tan importante ya que al no tener esta membrana tan cargada negativamente entran sin tanto impedimento electrostático, tanto FS catiónicos, aniónicos o neutros. Sin embargo, debido a la similitud entre células humanas y fúngicas existen publicaciones que indican que es preferible utilizar FS catiónicos en vez de tensoactivos aniónicos ya que estos últimos son también interiorizados por las células humanas, lo que produciría un aumento de los efectos secundarios al aplicar la TFD antifúngica [8,9].

Los FS catiónicos son típicamente moléculas planas y rígidas con un alto grado de conjugación. El NMB (cloruro de 3,7-bis (etilamino)-2,8-dimetilfenotiacina-5-io) es una fenotiazina formada por una estructura plana tricíclica con un máximo de absorción a 630 nm y de emisión de fluorescencia a 650 nm (Figura 7.1).

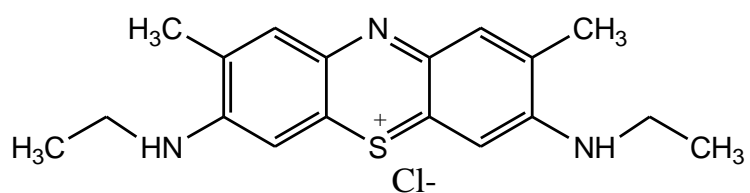


Figura 7.1. Estructura química del NMB

El objetivo de este capítulo es estudiar el efecto antifúngico que tiene el NMB en la TFD *in vitro* contra especies de *Candida* patógenas para el ser humano, así como los efectos adversos que produce dicha técnica sobre células epidérmicas humanas.

## 7.2 Parte experimental

### 7.2.1 Cepas fúngicas y células humanas

Las cepas de levadura que se han estudiado en este capítulo son *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida albicans* ATCC 10231, obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC: American Type Culture Collection; Rockville, MD) y *C. albicans* CECT 1001 suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT: Universidad de Valencia, España).

Las células humanas que se han utilizado son queratinocitos (HaCaT: human adult high calcium low temperature) y fibroblastos (hNDF: human normal dermal fibroblasts), obtenidos de la Universidad Autónoma de Madrid y del Hospital Central de Asturias, respectivamente.

### 7.2.2 Reactivos químicos

El NMB (cloruro de 3,7-Bis (etilamino)-2,8-dimetilfenotiacina-5-io), el PBS (*Sterile dulbecco's Phosphate Buffered Saline* pH 7.4), el DMSO (dimetil sulfóxido) y el SDS (dodecil sulfato sódico) fueron comprados en SIGMA-Aldrich. La MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) fue adquirida en HWI Analytik GMBH (Ruelzheim, Alemania). El DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* 4.5 g/L glucosa), el FBS (*Fetal Bovine Serum*), la Penicilina Estreptomina, la L-glutamina para los ensayos biológicos con células humanas fueron suministrados por Lonza (Sur América). El "Pierce BCA Protein Assay Kit" fue obtenido en Thermo Scientific.

El medio de cultivo fúngico, Sabouraud (SB), fue preparado a partir de Sabouraud Dextrose Agar<sup>®</sup>, comprado en Merck. El medio de cultivo de células humanas (MCH) fue puesto a punto a partir de DMEM suplementado con FBS 10%, penicilina estreptomina 1% (v/v) y L-glutamina 2 mM. La disolución stock de NMB 1 mM fue preparada en agua tamponada estéril (PBS, pH=7.4). Las disoluciones de

trabajo de NMB se disolvieron en PBS (para experimentos con levaduras) o con DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM y penicilina estreptomicina 1% (v/v) (para experimentos con células humanas). Las disoluciones fueron preparadas a oscuras y almacenadas a 4° C.

### 7.2.3 Fuentes de luz

Tanto las distintas especies de *Candida* como las células humanas, HaCaT y hNDF, fueron irradiadas con la lámpara LED Sorisa Photocare® con una emisión entre 620 y 645 ± 10 nm y una irradiancia de 15 mW cm<sup>-2</sup>.

### 7.2.4 Inactivación fotosensibilizada en suspensiones celulares fúngicas

Se adiciona NMB (2, 7.5 y 12.5 µM en PBS) a la suspensión de levadura (~10<sup>6</sup> ufc/mL), se incuba a oscuras durante 15, 30 ó 45 minutos a 37° C y 120 rpm. Para excitar la banda de 630 nm del NMB se irradia la muestra (sin lavado previo del FS en exceso) entre 620 y 645 nm mediante la fuente de LEDs Sorisa Photocare® de 15mW cm<sup>-2</sup>, durante 15, 30 ó 45 minutos. Esto corresponde a una fluencia de 14, 27 y 41 J cm<sup>-2</sup>, respectivamente. Se siembra la suspensión, se incuba a 37° C durante 2 días y se realiza el recuento de las colonias formadas después del tratamiento fotodinámico. El control de toxicidad de la luz (sin FS) y la toxicidad del FS (sin luz) se realiza para cada ensayo y en las mismas condiciones en que se realizan los experimentos. Los ensayos se realizaron por triplicado, dando los valores de viabilidad celular como logaritmo de las cfu/mL frente a la concentración de NMB como desviaciones estándares.

#### 7.2.5 Efecto del tratamiento fotodinámico en células humanas

La viabilidad celular de los queratinocitos y fibroblastos después del tratamiento fotodinámico se evalúa mediante el ensayo de MTT. Se adiciona NMB (2, 5 y 7.5  $\mu\text{M}$  en MCH) a los hNDF y HaCaT ( $1 \cdot 10^6$  y  $2 \cdot 10^6$  células, respectivamente) y se incuban a oscuras durante 15 min a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Se irradia la muestra entre 620 y 645 nm mediante la fuente de LEDs Sorisa Photocare® de  $15\text{mW cm}^{-2}$ , durante 15, 30 ó 45 min (fluencia de 14, 27 y 41  $\text{J cm}^{-2}$ , respectivamente). Se retira el NMB en exceso mediante dos lavados con PBS y pasadas 24h se incuban las células con MTT (0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$  en MCH) durante 3h a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Se retira la MTT mediante dos lavados con PBS y se adicionan 500  $\mu\text{L}$  de DMSO para lisar las células. Se agita a oscuras durante 15 min y se lee la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas (Biotek ELx808).

#### 7.2.6 Incorporación del NMB en levaduras

La incorporación del NMB en las levaduras en función del tiempo se realiza mediante medidas de fluorescencia del lisado celular. Se adiciona a la suspensión fúngica NMB 2.5  $\mu\text{M}$  y se incuban a  $37^\circ\text{C}$  con agitación y a oscuras durante 1, 2, 4, 6 y 24 h. Se retira el NMB en exceso mediante lavados con PBS con centrifugaciones de 5 minutos a 1398 g. Se añade SDS (2% (w/v) en  $\text{H}_2\text{O}$ ) al pellet, se agita a oscuras durante 24 h y se mide la fluorescencia del FS con un espectrofluorímetro (*Jobin Yvon-Spex FLUOROMAX-4*), excitando a 590 nm y registrando la emisión de la NMB entre 600 y 800nm.

Se calcula para cada tiempo de incorporación el área bajo la curva de cada espectro de fluorescencia y se grafican los resultados como fluorescencia del lisado celular normalizada frente al tiempo. Los experimentos se realizaron por triplicado, mostrando valores de incorporación del FS frente al tiempo como desviación estándar.

### 7.2.7 Incorporación del NMB en células epidérmicas humanas

La incorporación del NMB en función del tiempo se realiza también mediante medidas de fluorescencia del lisado celular. Se añade NMB 2.5  $\mu\text{M}$  al cultivo celular y se incuba a distintos tiempos (0.5, 1, 2, 6, 8, 18 y 24 h). Para cada tiempo de incorporación se rascan las células, se transvasan a un tubo y al pellet resultante se le añade SDS (2% (w/v) en  $\text{H}_2\text{O}$ ) que lizará las células, liberando así el NMB que había sido incorporado por las estas. Para cada tiempo, se realiza el ensayo de Cuantificación de proteínas y se mide la fluorescencia del NMB (*Jobin Yvon-Spex FLUOROMAX-4*), excitando a 590 nm y registrando la emisión en un rango entre 600 y 800 nm.

El tratamiento matemático de los datos experimentales consiste en calcular el área bajo la curva de cada espectro de fluorescencia obtenido para cada tiempo. Paralelamente se calcula también la cantidad de proteína total en muestra. Mediante la Ecuación de la recta patrón que relaciona el contenido proteico con el número de células se realiza una conversión de los datos para obtener valores de número de células. Por último se divide el área bajo la curva del espectro de fluorescencia por el número de células y se grafican los resultados como *Fluorescencia del lisado celular* (normalizado por el número de células) frente al tiempo.

### 7.2.8 Espectros de excitación y de emisión de fluorescencia

Se adiciona NMB 10  $\mu\text{M}$  en las suspensiones de levadura en PBS ( $\sim 10^6$  ufc/mL), se incuba durante 1 hora y se retira el FS en exceso con 6 lavados con PBS mediante centrifugaciones de 5 min a 1398 g. Se realizan los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia en un espectrofluorómetro Spex Fluoromax 4 (Horiba Jobin-Yvon, Edison, NJ). La excitación se realizó entre 400 y 730 nm y se recogió la emisión a 750 nm. La emisión de fluorescencia se realizó excitando la muestra a 590 nm y recogiendo la señal entre 600 y 800 nm. Las mediciones espectroscópicas se llevaron

a cabo en cubetas de 1 cm de cuarzo (Hellmut, Alemania) a temperatura ambiente y bajo agitación suave.

## 7.3 Resultados

### 7.3.1 Inactivación fotosensibilizada en suspensiones celulares fúngicas

Tal y como muestra la Figura 7.2, la respuesta al tratamiento fotodinámico utilizando NMB como FS da como resultado un efecto fungicida similar para todas las cepas para un mismo tiempo de incubación. Sin embargo, se observa que el grado de fotoinactivación celular depende de la concentración del FS y de la dosis de luz, ya que apenas se observan diferencias entre 27 y 41 J cm<sup>-2</sup> pero si frente a 14 J cm<sup>-2</sup>.

Si se incuba NMB junto a las levaduras (Figura 7.2 C, F, I, L) durante 45 min, se observa que para todas las especies, concentraciones y fluencias se obtiene un efecto fungicida de 6 log<sub>10</sub>, a excepción de para *C. parapsilosis* que parece ser la especie más resistente debido a que si se irradia 15 min (14 J cm<sup>-2</sup>) se obtiene un efecto fungicida de solo 3 log<sub>10</sub> utilizando NMB 2 μM. Para todas las especies, a 30 min de tiempo de incubación (Figura 7.2 B, E, H, K) también se obtiene un efecto fungicida de reducción de 6 log<sub>10</sub>, si se irradia 30 o 45 min (27 y 41 J cm<sup>-2</sup>), a excepción de si se irradia 15 min con NMB 2 μM ya que se obtiene un efecto fungicida de reducción de 2-3 log<sub>10</sub>. Por último, a 15 min de tiempo de incubación (Figura 7.2 A, D, G, J) *C. parapsilosis* y *C. krusei* son las menos resistentes ya que irradiando 30 y 45 min se obtiene un efecto fungicida de 6 log<sub>10</sub> para todas las concentraciones de NMB. En cambio, las dos cepas de *C. albicans* son las más resistentes ya que irradiando 30 min se obtiene un efecto fungicida de 2-3 log<sub>10</sub> utilizando NMB 2 o 7.5 μM.

Para todas las levaduras, el ensayo de toxicidad a oscuras (Figura 7.2, función roja) no produce efecto fotodinámico considerable ya que no se obtiene reducción logarítmica a lo largo de todo el rango de concentraciones de NMB ensayadas, así que, una vez más el FS es tóxico solo si combina con luz.



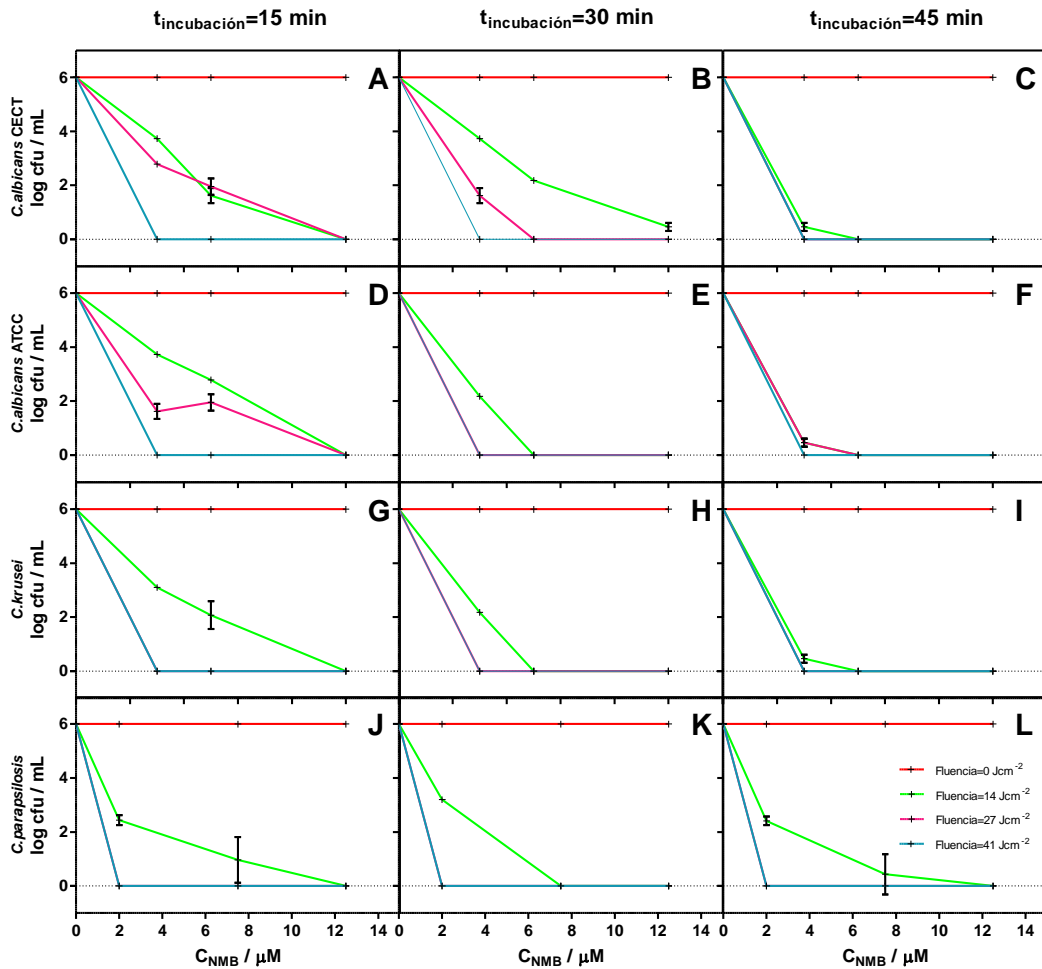


Figura 7.2. Reducción de unidades logarítmicas post-tratamiento fotodinámico de la suspensión inicial de levadura. *C. albicans* CECT (A, B, C), de *C. albicans* ATCC (D, E, F), de *C. krusei* (G, H, I) y de *C. parapsilosis* (J, K, L) a distintos tiempos de incubación: 15 (A, D, G, J), 30 (B, E, H, K) y 45 (C, F, I, L) minutos. Se grafican cuatro tipos de experimentos en función del tiempo de irradiación: muestra sin irradiar (toxicidad de la NMB; rojo), fluencia de 14 J cm<sup>-2</sup> ( $t_{\text{irradiación}}=15$  min; verde), fluencia de 27 J cm<sup>-2</sup> ( $t_{\text{irradiación}}=30$  min; rosa), fluencia de 41 J cm<sup>-2</sup> ( $t_{\text{irradiación}}=45$  min; azul).

### 7.3.2 Efecto del tratamiento fotodinámico en células epidérmicas humanas

Para cada tiempo de irradiación, concentración de NMB y cada tipo de célula, se realizan dos tipos de ensayos distintos que difieren en si se realiza o no una etapa de lavado previa a la irradiación de la muestra, con la finalidad de eliminar el NMB en exceso que no ha sido incorporado por las células. El control de toxicidad de la luz y toxicidad a oscuras del FS se realiza para cada ensayo y en las mismas condiciones. Los experimentos se hacen por triplicado, dando los valores de viabilidad celular frente a la concentración del NMB como desviaciones estándares

La viabilidad celular de los hNDF y de los HaCaT después de recibir el tratamiento fotodinámico durante 15, 30 y 45 minutos se muestra en la Figura 7.3. Tanto para los queratinocitos como para los fibroblastos no se obtienen diferencias en función de si se realiza o no la etapa de lavado previa a la irradiación de la muestra ya que se obtienen resultados muy parecidos (Figura 7.3: función verde con lavado pre-irradiación y función azul con lavado post-irradiación). En los hNDF, la respuesta al tratamiento fotodinámico no es función del tiempo de irradiación, ya que se obtienen para 14, 27 ó 41 J cm<sup>-2</sup> prácticamente los mismos resultados, es decir, una viabilidad celular que se encuentra entre el 30 y 50 % a lo largo de todas las concentraciones de NMB ensayadas (Figura 7.3: A, B, C, D). Lo mismo sucede para los HaCaT, la respuesta al tratamiento es muy parecida para todos los tiempos de irradiación y concentraciones de NMB, obteniéndose en este caso una viabilidad celular muy baja, solo el 10% de células permanecen vivas después del tratamiento fotodinámico (Figura 7.3: E, F, G, H).

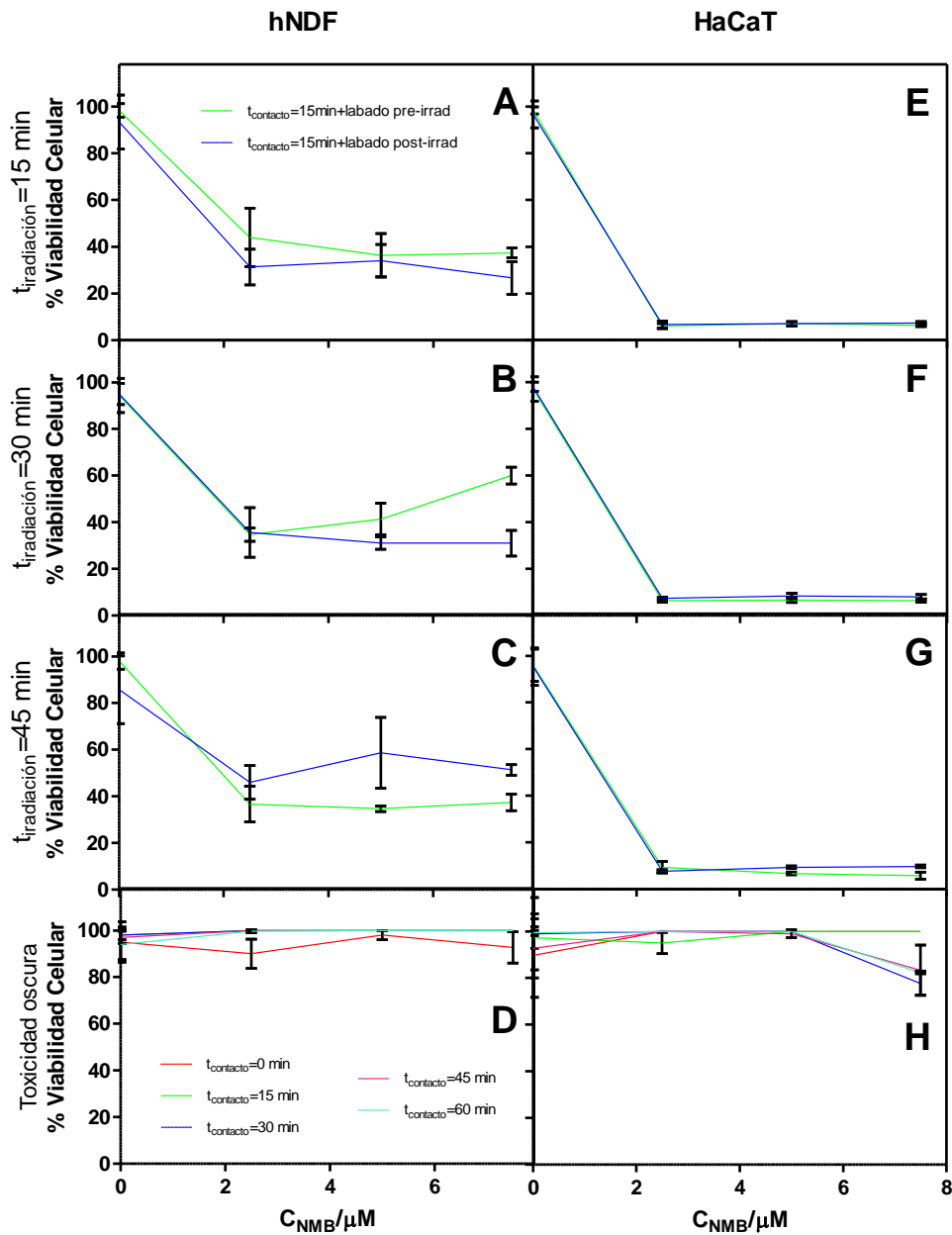


Figura 7.3. Viabilidad celular post-tratamiento fotodinámico de hNDF (A, B, C, D) y HaCaT (E, F, G, H) en función de la concentración de NMB. Ensayos incubando 15 min a oscuras, irradiando 15 min (A, E), 30 min (B, F) o 45 min (C, G) y lavando el exceso de FS antes de la irradiación (verde) o lavando el exceso de FS después de la irradiación (rojo). Toxicidad a oscuras de hNDF (D) y HaCaT (H) a distintos tiempos de incubación (0 min, naranja; 15 min, verde; 30 min, lila; 45 min, rosa; 60 min, turquesa).

Los resultados de viabilidad celular de la toxicidad a oscuras del NMB a distintos tiempos de incubación (0, 15, 30, 45 y 60 min) no difieren significativamente entre los obtenidos para los hNDF (D) y los HaCaT (H), ya que se obtiene una viabilidad celular del 90% aproximadamente. De este resultado de citotoxicidad a oscuras se concluye que el NMB es tóxico para las células humanas solo si se combina adecuadamente con irradiación a la longitud de onda de excitación de este FS.

### 7.3.3 Incorporación del NMB en levaduras

La Figura 7.4 muestra como el patrón de incorporación del NMB es muy similar en las cuatro especies de *Candida* ya que se obtiene un máximo alrededor de las 2 horas de incubación. En cambio, si se comparan los máximos se observa que las cepas incorporan distinta cantidad de NMB, siendo el orden de internalización de FS el siguiente: *C. albicans* CECT (rojo) > *C. albicans* ATCC (verde) > *C. krusei* (lila) > *C. parapsilosis* (azul), con un 85, 70, 45, 30 % respectivamente.

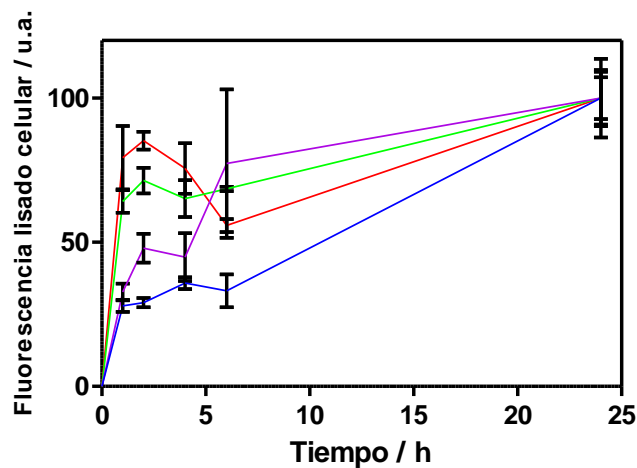


Figura 7.4. Fluorescencia del NMB procedente del lisado celular a distintos tiempos de incubación. *C. albicans* CECT (rojo), *C. albicans* ATCC (verde), *C. krusei* (lila) y *C. parapsilosis* (azul).

### 7.3.4 Incorporación del NMB en células epidérmicas humanas

La Figura 7.5 muestra el perfil de incorporación del NMB en las células humanas a lo largo del tiempo. La principal diferencia entre ambas líneas celulares está en la cantidad de FS que son capaces de incorporar, siendo  $10^{10}$  órdenes de magnitud superior para los queratinocitos frente a los fibroblastos. El perfil de incorporación también difiere entre células ya que en los queratinocitos se da un máximo a las 6 h y a partir de este momento la incorporación del NMB va disminuyendo gradualmente como consecuencia de la metabolización o expulsión del FS. En cambio, los fibroblastos van incorporando el NMB gradualmente con el tiempo, encontrándose un mínimo a las 8 h de incubación.

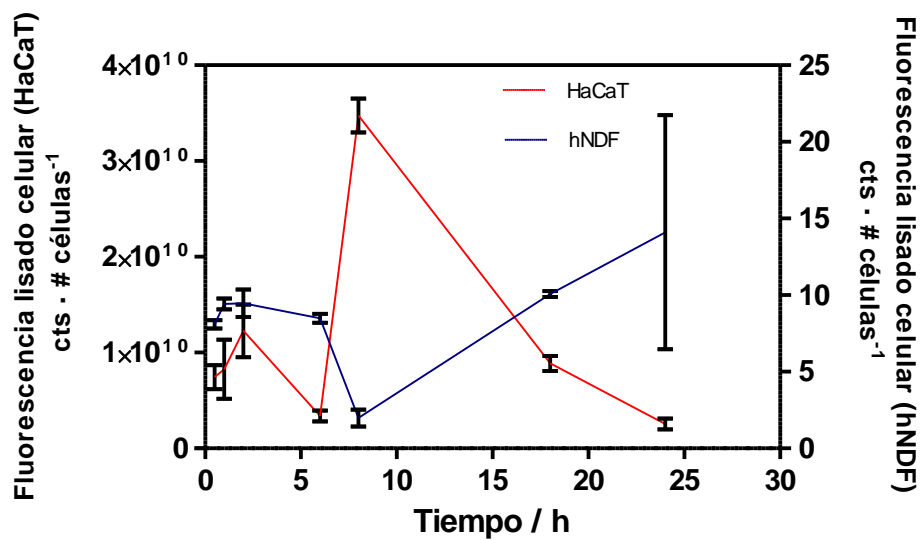


Figura 7.5. Fluorescencia del NMB procedente del lisado celular a distintos tiempos de incubación. HaCaT (rojo) y hNDF (azul).

### 7.3.5 Espectros de excitación y de emisión de fluorescencia

En la Figura 7.6 se muestran los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia del NMB en PBS y en las suspensiones de levadura. El espectro de excitación en levaduras cambia la forma respecto al realizado en PBS ya que el pequeño codo observado en PBS se transforma en un segundo pico diferenciado a 583 nm en levaduras debido a que aumenta la proporción monómero-dímero de NMB. Los espectros de emisión de fluorescencia del NMB tienen la misma forma tanto en levaduras como en PBS pero aquí sí que se da un desplazamiento batocrómico de 5 nm del NMB en PBS (655 nm) respecto al NMB en levaduras (650 nm).

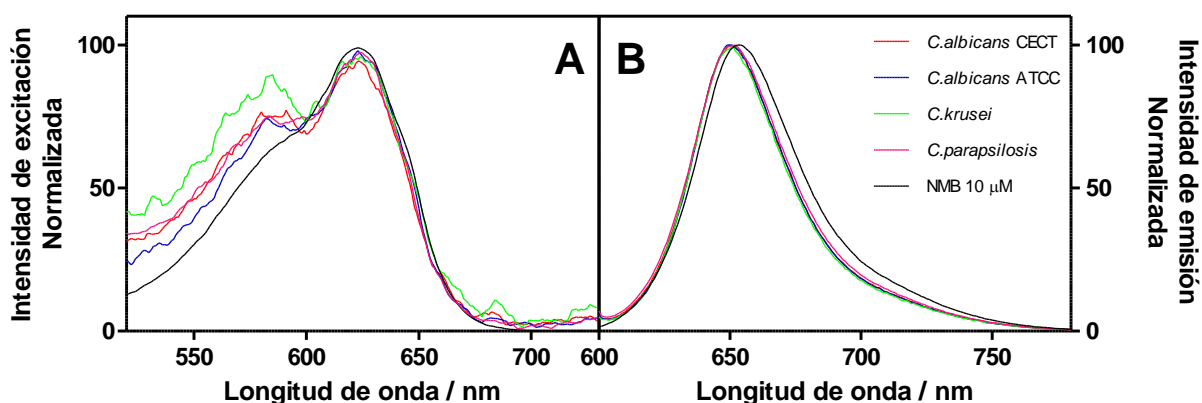


Figura 7.6. Espectro de excitación (A) y espectro de emisión de fluorescencia (B) normalizados del NMB (10 μM) en levaduras y en PBS (pH= 7.4). Para ambos espectros: *C. albicans* CECT (rojo), *C. albicans* ATCC (azul), *C. krusei* (verde) y *C. parapsilosis* (lila).

## 7.4 Discusión

Existen numerosos estudios utilizando fenotiacinas como FS eficaces en TFA, siendo el MB (*methylene blue*) y el TBO (*toluidine blue O*) los más ensayados hasta día de hoy frente a levaduras como *Candida albicans* [10] o bien frente a bacterias como el *Acinetobacter baumannii* [11], *Escherichia coli* [10], *Yersinia enterocolitica* [12], *S. aureus* [10] o los reportados por M. Usacheva *et al* [13] frente a *Staphylococcus aureus*, el *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, el *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*

Además, el MB es el único FS aprobado para su uso en TFA en clínica. Sin embargo, nuevas generaciones de FS, como el NMB (*new methylene blue*) o el DMMB (*dimethylmethylene blue*) se empezaron a utilizar de modo experimental como análogos del MB o el TBO, debido a que su mayor lipofilia y su mayor rendimiento de formación de  $^1\text{O}_2$  los hace mucho más eficaces en TFA [14]. Algunos estudios con estos FS en TFA se han realizado sobre bacterias como *Escherichia coli* [15] o sobre esporas de *Bacillus* [16].

La optimización *in vitro* de los factores de TFD antifúngica (la concentración del FS, el tiempo de contacto y el tiempo de irradiación) se ha evaluado mediante la viabilidad celular expresado como reducción logarítmica de las especies de *Candida* utilizando NMB como FS, así como los efectos secundarios que se producen sobre las células humanas, queratinocitos y fibroblastos, después de aplicar la TFD antifúngica. Para una suspensión inicial fúngica de  $10^6$  ufc/mL y sin lavado pre-irradiación que elimine el FS que no ha sido incorporado por las células, se obtiene una reducción de  $6 \log_{10}$  en las cuatro especies de *Candida* si se trabaja a fluencias de  $41 \text{ J cm}^{-2}$ , para las tres concentraciones de NMB y los tres tiempos de incubación ensayados. Sin embargo, si se trabaja a  $14 \text{ J cm}^{-2}$  se observan diferencias entre especies, siendo las dos cepas de *C. albicans* más resistentes que *C. parapsilosis* y *C. krusei* en función de la concentración de NMB y en menor medida del tiempo de incubación. Por el

contrario, el patrón de incorporación del NMB es el mismo en las cuatro especies, aunque la cantidad de FS incorporado varía entre cepas (85% *C. albicans* CECT > 70% *C. albicans* ATCC > 45% *C. krusei* > 30% *C. parapsilosis*). Analizando los resultados en los que se encuentran diferencias entre especies (a fluencias de  $14 \text{ J cm}^{-2}$ ) y los experimentos de incorporación del FS, se observa que *C. krusei* y *C. parapsilosis* son las que incorporan menos cantidad de FS pero son las más susceptibles a la terapia, mientras que las dos cepas de *C. albicans* son las que incorporan más cantidad de FS pero son las más resistentes. Este hecho contradictorio puede llevar a pensar que no es la cantidad de FS incorporado el que produce mayor muerte en las levaduras, sino que es el orgánulo en el que se acumula el FS, así como su accesibilidad al oxígeno, lo que confiere el éxito a la terapia.

Los experimentos biológicos de viabilidad celular realizados sobre queratinocitos y fibroblastos dan como resultado un efecto fotocitotóxico del NMB tanto si se irradia la muestra con una etapa previa de lavado o posterior a dicha irradiación. Para cada línea celular se obtiene el mismo comportamiento en ambos casos, así que, la viabilidad celular no es función de si existe FS en exceso en el medio. La gran diferencia en cuanto a viabilidad entre estos dos tipos de células reside en que los queratinocitos son mucho más susceptibles a la terapia que los fibroblastos, ya que para todas las concentraciones de NMB y todas las fluencias se obtiene el 100% de muerte celular, mientras que para los fibroblastos se obtiene el 40% de viabilidad aproximadamente. Esta resistencia de los fibroblastos probablemente puede atribuirse a que incorporan menos cantidad de NMB, tal y como se ve reflejado en la figura 1.5, donde se puede observar la incorporación del FS con el tiempo. En cambio, los  $10^{10}$  órdenes de magnitud superiores de incorporación del NMB en los queratinocitos provocan que haya tanto exceso de FS intracelular que la viabilidad se vea disminuida hasta valores de mortalidad total. Este comportamiento indica que en las condiciones en las que se produce un efecto fungicida sobre las levaduras también produce la muerte estos dos tipos de células humanas en un sistema *in vitro* en dos dimensiones.



Los cambios en la forma debidos a la proporción monómero-dímero del espectro de excitación del NMB en levaduras y los desplazamientos batocrómicos en los espectros de fluorescencia del NMB en levaduras (ambos respecto al espectro del NMB en PBS) corroboran una vez más y apoyan los resultados de incorporación celular que indican que el NMB se encuentra en el interior de la célula fúngica en el momento de aplicarse la TFD.

No se ha podido contrastar los resultados obtenidos en este capítulo con otros estudios de TFD antifúngica realizados con NMB *in vitro* que demuestren que este FS es eficaz para producir daño fotodinámico sobre especies de *Candida* debido a la escasez de estudios de este FS en especies de *Candida*. Sin embargo, recientemente se han publicado estudios[17] de TFD *in vivo* con distintos FS del tipo fenotiacinas para tratar infecciones cutáneas de *C. albicans* sobre quemaduras de ratón, resultando ser más eficaz el NMB que el MB y la TBO en la inactivación fotodinámica de esta levadura debido a la mayor acumulación del NMB en el tejido fúngico a tratar.

## 7.5 Conclusiones

El NMB irradiado con luz roja produce un efecto fotodinámico fungicida, con distinta susceptibilidad y eficacia fotodinámica entre las especies de *Candida* ensayadas, que es principalmente función del tiempo de irradiación aplicado. A fluencias bajas se ven diferencias entre especies, siendo *C. krusei* y *C. parapsilosis* las especies más susceptibles pero a su vez son las que incorporan menos cantidad de NMB, así que, no es la cantidad de FS incorporado lo que produce mayor muerte celular fúngica sino que es el orgánulo en el que se acumula el FS y su accesibilidad al oxígeno. Al irradiar *in vitro* los dos tipos de células humanas, los queratinocitos incorporan  $10^{10}$  órdenes de magnitud más de NMB que los fibroblastos, lo que provoca que haya tanto exceso de FS intracelular que se de una reducción del 100% en la viabilidad celular del cultivo, así que, en estas condiciones se produce daño considerable sobre las células epidérmicas humanas.

## 7.6 Referencias

- [1] L.E. Castrillón, A. Palma, C. Padilla, Factores de virulencia en *Candida* sp, *Dermatología Rev Mex.* 49 (2005) 12-27.
- [2] M. Weig, U. Grob, F. Muhischlegel, Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection, *Trends Microbiol.* 6 (1998) 468-470.
- [3] R.L. Castrillón, R.A. Palma, D.C. Padilla, Reacción inmunológica en infecciones por *Candida* sp, *Dermatología Rev Mex.* 48 (2004) 140-150.
- [4] P. Eggimann, J. Garbino, D. Pittet, Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients, *Lancet Infect Dis.* 3 (2003) 685-702.
- [5] A.S. Garcez, S.C. Nunez, M.S. Baptista, N.A. Daghasanli, R. Itri, M.R. Hamblin, M.S. Ribeiro, Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide, *Photochem. Photobiol. Sci.* 10 (2011) 483-490.
- [6] R.A. Prates, I.T. Kato, M.S. Ribeiro, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*, *J Antimicrob Chemother.* 66 (2011) 1525-1532.
- [7] G. Jori, S.B. Brown, Photosensitized inactivation of microorganisms, *Photochemical & Photobiological Sciences.* 3 (2004) 403-405.
- [8] R. Bonnett, Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy, *Chem. Soc. Rev.* 24 (1995) 19-33.
- [9] M. Wainwright, K.B. Crossley, Photosensitising agents - Circumventing resistance and breaking down biofilms: A review, *International Biodeterioration and Biodegradation.* 53 (2004) 119-126.

[10] T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Effect of cell-photo sensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 2329-2335.

[11] X. Ragàs, T. Dai, G.P. Tegos, M. Agut, S. Nonell, M.R. Hamblin, Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: *in vitro* and *in vivo* studies, *Lasers Surg. Med.* 42 (2010) 384-390.

[12] M. Wainwright, D.A. Phoenix, T.E. Smillie, D.R. Wareing, Phenothiaziniums as putative photobactericidal agents for red blood cell concentrates, *J. Chemother.* 13 (2001) 503-509.

[13] M.N. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel, Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms, *Lasers Surg. Med.* 29 (2001) 165-173.

[14] D.A. Phoenix, F. Harris, Phenothiazinium-based photosensitizers: antibacterials of the future? *Trends Mol. Med.* 9 (2003) 283-285.

[15] M. Wainwright, M.N. Byrne, M.A. Gattrell, Phenothiazinium-based photobactericidal materials, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology.* 84 (2006) 227-230.

[16] T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores, mediated by phenothiazinium dyes, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005) 6918-6925.

[17] T. Dai, B.B. Fuchs, J.J. Coleman, R.A. Prates, C. Astrakas, T.G. St Denis, M.S. Ribeiro, E. Mylonakis, M.R. Hamblin, G.P. Tegos, Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform, *Front. Microbiol.* 3 (2012) 120.

## **Capítulo 8**

***Terapia fotodinámica in vitro aplicada sobre  
Trichophyton mentagrophytes con NMB como  
fotosensibilizador***



## 8.1 Introducción

Los dermatofitos son hongos filamentosos que presentan la capacidad de invadir la capa córnea de la epidermis, debido a que contiene proteínas fibrosas como la queratina, y estructuras queratinizadas, como pelo y uñas [1-3]. Como consecuencia causan micosis cutáneas llamadas dermatofitosis o comúnmente también conocidas como tiñas. Entre los millones de personas afectadas por micosis superficiales, las dermatofitosis, la pitiriasis versicolor y la candidiasis son las micosis más frecuentes [4]. Las infecciones en las uñas están producidas principalmente por dos dermatofitos, el *Trichophyton mentagrophytes* y el *Trichophyton rubrum*, o bien por *Candida albicans*. Los tratamientos actuales consisten en el desbridamiento químico o mecánico, mediante la administración de un fármaco antifúngico oral o tópico, o bien mediante la combinación de ambos tratamientos.

En este capítulo se pretende aplicar la TDF utilizando NMB (Figura 8.1) como FS para inducir la muerte celular del dermatofito *T. mentagrophytes*. En el caso del NMB, fenotiacina plana tricíclica, su longitud de onda de absorción se encuentra dentro del margen donde se da la máxima penetración de la luz en el tejido tisular (ventana terapéutica entre 600-850 nm) [5,6] ya que en soluciones acuosas tamponadas absorbe a 630 nm y emite fluorescencia a 650 nm.

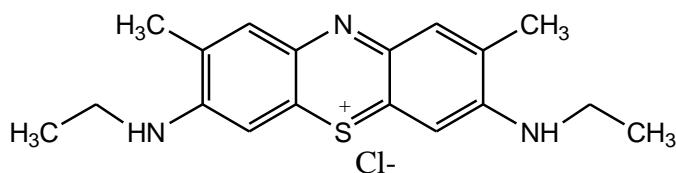


Figura 8.1. Estructura química del NMB

El objetivo de este capítulo es estudiar el efecto antifúngico que produce el NMB en la TFD *in vitro* sobre *T. mentagrophytes*.

## 8.2 Parte experimental

### 8.2.1 Cepas fúngicas

Se ha utilizado la cepa de *Trichophyton mentagrophytes* CECT 2956 obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

### 8.2.2 Reactivos químicos

El NMB (cloruro de 3,7-Bis (etilamino)-2,8-dimetilfenotiacina-5-io) y el PBS (*Sterile dulbecco's Phosphate Buffered Saline* pH 7.4) fueron comprados en SIGMA-Aldrich.

El medio de cultivo fúngico, Sabouraud (SB), fue preparado a partir de Sabouraud Dextrose Agar®, comprado en Merck. La disolución stock de NMB 1 mM, fueron preparadas en agua tamponada estéril (PBS, pH=7.4). Las disoluciones de trabajo de NMB se disolvieron a oscuras en PBS hasta la concentración deseada y se almacenaron a 4° C.

### 8.2.3 Fuentes de luz

*T. mentagrophytes* fue irradiado con una lámpara LED Sorisa Photocare® con una irradiancia de 15 mW cm<sup>-2</sup>. Para excitar el NMB se seleccionó una emisión roja entre 620 y 645 ± 10 nm.

### 8.2.4 Inactivación fotosensibilizada de la suspensión fúngica

La optimización del método para la fotoinactivación de células de *T. mentagrophytes* mediante TFD se ha realizado mediante un diseño experimental que resultó de la combinación de las variables siguientes: la concentración de NMB (0, 0.1,



1, 10, 25, 50, 75, 100 y 1000  $\mu\text{M}$ ), el tiempo de incubación del FS en el hongo (0, 10, 30 y 90 min) y el tiempo de irradiación (0, 10, 30 y 90 min).

Como resultado de la combinación de todas las variables y de sus niveles se obtuvo para cada una de las 9 concentraciones de NMB ensayadas ( $C_{\text{NMB}}/\mu\text{M}$ ) la siguiente tabla experimental (Tabla 8.1), resultando un total de 144 experiencias:

Tabla 8.1 Diseño experimental para cada una de las concentraciones de NMB

Experiencia	$C_{\text{NMB}}/\mu\text{M}$	$t_{\text{incubación}}/\text{min}$	$t_{\text{irradiación}}/\text{min}$
1	$C_{\text{NMB}}$	0	0
2	$C_{\text{NMB}}$	0	10
3	$C_{\text{NMB}}$	0	30
4	$C_{\text{NMB}}$	0	90
5	$C_{\text{NMB}}$	10	0
6	$C_{\text{NMB}}$	10	10
7	$C_{\text{NMB}}$	10	30
8	$C_{\text{NMB}}$	10	90
9	$C_{\text{NMB}}$	30	0
10	$C_{\text{NMB}}$	30	10
11	$C_{\text{NMB}}$	30	30
12	$C_{\text{NMB}}$	30	90
13	$C_{\text{NMB}}$	90	0
14	$C_{\text{NMB}}$	90	10
15	$C_{\text{NMB}}$	90	30
16	$C_{\text{NMB}}$	90	90

Se sembró una colonia de cultivo stock en Sabouraud glucosado al 2% (v/w) y se incubó a 26° C durante 14 días. Una vez crecidas las colonias, estas se desprendieron de la superficie del medio de cultivo sólido por agitación manual mediante una solución salina estéril con bolas de cristal y se transfirió la suspensión por decantación a un

recipiente, obteniéndose así la suspensión de trabajo de *T. mentagrophytes*. Se realizaron diluciones decimales seriadas de esta suspensión fúngica en solución salina estéril y a cada una de ellas se adicionó NMB (0, 0.1, 1, 10, 25, 50, 75, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  en PBS) con la finalidad de escoger aquella que de cómo resultado aproximadamente  $10^6$  ufc/mL. A continuación se incubó a oscuras durante 10, 30 o 90 min a  $37^\circ\text{C}$  y 120 rpm. Para excitar la banda de 630 nm del NMB se irradió la muestra, sin lavado previo del FS en exceso, entre 620 y 645 nm mediante la fuente de LEDs Sorisa Photocare® durante 10, 30 o 90 min, correspondiente a una fluencia de 9, 27 y  $81\text{ J cm}^{-2}$  respectivamente. Se sembraron 0.1 mL de la suspensión, se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 14 días y se realizó el recuento de las colonias formadas después del tratamiento fotodinámico. El control de toxicidad de la luz (sin FS) y la toxicidad del FS (sin luz) se realizó para cada ensayo y en las mismas condiciones en que se realizaron los experimentos.

### 8.3 Resultados

Las concentraciones de 0, 0.1 y 1  $\mu\text{M}$  de NMB no producen efecto citotóxico sobre *T. mentagrophytes* ya que se obtiene un cultivo totalmente confluyente después de irradiar la muestra para todos los tiempos de incubación e irradiación ensayados. La concentración de 10 y 25  $\mu\text{M}$  de NMB produce efecto citotóxico parcial ya que como máximo se obtiene una reducción de 5 unidades logarítmicas en la ufc/mL. Sin embargo, para concentraciones de 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$  a medida que se aumenta el tiempo de incubación e irradiación, se obtiene un efecto fungicida mayor sobre la cepa de *T. mentagrophytes* capaz de alcanzar la reducción total de 6 unidades logarítmicas. Por último, si se irradia la muestra con NMB 1000  $\mu\text{M}$  se observa que el resultado no es función ni del tiempo de contacto y del tiempo de irradiación ya que se produce un efecto fungicida total para cualquier combinación de las experiencias ensayadas para esta concentración. En el gráfico D de la Figura 8.2, se muestran los resultados superpuestos y se observa que para fluencias de 9 y 27  $\text{J cm}^{-2}$  se obtiene prácticamente la misma respuesta en el tratamiento fotodinámico para los tres tiempos de contacto ensayados. Así que, de los resultados obtenidos al aplicar TFD sobre suspensiones de *T. mentagrophytes* ( $10^6$  ufc/mL) puede extraerse que con un tiempo de agitación e irradiación de 10 min ( $9 \text{ J cm}^{-2}$ ) la concentración mínima de NMB que produce total mortandad celular es de 100  $\mu\text{M}$ , en cambio, para el mismo tiempo de contacto, si se irradia la muestra 90 min ( $81 \text{ J cm}^{-2}$ ) puede disminuirse la concentración de NMB hasta 50  $\mu\text{M}$ .

A continuación, en la Figura 8.2, se muestran los resultados obtenidos para este ensayo.

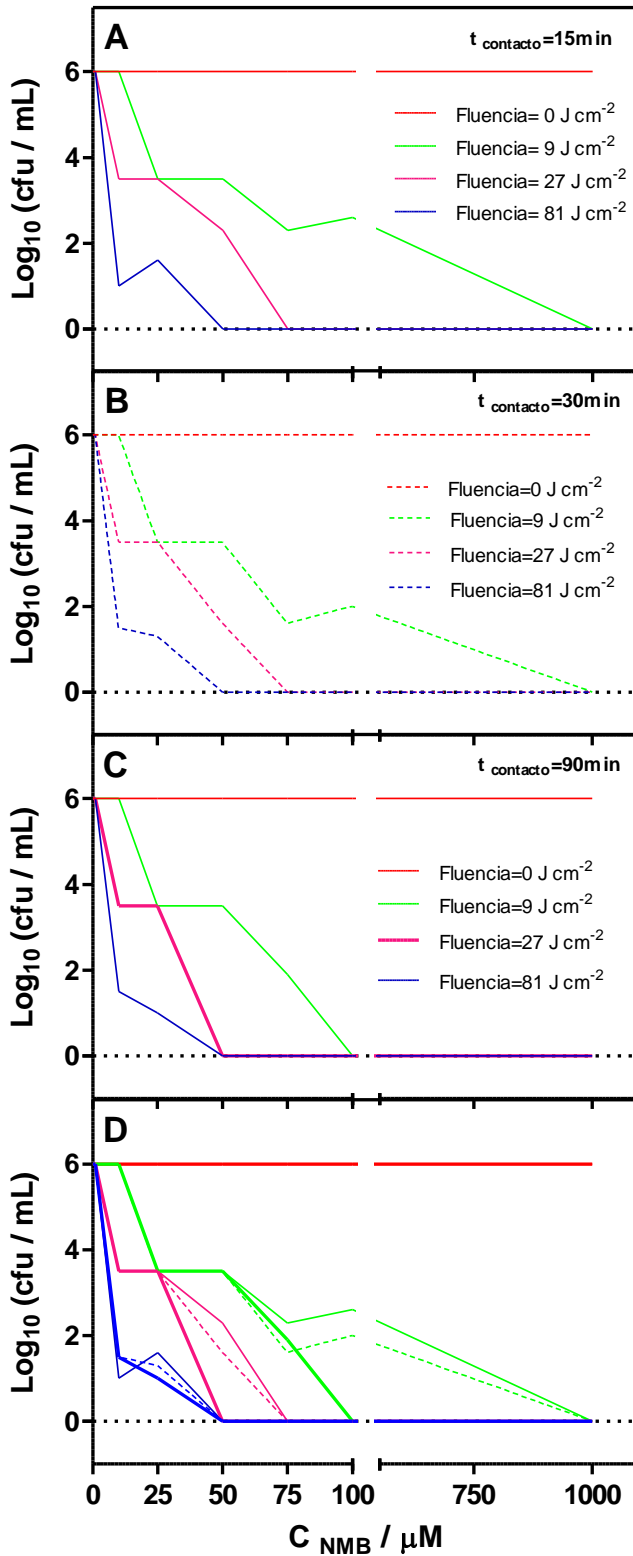


Figura 8.2. Reducción logarítmica de las ufc/mL de *Trichophyton mentagrophytes* post tratamiento fotodinámico con NMB irradiando la muestra entre 620 y 645 nm. El gráfico A (tiempo de contacto de 10 min), el gráfico B (tiempo de contacto de 30 min) y el gráfico C (tiempo de contacto de 90 min) muestran los resultados siguientes: el control de la luz (función roja), para una fluencia de 9  $\text{J cm}^{-2}$  (función verde), para una fluencia de 27  $\text{J cm}^{-2}$  (función rosa), para una fluencia de 81  $\text{J cm}^{-2}$  (función azul). El gráfico D muestra los resultados simultáneamente para cada tiempo de contacto (tiempo de contacto: 10 min línea fina, 30 min línea punteada, 90 min línea gruesa).

El ensayo de toxicidad a oscuras (función roja de los gráficos A, B, C y D de la Figura 8.2) demuestra que el NMB no produce ningún efecto fungicida ya que no se obtiene reducción logarítmica a lo largo de todo el rango de concentraciones de NMB ensayadas, así que, este FS es tóxico sobre esta especie de dermatofito solo si combina con luz.

A modo de resumen, la optimización *in vitro* de los factores de TFD (la concentración del FS, el tiempo de contacto y el tiempo de irradiación) se ha evaluado mediante la viabilidad celular expresado como reducción logarítmica de las especies de *T. mentagrophytes* utilizando NMB como FS. Se ha obtenido como resultado fotodinámico que la mínima concentración de NMB (sin lavado pre-irradiación que elimine el FS que no ha sido incorporado por las células) que produce una mortalidad celular total del cultivo de *T. mentagrophytes* ( $\sim 10^6$  ufc/mL) es de 50 o 100  $\mu\text{M}$  y con 81 o 9  $\text{J cm}^{-2}$  (respectivamente), con un tiempo de contacto para ambos de 10 minutos.

## 8.4 Discusión

Hasta la fecha, se han realizado diferentes estudios *in vitro* utilizando la TFD como posible tratamiento contra las dermatofitosis. En particular para las onicomicosis, el dermatofito más estudiado ha sido *Trichophyton rubrum*. Así, varias publicaciones científicas demuestran que *T. rubrum* puede ser tratado *in vitro* mediante TFD para obtener un efecto fungicida con distintos FS, como el TBO [7] (Toulidine Blue O), Sylsens B (tricloruro de 5,10,15-tris(4-metilpiridinio)-20-fenil-[21H,23H]-porfina), [8-13] DP mme (deuteroporfirina monometilester), [8-10] o ácido 5-aminolevulínico [12,14]. Sin embargo, son escasos los estudios que se han publicado para tratar las micosis producidas por *T. mentagrophytes* con TFD.

La especie *T. mentagrophytes*, macroscópicamente tiene una morfología de talo plano y suave, con bordes blancos y tonos beige en la parte central de la colonia. Microscópicamente se observan ramificaciones formadas por las hifas y pseudohifas con macroconidios o microconidios en sus extremos, llamados también esporas en el caso de la reproducción asexual. Los macroconidios, con un tamaño 20-50  $\mu\text{m}$  de largo y 6-8  $\mu\text{m}$  de ancho, raramente se obtienen en el laboratorio después de aislarse del microorganismo. *In vitro*, las colonias aterciopeladas de este hongo filamentoso producen básicamente microconidios, con un diámetro de 4-6  $\mu\text{m}$  [15].

Jenefar *et al* [16] demostró en 2010 que este dermatofito puede ser tratado mediante TFD utilizando acriflavina a una concentración de 0.2  $\mu\text{M}$ , concentración de FS sensiblemente menor que la que se ha tenido que aplicar en el presente trabajo para producir un efecto fungicida sobre *T. mentagrophytes* utilizando NMB como FS (50 o 100  $\mu\text{M}$  a 81 o 9  $\text{J cm}^{-2}$ ). No obstante, estos dos valores de concentración no pueden compararse con los obtenidos en este estudio debido a que Jenefar no publica la fluencia con la que trata la muestra fúngica.

Se ha demostrado la eficacia de FSs del tipo fenotiacinas en TFD para el tratamiento de distintos tipos de bacterias, como *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli* [17]. Además, estudios previos han demostrado que el NMB es más eficaz que el MB, el TBO o el DMMB frente a especies de *Acinetobacter baumannii* drogo-resistentes, debido a que es capaz de producir un efecto bactericida de más de 6 log<sub>10</sub> si se irradia la muestra a 30 J cm<sup>-2</sup> y a concentraciones de 10 o 2 μM, con lavado o sin lavado del NMB en exceso, respectivamente [18]. Este estudio concluye que el mayor efecto bactericida del NMB se debe a que es un FS más lipofílico, a que posee una mayor interacción inicial con el microorganismo, a su mayor fuerza de unión con la superficie celular compuesta por lipopolisacáridos y a su localización intracelular. Además, estudios fotoquímicos del grupo demuestran para otra bacteria gram-negativa, la *E.coli*, que el NMB se encuentra en un ambiente acuoso, siendo accesible a proteínas externas como la BSA o bien interaccionando con los lipopolisacáridos de la pared celular [19].

Si se compara la concentración citotóxica de NMB necesaria para producir un efecto bactericida sobre *Acinetobacter baumannii* (10 o 2 μM, con lavado o sin lavado, a 30 J cm<sup>-2</sup>), se observa que esta concentración es mucho mayor para *T. mentagrophytes* (50 o 100 μM a 81 o 9 J cm<sup>-2</sup>). Varios factores independientes, o la combinación de ellos, podrían explicar esta mayor fototoxicidad del NMB sobre la bacteria que sobre el hongo dermatofito. Podría ser debido a que el NMB se localice en, o próximo a, orgánulos celulares indispensables para la integridad celular, porque se acumule más cantidad de FS debido a que se da una mayor internalización por parte de la bacteria o porque en el lugar donde se localiza está mucho más accesible al oxígeno molecular con lo cual se generarían más cantidad de EROs tóxicas para la célula.

## **8.5 Conclusiones**

Este capítulo demuestra que NMB puede ser considerado para ser aplicado como fármaco fotosensible para el tratamiento de micosis superficiales producidas por *Trichophyton mentagrophytes* tras la exposición a luz roja.



## 8.6 Referencias

- [1] N. Campbell, J. Reece, Biología, Ed Médica Panamericana, 2005.
- [2] R.C. Summerbell, I. Weitzman, A.A. Padhye, *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton*, and agents of superficial mycoses. Manual of clinical Microbiology. 2 (2006) 1874-1897.
- [3] J. Pemán, E. Martín-Mazuelos, M.C. Rubio-Calvo, Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Tema 12: Identificación de hongos dermatofitos, Revista Iberoamericana de Microbiología. 12 (2007) 1-11.
- [4] M. Pereiro, Dermatofitos y Dermatofitosis, Torres Rodríguez JM, 1982.
- [5] K.P. Nielsen, A. Juzeniene, P. Juzenas, K. Stamnes, J.J. Stamnes, J. Moan, Choice of optimal wavelength for PDT: the significance of oxygen depletion Photochem. Photobiol. 81 (2005) 1190-1194.
- [6] B.C. Wilson, M.S. Patterson, The physics of photodynamic therapy, Phys. Med. Biol. 31 (1986) 327-360.
- [7] J.C.F. Amorim, B.M. Soares, O.A. Alves, M.V.L. Ferreira, G.R. Sousa, L.B. Silveira, A.C.C. Piancastelli, M. Pinotti, Phototoxic action of light emitting diode in the *in vitro* viability of *Trichophyton rubrum*, An Bras Dermatol. 87 (2012) 250-255.
- [8] T.G. Smijs, J.A. Bouwstra, H.J. Schuitmaker, M. Talebi, S. Pavel, A novel ex vivo skin model to study the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment in different growth phases, J. Antimicrob. Chemother. 59 (2007) 433-440.
- [9] T.G.M. Smijs, J.A. Bouwstra, M. Talebi, S. Pavel, Investigation of conditions involved in the susceptibility of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* to photodynamic treatment, Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 60 (2007) 7550-759.

[10] T.G. Smijs, H.J. Schuitmaker, Photodynamic inactivation of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Photochem Photobiol.* 77 (2003) 556-560.

[11] T.G. Smijs, A.A. Mulder, S. Pavel, J.J. Onderwater, H.K. Koerten, J.A. Bouwstra, Morphological changes of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* after photodynamic treatment: a scanning electron microscopy study. *Med Mycol.* 46 (2008) 315-325.

[12] T.G. Smijs, S. Pavel, The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*. *Photochem Photobiol.* 87 (2011) 2-13.

[13] T.G. Smijs, S. Pavel, M. Talebi, J.A. Bouwstra, Preclinical studies with 5,10,15-Tris(4-methylpyridinium)-20-phenyl-[21H,23H]-porphine trichloride for the photodynamic treatment of superficial mycoses caused by *Trichophyton rubrum*. *Photochem. Photobiol.* (2009) 733-739.

[14] H. Kamp, H.J. Tietz, M. Lutz, H. Piazena, P. Sowyrda, J. Lademann, U. Blume-Peytavi, Antifungal effect of 5-aminolevulinic acid PDT in *Trichophyton rubrum*. *Mycoses.* 48 (2005) 101-107.

[15] J. Kane, R. Summerbell, L. Sigler, S. Kraiden, G. Land, Laboratory Handbook of Dermatophytes. A clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair and nails, *Mycopathologia.* 147 (1999) 113-114.

[16] S. Jenefar, D. Raynukaa, V. Balaji, V. Kaviyaran, P. Ebenezer, Photodynamic control of *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* by acriflavin, an acridine dye. *J. Bio sci. Res.* 1 (2010) 52-57.

[17] D.A. Phoenix, Z. Sayed, S. Hussain, F. Harris, M. Wainwright, The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 39 (2003) 17-22.

[18] X. Ragàs, T. Dai, G.P. Tegos, M. Agut, S. Nonell, M.R. Hamblin, Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: *in vitro* and *in vivo* studies, Lasers Surg. Med. 42 (2010) 384-390.

[19] X. Ragàs, Singlet Oxygen in Antimicrobial Photodynamic Therapy: Biological effects, Mechanistic Studies and Future Directions, Tesis Doctoral (2011).



# **Capítulo 9**

## ***Conclusiones***

- La hipericina, como FS para TFD antifúngica, está dotada de potencial antifúngico frente a *Candida* spp., aunque la susceptibilidad depende de la especie. De acuerdo con los experimentos obtenidos *in vitro*, sólo *C. albicans* puede ser efectivamente dañada sin causar daño considerable sobre las células epidérmicas humanas.

- Se han estudiado los fotoprocesos involucrados en la TFD antifúngica con hipericina sobre las tres especies de *Candida* ensayadas. Se ha documentado la formación de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$  y  $H_2O_2$  en las tres especies. Las diferencias significativas que se han encontrado en los fotoprocesos que ocurren en *C. krusei*, en relación a las otras especies de *Candida*, son debidas a que estos se producen en un patrón de distribución intracelular distinto de la hipericina en esta levadura.

- La TMPyP produce efectos fototóxicos con distinta susceptibilidad en función de la especie de levadura, de la concentración celular de la suspensión inicial de levadura y de si existe o no una etapa de lavado previa a la irradiación. En suspensiones iniciales de  $10^6$  ufc/mL no se produce efecto citotóxico y en suspensiones iniciales de  $10^3$  ufc/mL solo se produce una disminución de  $1 \log_{10}$  en *C. albicans* ATTC y *C. parapsilosis*. Solo si se retira el exceso de TMPyP antes de irradiar la muestra no se produce daño sobre queratinocitos y fibroblastos

- Se han estudiado los fotoprocesos involucrados al aplicar la TFD *in vitro* con TMPyP sobre las cuatro especies de *Candida*, documentándose la fluorescencia de la TMPyP, la fosforescencia del  $^1O_2$  formado por transferencia de energía del triplete de la TMPyP, así como los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de este FS en las levaduras. Se ha obtenido una doble localización de la TMPyP: en la pared celular y unida a los ácidos nucleicos.

- El efecto fotodinámico fungicida del NMB es función de la especie de *Candida* y el tiempo de irradiación, siendo a fluencias bajas *C. krusei* y *C. parapsilosis* las más susceptibles. La eficacia de la terapia es función del orgánulo en el que se acumula el NMB y su accesibilidad al oxígeno. Los ensayos *in vitro* con células humanas dan como resultado que en las condiciones que se produce la muerte celular fúngica se produce también daño considerable sobre las células epidérmicas humanas.

- Puede considerarse el NMB como fármaco fotosensible para el tratamiento de micosis superficiales producidas por *Trichophyton mentagrophytes* tras la exposición a luz roja.





## **Anexos**

***Artículos científicos publicados***



## ***In Vitro* Fungicidal Photodynamic Effect of Hypericin on *Candida* Species<sup>†</sup>**

Antonio Rezusta<sup>1,2</sup>, Patricia López-Chicón<sup>3</sup>, Manuel P. Paz-Cristobal<sup>2</sup>, Mireia Alemany-Ribes<sup>3</sup>, David Royo-Díez<sup>2</sup>, Montserrat Agut<sup>3</sup>, Carlos Semino<sup>3</sup>, Santi Nonell<sup>3</sup>, M<sup>ª</sup> Jose Revillo<sup>1</sup>, Carmen Aspiroz<sup>2,4</sup> and Yolanda Gilaberte<sup>\*2,5</sup>

<sup>1</sup>IIS Aragón, Department of Microbiology, University Hospital Miguel Servet, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

<sup>2</sup>Health Science Institute of Aragon, Zaragoza, Spain

<sup>3</sup>IQS School of Engineering, University Ramon Llull, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Department of Microbiology, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain

<sup>5</sup>Department of Dermatology, Hospital San Jorge, Huesca, Spain

Received 31 August 2011, accepted 23 November 2011, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.01053.x

### **ABSTRACT**

Hypericin is a natural photosensitizer considered for the new generation of photodynamic therapy (PDT) drugs. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* fungicidal effect of hypericin PDT on various *Candida* spp., assessing its photocytotoxicity to keratinocytes (HaCaT) and dermal fibroblasts (hNDF) to determine possible side effects. A 3 log fungicidal effect was observed at 0.5 McFarland for two *Candida albicans* strains, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* with hypericin concentrations of 0.625, 1.25, 2.5 and 40  $\mu\text{M}$ , respectively, at a fluence of 18 J cm<sup>-2</sup> (LED lamp emitting at 602  $\pm$  10 nm). To obtain a 6 log reduction, significantly higher hypericin concentrations and light doses were needed (*C. albicans* 5  $\mu\text{M}$ , *C. parapsilosis* 320  $\mu\text{M}$  and *C. krusei* 320  $\mu\text{M}$ ; light dose 37 J cm<sup>-2</sup>). Keratinocytes and fibroblasts can be preserved by keeping the hypericin concentration below 1  $\mu\text{M}$  and the light dose below 37 J cm<sup>-2</sup>. *C. albicans* appears to be suitable for treatment with hypericin PDT without significant damage to cutaneous cells.

### **INTRODUCTION**

*Candida* spp. is a common inhabitant of the mouth, throat, digestive tract and skin. However, these species may become pathogenic in the presence of predisposing factors, producing infections that range from superficial mucosal lesions to severe and invasive systemic dissemination (1). In fact, oropharyngeal candidiasis is one of the most common opportunistic infections in immunocompromised patients (2,3).

Many antifungal agents are currently available on the market, such as fluconazole, the echinocandins or amphotericin B, the drug of choice depending on the infecting species and the clinical setting. *C. albicans* isolates are the most susceptible to all of the antifungal agents. *C. parapsilosis* tends to have higher MICs for all of the echinocandin agents (4–6). *C. krusei* isolates have the highest fluconazole and flucytosine

MICs of any of the species (3,7). These therapies are effective, but recurrence of candidiasis is common. The concomitant risk of antifungal resistance, fluconazole interactions with other medical regimens and organ toxicity are potential adverse events. Amphotericin B is well known for severe and potentially lethal side effects when administered intravenously. Reduced toxicity, enhancement of bioavailability and counteraction of resistance are features still awaited by clinicians.

Photodynamic therapy (PDT) is based on the use of a photosensitizing drug (PS), which in the presence of oxygen produces reactive oxygen species (ROS) upon light activation at a wavelength matching its absorption spectrum (8). By means of their highly oxidative nature, the generated ROS can subsequently react with molecules in their direct environment eventually causing destruction of the target cells (9,10). PDT is a very promising alternative to antimicrobials for the treatment of topical infections (11) and the development of PSs (12) to improve antimicrobial PDT is an area of extensive research (13) as the currently approved PSs have been designed primarily for anticancer applications.

Different studies have demonstrated that *Candida* spp. can be effectively sensitized *in vitro* by administering PSs, such as phenothiazine dyes, porphyrins and phthalocyanines, as well as aminolevulinic acid, which, although not a PS itself, is effectively metabolized into protoporphyrin IX (14–17). Besides its efficacy against fungi in general, PDT has shown other benefits. Firstly, the sensitizers used are highly selective. Secondly, all investigated PSs lack genotoxic and mutagenic activity. Finally, the hazard of selection of drug-resistant fungal strains has never been reported (18–20).

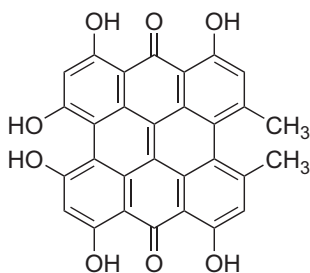
Hypericin (Fig. 1) is a naturally occurring polycyclic aromatic naphthodianthrone isolated from certain species of plants from the genus *Hypericum* (21). Hypericin solutions in organic solvents show several absorption peaks in the visible spectrum (*e.g.* maximum absorbance at 550 and 588 nm in ethanol) and fluorescence emission at about 600 nm in ethanol (22), whereas hypericin forms nonfluorescent high molecular weight aggregates in aqueous solutions. Moreover, this PS can associate with macromolecules, such as polyvinylpyrrolidone and several proteins (*e.g.* albumin, amyloid fibrils and low density lipoproteins) producing red fluorescent monomers

<sup>†</sup>This paper is part of the Symposium-in-Print on "Antimicrobial Photodynamic Therapy and Photoinactivation."

\*Corresponding author email: ygilaberte@salud.aragon.es (Yolanda Gilaberte)

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

Photochemistry and Photobiology © 2011 The American Society of Photobiology 0031-8655/12



**Figure 1.** Chemical structure of hypericin.

(23,24). Hypericin is a very promising agent for oncologic PDT, in fact it has been proved useful for diagnosis or therapy of bladder tumor cells (25), nasopharyngeal cancer (26), nonmelanoma skin cancer (27) or cutaneous lymphoma (28) among others. Related to the antimicrobial activity, it has been shown that several species of *Hypericum* extracts have an inhibitory effect against gram positive and gram negative bacteria and even against *C. albicans* without light activation (29). The activity of hypericin as an antiviral agent has also been studied against enveloped viruses such the herpes simplex virus, cytomegalovirus and HIV (30).

Keratinocytes are the most predominant skin cell type in the outermost layer of the epidermis and fibroblasts are the principal cellular constituents of connective tissues and organs of the body. The capacity of fibroblasts to produce and organize the extracellular matrix and to communicate with other cells makes them a central component of this tissue biology (31). Therefore, our aim was to study the antifungal effect of hypericin PDT *in vitro* against several species of *Candida* and assess any side effects on keratinocytes and fibroblasts.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Hypericin<sup>®</sup> was purchased from Sigma-Aldrich and HWI Analytik GMBH (Ruelzheim, Germany). Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 4.5 g L<sup>-1</sup> glucose, fetal bovine serum (FBS), penicillin streptomycin solution, L-glutamine solution for biological assays were purchased from Lonza, South American Origin. Sterile Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) and 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich. Pierce BCA Protein Assay Kit was purchased from Thermo Scientific. The Sabouraud medium (SB) was prepared from Sabouraud dextrose agar<sup>®</sup> (Oxoid) supplemented with Chloramphenicol<sup>®</sup> at 50 mg L<sup>-1</sup> (Sigma).

**Microorganisms and growth conditions.** *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. albicans* (ATCC 10231) strains were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD) and *C. albicans* CECT 1001 from the Spanish Type Culture Collection (CECT). The yeasts were grown aerobically overnight in SB medium at 35°C. Stock inoculum suspensions were prepared in distilled water and adjusted to optical densities corresponding to 0.5 McFarland for three logs reduction assays. For those experiments aiming at six logs reduction, 4 McFarland values were used instead. Cell viability was assessed counting the number of colony-forming units (CFU), developed on SB after an incubation period of 48 h at 35°C.

**Cell cultures and growth conditions.** Keratinocytes (ATCC PCS-200-011; human adult high calcium low temperature keratinocytes [HaCaT]) and fibroblasts (ATCC PCS-201-012; human normal dermal fibroblasts [hNDF]) were obtained from American Type Culture Collection. HaCaT and hNDF were cultured in T-25 flask and T-75 flask, respectively, during 2 days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The culture media used were DMEM-high glucose supplemented with FBS (10%

vol/vol), L-glutamine and Penicillin streptomycin (1% vol/vol). After 2 days, 80% confluent cells were trypsinized for detaching the cells from the flask surface and cultured for two additional days at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in 48-well microplates until each well contained 10<sup>6</sup> cells.

**Photosensitizer solutions.** Stock hypericin solutions were prepared in ethanol (Alcohol<sup>®</sup> 70°, Spain) or dimethyl sulphoxide (DMSO) (Panreac<sup>®</sup>, Barcelona, Spain) and diluted either with bidistilled water (for yeasts) or with DMEM supplemented with L-glutamine 2 mM and penicillin streptomycin 1% vol/vol (for keratinocytes and fibroblasts) to the desired concentration immediately prior to use. The concentrations used ranged from 0.032 to 640 μM. All solutions were prepared and handled under light-restricted conditions.

**Yeast uptake.** Stock inoculum suspensions (10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) were centrifuged at 3000 rpm (1400 g) for 3 min and washed with PBS to remove the growth medium. Hypericin 2.5 μM in PBS was then immediately added to the yeast suspension and incubated in the dark for different times ranging from 30 min to 24 h at 37°C under gentle stirring. After each preset time, the medium was discarded and washed three times with PBS to remove the excess of hypericin by centrifugation at 3000 rpm for 3 min. The final pellet was resuspended in 1 mL SDS 2% in water and stirred during 24 h in the dark at room temperature. The amount of hypericin incorporated by the cells was obtained by fluorescence spectroscopy exciting the lysate at 530 nm and recording the emission spectrum in the range 550–750 nm. Then, the area under the emission spectrum was calculated by integration (Jobin-Yvon Spex Fluoromax 4 spectrofluorometer). The experiments were carried out in triplicate for each condition.

**Human cells uptake.** Keratinocytes and fibroblasts were seeded in six-well microplates and grown for 2 days until ca 10<sup>6</sup> cells per well. They were then washed with PBS to remove the growth medium. Immediately after adding hypericin 2.5 μM in DMEM, the cells were incubated in the dark for different times ranging from 30 min to 24 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After each preset time, the cells were washed three times with PBS to remove the excess of hypericin and culture media. Afterwards, the cells were scraped and resuspended in 1 mL of SDS 2% in water and stirred for 24 h in the dark at room temperature. The amount of hypericin incorporated by the cells was obtained by fluorescence spectroscopy as described above for the yeasts. The fluorescence intensity values obtained for each sample were normalized to the total number of cells in the well to correct for variations between samples. The bicinchoninic acid protein assay (32) was used to this end. The experiments were carried out in triplicate for each condition.

**Light sources.** Yeasts were irradiated in the microbiology laboratory with a LED lamp emitting at 602 ± 10 nm with an irradiance of 10.3 mW cm<sup>-2</sup>. The skin cells were irradiated in the cell-culture laboratory using a slightly different LED lamp emitting at 593 ± 10 nm with an irradiance of 9 mW cm<sup>-2</sup>. Given the broad absorption spectrum of hypericin, the small differences between the two light sources bore no significant influence on the outcome of the two series of experiments.

**Photodynamic treatments of yeasts.** Starting from 24 h old yeast cultures, suspensions of the desired McFarland value were prepared in bidistilled water; 90 μL of these initial suspensions was dropped into different wells of a microtiter plate and different concentrations of hypericin in the range 0.325–640 μM were added. The plates were then maintained at 35°C in the dark for different periods of time (0, 15, 30 and 60 min, 3 and 24 h) to evaluate the influence of contact time on the outcome of the photodynamic treatments. Afterwards, yeast cells were subjected to LED illumination for 30 or 60 min (18 or 37 J cm<sup>-2</sup>). Fungal cultures grown under the same conditions with and without PS, either kept in the dark or illuminated, served as controls. After the treatments, samples and controls were incubated at 35°C for 48 h, and the antifungal effect was determined by counting the number of CFU per milliliter (33) in samples and controls. We adopted the criterion used to define bactericidal activity as the definition for fungicidal activity, namely a 99.9%, or 3 log<sub>10</sub>, reduction in CFU per milliliter from the starting inoculum. This criterion has been used previously to assess the antifungal activity of drugs against *Candida* spp. (34). A more stringent criterion of 6 log<sub>10</sub> unit decrease was also adopted for the purpose of assessing how far we could go without inducing significant phototoxicity to skin cells.

All experiments were carried out at least nine times (three different days and three replicates each day) and in some cases by different technicians.

**Photodynamic treatments of human skin cells.** Cell viability was evaluated by the MTT assay. Cells grown in microplate wells (*ca*  $10^6$ ) were washed with PBS to remove the growth medium. Immediately after adding increasing concentrations of hypericin (0.5, 1, 5 and  $10 \mu\text{M}$ ), the wells were irradiated for 15, 30 and 60 min (8, 18 and  $37 \text{ J cm}^{-2}$ ), respectively. The irradiated cells were then washed with PBS to remove the excess of hypericin and were incubated with MTT ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and growth medium for 24 h at  $37^\circ\text{C}$ . The medium was then replaced by DMSO, the resulting suspension was stirred for 15 min, and the absorbance at 550 nm was read on a microplate reader (Biotek ELx808). For each assay, dark toxicity and light controls were carried out at the same hypericin concentration and light dose, respectively. The experiments were carried out in triplicate for each condition. Survival values are expressed by means  $\pm$  SD.

**Statistics.** Hypericin concentration values were expressed by means  $\pm$  SD. Differences between two means were analyzed using the Mann-Whitney *U*-test. Statistical significance was assumed at a *P* value of  $< 0.05$ .

## RESULTS

### Photosensitized inactivation of yeast cellular suspensions

Under the experimental conditions described above, photodynamic treatment with hypericin inhibited the growth of different strains of yeasts reaching a fungicidal effect. In the absence of light, hypericin inactivated less than 10% of the yeast, except for the highest concentration used for *C. krusei*, an effect due to the amount of DMSO added. Similarly, the light treatment alone exerted some cytotoxicity (around 20% cell viability reduction) at  $37 \text{ J cm}^{-2}$ .

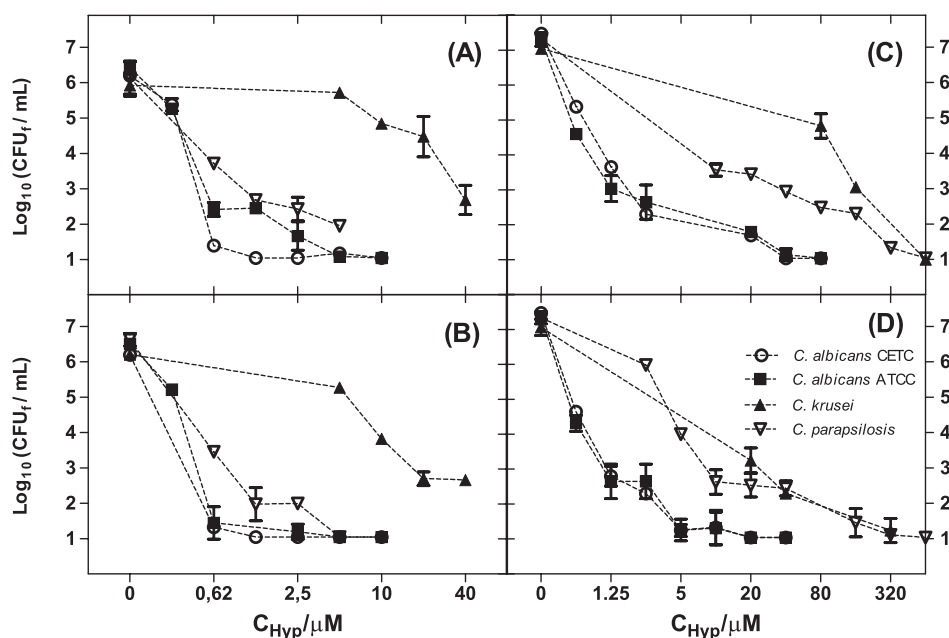
The effect of the preincubation time of *Candida* cells with the PS before illumination was studied. A short incubation time ( $< 1$  min) was enough to produce complete photoinactivation on all the strains. Incubation times of 15, 30 and 60 min did not increase the efficacy of the treatment.

Hypericin exhibits a phototoxic effect on all *Candida* spp. (Fig. 2), the extent of cell photoinactivation being dependent on the concentration of the PS, the light dose delivered and the *Candida* species. Starting from 0.5 McFarland values, a 3  $\log_{10}$  fungicidal effect for *C. albicans* (ATCC and CECT) and *C. parapsilosis* was achieved with a concentration of hypericin as low as 0.625 and  $1.25 \mu\text{M}$ , respectively, and a light fluence of 18 and  $37 \text{ J cm}^{-2}$ . A higher concentration of hypericin,  $40 \mu\text{M}$  at a fluence of  $18 \text{ J cm}^{-2}$  or  $20 \mu\text{M}$  at  $37 \text{ J cm}^{-2}$ , was necessary to observe a 3  $\log_{10}$  fungicidal effect on *C. krusei*. The hypericin concentrations needed to obtain a 3  $\log_{10}$  fungicidal effect for the 0.5 and 4.0 McFarland values were not significantly different for *C. albicans* spp. ( $P > 0.1$ ) but they were for *C. parapsilosis* ( $P < 0.002$ ) and *C. krusei* ( $P < 0.05$ ), either with 18 or  $37 \text{ J cm}^{-2}$  for all the strains.

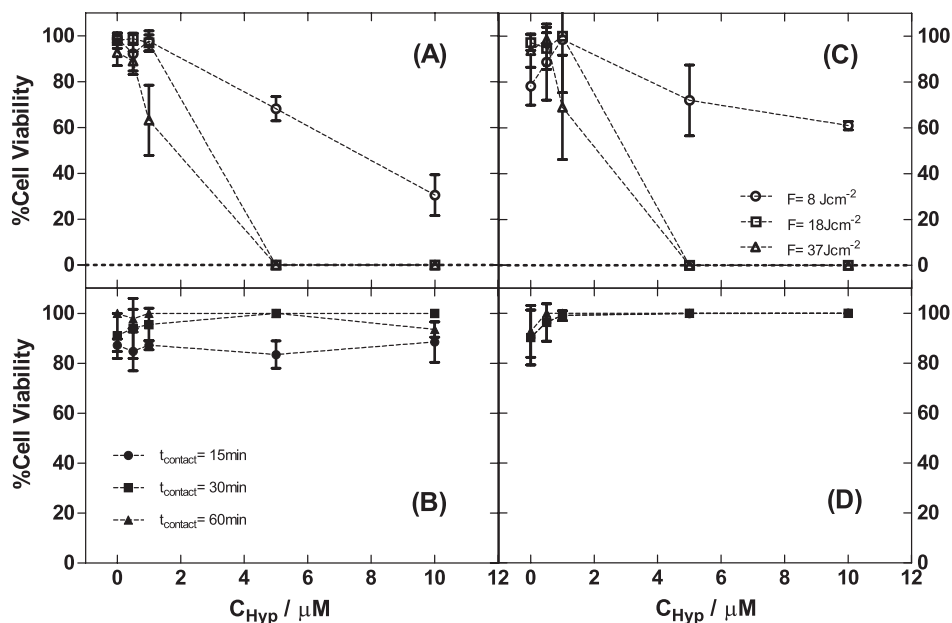
Higher hypericin concentration and light dose were needed to reach a 6  $\log_{10}$  reduction in yeast viability starting from 4.0 McFarland values (Fig. 2). This increase was lower for *C. albicans* spp. ( $5 \mu\text{M}$  and  $37 \text{ J cm}^{-2}$ ) than for *C. parapsilosis* ( $320 \mu\text{M}$  and  $37 \text{ J cm}^{-2}$ ) and *C. krusei* ( $320 \mu\text{M}$  and  $37 \text{ J cm}^{-2}$ ). Hypericin concentrations needed to obtain 3 or 6  $\log_{10}$  reduction starting from 4 McFarland values were statistically significantly different for all strains either using 18 or  $37 \text{ J cm}^{-2}$  ( $P < 0.05$ ).

### Effect of photodynamic treatments on of human cells

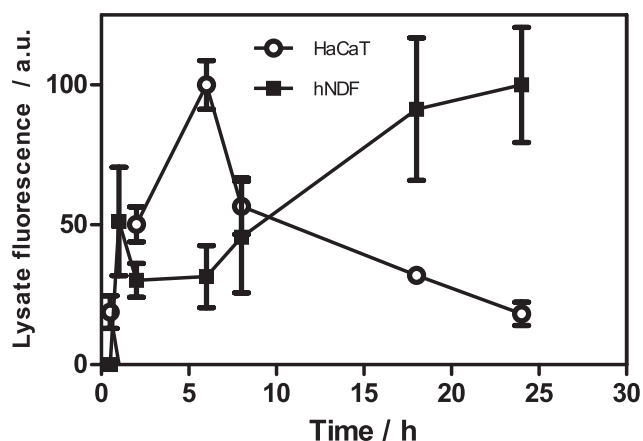
Once the conditions for inducing yeast cell death were identified, the effect of such photodynamic treatments on HaCaT and hNDF were assessed as well (Fig. 3). The results show that these cells are  $> 90\%$  viable only under the treatment conditions needed to photoinactivate *C. albicans* cells. In all other cases, photodamage to human cells cannot be completely avoided. However, its dark toxicity is almost negligible.



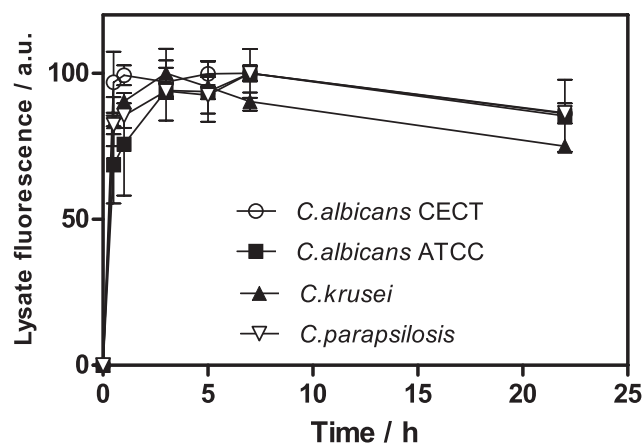
**Figure 2.** Light-fluence and hypericin-concentration effects on *Candida* strains photoinactivation. Panels (A) and (B) refer to experiments starting from McFarland values of 0.5 (A:  $18 \text{ J cm}^{-2}$ ; B:  $37 \text{ J cm}^{-2}$ ) while panels (C) and (D) refer to experiments starting from McFarland values 4.0 (C:  $18 \text{ J cm}^{-2}$ ; D:  $37 \text{ J cm}^{-2}$ ).



**Figure 3.** Cell viability of HaCaT (A) and hNDF (C) after photoinactivation with different concentrations of hypericin and increasing fluences: 8  $J cm^{-2}$  (circles), 18  $J cm^{-2}$  (squares) and 37  $J cm^{-2}$  (triangles). (B, D) Dark toxicity under the same conditions.



**Figure 4.** Time course of hypericin uptake by HaCaT (circles) and hNDF (squares). See the Materials and Methods section.



**Figure 5.** Time course of hypericin uptake by *Candida* spp. See the Materials and Methods section.

### Uptake of hypericin in human cells and yeasts

The uptakes of hypericin by human cells and yeast were obtained by measuring the fluorescence of this photosensitizer after lysing the cells. For HaCaT cells, the uptake increases gradually until 6 h, when a maximum is observed (Fig. 4). Subsequently, the incorporation of the hypericin decreases over time, probably due to expulsion or metabolism of the PS by the cells. For hNDF cells, the uptake increases steadily with the contact time, with a transient maximum around 1 h (Fig. 4). For all yeasts, the uptake increases steadily and reaches a plateau after 24 h of incubation (Fig. 5).

## DISCUSSION

The usefulness of PDT for the inactivation of pathogenic microorganisms is being increasingly recognized. Among the

many PSs being scrutinized for this purpose, hypericin has attracted much attention as it is a natural product, already used in traditional medicine and known for its photosensitizing properties. This study demonstrates that all *Candida* spp. can be successfully photoinactivated by hypericin, although there are differences in susceptibility among the species. *C. albicans* is the most susceptible species and *C. krusei* the most resistant. Moreover, our study also demonstrates that hypericin PDT photosensitizes the yeasts very quickly, immediately after adding hypericin to the cells. Increasing the preincubation time did not increase the efficiency of the treatments, in line with the observations for other PSs (35).

Concerning the fungicidal light dose, 18  $J cm^{-2}$  was the minimal effective fluence needed to reach a 3 log fungicidal effect in *C. albicans* and *C. parapsilosis*, similar to the findings with other PSs (36). Treatment with light alone (602 nm) did

not elicit any significant effect on the yeasts, in agreement with earlier reports (20,36), although Souza *et al.* (17) found that low-power laser irradiation at 660 nm ( $15.8\text{--}39.5\text{ J cm}^{-2}$ ) exerted an antifungal effect on *C. albicans*.

Our biological *in vitro* studies demonstrate that hypericin may also induce a significant phototoxic effect *in vitro* to human keratinocytes and fibroblasts as a function of concentration and light dose. Nevertheless, it is possible to use hypericin in PDT as long as the concentration and light dose are kept below  $1\text{ }\mu\text{M}$  and  $37\text{ J cm}^{-2}$ , respectively. These *in vitro* results are consistent with clinical data obtained on healthy subjects treated with topically administered hypericin for whom the minimal phototoxic light dose was  $4\text{ J cm}^{-2}$  (28).

PDT should preserve not only the host tissue but also the local inflammatory process involved in infections, which is itself a protective and reparative mechanism where leukocytes, particularly neutrophils, play an important role (37). In this sense, it has been recently demonstrated that photosensitizers, such as toluidine blue-O or methylene blue can preserve the host neutrophils while exerting a significant therapeutic effect on *in vivo* localized microbial infections (38). In the case of hypericin, it has been reported that the superoxide generation in stimulated neutrophils can be inhibited via an oxygen-dependent photosensitization mechanism (39). Thus, it remains to be ascertained whether the conditions needed to impair neutrophils' function preclude an effective fungicidal effect.

To our knowledge, our study compares for the first time the fungicidal capacity of hypericin PDT using the well-established microbiological endpoint of  $3\text{ log}_{10}\text{ CFU mL}^{-1}$  reduction (34) with the arbitrary yet more stringent endpoint of  $6\text{ log}_{10}$  reduction. Differences in the concentrations of hypericin needed to achieve both endpoints are statistically significant for all strains and for both light fluences.

According to our data, infections caused by *C. albicans*, the species most frequently involved in clinical infections caused by yeasts, could be suitable for treatment with hypericin PDT to obtain 3, but not 6,  $\text{log}_{10}$  reduction *in vitro*, inflicting minimal damage to cutaneous cells. It is arguable whether it is really necessary to reach such a population decrease to resolve the clinical infection or if it is better to use lower PDT doses and perhaps to repeat the treatments to preserve normal tissue. In the case of other species, such as *C. parapsilosis*, only 3 logs reduction, starting from 0.5 McFarland values, could be obtained without inducing significant phototoxicity to skin cells.

Our study also compares the fungicidal effect *in vitro* of hypericin PDT on *Candida* strains starting from two different inocula, 0.5 and 4 McFarland. According to our results, the starting inoculum is an important factor for PDT efficacy; nevertheless, *C. albicans* spp. seems to be especially sensitive to hypericin PDT (not statistically significant differences in photosensitizer concentration for 3 log reduction either using 0.5 or 4 McFarland). This finding could be an additional value to support the clinical use of hypericin in PDT for infections caused by *C. albicans*.

A different susceptibility to PDT among *Candida* species has been previously reported with other PSs, *C. albicans* being the most sensitive species (36). For instance, Bliss *et al.* (40) found that *Candida glabrata* shows less sensitivity to photoinactivation than *C. albicans*. This has been attributed to the

phenomenon of coadhesion between closely apposed blastoconidia, which may limit the contact area between *C. glabrata* cells and the PS (3,41). Another factor that could influence the response of the microorganisms to PDT is their physiological state (9).

Concerning cellular uptake, the time of incubation with hypericin before irradiation did not increase the fungicidal effect of PDT although the uptake increased for all yeast until 24 h of incubation. According to these data, hypericin uptake does not correlate with its phototoxicity. Considering that subcellular localization of photosensitizers is critical to the therapeutic outcome of PDT, and that hypericin is capable of targeting cellular membrane systems very rapidly, factors related to changes in the intracellular distribution of the photosensitizer with time could be implicated (42).

On the other hand, we also found that although hypericin uptake of *C. parapsilosis* was higher than those of *C. albicans* strains, the phototoxic effect was higher in the latter.

These findings are consistent with those published by Mikeš *et al.* (43), who showed that despite the higher accumulation of hypericin in fetal human colon (FHC) epithelial cells compared with HT-29 colon adenocarcinoma cells, the cytotoxic effects were more pronounced in the latter.

Different PSs have been proved to be active *in vitro* against *Candida* spp. (15,17,20,35,36,44–46). It is, however, difficult to compare our results with those of these earlier studies because the strains of *Candida* and the photoinactivation conditions were different (17,36). Other PSs with recognized photodynamic antimicrobial effect, such as methylene blue (17), toluidine blue (47), ALA (15) or BAM-SiPc (35) require higher concentrations and longer incubation times to achieve the same fungicidal effect ( $3\text{ log}_{10}$  reduction) on *C. albicans* than those we used with hypericin in this study (20). Therefore, hypericin seems to meet many of the qualities to be used in PDT against some yeasts.

## CONCLUSIONS

This study shows that hypericin-PDT is endowed with antifungal potential against *Candida* spp., although the susceptibility is species dependent. Considering the selectivity of this therapy, according to our *in vitro* experiments, only *C. albicans* can be effectively killed without significant damage to normal skin cells, keratinocytes and fibroblasts. Further scrutiny of this drug in experimental infections or clinical trials is thus warranted to assess its potential for treating yeast infections *in vivo*.

*Acknowledgements*—Supported by grant nos. PI120/09 from the Department of Science, Technology and University of the Government of Aragón, and CTQ2010-20870-C03-01 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, Spain.

## REFERENCES

- Rex, J., T. Walsh, J. Sobel, S. Filler, P. Pappas, W. Dismukes and J. Edwards (2000) Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 662–678.
- Lasker, B., C. Elie, T. Lott, A. Espinel-Ingroff, L. Gallagher, R. Kuykendall, M. Kellum, W. Pruitt, D. Warnock, D. Rimland, M. McNeil and E. Reiss (2001) Molecular epidemiology of *Candida*

- albicans* strains isolated from the oropharynx of HIV-positive patients at successive clinic visits. *Med. Mycol.* **39**, 341–352.
3. Vazquez, J. (2003) Invasive oesophageal candidiasis: Current and developing treatment options. *Drugs* **63**, 971–989.
  4. Almirante, B., D. Rodríguez, B. Park, M. Cuenca-Estrella, A. Planes, M. Almela, J. Mensa, F. Sanchez, J. Ayats, M. Gimenez, P. Saballs, S. Fridkin, J. Morgan, J. Rodríguez-Tudela, D. Warnock, A. Pahissa and B. C. P. S. Group (2005) Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1829–1835.
  5. Pfaller, M., D. Diekema, R. Jones, H. Sader, A. Fluit, R. Hollis, S. Messer and S. P. Group (2001) International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3254–3259.
  6. Vazquez, J., M. Lynch and J. Sobel (1995) In vitro activity of a new pneumocandin antifungal agent, L-733,560 against azole-susceptible and -resistant *Candida* and *Torulopsis* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2689–2691.
  7. Yoon, S., J. Vazquez, P. Steffan, J. Sobel and R. Akins (1999) High-frequency, in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 836–845.
  8. Dougherty, T. J., C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbek, J. Moan and Q. Peng (1998) Photodynamic therapy. *J. Natl Cancer Inst.* **90**, 889–905.
  9. Jori, G., C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppellotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti and G. Roncucci (2006) Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.* **38**, 468–481.
  10. Wustrow, T. (1995) Mechanisms of phototoxic effects in photodynamic therapy. *Adv. Otorhinolaryngol.* **49**, 31–35.
  11. Donnelly, R., P. McCarron and M. Tunney (2008) Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol. Res.* **163**, 1–12.
  12. Sharma, S. K., T. Dai, G. B. Kharkwal, Y. Y. Huang, L. Huang, V. J. De Arce, G. P. Tegos and M. R. Hamblin (2011) Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 1303–1319.
  13. Demidova, T. and M. Hamblin (2004) Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **17**, 245–254.
  14. Jackson, Z., S. Meghji, A. MacRobert, B. Henderson and M. Wilson (1999) Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial. *Lasers Med. Sci.* **14**, 150–157.
  15. Monfrecola, G., E. Procaccini, M. Bevilacqua, A. Manco, G. Calabro and P. Santoianni (2004) In vitro effect of 5-aminolaevulinic acid plus visible light on *Candida albicans*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 419–422.
  16. Paardekooper, M., A. De Bruijne, A. Van Gompel, R. Verhage, D. Averbeck, T. Dubbelman and P. Van den Broek (1997) Single strand breaks and mutagenesis in yeast induced by photodynamic treatment with chloroaluminum phthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **40**, 132–140.
  17. Souza, R., J. Junqueira, R. Rossoni, C. Pereira, E. Munin and A. Jorge (2009) Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med. Sci.* **25**, 385–389.
  18. Calzavara-Pinton, P., M. Venturini and R. Sala (2005) A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **78**, 1–6.
  19. Soukos, N., L. Ximenez-Fyvie, M. Hamblin, S. Socransky and T. Hasan (1998) Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2595–2601.
  20. Zeina, B., J. Greenman, W. Purcell and B. Das (2001) Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br. J. Dermatol.* **144**, 274–278.
  21. Durán, N. and P. Song (1986) Hypericin and its photodynamic action. *Photochem. Photobiol.* **43**, 677–680.
  22. Kiesslich, T., B. Krammer and K. Plaetzer (2006) Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.* **13**, 2189–2204.
  23. Kubin, A., P. Meissner, F. Wierrani, U. Burner, A. Bodenteich, A. Pytel and N. Schmeller (2008) Fluorescence diagnosis of bladder cancer with new water soluble hypericin bound to polyvinylpyrrolidone: PVP-hypericin. *Photochem. Photobiol.* **84**, 1560–1563.
  24. Sgarbossa, A., D. Buselli and F. Lenci (2008) In vitro perturbation of aggregation processes in beta-amyloid peptides: A spectroscopic study. *FEBS Lett.* **582**, 3288–3292.
  25. Olivo, M., W. Lau, V. Manivasager, R. Bhuvanewari, Z. Wei, K. Soo, C. Cheng and P. Tan (2003) Novel photodynamic diagnosis of bladder cancer: Ex vivo fluorescence cytology using hypericin. *Int. J. Oncol.* **23**, 1501–1504.
  26. Olivo, M., H. Du and B. Bay (2006) Hypericin lights up the way for the potential treatment of nasopharyngeal cancer by photodynamic therapy. *Curr. Clin. Pharmacol.* **1**, 217–222.
  27. Kacerovská, D., K. Pizinger, F. Majer and F. Smíd (2008) Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical hypericum perforatum extract—a pilot study. *Photochem. Photobiol.* **84**, 779–785.
  28. Rook, A. H., G. S. Wood, M. Duvic, E. C. Vonderheid, A. Tobia and B. Cabana (2010) A phase II placebo-controlled study of photodynamic therapy with topical hypericin and visible light irradiation in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **63**, 984–990.
  29. Pistelli, L., A. Bertoli, S. Zucconelli, I. Morelli, L. Panizzi and F. Menichini (2000) Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*. *Fitoterapia* **71**(Suppl. 1), S138–S140.
  30. Lavie, G., Y. Mazur, D. Lavie, A. Prince, D. Pascual, L. Liebes, B. Levin and D. Meruelo (1995) Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components. *Transfusion* **35**, 392–400.
  31. Sorrell, J. M. and A. I. Caplan (2009) Fibroblasts—a diverse population at the center of it all. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **276**, 161–214.
  32. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85.
  33. Pagonis, T. C., J. Chen, C. R. Fontana, H. Devalapally, K. Ruggiero, X. Song, F. Foschi, J. Dunham, Z. Skobe, H. Yamazaki, R. Kent, A. C. Tanner, M. M. Amiji and N. S. Soukos (2010) Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J. Endod.* **36**, 322–328.
  34. Ernst, E., K. Yodoi, E. Roling and M. Klepser (2002) Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitanae* determined by microdilution, Etest, and time-kill methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 578–581.
  35. So, C., P. Tsang, P. Lo, C. Seneviratne, L. Samaranyake and W. Fong (2010) Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by BAM-SiPc. *Mycoses* **53**, 215–220.
  36. Dovigo, L., A. Pavarina, E. de Oliveira Mima, E. Giampaolo, C. Vergani and V. Bagnato (2009) Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses* **54**, 123–130.
  37. Moghissi, K. (2010) Can Surgical Site Infection (SSI) be treated by photodynamic therapy (PDT)? *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **7**, 1–2.
  38. Tanaka, M., M. Kinoshita, Y. Yoshihara, N. Shinomiya, S. Seki, K. Nemoto, T. Hirayama, T. Dai, L. Huang, M. R. Hamblin and Y. Morimoto (2011) Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. *Photochem. Photobiol.* DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.01005.x.
  39. Nishiuchi, T., T. Utsumi, T. Kanno, Y. Takehara, H. Kobuchi, T. Yoshioka, A. A. Horton, T. Yasuda and K. Utsumi (1995) Inhibition of neutrophil superoxide generation by hypericin, an anti-retroviral agent. *Arch. Biochem. Biophys.* **323**, 335–342.
  40. Bliss, J. M., C. E. Bigelow, T. H. Foster and C. G. Haidaris (2004) Susceptibility of *Candida* Species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2000–2006.



41. Espinel-Ingroff, A., M. Pfaller, S. A. Messer, C. C. Knapp, N. Holliday and S. B. Killian (2004) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 718–721.
42. Ho, Y. F., M. H. Wu, B. H. Cheng, Y. W. Chen and M. C. Shih (2009) Lipid-mediated preferential localization of hypericin in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 1287–95.
43. Mikeš, J., M. Hýžďalová, L. Kočí, R. Jendželovský, J. Kovač, A. Vaculová, J. Hofmanová, A. Kozubik and P. Fedoročko (2011) Lower sensitivity of FHC fetal colon epithelial cells to photodynamic therapy compared to HT-29 colon adenocarcinoma cells despite higher intracellular accumulation of hypericin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **10**, 626–632.
44. Cormick, M., M. Alvarez, M. Rovera and E. Durantini (2009) Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 1592–1599.
45. Lam, M., P. C. Jou, A. A. Lattif, Y. Lee, C. L. Malbasa, P. K. Mukherjee, N. L. Oleinick, M. A. Ghannoum, K. D. Cooper and E. D. Baron (2011) Photodynamic therapy with Pc 4 induces apoptosis of *Candida albicans*. *Photochem. Photobiol.* **87**, 904–909.
46. Lambrechts, S., M. Aalders and J. Van Marle (2005) Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2026–2034.
47. Carvalho, G., M. Felipe and M. Costa (2009) The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. *J. Microbiol.* **47**, 619–623.

## On the mechanism of *Candida* spp. photoinactivation by hypericin†‡

Patricia López-Chicón,<sup>a</sup> Manuel P. Paz-Cristobal,<sup>b</sup> Antonio Rezusta,<sup>b,c</sup> Carmen Aspiroz,<sup>b,d</sup> María Royo-Cañas,<sup>b</sup> Elena Andres-Ciriano,<sup>b</sup> Yolanda Gilaberte,<sup>\*b,e</sup> Montserrat Agut<sup>a</sup> and Santi Nonell<sup>\*a</sup>

Received 13th April 2012, Accepted 18th April 2012

DOI: 10.1039/c2pp25105a

The photoprocesses involved in hypericin photoinactivation of three different *Candida* species (*C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*) have been examined. Production of singlet oxygen from the triplet state and of superoxide from both the triplet state and the semiquinone radical anion are demonstrated. Hydrogen peroxide is formed downstream of these early events. The outcome of the photodynamic treatments is dictated by the intracellular distribution of hypericin, which is different in the three species and affects the ability of hypericin to produce the different reactive oxygen species and trigger cell-death pathways. The results are in line with the previously-observed different susceptibilities of the three *Candida* species to hypericin photodynamic treatments.

### Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment modality based on the use of a photosensitizing drug that induces the production of reactive oxygen species (ROS) upon light activation.<sup>1</sup> By means of their highly oxidative nature, the generated ROS subsequently react with biomolecules in their direct environment, eventually leading to the destruction of the target cells.<sup>2,3</sup> Antimicrobial PDT (aPDT) is being actively explored as an alternative to antibiotics for the treatment of infections.<sup>4</sup> The development and scrutiny of a new-generation of photosensitisers (PSs) is an area of current extensive research in aPDT.<sup>5</sup>

The genus *Candida* spp., belonging to the kingdom of fungi, is a yeast that lives as a guest on the mucous membranes of the mouth, throat, digestive tract and skin. In immunocompromised patients and in the presence of certain factors, some species of *Candida* develop their virulence and become pathogenic causing mucosal lesions, skin infections, or serious and invasive systemic dissemination.<sup>6</sup>

Hypericin (Fig. 1), a naturally occurring dye isolated from plants from the genus *Hypericum*,<sup>7</sup> has been explored as a therapeutic agent for several cancer types,<sup>8–11</sup> as well as an antiviral<sup>12</sup> and an antibacterial agent.<sup>13,14</sup>

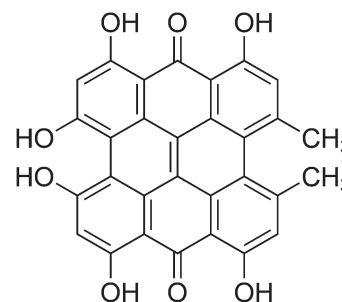


Fig. 1 Chemical structure of hypericin.

Regarding its analysis as an aPDT photosensitiser, recent results from our laboratory have revealed a photodynamic fungicidal effect of hypericin against *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*. It was found that the doses of both hypericin and light needed to photoinactivate these yeasts were strongly dependent on the particular strain. For instance, the conditions needed to induce a reduction of 3-log<sub>10</sub> (99.9%) colony-forming units (CFU) per millilitre were 1.25 μM for *C. albicans*, 2.5 μM for *C. parapsilosis* and 40 μM for *C. krusei* under a light fluence of 18 J cm<sup>-2</sup>.<sup>15</sup>

Regarding its photophysical and photosensitising properties, hypericin absorbs in the visible spectrum (*i.e.*, maximum absorbance at 550 and 588 nm in ethanol) and shows fluorescence emission around 600 nm in ethanol,<sup>16</sup> whereas in aqueous solutions it forms non-fluorescent aggregates. In biological media, association with proteins restores the red fluorescence from the monomers.<sup>17,18</sup> Monomeric hypericin is also endowed with a high quantum yield of triplet-state formation (0.5–0.7),<sup>19,20</sup> and the ability to photooxidise biological substrates by both type-I and type-II mechanisms. The former involves radical intermediates formed in hydrogen- or electron-transfer reactions and the latter involves the formation of singlet molecular oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) by an energy-transfer process.<sup>21</sup>

<sup>a</sup>IQS School of Engineering, Universitat Ramon Llull, Via Augusta, 390, 08017 Barcelona, Spain. E-mail: santi.nonell@iqs.url.edu

<sup>b</sup>Health Science Institute of Aragon, Zaragoza, Spain

<sup>c</sup>IIS Aragón, Department of Microbiology, University Hospital Miguel Servet, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

<sup>d</sup>Department of Microbiology, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain

<sup>e</sup>Department of Dermatology, Hospital San Jorge, Huesca, Spain

† This article is published as part of a themed issue in honour of Professor Kurt Schaffner on the occasion of his 80th birthday.

‡ Electronic supplementary information (ESI) available: Control microscopy images. See DOI: 10.1039/c2pp25105a

In this work, we set out to gain mechanistic insight into the photoinactivation of *Candida* spp. by hypericin, in order to identify the reactive intermediates involved and the factors that could explain their different susceptibility to aPDT.

## Materials and methods

### Chemicals

Hypericin® was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and from HWI Analytik GmbH (Ruelzheim, Germany). Catalase, superoxide dismutase and sterile Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) were purchased also from Sigma-Aldrich, while sodium azide, dimethylsulfoxide (DMSO) and ethanol were from Panreac (Spain). MitoTracker Green® (MTG) (Ref. M7514), CellTracker Green® (CTG) (Ref. C2925) and DAPI (Ref. D3571) were obtained from Molecular Probes (InvitrogenT, USA). Pierce BCA Protein Assay Kit was purchased from Thermo Scientific. The Sabouraud medium (SB) was prepared from Sabouraud dextrose agar® (Oxoid) supplemented with Chloramphenicol® at 50 mg L<sup>-1</sup> (Sigma). Deuterium oxide (D<sub>2</sub>O; 99.9%) was purchased from Solvents Documentation Synthesis (Peypin, France). Deuterated PBS was prepared by dissolving PBS powder in deuterium oxide.

### Microorganisms and cell growth conditions

*C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 6258) and *C. albicans* (ATCC 10231) strains were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). The yeasts were grown aerobically overnight in SB medium at 35 °C. Stock inoculum suspensions were prepared in distilled water and adjusted to an attenuation *ca.* 0.6. Cell viability was assessed counting the number of colony-forming units (CFUs) developed on SB after an incubation period of 48 h at 35 °C.

### Photosensitiser solutions

Stock hypericin solutions were prepared in ethanol or DMSO, diluted with bi-distilled water and stored in the dark at 4 °C. All solutions were prepared and handled under light-restricted conditions.

### Light sources

Photoinactivation studies were conducted using a lamp made of light-emitting diodes (LEDs) emitting at 602 ± 10 nm with an irradiance of 10.3 mW cm<sup>-2</sup>.

### Spectroscopic measurements

Ground-state absorption spectra were recorded using a Varian Cary 6000i spectrophotometer (Varian Inc., Palo Alto, CA). Fluorescence emission spectra were recorded in a Spex Fluoromax-4 spectrofluorometer (Horiba Jobin-Yvon, Edison, NJ). Time-resolved fluorescence decays were recorded with a time-correlated single photon counting system (Fluotime 200, PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) equipped with a red-sensitive

photomultiplier. The fluorescence was excited at 596 nm by means of a pulsed LED working at 10 MHz repetition rate, and was observed at 655 nm keeping the counting frequency below 1%. Fluorescence decays were analysed using the PicoQuant FluoFit 4.0 data analysis software.

Singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) phosphorescence was detected by means of a customized PicoQuant Fluotime 200 system.<sup>22</sup> Briefly, a diode-pumped pulsed Nd:Yag laser (FTSS355-Q, Crystal Laser, Berlin, Germany) working at 10 kHz repetition rate at 532 nm (12 mW, 1.2 μJ per pulse) was used for excitation. A 1064 nm rugate notch filter (Edmund Optics, UK) was placed at the exit port of the laser to remove any residual component of its fundamental emission in the near-IR region. The luminescence exiting from the sample was filtered by a cold mirror (CVI Melles Griot, USA) and an interference filter at 1273 ± 86 nm (Interferenzoptik Elektronik GmbH, Germany) and focused onto a near-IR sensitive photomultiplier tube assembly (H9170-45, Hamamatsu Photonics Hamamatsu City, Japan). Photon counting was achieved with a NanoHarp 250 multichannel scaler (PicoQuant, Germany). The time-resolved emission signals were analyzed using the FluoFit 4.0 software (PicoQuant, Germany) to extract lifetime values.

Transient absorption experiments were carried out using a home-built nanosecond laser flash photolysis apparatus described elsewhere.<sup>23</sup> The excitation wavelength was 532 nm and the transient absorption was recorded at the appropriate wavelengths for monitoring either the triplet state (<sup>3</sup>Hyp, 520 nm) or the radical anion (Hyp<sup>•-</sup>, 740 nm).<sup>24</sup>

Hypericin in the concentration range 10–60 μM was added to the yeast suspensions in PBS (~10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) immediately prior to the spectroscopic measurements. For measurements in D<sub>2</sub>O-based PBS (D-PBS) the suspensions were centrifuged twice at 3000 rpm for 5 min and resuspended with D-PBS. All spectroscopic measurements were carried out in 1 cm quartz cuvettes (Hellma, Germany) at room temperature under gentle stirring.

### Fluorescence microscopy

Experiments were carried out firstly with the same hypericin concentration of 5 μM for all strains and, secondly, using the fungicidal concentration of hypericin for each strain (*C. albicans* 1.25 μM, *C. parapsilosis* 2.5 μM and *C. krusei* 40 μM). 0.5 McFarland standard suspensions were incubated for 1 and 30 min, the time used for irradiation in the steady-state experiments, centrifuged for 5 min at 10 000 rpm, and washed using physiological saline solution at 35 °C. After repeating this washing procedure three times, the pellets were resuspended in SB medium at 35 °C and the fluorescent probes MTG or CTG (5 μM) were added. After dark incubation for 40 min at 35 °C, the samples were washed three times as above. The pellets obtained were resuspended in 3% paraformaldehyde solution and further incubated in the dark for 15 min at 35 °C. After that, paraformaldehyde was removed by washing twice with physiological saline solution. Finally, 500 μL of the final suspensions were dispensed into a well containing a polylysine-treated glass coverslip, centrifuged for 30 min at 3000 rpm in order to fix the cells on the coverslips, and these were removed and mounted on

glass plates using Mowiol mounting medium containing DAPI (5  $\mu\text{M}$ ) for nuclear staining.

Samples were visualised with an Olympus FV10i or a Leica SP2 AOBS confocal scanning microscope. Images were collected using microscopes in sequential mode with a 60 $\times$  oil immersion lens (lens specification, Plan S-APO 60xO, NA 1.35) or a 100 $\times$  oil immersion lens (lens specification, HCX PL APO 100 $\times$ , NA 1.40) a line average of 8 and a format of 1024  $\times$  1024 pixels. The confocal pinhole was 1 Airy unit.

Images were exported from the FV10i or SP2 software into Adobe Photoshop CS5. In the figures shown in this manuscript, there was no image manipulation performed prior to export into Adobe Illustrator CS5 to generate the figures.

### Effect of quenchers

0.5 McFarland yeast suspensions in PBS buffer at pH 7.3–7.4 were merged with PBS solutions containing the desired ROS-quencher. Thus, sodium azide 80 mM (quencher of  $^1\text{O}_2$ ), catalase 1880 U mL $^{-1}$  (CAT, quencher of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) or superoxide dismutase 200 U mL $^{-1}$  (SOD, quencher of  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) were added to the cells and kept in the dark for 15 min at 35  $^\circ\text{C}$ . Afterwards the concentration of hypericin required for 3- $\log_{10}$  CFU reduction (*C. albicans* ATCC 1.25  $\mu\text{M}$ , *C. parapsilosis* 2.5  $\mu\text{M}$  and *C. krusei* 40  $\mu\text{M}$ )<sup>15</sup> was added and the cells were irradiated for 30 min (18 J cm $^{-2}$ ). Fungal cultures grown under the same conditions without quenchers served as controls. After the treatments, samples and controls were incubated at 35  $^\circ\text{C}$  for 48 h, and the antifungal effect was determined by counting the number of CFUs.

## Results

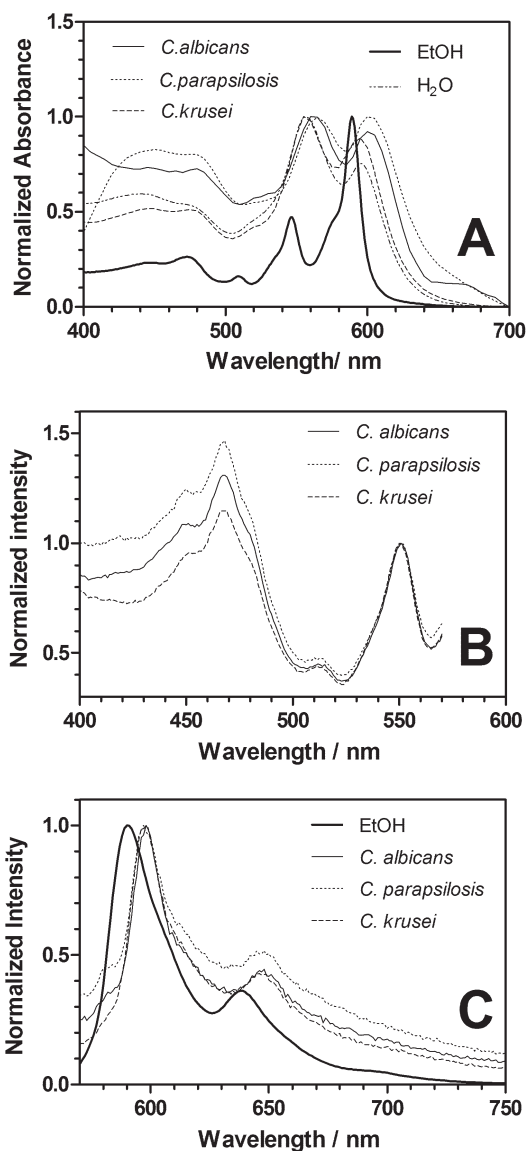
### Absorption and fluorescence spectra

The absorption, fluorescence and fluorescence excitation spectra of hypericin in different solvents and yeast suspensions are shown in Fig. 2. Compared to ethanol, the absorption spectra in the yeast suspensions showed broader and red shifted bands with different maxima and relative amplitudes for each *Candida* species.

The fluorescence was also red shifted and substantially weaker than in ethanol. Almost no fluorescence could be detected in PBS due to the formation of non-fluorescent aggregates.<sup>25</sup> These observations, similar to those made recently in a single HeLa cell,<sup>26</sup> indicate that hypericin is bound to the yeasts and localized in lipophilic domains, as confirmed by fluorescence microscopy (see below). No remarkable concentration effects could be detected in the range 1–60  $\mu\text{M}$ .

### Fluorescence kinetics

The fluorescence decay of in ethanol (Fig. 3) showed first-order kinetics with lifetime 5.0 ns, in very good agreement with literature reports.<sup>25</sup> We were unable to detect any decay in pH 7.4 PBS, confirming the aggregation of hypericin in aqueous media.<sup>27</sup> In the presence of yeasts, the fluorescence decay was multiexponential, the actual lifetimes and relative amplitudes of

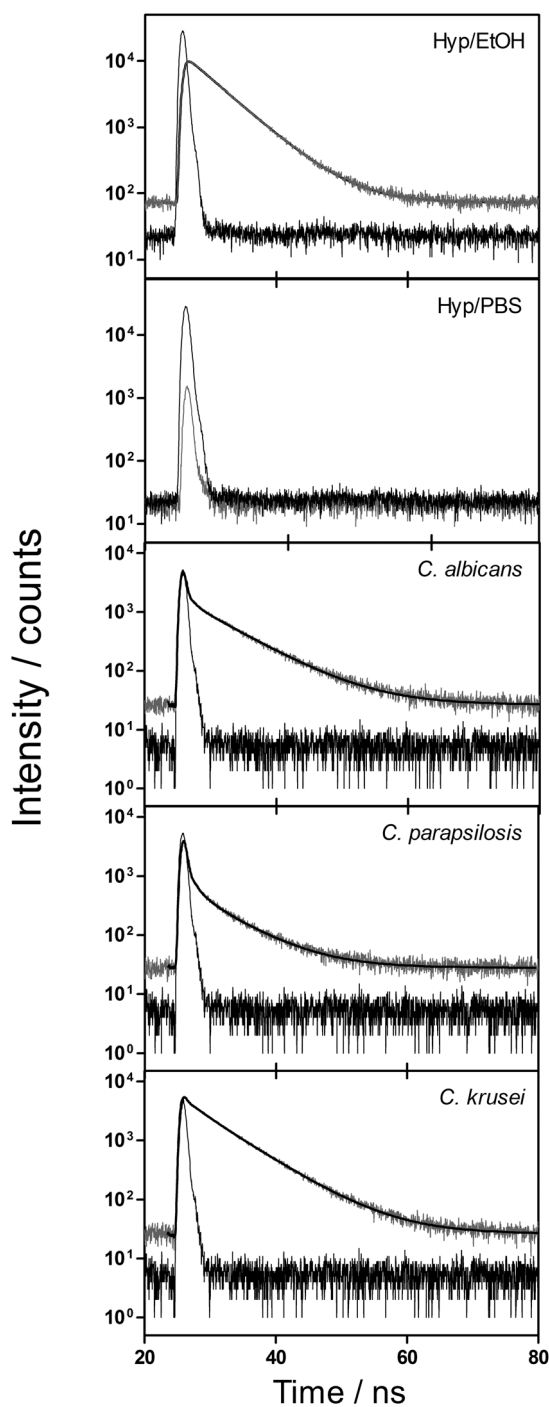


**Fig. 2** (A) Absorption spectra of 10  $\mu\text{M}$  hypericin in the yeasts, in ethanol and in water. (B) Normalized fluorescence excitation spectra in the yeasts ( $\lambda_{\text{obs}} = 600 \text{ nm}$ ). (C) Normalized fluorescence spectra in the yeasts and in ethanol ( $\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$ ).

the components varying among the yeasts beyond experimental uncertainty (Table 1). The average singlet lifetimes follow the trend *C. parapsilosis* < *C. albicans*  $\ll$  *C. krusei*, which suggests different localization patterns of hypericin in each *Candida* species.

### Fluorescence microscopy

Fig. 4 compares the distribution of hypericin in the three species of *Candida*. Additional images can be found in the ESI.† Confocal fluorescence microscopy showed that hypericin is inside the three species already after 1 min incubation, and its distribution stays stable at least within 30 min of incubation. Control samples lacking hypericin did not show any red fluorescence. Using the fungicidal concentration for each strain, the fluorescence



**Fig. 3** Time-resolved fluorescence decay of hypericin in the yeasts and in neat solvents. The samples were irradiated at 596 nm and the fluorescence was recorded at 655 nm. The grey curve is the signal, the thin black is the instrument response function, and the thick black on top of the signal corresponds to the fit.

distribution within cells was the same as using the same concentration (5  $\mu\text{M}$ ) for all of them. Hypericin showed a localisation similar to that of the cytoplasm probe CTG (green) but different from that of DAPI, a nuclear probe. Distribution in the cytoplasm was however different in the three strains. Hypericin accumulates in *C. albicans* mostly in a blotch and some small dots, while it displays a punctuated fluorescence pattern in

**Table 1** Summary of hypericin's photophysical data: fluorescence wavelength ( $\lambda_F$ ) and lifetime ( $\tau_S$ ); triplet lifetime in argon- ( ${}^{\text{Ar}}\tau_T$ ) and air- ( ${}^{\text{Air}}\tau_T$ ) saturated solutions; singlet oxygen lifetime in PBS ( ${}^{\text{PBS}}\tau_{\Delta}$ ) and in deuterated PBS ( ${}^{\text{D-PBS}}\tau_{\Delta}$ ); and lifetime of hypericin's radical anion ( $\tau_{\text{HYP}^-}$ ) in argon-saturated yeast suspensions

	EtOH	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>
$\lambda_F/\text{nm}^a$	590	598	597	598
$\tau_S/\text{ns}^b$	5.0	0.25 (59)	0.37 (61)	—
(% amplitude)	(100)	4.1 (11)	2.0 (21)	3.1 (23)
$\tau_S(\text{average})/\text{ns}^b$	5.0	2.8	1.9	5.7
${}^{\text{Ar}}\tau_T/\mu\text{s}^c$	—	4.8 (5)	2.1 (20)	2.9 (42)
(% amplitude)	—	57 (95)	40 (80)	46 (58)
${}^{\text{Air}}\tau_T/\mu\text{s}^c$	—	0.9 (100)	0.8 (100)	0.2 (85)
(% amplitude)	—	—	—	2.4 (15)
${}^{\text{Air}}\tau_T/\mu\text{s}^d$	—	1.2	0.7	0.2
${}^{\text{PBS}}\tau_{\Delta}/\mu\text{s}^d$	—	4.3	4.8	4.0
${}^{\text{D-PBS}}\tau_{\Delta}/\mu\text{s}^d$	—	27	40	28
$\tau_{\text{HYP}^-}/\mu\text{s}^e$	—	800	890	1100

<sup>a</sup>  $\lambda_{\text{exc}} = 530$  nm. <sup>b</sup>  $\lambda_{\text{exc}} = 596$  nm and  $\lambda_{\text{obs}} = 655$  nm; uncertainty  $\pm 10\%$ . <sup>c</sup> From transient absorption measurements at  $\lambda_{\text{obs}} = 520$  nm; uncertainty  $\pm 20\%$ . <sup>d</sup> From  ${}^1\text{O}_2$  phosphorescence at  $\lambda_{\text{obs}} = 1275$  nm; uncertainty  $\pm 10\%$ . <sup>e</sup> From transient absorption measurements at  $\lambda_{\text{obs}} = 740$  nm in argon-saturated suspensions; uncertainty  $\pm 20\%$ .

*C. parapsilosis* that co-localises with MTG, and in *C. krusei* the fluorescence is diffusely distributed in the cytoplasm, clearly more so than in *C. albicans* and in *C. parapsilosis*.

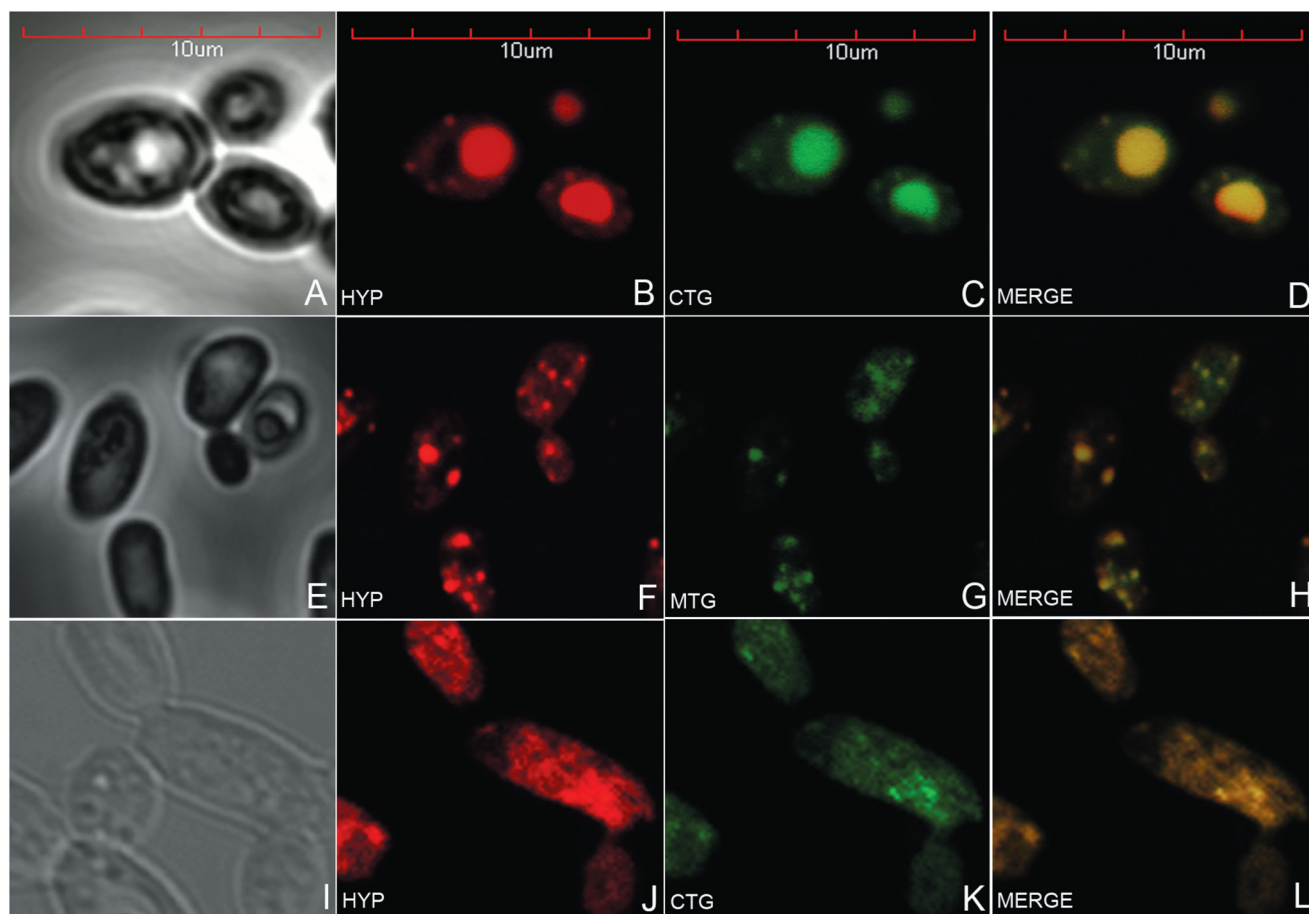
### Transient absorption experiments

Production of the triplet and radical anion of hypericin in yeasts,  ${}^3\text{Hyp}$  and  $\text{Hyp}^{\cdot-}$  respectively, was probed by transient absorption experiments taking advantage of their different absorption spectra.<sup>24</sup> In argon-saturated samples, all yeasts produced the two intermediates (Fig. 5). The decay of  ${}^3\text{Hyp}$  could be adequately modelled by a biexponential function in all yeasts (Table 1). Inspection of the decays in Fig. 5 shows that the contribution of the shorter-lived component follows the trend *C. albicans* < *C. parapsilosis* < *C. krusei*. When air was allowed into the samples all triplet states of *C. albicans* and *C. parapsilosis* were quenched and decayed faster, however the 2.9  $\mu\text{s}$  component in *C. krusei* was not quenched (Table 1).

Likewise, the decays at 740 nm showed two components. The lifetime of the fast one matched that of the triplet state and is ascribed to that species. The second one is ascribed to  $\text{Hyp}^{\cdot-}$  and had a much longer lifetime, in the millisecond range in argon-saturated solutions. When oxygen was allowed into the system, the signals disappeared completely.

### Singlet oxygen measurements

Time-resolved near-IR luminescence detection is a powerful tool to study the process of  ${}^1\text{O}_2$  photosensitization in cells as  ${}^1\text{O}_2$  can be directly monitored through its phosphorescence at 1275 nm.<sup>22,28–33</sup> Irradiation of hypericin-loaded yeasts with a pulsed laser at 532 nm produced unequivocal luminescence signals at 1275 nm in all yeasts (Fig. 6). The emission was assigned to  ${}^1\text{O}_2$  based on the disappearance of the signal at



**Fig. 4** Fluorescence microscopy of hypericin in the three *Candida* species studied. *C. albicans*: (A) phase contrast image; (B) hypericin fluorescence (red) is localized inside cells mainly as a blotch and some dots; (C) CTG fluorescence (green); (D) merged image (orange); *C. parapsilosis*: (E) phase contrast image; (F) hypericin fluorescence (red); (G) MTG fluorescence (green); (H) merged image (orange). *C. krusei*: (I) phase contrast image; (J) hypericin fluorescence (red) is more diffuse than in the other species and does not show a particular intra-cellular pattern; (K) CTG fluorescence (green); (L) merged image (orange).

1325 nm, where  $^1\text{O}_2$  shows almost no phosphorescence, and on the increase in the emission lifetime in deuterated PBS (D-PBS) relative to PBS.<sup>34</sup> Actual kinetic data are collected in Table 1. A clear difference can be observed between *C. krusei* and the other species in that the rise of the signal is much faster and cannot be resolved.

#### Effect of ROS quenchers

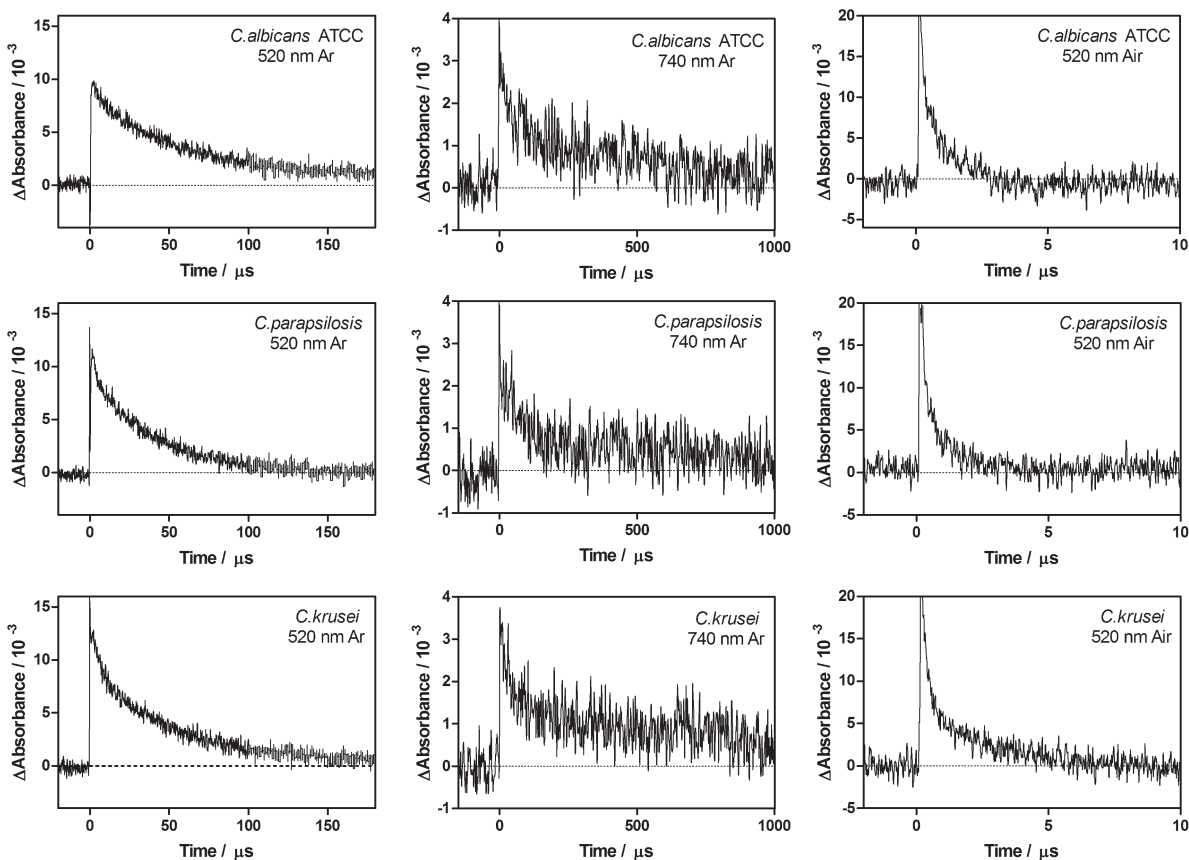
Photoinactivation studies under conditions leading to 3- $\log_{10}$  reduction of CFU per milliliter<sup>15</sup> were carried out in the presence of specific ROS quenchers (Fig. 7). Catalase completely inhibited the phototoxicity of hypericin for *C. albicans* and *C. parapsilosis*. The protective effect was less important for *C. krusei* but survival could still be increased by ca. 20-fold relative to the quencher-free suspensions. The other ROS quenchers, sodium azide and superoxide dismutase, were less effective than catalase, although they were nevertheless able to significantly increase the yeast survival by ca. 2 logs (*C. albicans* and *C. parapsilosis*) and 1 log (*C. krusei*).

#### Discussion

The mechanistic details of *Candida* spp. photoinactivation were studied as a means to document the photoprocesses occurring in hypericin-PDT and eventually ascertain the differences observed previously in the susceptibility of different species.<sup>15</sup>

Absorption spectra (Fig. 2) reveal the presence of hypericin aggregates in the yeast suspensions as well as in neat water, as indicated by the broadening of the bands and changes in their relative amplitudes compared to ethanol. The aggregates are non-fluorescent as shown by the lack of fluorescence in PBS. These observations are consistent with previous reports and reflect the hydrophobic nature of hypericin.<sup>25</sup> As such, observation of fluorescence in the yeast suspensions after only 1 min incubation and the large differences between absorption and fluorescence excitation spectra indicate that hypericin is taken up by the yeasts and that internalisation restores the red fluorescence from the monomers.<sup>17,18</sup>

Time-resolved fluorescence reveals the presence of different hypericin populations, suggesting a complex localization pattern inside the cells and different microenvironments in the different *Candida* species. Multiexponential fluorescence decays have



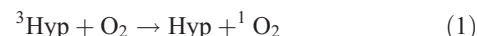
**Fig. 5** Transient absorption of hypericin in argon- and air-saturated yeast suspensions. Signals recorded at 520 nm correspond to  $^3\text{Hyp}$ , while signals at 740 nm correspond to both  $^3\text{Hyp}$  (shorter component) and  $\text{Hyp}^{\cdot-}$  (longer component).

also been observed for hypericin in other eukaryotic cells,<sup>35</sup> as well as in low-density lipoproteins.<sup>36</sup>

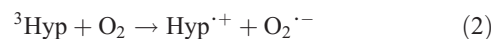
Confocal fluorescence microscopy confirms that hypericin is internalized by all *Candida* species, and that it is localised in cytosolic organelles and not in the nucleus. These findings are in line with those reported recently for the phthalocyanine Pc 4.<sup>37</sup> The distribution is different in the three species and is not affected by concentration or incubation time. The big blotch in *C. albicans* could correspond to the vacuole, a quite large specific *C. albicans* organelle with a similar function as the mammalian lysosome.<sup>38</sup> Hypericin accumulation in the vacuole would thus correspond to the lysosomal accumulation described in some mammalian cells.<sup>39,40</sup> As to *C. parapsilosis*, the partial co-localization with MTG could indicate a preferential mitochondrial localization, also described for hypericin in other types of cells.<sup>41</sup> In mammalian cells, mitochondria and lysosomes are among the most effective organelles for triggering cell death after a photodynamic insult. The fluorescence of hypericin in *C. krusei* was substantially diffused compared to the other *Candida* species. We hypothesize that this reflects the particular ultrastructure of *C. krusei*, consisting of intracytosolic organelles such as small vesicles, lipid droplets, ribosomes and groups of dense intra-cytoplasmic granules.<sup>42</sup>

Transient absorption experiments showed likewise the formation of different populations of hypericin's triplet excited state in all yeasts (Fig. 5) providing additional evidence for its

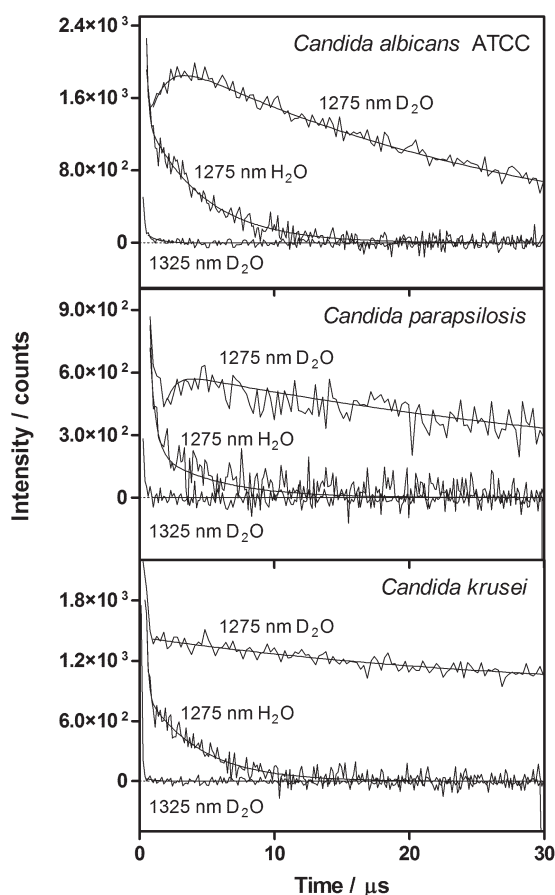
complex localization. In the case of *C. albicans* and *C. parapsilosis* oxygen was able to quench all triplets, while in the case of *C. krusei* a fraction of triplets could not be trapped by oxygen (Table 1). Observation of the characteristic  $^1\text{O}_2$  near-IR phosphorescence with rise-times matching those for triplet decay (Fig. 5 and Table 1) indicates that quenching occurred, at least partially, by energy transfer to oxygen (eqn (1)):<sup>43,44</sup>



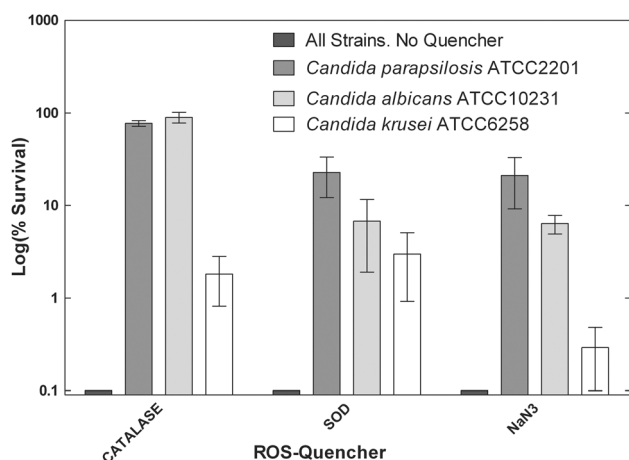
The situation in *C. krusei* is different. On one hand, a fraction of triplets were not trapped by oxygen, indicating their location in oxygen-shielded compartments. Such triplets are thus ineffective for producing singlet oxygen. On the other hand, for those triplets that are trapped, the decay is much faster than in *C. albicans* and *C. parapsilosis*, 0.2  $\mu\text{s}$  vs. 0.9  $\mu\text{s}$  (Table 1) suggesting additional contributions to the quenching process. The observation that superoxide dismutase is the most effective ROS quencher for *C. krusei* (Fig. 7) suggests that such additional process may be the direct formation of superoxide by electron transfer (eqn (2)):



Regarding the role of  $^1\text{O}_2$  in the photoinactivation process, additional insight can be gained by inspection of the actual  $^1\text{O}_2$  lifetime data in Table 1. On one hand, the  $^1\text{O}_2$  lifetime in the



**Fig. 6**  $^1\text{O}_2$  kinetics in the yeasts observed at 1275 nm and at 1325 nm (negative control) in PBS and in D-PBS. The D-PBS curves have been shifted upwards for better clarity.

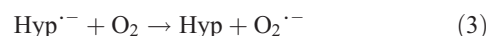


**Fig. 7** Inhibition by different ROS quenchers of the phototoxic effect induced by hypericin-PDT on *Candida* spp. For comparison, the survival level in the absence of quenchers is shown.

yeast suspensions in PBS is slightly longer than in neat PBS (4–4.8  $\mu\text{s}$  vs. 3.3  $\mu\text{s}$ ).<sup>45</sup> However, when the yeasts were suspended in D-PBS the lifetime increased but was shorter than in neat D<sub>2</sub>O (27–40  $\mu\text{s}$  vs. 67  $\mu\text{s}$ ).<sup>34</sup> These results indicate that  $^1\text{O}_2$  spends a substantial fraction of its lifetime inside the cells and in

hydrophobic regions.<sup>36</sup> It is therefore not surprising that sodium azide, a water-soluble quencher, has only a limited protective effect.

Transient absorption also showed the formation of hypericin's radical anion with a lifetime close to 1 ms in deoxygenated yeast suspensions (Table 1). Formation of hypericin semiquinone radical anion following photoactivation has been shown using electron paramagnetic resonance and is enhanced in the presence of electron donors.<sup>41</sup> In air-saturated solutions the radical anion was totally quenched by oxygen, in agreement with the reported quenching rate constant of  $3.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in acetonitrile.<sup>24</sup> This suggests the formation of superoxide (eqn (3)):



and is consistent with the observation that superoxide dismutase exerts a protective effect (Fig. 7). Production of superoxide by photoactivated hypericin is a well-documented process in mammalian cells.<sup>41</sup>

In addition to  $^1\text{O}_2$  and  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , our results also show that  $\text{H}_2\text{O}_2$  is produced downstream of hypericin photoactivation in the yeasts and in fact catalase shows the highest protective effect (Fig. 7).  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation has also been reported within an hour of hypericin photosensitization followed by GSH depletion.<sup>46</sup> The pathways leading to  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in the yeasts from  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and  $^1\text{O}_2$  are not clear though it has long been recognized that  $\text{O}_2^{\cdot-}$  undergoes rapid dismutation in cells to form  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{O}_2$  – and even  $^1\text{O}_2$  depending on the conditions.<sup>47</sup> Likewise, production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  has also been demonstrated as a by-product of the reaction of  $^1\text{O}_2$  with methionine<sup>48</sup> and tyrosine,<sup>49</sup> and as the result of NADPH-oxidase activation by  $^1\text{O}_2$ .<sup>50</sup> All these ROS can interconvert through complex pathways and it is not at all surprising that their relative amounts be strongly dependent on the site where they are generated. The finding that  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and  $^1\text{O}_2$  quenchers have a comparatively less pronounced effect on cell survival than catalase suggests that production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  or its immediate precursors must be faster than scavenging of  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and  $^1\text{O}_2$  and/or occur at sites with low accessibility to the quenchers. It must be borne in mind that  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and  $^1\text{O}_2$  are reactive intermediates with a short lifetime and hence more difficult to trap than  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Finally, it is interesting to note that the least susceptible species *C. krusei* is also the one where oxygen is less able to trap all triplet states and also where ROS quenchers show the least protective effect. This suggests that cell death occurs, at least partially, by other less-efficient mechanisms. Taken together, these results are consistent with the lower susceptibility of *C. krusei* to hypericin-PDT.

## Conclusions

The photoprocesses involved in hypericin-PDT of three *Candida* species have been studied. Formation of  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $^1\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  has been documented in the three species. Significant differences have been found in the photoprocesses occurring in *C. krusei* relative to the other *Candida* species, which ultimately originate on the different intracellular distribution pattern of hypericin in this yeast.



## Acknowledgements

Supported by grants Nos. PII20/09 from the Department of Science, Technology and University of the Government of Aragón, and CTQ2010-20870-C03-01 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, Spain.

## Notes and references

- 1 T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan and Q. Peng, Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, **90**, 889–905.
- 2 T. Wustrow, Mechanisms of phototoxic effects in photodynamic therapy, *Adv. Otorhinolaryngol.*, 1995, **49**, 31–35.
- 3 G. Jori, C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppellotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti and G. Roncucci, Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications, *Lasers Surg. Med.*, 2006, **38**, 468–481.
- 4 R. F. Donnelly, P. A. McCarron and M. M. Tunney, Antifungal photodynamic therapy, *Microbiol. Res.*, 2008, **163**, 1–12.
- 5 S. K. Sharma, T. Dai, G. B. Kharkwal, Y. Y. Huang, L. Huang, V. J. De Arce, G. P. Tegos and M. R. Hamblin, Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models, *Curr. Pharm. Des.*, 2011, **17**, 1319.
- 6 J. Rex, T. Walsh, J. Sobel, S. Filler, P. Pappas, W. Dismukes and J. Edwards, Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis.*, 2000, **30**, 662–678.
- 7 N. Durán and P. Song, Hypericin and its photodynamic action, *Photochem. Photobiol.*, 1986, **43**, 677–680.
- 8 M. Olivo, W. Lau, V. Manivasager, R. Bhuvanewari, Z. Wei, K. Soo, C. Cheng and P. Tan, Novel photodynamic diagnosis of bladder cancer: *ex vivo* fluorescence cytology using hypericin, *Int. J. Oncol.*, 2003, **23**, 1501–1504.
- 9 M. Olivo, H. Du and B. Bay, Hypericin lights up the way for the potential treatment of nasopharyngeal cancer by photodynamic therapy, *Curr. Clin. Pharmacol.*, 2006, **1**, 217–222.
- 10 D. Kacerovská, K. Pizinger, F. Majer and F. Smíd, Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical hypericum perforatum extract, *Photochem. Photobiol.*, 2008, **84**, 779–785.
- 11 A. H. Rook, G. S. Wood, M. Duvic, E. C. Vonderheid, A. Tobia and B. Cabana, A phase II placebo-controlled study of photodynamic therapy with topical hypericin and visible light irradiation in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and psoriasis, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2010, **63**, 984–990.
- 12 G. Lavie, Y. Mazur, D. Lavie, A. Prince, D. Pascual, L. Liebes, B. Levin and D. Meruelo, Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components, *Transfusion*, 1995, **35**, 392–400.
- 13 L. Pistelli, A. Bertoli, S. Zucconelli, I. Morelli, L. Panizzi and F. Menichini, Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*, *Fitoterapia*, 2000, **71**, S138–S140.
- 14 W. Cecchetti, Antimicrobial activity of sever *Hypericum* entities from Central Italy, *Planta Med.*, 2007, **73**, 564–566.
- 15 A. Rezusta, P. López-Chicón, M. P. Paz-Cristobal, M. Alemany-Ribes, D. Royo-Díez, M. Agut, S. Semino, S. Nonell, M. J. Revillo, C. Aspiroz and Y. Gilaberte, *In vitro* fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species, *Photochem. Photobiol.*, 2012, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.01053.x.
- 16 T. Kiesslich, B. Krammer and K. Plaetzer, Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy, *Curr. Med. Chem.*, 2006, **13**, 2189–2204.
- 17 A. Kubin, P. Meissner, F. Wierrani, U. Burner, A. Bodenteich, A. Pytel and N. Schmeller, Fluorescence diagnosis of bladder cancer with new water soluble hypericin bound to polyvinylpyrrolidone: PVP-hypericin, *Photochem. Photobiol.*, 2008, **84**, 1560–1563.
- 18 A. Sgarbossa, D. Buselli and F. Lenci, *In vitro* perturbation of aggregation processes in beta-amyloid peptides: a spectroscopic study, *FEBS Lett.*, 2008, **582**, 3288–3292.
- 19 M. J. Fehr, M. A. McCloskey and J. W. Petrich, Light-induced acidification by the antiviral agent hypericin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 1833–1836.
- 20 A. Michaeli, A. Regev, Y. Mazur, J. Feitelson and H. Levanon, Triplet state reactions of hypericin. Time-resolved laser photolysis and electron paramagnetic resonance spectroscopy, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 9154–9160.
- 21 C. S. Foote, Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.*, 1991, **54**, 659.
- 22 A. Jimenez-Banzo, X. Ragàs, P. Kapusta and S. Nonell, Time-resolved methods in biophysics. 7. Photon counting vs. analog time-resolved singlet oxygen phosphorescence detection, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, **7**, 1003–1010.
- 23 N. Rubio, A. Jimenez-Banzo, T. Torres and S. Nonell, Spectral and kinetic properties of the radical ions of chloroboron(III) subnaphthalocyanine, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2007, **185**, 214–219.
- 24 A. P. Darmanyan, W. S. Jenks, D. Eloy and P. Jardon, Quenching of excited triplet state hypericin with energy acceptors and donors and acceptors of electrons, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 3323–3331.
- 25 T. Yamizaki, N. Ohta, I. Yamazaki and Pill-Song, Excited-state properties of hypericin: electronic spectra and fluorescence decay kinetics, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 7870–7875.
- 26 T. Breitenbach, M. K. Kuimova, P. Gbur, S. Hatz, N. B. Schack, B. W. Pedersen, J. D. C. Lambert, L. Poulsen and P. R. Ogilby, Photosensitized production of singlet oxygen: spatially-resolved optical studies in single cells, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, **8**, 442–452.
- 27 G. Bánó, J. Stanicová, D. Jancura, J. Marek, M. Bánó, J. Ulicný, A. Strejčková and P. Miskovský, On the diffusion of hypericin in dimethylsulfoxide/water mixtures. The effect of aggregation, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 2417–2423.
- 28 M. Niedre, M. S. Patterson and B. C. Wilson, Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells *in vitro* and tissues *in vivo*, *Photochem. Photobiol.*, 2002, **75**, 382–391.
- 29 C. Schweitzer and R. Schmidt, Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 1685–1757.
- 30 J. Baier, M. Maier, R. Engl, M. Landthaler and W. Bäumler, Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 3041–3046.
- 31 J. W. Snyder, E. Skovsen, J. D. C. Lambert, L. Poulsen and P. R. Ogilby, Optical detection of singlet oxygen from single cells, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, **8**, 4280–4293.
- 32 J. Schlothauer, S. Hackbarth and B. Röder, A new benchmark for time-resolved detection of singlet oxygen luminescence – revealing the evolution of lifetime in living cells with low dose illumination, *Laser Phys. Lett.*, 2009, **6**, 216–221.
- 33 X. Ragàs, M. Agut and S. Nonell, Singlet oxygen in *Escherichia coli*: New insights for antimicrobial photodynamic therapy, *Free Radical Biol. Med.*, 2010, **49**, 770–776.
- 34 P. R. Ogilby and C. S. Foote, Chemistry of singlet oxygen. 36. Singlet molecular oxygen (1-delta-g) luminescence in solution following pulsed laser excitation - solvent deuterium-isotope effects on the lifetime of singlet oxygen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 2069–2070.
- 35 P. Taroni, G. Valentini, D. Comelli, C. D'Andrea, R. Cubeddu, D.-N. Hu and J. E. Roberts, Time-resolved microspectrofluorimetry and fluorescence lifetime imaging of hypericin in human retinal pigment epithelial cells, *Photochem. Photobiol.*, 2005, **81**, 524–528.
- 36 P. Gbur, R. Dedic, D. Chorvat Jr, P. Miskovsky, J. Hala and D. Jancura, Time-resolved luminescence and singlet oxygen formation alter illumination of the hypericin-low-density lipoprotein complex, *Photochem. Photobiol.*, 2009, **85**, 816–823.
- 37 M. Lam, P. C. Jou, A. A. Lattif, Y. Lee, C. L. Malbasa, P. K. Mukherjee, N. L. Oleinick, M. A. Ghannoum, K. D. Cooper and E. D. Baron, Photodynamic therapy with Pc 4 induces apoptosis of *Candida albicans*, *Photochem. Photobiol.*, 2011, **87**, 904–909.
- 38 V. Veses, M. Casanova, A. Murgui, A. Dominguez, N. A. R. Gow and J. P. Martínez, ABG1, a novel and essential *Candida albicans* gene encoding a vacuolar protein involved in cytokinesis and hyphal branching, *Eukaryotic Cell*, 2005, **4**, 1088–1101.
- 39 A. B. Uzdensky, L. W. Ma, V. Iani, G. O. Hjortland, H. B. Steen and J. Moan, Intracellular localization of hypericin in human glioblastoma and carcinoma cell lines, *Lasers Med. Sci.*, 2001, **16**, 276–283.
- 40 T. Theodossiou, M. D. Spiro, J. Kacobson, J. S. Hotherhall and A. J. MacRobert, Evidence for intracellular aggregation of hypericin and the impact on its photocytotoxicity in PAM 212 murine keratinocytes, *Photochem. Photobiol.*, 2004, **80**, 438–443.
- 41 T. A. Theodossiou, J. S. Hotherhall, P. A. De Witte, A. Pantos and P. Agostinis, The multifaceted photocytotoxic profile of hypericin, *Mol. Pharmaceutics*, 2009, **6**, 1775–1789.

- 42 Y. H. Samaranayake and L. P. Samaranayake, *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen, *J. Med. Microbiol.*, 1994, **41**, 295–310.
- 43 H. Racinet and P. Jardon, Formation d'oxygene singlet  $^1\Delta_g$  photosensibilisée par l'hypericine. Étude cinétique en milieu micellaire non ionique, *J. Chim. Phys.*, 1988, **85**, 971–977.
- 44 M. Roslaniec, H. Weitman, D. Freeman, Y. Mazur and B. Ehrenberg, Liposome binding constants and singlet oxygen quantum yields of hypericin, tetrahydroxy helianthone and their derivatives: studies in organic solutions and in liposomes, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2000, **57**, 149–158.
- 45 A. A. Krasnovsky Jr., Quantum yield of photosensitized luminescence and radiative lifetime of singlet ( $^1\Delta_g$ ) molecular oxygen in solutions, *Chem. Phys. Lett.*, 1981, **81**, 443–445.
- 46 S. M. Ali, S. K. Chee, G. Y. Yuen and M. Olivo, Hypocrellins and hypericin induced apoptosis in human tumor cells: a possible role of hydrogen peroxide, *Int. J. Mol. Med.*, 2002, **9**, 461–472.
- 47 R. Konaka, E. Kasahara, W. C. Dunlap, Y. Yamamoto, K. C. Chien and M. Inoue, *Free Radical Biol. Med.*, 1999, **27**, 294–300.
- 48 P. K. Sysak, C. S. Foote and T.-Y. Ching, Chemistry of singlet oxygen—XXV. Photooxygenation of methionine, *Photochem. Photobiol.*, 1977, **26**, 19–27.
- 49 Y. Fang and J. Liu, Reaction of protonated tyrosine with electronically excited singlet molecular oxygen ( $^1\Delta_g$ ): An experimental and trajectory study, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 11250–11261.
- 50 N. Rubio, A. Rajadurai, K. D. Held, K. M. Prise, H. L. Liber and R. W. Redmond, Real-time imaging of novel spatial and temporal responses to photodynamic stress, *Free Radical Biol. Med.*, 2009, **47**, 283–290.