

Tesis Doctoral

Búsqueda de nuevos fotosensibilizantes para el tratamiento del cáncer, inactivación bacteriana y de principios activos antineoplásicos a partir de especies vegetales de Argentina

Mamone, Leandro Ariel

2014-03-20

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mamone, Leandro Ariel. (2014-03-20). Búsqueda de nuevos fotosensibilizantes para el tratamiento del cáncer, inactivación bacteriana y de principios activos antineoplásicos a partir de especies vegetales de Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Mamone, Leandro Ariel. "Búsqueda de nuevos fotosensibilizantes para el tratamiento del cáncer, inactivación bacteriana y de principios activos antineoplásicos a partir de especies vegetales de Argentina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-20.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Búsqueda de nuevos fotosensibilizantes para el tratamiento del cáncer,
inactivación bacteriana y de principios activos antineoplásicos a partir de especies
vegetales de Argentina**

Preliminar de tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área CIENCIAS BIOLÓGICAS

Leandro Ariel Mamone

Director de tesis: Dra Adriana G. Casas

Director Asistente: Dra Gabriela Di Venosa

Consejero de Estudios: Dr Omar Coso

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias. Consejo nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Hospital de Clínicas “José de San Martín”- UBA.

Buenos Aires, 2013

Búsqueda de nuevos fotosensibilizantes para el tratamiento del cáncer, inactivación bacteriana y de principios activos antineoplásicos a partir de especies vegetales de Argentina

RESUMEN

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento contra el cáncer que implica la administración de un Fotosensibilizante (FS) y su activación mediante luz visible, produciendo así, fotodaños mediados por oxígeno singlete en el tumor. Además de su uso en cáncer, los principales usos de la TFD incluyen el tratamiento de desórdenes inflamatorios e infecciones.

El objetivo de este trabajo fue investigar una colección de plantas de la Argentina como fuente de nuevos FS naturales para ser usados en cáncer y Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA), así como también de compuestos antitumorales y antibacterianos.

Se realizó una colección de 113 extractos de plantas de Argentina, y se testeó la presencia de actividad fototóxica sobre la línea celular LM2 de adenocarcinoma mamario, y sobre la especie bacteriana Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*.

En la línea celular LM2 se observó que la exposición a los extractos metanólicos de hoja de *Combretum fruticosum* y *Scutia buxifolia* indujo la muerte celular al aplicar TFD. Estos extractos se probaron en diferentes líneas celulares y el efecto fue selectivo contra las líneas tumorales.

Se determinó además, que el extracto metanólico de hoja de *Collaea argentina* es fotoprotector contra la TFD.

En bacterias *S. epidermidis*, tres extractos resultaron ser altamente fotoactivos: *Solanum verbascifolium* flor, *Tecoma stans* flor y *Cissus verticillata* raíz. Estos indujeron

reducciones de 4, 2 y 3 órdenes de magnitud en la supervivencia de la bacteria, respectivamente al aplicar la TFDA. Es destacable que la TFDA empleando *S. verbascifolium* como FS, fue más eficiente con luz solar que empleando una fuente de luz artificial (erradicación total vs. 4 órdenes de reducción).

El balance entre compuestos oxidantes y antioxidantes debe estar probablemente enmascarando potenciales FS de los extractos vegetales, pero empleando el extracto crudo, el nivel de fotoactividad de *S. verbascifolium* es similar al de algunos de los FS comerciales bajo la exposición a luz solar, demostrando que compuestos naturales vegetales son efectivos para ser usados en TFDA.

Se llevó a cabo la caracterización fotoquímica de la TFDA empleando el extracto de *S. verbascifolium*. Las reacciones fueron mediadas principalmente por oxígeno singlete y en menor medida, por el radical hidroxilo.

Se estableció un modelo de internalización bacteriana en queratinocitos PAM212 empleando las especies *S. epidermidis* y *S. aureus*. Sobre las células infectadas se aplicó TFDA con *S. verbascifolium*, resultando en la reducción de las bacterias intracelulares sin afectar la viabilidad de las células eucariotas.

Desarrollamos, además, un método para el “screening” de potenciales FS de plantas basado en la generación de reacciones redox y producción de oxígeno singlete ante la aplicación de luz.

En cuanto a la búsqueda de potenciales compuestos antitumorales, investigamos la citotoxicidad de los extractos en oscuridad. Empleamos 4 líneas tumorales y 3 no tumorales. Trece extractos resultaron ser altamente citotóxicos. Sin embargo, la inhibición del crecimiento celular fue dependiente de la línea celular y no se encontró selectividad por las líneas tumorales, excepto por el extracto de *Ipomoea cairica*. En general, las concentraciones inhibitorias 50 estuvieron en el rango de 10-150 µg/ml. Los extractos más citotóxicos correspondieron a las especies *Solanum chacoense*, *Iochroma australe* y *Jacaranda mimosifolia*. Se aislaron parcialmente los principios activos de estos tres extractos, y se encontró que estos indujeron un alto porcentaje de muerte celular mediante el arresto del ciclo celular e inhibición de la migración celular.

En líneas generales, este es uno de los primeros estudios enfocado al análisis de las propiedades de las plantas nativas de Argentina como antitumorales y antibacterianos en presencia o ausencia de luz y sus efectos biológicos.

Palabras clave: Terapia fotodinámica, extractos vegetales, nuevos fotosensibilizantes, compuestos antitumorales, líneas celulares, inactivación bacteriana.

Search of new photosensitizers for the treatment of cancer, bacterial inactivation and antineoplastic active principles from Argentinian plant species

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is an anticancer treatment that involves administration of a photosensitizer (PS) and its subsequent activation by visible light to result primarily in singlet oxygen-induced photodamage to the tumor. In addition to cancer, mainstream uses for PDT include inflammatory disorders and infections.

The aim of this work was to investigate a collection of plants from Argentina as a source of new natural PS to be used in cancer and antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), as well as antitumor and antibacterial compounds.

A collection of 113 Argentinean plant extracts was prepared and screened for phototoxicity on LM2 mammary adenocarcinoma cells and the Gram-positive species *Staphylococcus epidermidis*.

In the mentioned cell line, it was found that exposure to the methanolic extracts of *Combretum fruticosum* and *Scutia buxifolia* leaves induced cell death after PDT. This extracts were tested in different cell lines. The effect was selective for tumor lines.

It was also found that *Collaea argentina* leaf extract was photoprotective against PDT.

In bacteria, three extracts turned out to be highly photoactive: *Solanum verbascifolium* flower, *Tecoma stans* flower and *Cissus verticillata* root. They induced 4, 2 and 3 logs decrease in bacterial survival, respectively. It was noticeable that *S. verbascifolium*-aPDT was more efficient under sunlight as compared to artificial light (total eradication vs. 4 logs).

The balance between oxidant and antioxidant compounds is very likely to be masking or unmasking potential PS of plant extracts, but employing the crude extract, the level of photoactivity of *S. verbascifolium* is similar to some artificial PS upon exposure to sunlight, demonstrating that natural resources can be employed in aPDT.

Photochemical characterization of *S. verbascifolium* flower extract upon exposure to light was carried out. aPDT reaction was dependent mainly on singlet oxygen and to a lesser extent, on hydroxyl radicals.

We established a model of bacteria internalization into human keratinocytes employing *S. aureus* and *E. epidermidis* species. Afterwards, we applied aPDT on infected cells, and the response was a reduction in the number of intracellular bacteria without affecting viability of eukaryotic cells.

We developed an easy method for the screening of potential PS from plants based on redox reactions and singlet oxygen production.

Regarding to the search for potential new anti-cancer agents, we investigated the effect of plant extracts on cell growth (in dark conditions). Four tumor cell lines and 3 non tumor cell lines were assayed. Thirteen extracts were found to be highly cytotoxic. However, inhibition on cell growth was dependent on cell type and selectivity was not found except for *Ipomoea cairica* extract. In general, the inhibitory concentrations 50% were in the range of 10-150 µg/ml. The most cytotoxic extracts were *Solanum chacoense*, *Iochroma australe* and *Jacaranda mimosifolia*.

Active compounds from these three extracts were partially isolated, finding that they induced a high percentage of cell death through cell cycle arrest and inhibition of cell migration.

Overall, this is one of the first studies focusing on Argentinean native plants and their compounds biological effects on PDT, as antitumor and antibacterial.

Keywords: Photodynamic therapy, plant extracts, new photosensitizers, anti-tumoral compounds, cell lines, bacterial inactivation.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Adriana Casas por su guía, sus ideas, su trabajo, su dedicación, y sobre todo, su paciencia a lo largo de estos cinco años. Me cuesta trabajo imaginar un mejor ambiente para el desarrollo profesional y personal, que el generado en su grupo de trabajo.

A la Dra. Alcira Batlle por su consejo y las contribuciones durante mi formación profesional.

A las Dras. Gabriela Di Venosa y Lorena Rodriguez, por las incontables manos, la generosidad, la amistad y todo lo que aprendí de ellas.

Al Lic. Lautaro Gándara y la Lic. Sarah Schikinger, por su colaboración y dedicación en el trabajo realizado, y porque aprendí mucho de ellos.

A las Dras. Berenice Diez y Julieta Teijo, compañeras, profesoras y amigas de esta parte del viaje.

A la Dra. Maria Victoria Rossetti y el resto de compañeros del CIPYP, por su buena predisposición, su amabilidad, hicieron siempre mucho más fácil el trabajo y generaron un buen lugar para llevarlo a cabo.

Al Ing. Agr. Juan Jose Valla por su colaboración en la recolección e identificación de las especies vegetales empleadas en este trabajo.

A la Dra. Fernanda Buzzola por su colaboración con el trabajo realizado en bacterias, parte fundamental de esta tesis.

A la Dra. Carmen Martinez por su colaboración con las técnicas de medición de especies oxidantes *in vitro*.

A todos los integrantes del laboratorio del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la UAM-España, por las técnicas que aprendí durante mi estadía allí.

Al CONICET por las becas que permitieron que pueda llevar a cabo el doctorado y todo el trabajo que aquí se presenta.

A la Universidad de Buenos Aires, por la formación que allí recibí.

En especial, un enorme agradecimiento a los Lics. Luis Mamone y Ana Etchezuri, uno tan grande no se puede expresar con palabras. Tratar día a día de ser un poco mejor persona y tal vez biólogo, sea una forma de empezar a hacerlo. Este trabajo también es de ellos.

A la Lic. Celeste Mamone, una de las primeras maestras en esta larga carrera de estudiante, y una compañera sobre todo.

A mi familia, Manu, Oscar, Guille, Conce, Fedez, los chamanes de la tribu, y para Bruno, Facu, Marina y Vale, los mas jóvenes.

A sus majestades Vera y Ambar Estellez, princesas porteñas de nacimiento y sobrinas por oficio.

A un tal Lucas, a Salvador, a Cordelio, a Canobi, a los delirantes de 24 y Carlos Calvo, del fondo del tiempo allá por Catalinas Sur, del Capitán Uriarte, del diván en Groenlandia, de Sao Pedro, de Paso a Faso y de los caminos que se cruzan en Ciudad Universitaria, sin el cariño, sin el amor, sin la amistad, sin los problemas, las prisas y las angustias, nada es posible.

Y por ultimo, a Majo, por el sombrero de falso fondo y cada uno de los conejos, pero sobre todo por el aguante y los km. 非常感謝你中國.

ABREVIATURAS

ALA: Ácido 5-aminolevúlico

ALA-TFD: Terapia fotodinámica basada en ALA

ATCC: American Type Culture Collection

CI₃₀: Concentración inhibitoria 30

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50

CI₇₅: Concentración inhibitoria 75

Ce6: Clorina e6

CMB: Concentración mínima bactericida

CMI: Concentración mínima inhibitoria

DL₅₀: Dosis lumínica letal 50

DMSO: Dimetilsulfóxido

FS: Fotosensibilizante, fotosensibilizantes

HO: Radical hidroxilo

IP: Ioduro de propidio

K_{obs}: Constante de fotodegradación observada

LB: Medio líquido Luria Bertani

LBA: Agar Luria Bertani

MTT: Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazolio)

MOI: Multiplicidad de infección

MRSA: *S. Aureus* Meticilina resistente

¹O₂: Oxígeno singlete

PBS: Buffer fosfato de sodio

PpIX: Protoporfirina IX

RL: radicales libres

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

SFB: Suero fetal bovino

TFD: Terapia fotodinámica

TFDA: Terapia fotodinámica Antimicrobiana

Trp: Triptofano

TS: Medio líquido tripteína de soya

TSA: Agar tripteína de soya

UF: unidades arbitrarias de fluorescencia.

UFC: Unidades formadoras de colonias

ÍNDICE

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	viii
ABREVIATURAS.....	x
ÍNDICE.....	xii
INTRODUCCIÓN	
1. Cáncer y tratamientos.....	1
1.1 Cáncer. Generalidades.....	1
1.2 Incidencia del cáncer.....	3
1.3 Terapias contra el cáncer.....	5
2. Terapia Fotodinámica.....	7
2.1 Introducción.....	7
2.2 Ventana terapéutica.....	8
2.3 Principios y fotoquímica de la TFD.....	10
2.4 Blancos y vías de acción de la TFD.....	12
2.5 Fuentes de luz empleadas en TFD.....	13
2.6 Fotosensibilizantes.....	15
2.7 TFD en el tratamiento del cáncer.....	16
2.8 Búsqueda de fotosensibilizantes de origen vegetal.....	18
3. Compuestos antineoplásicos.....	21
3.1 Introducción.....	21
3.2 Antineoplásicos de origen vegetal.....	23
4. Especies reactivas del oxígeno.....	26
4.1 Introducción.....	26
4.2 Radicales libres.....	26
4.3 Oxígeno singlete.....	29
4.4 Compuestos antioxidantes en plantas.....	30
5. Infecciones bacterianas.....	30
5.1 Introducción.....	30
5.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	32
5.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	32
6. Antibióticos.....	33
6.1 Introducción.....	33
6.2 Resistencia a antibióticos.....	36
6.3 Antibióticos naturales.....	38

7 Terapia Fotodinámica antimicrobiana.....	41
7.1 Introducción.....	41
7.2 Ventajas de la TFDA.....	43
7.3 Diferencias entre bacterias Gram positivas y negativas y su rol en la TFDA.....	44
7.4 Fotosensibilizantes en TFDA.....	45
7.5 Aplicaciones ambientales de la TFDA.....	47
7.6 Fotosensibilizantes de origen vegetal en TFDA.....	49
REFERENCIAS.....	52
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	72
Objetivos parciales.....	72
MATERIALES Y MÉTODOS	
1 Reactivos y solventes empleados.....	73
2 Colección de extractos vegetales.....	73
2.1 Recolección de muestras vegetales.....	73
2.2 Preparación de los extractos.....	74
3 Estudios en líneas celulares.....	77
3.1 Líneas celulares utilizadas.....	77
3.2 Determinación del número de células.....	78
3.3 Ensayo de viabilidad del MTT.....	78
3.4 Determinación de citotoxicidad en oscuridad de los extractos vegetales.....	79
3.5 Observación de morfología celular.....	79
3.6 Inmunofluorescencia para alfa-tubulina.....	79
3.7 Inmunofluorescencia para F-actina.....	80
3.8 Determinación de contenido de ADN por citometría de flujo en células LM2 incubadas con extractos citotóxicos.....	80
3.9 Determinación de la capacidad migratoria de células LM2 incubadas con los extractos citotóxicos seleccionados.....	81
3.10 Fototoxicidad de extractos en células.....	81
3.11 Fuente lumínica para TFD de células.....	82
3.12 Microscopía de fluorescencia de células expuestas a los extractos FS.....	82
3.13 Análisis de la composición de los extractos vegetales FS en células por HPLC.....	82
3.14 Protección del extracto metanólico de hoja de <i>C. argentina</i> frente a la TFD.....	83
3.15 Exposición a radiación UV-A de células LM2 incubadas con extracto metanólico de hoja de <i>C. argentina</i>	84
3.16 Tratamiento estadístico.....	85
4 Experimentos en bacterias.....	85

4.1 Cepas bacterianas utilizadas.....	85
4.2 Ensayos de determinación de actividad antimicrobiana.....	86
4.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los extractos vegetales.....	86
4.4 “Screening” de posibles FS en bacterias.....	87
4.5 Fuente lumínica para TFDA.....	87
4.6 TFDA en medio sólido.....	88
4.7 Espectros de absorción y fluorescencia del extracto de <i>S. verbascifolium</i>	88
4.8 Ensayo de unión y captación de extracto de <i>S. verbascifolium</i>	88
4.9 Microscopía de fluorescencia de bacterias incubadas con <i>S. verbascifolium</i>	89
4.10 Fotodegradación de FS.....	89
4.11 Estudios de mecanismos fotoquímicos en la TFDA con <i>S. verbascifolium</i>	90
4.12 TFDA empleando <i>S. verbascifolium</i> y luz solar.....	90
4.13 Cromatografía en capa delgada de extracto de <i>S. verbascifolium</i>	91
4.14 Tratamiento estadístico.....	91
5 TFDA en bacterias internalizadas en queratinocitos.....	91
5.1 Internalización de <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> en queratinocitos PAM212.....	91
5.2 TFDA de <i>S. aureus</i> o <i>S. epidermidis</i> internalizados en queratinocitos.....	92
6 Reacciones de identificación y extracciones de principios activos de extractos vegetales citotóxicos.....	93
6.1 Ensayos de identificación para alcaloides.....	93
6.2 Ensayo de identificación para antraquinonas.....	93
6.3 Ensayo de identificación para saponinas.....	93
6.4 Ensayo de identificación para glúcidos.....	93
6.5 Ensayo de identificación para taninos.....	94
6.6 Extracción de alcaloides.....	94
7. Determinaciones de especies reactivas del oxígeno <i>in vitro</i> a partir de la iluminación de los extractos fotoactivos.....	94
7.1 Método colorimétrico para medir estado oxidante total.....	94
7.2 Método para determinación de oxígeno singlete en muestras vegetales irradiadas basado en la oxidación del triptófano.....	95
7.3 Determinación de oxígeno singlete mediante un marcador fluorescente en muestras vegetales irradiadas.....	95
REFERENCIAS.....	96
RESULTADOS	
CAPÍTULO I.....	98
I RESULTADOS EN LINEAS CELULARES.....	99

I.1 “Screening” de compuestos antitumorales <i>per se</i>	99
I.1.1 Determinaciones de citotoxicidad de los extractos vegetales.....	99
I.1.2 Acción de los extractos citotóxicos sobre la morfología celular y el citoesqueleto de las células LM2.....	107
I.1.3 Reacciones de identificación de grupos funcionales y extracción de alcaloides a partir de extractos citotóxicos.....	111
I.1.4 Contenido de ADN en células LM2 incubadas con los extractos citotóxicos de mayor citotoxicidad.....	115
I.1.5 Efectos de los extractos citotóxicos de mayor actividad sobre la capacidad migratoria <i>in vitro</i> de células LM2.....	118
I.1.6 Discusión.....	119
I.2 Compuestos fotosensibilizantes para células a partir de extractos vegetales.....	127
I. 2.1 “Screening” de fototoxicidad en células LM2.....	127
I.2.2 Fototoxicidad de <i>S. buxifolia</i> y <i>C. fruticosum</i> en líneas HB4a, HB4a-Ras y PAM212.....	129
I.2.3 Microscopía de fluorescencia de células LM2 incubadas con los extractos FS.....	132
I. 2.4 Fotosensibilización con clorofila <i>a</i> en células LM2.....	133
I.2.5 Análisis de los extractos de <i>C. fruticosum</i> y <i>S. buxifolia</i> por HPLC.....	133
I.2.6 Discusión.....	135
I.3 Fotoprotección a partir del extracto de hoja de <i>Collaea argentina</i>	138
I.3.1 Efecto fotoprotector de <i>C. argentina</i> frente a TFD.....	138
I.3.2 Fotoprotección de <i>C. argentina</i> frente a TFD con los FS verteporfín y temoporfín en células LM2.....	144
I.3.3 Exposición a radiación UV-A de células LM2 incubadas con extracto de <i>C. argentina</i>	147
I.3.4 Discusión.....	147
I.4 Conclusiones de los resultados en células.....	151
I.5 Referencias.....	153
CAPÍTULO II.....	163
II. RESULTADOS EN BACTERIAS.....	164
II.1 Compuestos antimicrobianos.....	164
II.1.1 Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas.....	164
II.1.2 Discusión.....	166
II.2 Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA).....	172
II.2.1 “Screening” de fototoxicidad en bacterias.....	172
II.2.2 TFDA sobre bacterias en suspensión empleando <i>S. verbascifolium</i> como FS.....	174
II.2.3 Unión de <i>S. verbascifolium</i> a bacterias.....	177
II.2.4 TFDA sobre bacterias en medio sólido empleando <i>S. verbascifolium</i> como FS.....	179
II.2.5 Fotodegradación de <i>S. verbascifolium</i>	180

II.2.6 Mecanismos de fotosensibilización de <i>S. verbascifolium</i>	182
II.2.7 TFDA empleando <i>S. verbascifolium</i> como FS y luz solar como fuente lumínica.....	184
II.2.8 Cromatografía en capa delgada de extracto de flor <i>S. verbascifolium</i>	185
II.2.9 Discusión.....	186
II.3 Conclusiones de los resultados en bacterias.....	193
II.4 Referencias.....	195
CAPÍTULO III.....	206
III FOTSENSIBILIZACIÓN DE QUERATINOCITOS INFECTADOS CON BACTERIAS.....	207
III.1 Puesta a punto de condiciones de infección de queratinocitos PAM212 con <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>	207
III.2 Determinación de fototoxicidad sobre queratinocitos y bacterias empleando <i>S. verbascifolium</i> y azul de Toluidina.....	208
III.3 Fotosensibilización de <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> luego de la internalización en queratinocitos.....	210
III.4 Discusión.....	215
III.5 Conclusiones.....	218
III.6 Referencias.....	219
CAPÍTULO IV.....	221
IV. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES CON ACTIVIDAD FOSSENSIBILIZANTE.....	222
IV.1 Detección de extractos potencialmente fotosensibilizantes por la metodología de cuantificación de especies oxidantes totales.....	222
IV.2 Detección de oxígeno singlete a partir de extractos vegetales FS irradiados.....	224
IV.2.1 Detección de oxígeno singlete por el método de oxidación del triptófano.....	224
IV.2.2 Detección de oxígeno singlete por un marcador específico fluorescente.....	225
IV.1.3 Disminución de la producción de 1O_2 por el extracto de <i>C. argentina</i>	228
IV.4 Discusión.....	230
IV.5 Conclusiones.....	232
IV.6 Referencias.....	234
CONCLUSIONES GENERALES.....	235

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer y tratamientos

1.1 Cáncer. Generalidades

El cáncer es una enfermedad compleja caracterizada por la presencia de células con la capacidad de proliferar de manera anormal, e invadir y colonizar otras zonas del organismo. Estas células conforman tejidos anormales que son denominados tumores.

Los tumores poseen dos componentes básicos en su estructura: las células neoplásicas que constituyen el parénquima tumoral, y el estroma de soporte. Este último, deriva de células del huésped no neoplásicas de tejido conectivo, vasos sanguíneos, células inflamatorias, etc) (García et al., 1999).

Debido a la gran complejidad de esta enfermedad, resulta difícil encontrar características generales que definan a la malignidad celular; sin embargo, se han descrito algunas propiedades compartidas por todos los tipos de células cancerígenas (Hanahan y Weinberg, 2000; Schultz, 2005):

- Proliferación celular aumentada: por un lado las células cancerígenas presentan una mayor sensibilidad a las señales que estimulan el crecimiento y por otra parte presentan una mínima o nula respuesta a las señales inhibitorias del crecimiento. Como consecuencia, estas respuestas alteradas producen un crecimiento celular incrementado y autónomo.

- Apoptosis insuficiente: la proliferación celular en el cáncer depende del balance entre tres factores: a) el aumento en la proporción de células con mayor tasa de crecimiento, b) el descenso en la tasa de muerte celular debido a una disminución de la apoptosis y c) la falta de diferenciación celular, que también se asocia a un aumento en la proliferación celular, ya que las células diferenciadas presentan tasas de crecimiento menores que las indiferenciadas. Estos tres factores intervienen en distinta medida según el tipo de cáncer.

- Diferenciación celular alterada: las células malignas no siguen el curso natural de la diferenciación. Algunas pueden asemejarse al tipo celular que les dio origen, otras

pueden presentar estadios intermedios de diferenciación, o incluso pueden expresar marcadores específicos de otros tejidos. La diferenciación en las células normales se asocia estrechamente a la proliferación, ya que va acompañada de una disminución o pérdida del potencial replicativo celular. En las células cancerígenas la falta de diferenciación promueve el aumento de la proliferación celular.

- **Metabolismo alterado:** las células cancerígenas presentan un aumento en la biosíntesis lipídica y proteica, así como numerosas alteraciones enzimáticas, la mayoría de ellas relacionadas con la gran demanda energética que requiere la alta proliferación celular. Estas alteraciones metabólicas traen como consecuencia la producción de productos de desecho, hormonas o citoquinas que muchas veces resultan tóxicas para el organismo.

- **Inestabilidad genómica:** las células cancerígenas en general presentan múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas tales como la poliploidía, aneuploidía, mutaciones puntuales o alteraciones en los patrones de metilación del ADN y a medida que el cáncer progresa, el número de alteraciones tiende a incrementarse. El cáncer consiste en clones de células que difieren muy poco de las parentales en sus características genéticas. Las variantes de clones se encuentran sometidas a un proceso selectivo continuo en el cual el clon mejor adaptado al medio es el que sobrevive.

- **Inmortalización:** las células tumorales poseen diferencias en la expresión de la telomerasa con respecto a las células normales, lo cual les confiere el potencial de dividirse infinitas veces, de la misma manera que las células madre y las células de la línea germinal.

- **Invasión y metástasis:** esta propiedad constituye el principal criterio que determina la malignidad celular y la letalidad del cáncer. Durante la invasión, las células cancerígenas se desprenden de su sitio de origen y se dispersan en distintos sitios del mismo tejido, eventualmente creciendo por encima del mismo e incluso en tejidos adyacentes. Esta etapa normalmente va acompañada de inflamación y neoangiogénesis, que consiste en la formación de nuevos capilares o reconstrucción de vasos sanguíneos preexistentes, con el fin de proveer de oxígeno y nutrientes al nuevo tejido tumoral. Durante la metástasis las células tumorales se separan del tejido de origen o tumor primario y migran a través de los vasos sanguíneos o linfáticos a otros órganos, donde

pueden formar nuevos tumores. Existen puntos que limitan la metástasis, tales como la capacidad de las células para atravesar los capilares (extravasación), o la capacidad de sobrevivir y proliferar en un nuevo microambiente. En general, los órganos más susceptibles de metástasis suelen ser los que presentan una alta irrigación, como el hígado, pulmón y hueso; sin embargo cada tipo de cáncer presenta patrones metastásicos diferentes.

1.2 Incidencia del cáncer

A nivel mundial, una de cada ocho causas de muerte es debido al cáncer. El cáncer causa más muertes que el SIDA, la tuberculosis y la malaria en forma conjunta. Como se indica en la Tabla 1, representa la segunda causa de muerte en los países desarrollados siguiendo a las enfermedades cardiovasculares y la tercera causa de muerte en los países en desarrollo después de enfermedades cardiovasculares y diarreas (American Cancer Society, 2011).

Tabla 1. Principales causas de muerte en el mundo en países desarrollados y en desarrollo

	Nivel Mundial			Países en Desarrollo			Países Desarrollados		
	Rank	Muertes	%	Rank	Muertes	%	Rank	Muertes	%
Enfermedades Cardiacas	1	8,923	15.1	1	7,342	14.5	2	1,563	19.3
Cáncer	2	7,424	12.6	2	5,255	10.4	1	2,154	26.6
Enfermedades Cerebrovasculares	3	5,712	9.7	3	4,949	9.8	3	757	9.4
Infecciones Respiratorias	4	4,177	7.1	4	3,910	7.7	4	305	3.8
Condiciones Perinatales*	5	3,180	5.4	5	3,141	6.2		35	0.4
Enf. Pulmonar Obstructiva Crónica	6	3,025	5.1	6	2,737	5.4	5	285	3.5
Diarrea	7	2,163	3.7	7	2,148	4.2		14	0.2
SIDA	8	2,040	3.5	8	2,018	4.0		20	0.2
Tuberculosis	9	1,464	2.5	9	1,448	2.9		15	0.2
Accidentes de Tráfico	10	1,275	2.2	10	1,158	2.3		114	1.4
Diabetes Mellitus	11	1,141	1.9		914	1.8	7	221	2.7
Malaria	12	889	1.5		888	1.8		0	0.0
Suicidio	13	844	1.4		707	1.4	9	118	1.5
Cirrosis	14	772	1.3		655	1.3	10	116	1.4
Nefritis y Nefrosis	15	739	1.3		611	1.2	8	126	1.6
		58,772	100.0		50,582	100.0		8,095	100.0

El número cero en una celda indica una estimación de menos de 500.
 * Incluye " que surjan en el período perinatal" como se define en la Clasificación Internacional de Enfermedades, peso al nacer, principalmente bajo, la prematuridad, la asfisia al nacer y nacimiento trauma, y no incluye todas las causas de las muertes ocurridas en el período perinatal.

Entre los tipos tumorales más frecuentes se encuentra el cáncer de próstata, que es el más comúnmente diagnosticado entre los hombres, y el cáncer de mama, el más común entre las mujeres (Figura 1). Los cánceres de colon, recto y pulmón son respectivamente el segundo y el tercer tipo más comúnmente diagnosticado entre mujeres y hombres (American Cancer Society, 2011) (Figura 1).

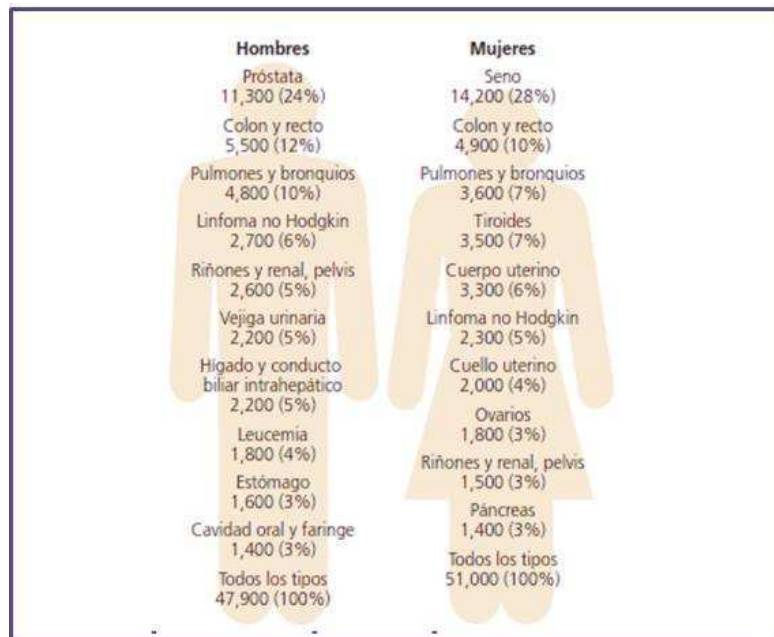


Figura 1: Incidencia de los distintos tipos de cáncer por sexo para la población mundial

La incidencia de los distintos tipos de cáncer varía notablemente según el sexo, la edad, el grupo étnico, la localización geográfica y los hábitos alimentarios, entre muchos otros factores (American Cancer Society, 2011) (Figura 2).

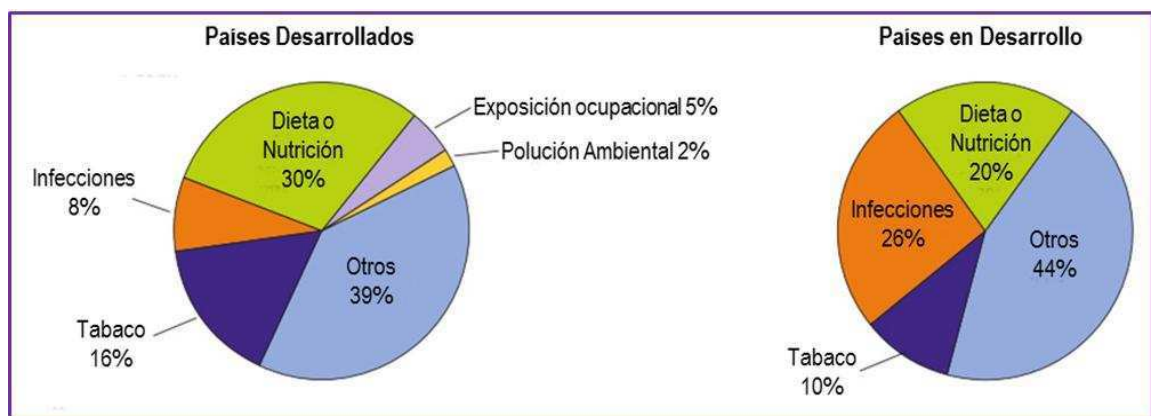


Figura 2: Proporción de causas de cáncer clasificado por factores de riesgo y nivel de desarrollo económico

En Argentina hay más de 50.000 muertos por cáncer al año: unos 27.000 hombres, en gran medida con cáncer de próstata y pulmón; y 23.000 mujeres, la mayoría con cáncer de mama y cuello de útero. En Latinoamérica, cada año muere casi medio millón de

personas víctimas del cáncer y se estima que la cifra se duplicará hacia 2020. A escala mundial, cada año hay unos siete millones de muertes y se registran unos 11 millones de nuevos casos, mientras 24 millones de habitantes viven con la enfermedad. Para el año 2050 se estiman 27 millones de nuevos casos de cáncer y 17,5 millones de muertes por esta enfermedad según la Sociedad Americana del Cáncer (American Cancer Society, 2011).

1.3 Terapias contra el cáncer

Una terapia contra el cáncer debe tener en cuenta varios aspectos, entre ellos el grado de remoción del tumor, ya que la cura de la enfermedad está sujeta a la erradicación total del mismo. Un tratamiento eficaz debe dirigirse no sólo al tumor primario, sino también a los nuevos tumores que puedan aparecer en otras partes del organismo (Alvarez et al., 2006). Cuando la remoción total es posible se habla de curación, pero si el tumor no está localizado, existen metástasis, o no es factible esa eliminación por otros motivos, el objetivo en la terapéutica es paliativo; en ese caso lo que se pretende es reducir el tamaño del tumor o el número de células, aliviar los síntomas y prolongar la supervivencia con una calidad de vida aceptable.

-Cirugía: Es la modalidad más antigua de tratamiento para el cáncer y sigue constituyendo la primera herramienta para tratar tumores sólidos localizados, de estadíos tempranos y con bajo potencial de metástasis (Kufe y Weichselbaum, 2003).

-Radioterapia: Es un tratamiento localizado para enfermedades neoplásicas y no neoplásicas, basado en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radiactividad, la que incluye los rayos gamma y las partículas alfa) (Lawrence et al., 2008). El ADN es la molécula diana dañada por esta terapia, provocando roturas en las cadenas a nivel de las uniones fosfodiéster, entrecruzamiento entre las hebras de ácido nucleico y proteínas cromosomales y provocando daños significativos a la membrana nuclear.

-Quimioterapia: Consiste en la administración de drogas para la destrucción de células cancerosas, dichos medicamentos se denominan citotóxicos. Por lo general, los agentes quimioterapéuticos actúan interfiriendo en los procesos fisiológicos de la proliferación celular y de esta manera impiden la reproducción de células tumorales. Pueden actuar sobre la síntesis de ADN, ARN y proteínas, como también en los mecanismos de

reparación del ADN (Arvelo et al., 2000). La quimioterapia no sólo disminuye la masa tumoral primaria sino que también elimina las células tumorales circundantes y metastásicas (Blanchard et al., 2008). Sobre esta modalidad terapéutica hablaremos en detalle más adelante.

-Inmunoterapia: Es un tratamiento basado en la estimulación del sistema inmunológico del paciente, con el objetivo que éste sea capaz de reconocer y eliminar las células tumorales (Rosenberg, 1984). Dentro de los tratamientos biológicos están los anticuerpos monoclonales, las vacunas y los denominados factores de crecimiento. El componente principal de la respuesta inmune es el TNF- α , entre otras citoquinas (Palucka et al., 2011).

-Terapia génica: Consiste en la inserción de genes funcionales ausentes en el genoma de un individuo (Escrig y Aliño, 1997). Se realiza en las células y tejidos con el objetivo de tratar una enfermedad o realizar un marcaje (Curiel et al., 2000). Los principales métodos que utiliza esta terapia son: aumento de la respuesta inmune celular antitumoral, introducción de genes activadores de drogas dentro de las células tumorales o terapia de genes suicidas, normalización del ciclo celular, manipulación de las células de la médula ósea, uso de ribozimas y tecnología antisentido o "antisense".

- Terapia hormonal: Esta terapia aumenta o disminuye la cantidad de ciertas hormonas, limitando así el crecimiento de los tumores que dependen de hormonas o que están inhibidos por la acción de estas hormonas (Untch et al., 2010). Los medicamentos que pertenecen a esta categoría son hormonas sexuales, o medicamentos similares a hormonas, que alteran la acción o la producción de hormonas femeninas o masculinas. Se usan para disminuir el crecimiento de los cánceres de seno, próstata y endometrio, que normalmente crecen en respuesta a las hormonas naturales del cuerpo (Dunnwald et al., 2007).

- Terapias fotoasistidas: El uso de luz para el tratamiento de enfermedades data de la antigüedad. Estas terapias consisten en el uso combinado de compuestos con efecto tóxico nulo en oscuridad, y que, en presencia de luz, se activan y desencadena la muerte de células tumorales selectivamente. Dentro de estas terapias podemos encontrar la terapia fototérmica (basada en la hipertermia como desencadenante de daño y muerte

celular) y la terapia fotodinámica. Acerca de esta última, tratará parte de esta tesis y sobre ella se hablará en la siguiente sección.

2. Terapia Fotodinámica

2.1 Introducción

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento para el cáncer y otras patologías, originado en el descubrimiento de que ciertos tipos de compuestos, llamados agentes fotosensibilizantes (FS), pueden destruir una célula tumoral cuando ésta es expuesta a la luz.

La combinación de la luz con el FS da lugar a una serie de reacciones fotoquímicas, mediadas por especies reactivas de oxígeno (ROS), que resultan citotóxicas y destruyen las células tumorales (Figura 3).

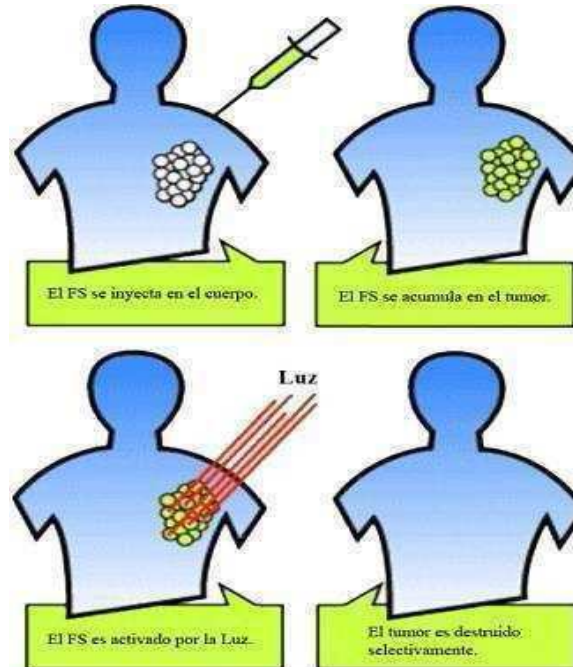


Figura 3: Principios básicos de la Terapia Fotodinámica

Es un tratamiento sumamente prometedor para tumores superficiales o de fácil acceso por vía endoscópica, y se basa en la acumulación preferencial del FS en el tejido maligno luego de su administración, generalmente sistémica.

Las ventajas terapéuticas que presenta la TFD respecto a las demás modalidades antitumorales, es que se puede repetir o usar luego de otros tratamientos, por no exhibir resistencia cruzada con otras drogas. Además, el riesgo de generación de nuevas neoplasias es bajo, ya que el daño al ADN es muy limitado, así como lo es también el riesgo de perforar o reducir la fuerza mecánica de órganos internos.

La TFD consta de dos fases. La primera consiste en la administración del FS por vía tópica, oral o intravenosa (porfirinas, ftalocianinas, etc.) o estimulando alguna vía endógena de síntesis de compuestos con actividad fotosensibilizante aplicando, por ejemplo, el precursor en la vía de síntesis de porfirinas fotoactivas, el ácido 5-aminolevúlico (ALA). La segunda fase involucra la activación del FS en presencia de oxígeno, mediante la aplicación en la zona a tratar de una luz de una longitud de onda específica. La TFD tiene selectividad dual; en primer lugar porque el FS es aplicado o se acumula preferentemente en el tejido blanco de la terapia, y en segundo lugar, por el direccionamiento de la fuente de luz sobre el mismo, minimizando el daño de las estructuras sanas adyacentes (Allevato, 2006).

La TFD en el tratamiento del cáncer es una de las aplicaciones más estudiadas, aunque además puede ser aplicada para otros fines tales como herbicida (Rebeiz et al., 1984; Nandihalli y Rebeiz, 1991), insecticida (Rebeiz et al., 1988; Ben Amor y Jori, 2000), antibacteriana, antimicótica y antiviral (Wainwright, 2004; 2003; Kharkwal et al., 2011); además de su potencial uso para la esterilización de agua, fluidos biológicos y sangre contaminada con microorganismos patógenos (Jori et al., 2011; Ben Amor y Jori, 2000; Wainwright, 2004; DeRosa y Crutchley, 2002; Jori y Brown, 2004).

2.2 Ventana terapéutica

La TFD es un procedimiento apropiado para personas que tienen contraindicada la cirugía por su edad, enfermedades asociadas (cardiopatía, trastornos de la coagulación, etc.) o como en el caso de pacientes trasplantados, dado que es un tratamiento poco

agresivo. La tasa de efectos adversos es baja y los resultados cosméticos son buenos (Morton et al., 2002). Sin embargo, una limitación de esta terapia se encuentra en las propiedades ópticas del tejido, que determinan tanto la penetración como la intensidad de luz que puede ser tolerada para no producir efectos térmicos (Wan et al., 1981; Grossweiner, 1994). Los tejidos humanos transmiten la luz más efectivamente en la región roja del espectro visible, y consecuentemente, la ventana para la penetración óptima es entre 600-800 nm (Grossweiner, 1994). En ese rango la luz tiene muy baja dispersión en los tejidos, y además la absorción por parte de otras biomoléculas tales como hemoglobina y melanina, es escasa (Figura 4).

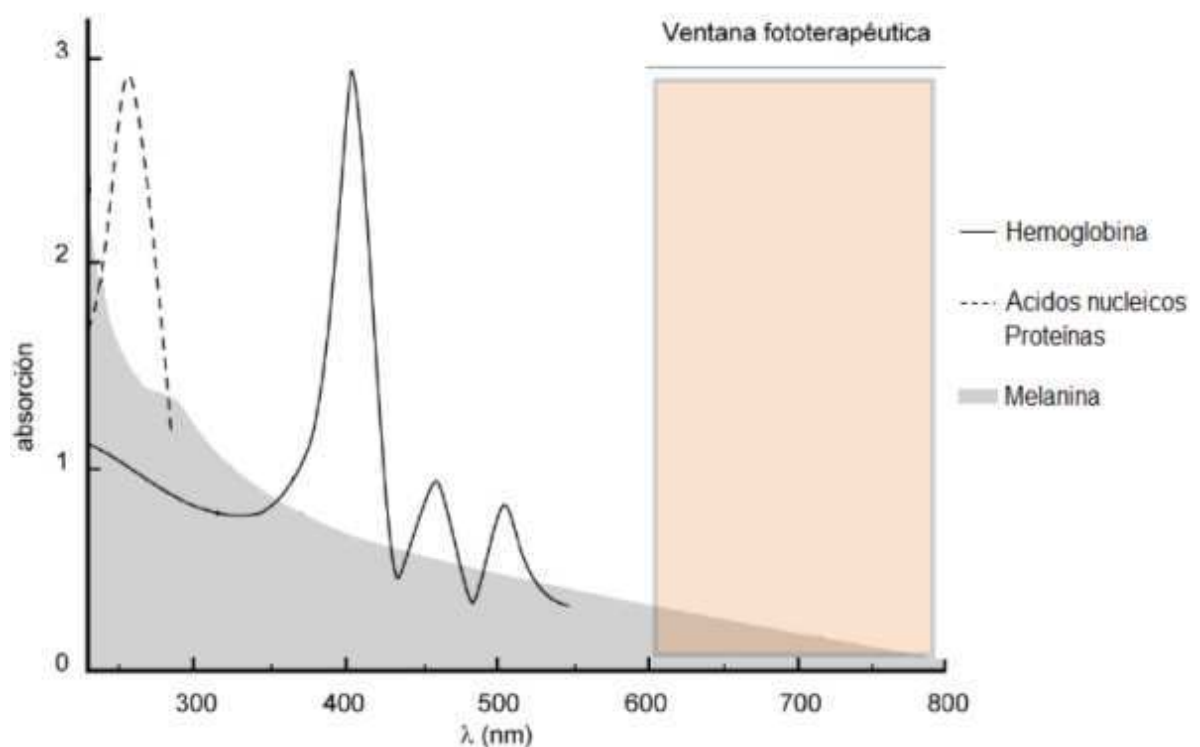


Figura 4: Ventana fototerapéutica de la TFD para el tratamiento de tejidos

Se muestran los espectros de absorción de la hemoglobina, los ácidos nucleicos y la melanina. La denominada “ventana fototerapéutica” (indicada con el rectángulo de color) se encuentra ente los 600 y 800 nm, región del espectro visible donde la absorción de los mencionados compuestos, es mínima.

2.3 Principios y fotoquímica de la TFD

Los FS utilizados en TFD son moléculas cuyos electrones de capas superiores son capaces de excitarse desde un estado basal (S_0) hasta un primer estado singlete excitado (S_1) a través de la estimulación con luz visible.

Los eventos fotofísicos involucrados en la TFD (Figura 5) se inician cuando el FS, que inicialmente se halla en el estado electrónico basal (S_0), absorbe un fotón de luz de longitud de onda adecuada (absorción). El FS, pasa entonces al primer estado excitado (S_1) de vida media muy corta. En este punto, el FS puede volver al estado basal S_0 emitiendo la energía absorbida, como fluorescencia o por conversión interna (disipación como calor). Por otra parte, el FS en S_1 , también puede decaer por cruzamiento intersistema hasta un estado triplete (T_1). Al tratarse de una transición prohibida por el principio de Franck-Condon, el pasaje del electrón desde o hacia el estado T_1 está desfavorecido cuánticamente, por lo que su vida media es lo suficientemente larga como para permitirle interactuar con moléculas del entorno.

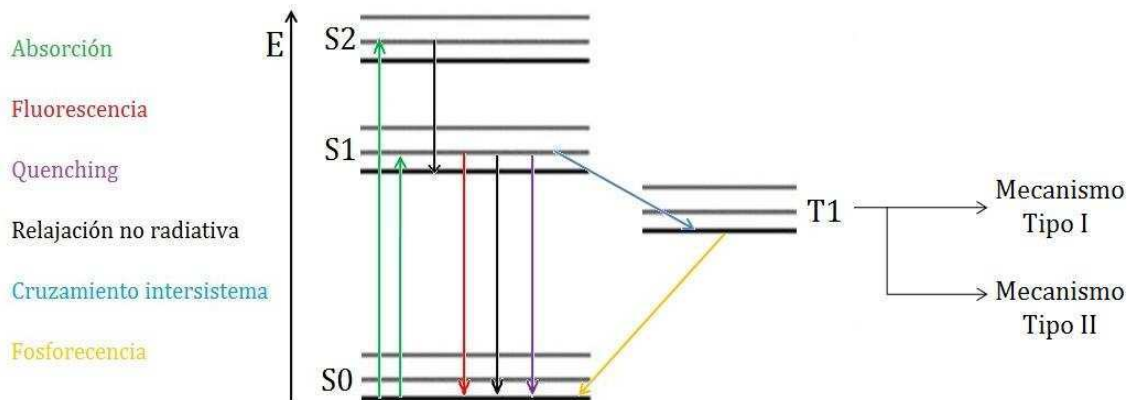


Figura 5: Diagrama de Jablonski de los procesos involucrados en TFD

Resumen de eventos fotofísicos vinculados a la TFD. El estado triplete conduce a la muerte celular por daño oxidativo a través de un mecanismo Tipo I o Tipo II.

Por lo tanto, los efectos fotoactivos del FS son mediados por el estado T_1 , aunque también éste puede volver al estado basal, mediante la emisión de fosforescencia.

El FS en T_1 puede reaccionar de dos maneras relevantes para la TFD, definidas como mecanismos de Tipo I o Tipo II. Ambas generaran la oxidación de biomoléculas. El mecanismo de Tipo I (transferencia de carga) consiste en la abstracción de un hidrógeno desde, o la transferencia electrónica hacía, un sustrato biológico, convirtiéndolo en un radical libre, el cual a su vez reaccionará con O_2 para generar ROS (en particular superóxido, radicales oxhidrilo y peróxidos) que propaguen el daño celular. Alternativamente el mecanismo de Tipo II (transferencia de energía) se caracteriza por un intercambio del espín electrónico entre el FS y el O_2 . La energía es transferida desde el FS en el estado T_1 hacia el O_2 , cuyo estado basal es el triplete, para convertirlo en oxígeno singlete (1O_2) (Sharman et al., 1999).

Luego de transferir la energía absorbida, ya sea por un mecanismo del Tipo I o del Tipo II, el FS retorna al S_0 , pudiendo absorber un nuevo fotón, de forma que el proceso se repetirá hasta que sea degradado finalmente debido al efecto de la luz (fotodegradación o “photobleaching”).

Ambos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente y la relación entre los procesos depende principalmente del FS, del sustrato y de la naturaleza del medio (Henderson y Dougherty, 1992). Sin embargo, en condiciones aeróbicas está aceptado que 1O_2 es la principal especie responsable de la inactivación celular (Röeder, 1998; Jori et al., 1996).

El 1O_2 , es un poderoso oxidante, que puede reaccionar con varios tipos de biomoléculas, como triacil-glicerolos insaturados, colesterol, fosfolípidos, aminoácidos como el triptofano, histidina y metionina (Pandey et al., 2006), generando así daños en componentes y estructuras de la célula que llevarán a la muerte de la misma, por apoptosis o por necrosis.

La vida media del 1O_2 en el ambiente celular es corta, por lo tanto el mismo reacciona en el sitio de formación. Asimismo, el sitio de daño depende del FS empleado, ya que estos difieren de su localización subcelular. En general, la membrana celular y la mitocondria son importantes sitios de daño (Nyman y Hynninen, 2004).

2.4 Blancos y vías de acción de la TFD

Existen diversos blancos celulares de daño fotodinámico y estos dependen principalmente de la naturaleza química del FS empleado, de la concentración, tiempo de exposición, vehículo y dosis lumínica. Según las características de los FS, estos presentan distinta localización subcelular. Los sitios de acción pueden ser biomoléculas o bien organelas como las mitocondrias, los microsomas, los lisosomas, el núcleo y el retículo endoplasmático (Moan et al, 1989; Jori, 1990).

Hay amplio consenso en señalar las membranas celulares como uno de los sitios principales de daño (Girotti, 1990; Chapman et al., 1991). La reacción de los ROS con los lípidos poliinsaturados es una de las más frecuentemente citadas, así como la formación de agregados entrecruzados de proteínas. La modificación específica de aminoácidos, la fragmentación de la cadena peptídica y la alteración de la carga luego de la TFD, han sido algunas de las evidencias encontradas a favor de esta hipótesis. Las proteínas así modificadas serían más susceptibles a la proteólisis (Prinsze et al., 1990; Farr y Kogoma, 1991).

Es sabido que el $^1\text{O}_2$ y otras ROS conducen a la peroxidación lipídica y daños en la membrana citoplasmática, ADN, estructuras del citoesqueleto, etc. (Moan et al., 1992). Pero el mecanismo final de la muerte celular puede deberse tanto a la necrosis como a la apoptosis, dependiendo del FS utilizado, la concentración, el tiempo de exposición, la dosis de luz, la fuente de luz y el tipo celular (He et al., 1994; Dellinger, 1996; Noodt et al., 1996; Miyamoto et al., 1999). Se conoce que los FS que se localizan en mitocondrias o lisosomas son altamente efectivos, ya sea desencadenando respuesta necrótica o apoptótica (Stockert et al., 2004).

Además, mecanismos de apoptosis y autofagia, ocurren luego de la TFD. La autofagia está asociada con el aumento de la supervivencia a bajos niveles del fotodaño en muchas células, sirviendo como una respuesta de pro-supervivencia en la vía de reciclado al daño de organelas (Kessel y Oleinick, 2009). La autofagia ofrece protección de los efectos fototóxicos en bajas dosis de TFD, pero puede servir como modelo de muerte alternativa cuando la dosis de TFD aumenta (Kessel y Arroyo, 2007; Kessel y Oleinick, 2010).

Dentro de los FS, los derivados de las porfirinas suelen presentar una localización preferentemente mitocondrial, aunque esto varía en función del tipo celular y el tiempo de exposición. En cambio, otras estructuras tales como la merocianina se localizan preferentemente en membranas celulares, mientras que la naranja de Acridina se localiza en núcleo, mitocondrias y lisosomas. Sin embargo, aún no existen trabajos que documenten las diferencias subcelulares de ubicación de dichos compuestos entre células tumorales y normales.

La muerte celular no es la única vía de eliminación del tumor o tejido afectado, ya que también pueden producirse daños en la vasculatura que lo abastece y de esta forma privarlo del suministro de nutrientes. La inflamación y activación del sistema inmune también contribuyen a la eliminación del tejido tratado (Figura 6) (St Denis et al., 2011).

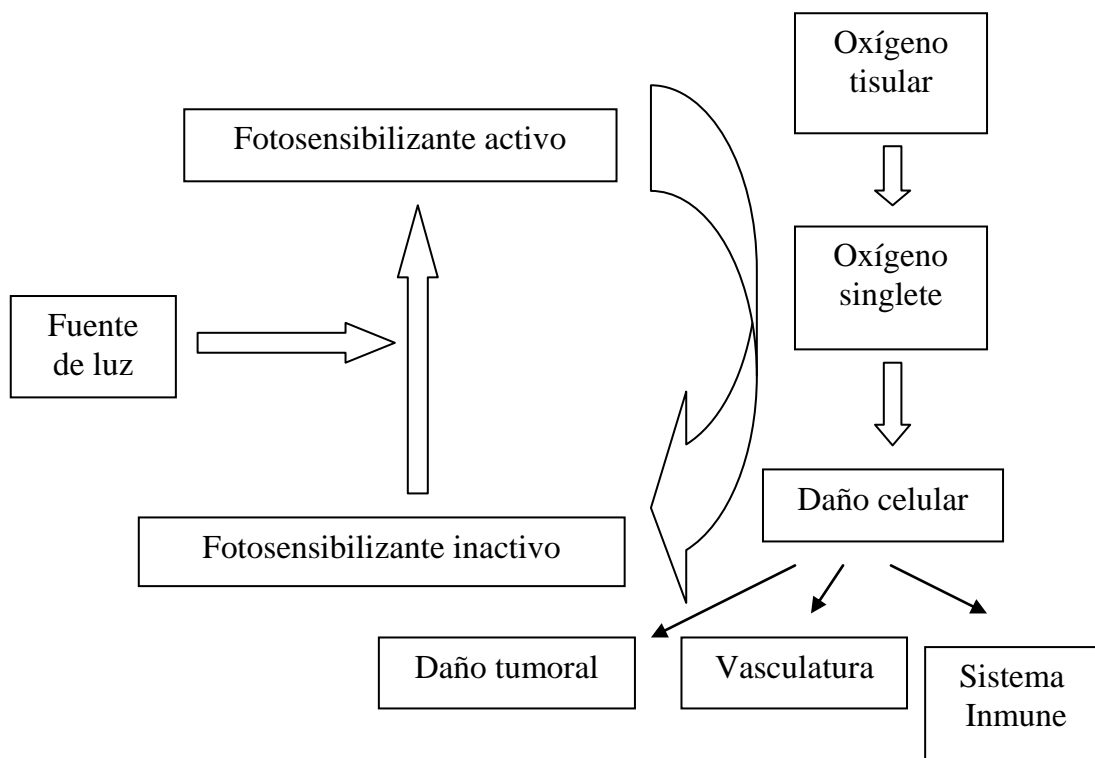


Figura 6: Esquema general de la TFD y sus vías de acción

2.5 Fuentes de luz empleadas en TFD

En los comienzos de la TFD se utilizaban como fuentes lumínicas lámparas convencionales por motivos de seguridad, costos, facilidad de uso y conveniencia para

ciertos FS. La luz blanca de amplio espectro suministrada por estas lámparas era convertida en luz monocromática mediante el uso de filtros ópticos. Sin embargo, el uso de este tipo de lámparas presenta ciertas desventajas, como la baja intensidad lumínica, el efecto térmico, y la dificultad de controlar la dosis lumínica, por lo que han sido progresivamente desplazadas por fuentes alternativas. Estas incluyen los diodos emisores de luz (LED), que suministran luz de alta energía y pueden disponerse en arreglos de tamaños y geometrías diversas, y dispositivos láser, los cuales emiten luz de alta energía y estrecho ancho de banda, que además pueden combinarse con fibras ópticas de forma de suministrar la luz de forma precisa sobre el tejido o sitio de infección (Pervaiz y Olivo, 2006). De todos modos, ningún tipo de fuente es intrínsecamente superior para todos los casos, por lo que la elección de la fuente lumínica apropiada dependerá de la dosis lumínica a suministrar, del tipo de FS empleado, y de la localización del tejido o sitio a irradiar.

La palabra láser es un acrónimo para Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, que refiere a dispositivos capaces de producir o amplificar radiación electromagnética a través de un proceso de estimulación controlada de la emisión, de acuerdo al standard IEC60601 para equipamiento médico eléctrico. La luz láser posee dos propiedades características: un rango de longitudes de onda muy estrecho, y un alto nivel de coherencia (relación de fases constante).

La posibilidad de los equipos láser de emitir luz con elevada potencia permite reducir los tiempos de irradiación necesarios para suministrar la dosis lumínica deseada. Como se trata de luz monocromática, la elección del equipo a utilizar se torna crucial, ya que debe coincidir con algún máximo de absorción del FS utilizado. De esta forma, un determinado sistema láser solamente podrá emplearse con una cantidad limitada de FS. Por otro lado, las lámparas convencionales emiten luz de espectro amplio, lo cual permite que sean empleadas en combinación con un gran rango de FS que presenten distintos máximos de absorción (Brancaleon y Moseley, 2002). En la actualidad los dispositivos láser constituyen la única manera de irradiar sitios donde sólo es posible acceder mediante arreglos de fibras ópticas (Figura 7), debido a la calidad del haz y la potencia de salida obtenida en estos equipos. La utilización de difusores de luz de distintas formas junto con microlentes permiten generar haces colimados uniformes, que tornan adecuados a estos dispositivos para la iluminación directa de sitios accesibles

(piel, cavidad oral, etc.). Las lámparas convencionales, en cambio, no pueden ser acopladas a fibras ópticas, pero es posible, no obstante, acoplarlas a guías ópticas líquidas que permiten suministrar la luz de forma precisa, en haces de entre 5 y 10 mm de diámetro, por lo que considerando su menor costo y complejidad, estos sistemas pueden ser preferibles en determinadas situaciones a los dispositivos láser (Brancaleon y Moseley, 2002).

En todos los casos, la penetración de la luz en el tejido no supera 1 cm de profundidad, lo cual limita las aplicaciones de la terapia.

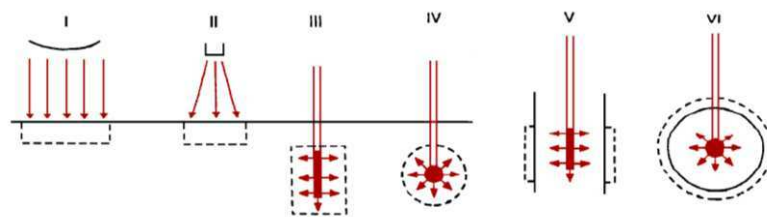


Figura 7: Sistemas de aplicación de luz en TFD

Iluminación superficial con lámpara convencional (I), láser acoplado a una fibra óptica (II). Iluminación intersticial con un difusor cilíndrico (III) o esférico (IV). Iluminación intraluminal e intracavitaria con difusor cilíndrico (V) o esférico e isotrópico (VI). Las flechas representan la luz emitida, y la línea punteada representa la distribución de la luz en un tejido altamente refringente.

2.6 Fotosensibilizantes

Algunos de los requisitos más importantes que debe caracterizar a un FS para lograr una actividad fotodinámica efectiva son:

- Alta pureza química.
- Alto coeficiente de absorción en la región visible del espectro cercana a la ventana fototerapéutica (600 a 800 nm).
- Energía del estado triplete apropiada (95 kJ/mol) para poder transferir eficientemente la energía al estado fundamental del oxígeno (Villanueva et al., 2002; Penning y Dubbelman, 1994).
- Estado excitado triplete con un tiempo de vida largo para producir $^1\text{O}_2$ eficientemente (mayor a 1 μs) (Wainwright, 2003; Bonnet, 2000).

- Selectividad alta por el tumor y toxicidad baja en otros tejidos.
- Toxicidad mínima en la oscuridad.
- Eliminación más rápida en el tejido sano (Morton et al., 2002; Allevato, 2006).
- Habilidad alta para inducir la muerte tumoral (Grossweiner, 1994).

Hay un gran número de FS en distintas fases de investigación clínica, y principalmente se trata de estructuras que contienen anillos tetrapirrólicos tales como los derivados de porfirinas, ftalocianinas, texafirina y clorinas (Tabla 2). Porfencenos, colorantes, y otras entidades también han sido empleadas en TFD. Los más utilizados son los derivados de las porfirinas, tales como el Photofrin®, temoporfin y verteporfin y el precursor ácido 5-aminolevúlico; y los derivados de la clorofila, tales como las clorinas, purinas y bacterioclorinas. Se emplean además como FS algunos colorantes tales como las ftalocianinas, y algunos productos naturales como la Hipericina.

Tabla 2: Fotosensibilizantes de uso comercial en TFD

COMPUESTO	DROGA	SUSTANCIA	EMPRESA	SITIO WEB
Porfirina	Photofrin®	HpD	Axcan Pharma, Inc.	www.axcan.com
Porfirina	Levulan®	ALA	DUSA Pharmaceuticals, Inc.	www.dusapharma.com
Porfirina	Metvix®	Me-ALA	Photocure ASA	www.metvix.com
Porfirina	Visudyne®	Vertiporfin	Novartis Pharmaceuticals	www.visudyne.com
Texafirina	Antrin®	Lutexafirina	Pharmacylics	www.pharmacylics.com
Clorina	Foscan®	Temoporfirina	Biolitec Pharma Ltd.	www.bioletcpharma.com
Clorina	LS11	Talaporfina	Light Science	www.lightsciences.com
Clorina	Photochlor	HPPH	RPCI	www.roswellpark.org
Colorante	Photosens®	ftalocianina	General Physics Institute	www.gpi.ru

2.7 TFD en el tratamiento del cáncer

Una de las aplicaciones más importantes de la TFD es en el tratamiento del cáncer, donde presenta varias ventajas respecto a los tratamientos convencionales. Es un tratamiento relativamente selectivo y que prácticamente no afecta tejidos sanos, no invasivo, su eficacia no depende del ciclo celular, y no presenta efectos colaterales o

resistencias cruzadas con otras drogas contra el cáncer. Los tejidos tratados con TFD, tienen buen resultado cosmético en el caso de la piel, ya que el colágeno no es afectado por el fotodaño inducido. Además, la mayoría de los FS usados no se localizan en el núcleo, por lo que el riesgo de mutaciones y carcinogénesis es mínimo (Nyman y Hynninen, 2004).

La selectividad de los FS por el tejido maligno se cree que puede ser atribuida a la afinidad de los mismos por las lipoproteínas, junto con una alta expresión tumoral de receptores de lipoproteínas de baja densidad. Otras hipótesis alternativas proponen que el bajo pH, la debilidad de la vasculatura, el drenaje linfático disminuido, y el incremento en el número de cuerpos lipídicos que se ha observado en algunos tumores, favorecerían la retención tumoral de los fotosensibilizantes. Sin embargo, estos mecanismos son particulares para cada tipo de sustancia (Wilson et al., 1991).

Los usos principales de la TFD incluyen principalmente los tumores superficiales y los de fácil acceso por vía endoscópica. Aunque el desarrollo de fibras ópticas intersticiales permite la irradiación de tumores sólidos de difícil acceso, se puede decir que hoy en día hay pocos tumores que no hayan sido tratados con TFD.

En el tratamiento de tumores dermatológicos, la TFD ha sido usada en carcinomas de células basales, enfermedad de Bowen, melanoma no melanótico, linfomas cutáneos de células T, carcinomas de células escamosas, sarcomas de Kaposi, metástasis dérmicas de carcinoma mamario y carcinomas basocelulares (Tomio et al., 1984; Calzavara-Pinton, 1995).

Además, tumores como los de pulmón, vejiga, cavidad oral, esófago, endometrio, mama y cerebro han sido tratados con éxito con TFD empleando sistemas de fibras ópticas para llevar a cabo la iluminación (Grant et al., 1993; Gossner et al., 1998; Jichlinski y Leisinger, 2001; Kelly et al., 2002).

Aparte de su uso para el tratamiento de tumores sólidos, la TFD también se emplea como purga *ex-vivo* de células tumorales remanentes en médula ósea antes del autotransplante y en el tratamiento hematológico de linfomas de células T (Grebenová et al., 1998). También se ha empleado la TFD para el tratamiento de carcinomatosis

peritoneales y para esterilización de la zona peritumoral en la TFD intraoperatoria (Molpus et al., 1996; Momma et al., 1998; Ris, 2005).

2.8 Búsqueda de fotosensibilizantes de origen vegetal

Las plantas son una importante fuente de principios activos con diversas utilidades en medicina. En particular, han sido fuente de algunas sustancias FS. Hace 4000 años los egipcios combinaban la ingesta de *Amni majus* con la exposición a la luz solar para combatir el vitiligo (Ebermann et al., 1996).

A lo largo de la historia se han repetido los reportes de casos de fito-fotodermatitis, es decir lesiones cutáneas asociadas a la exposición a determinadas plantas, o sus componentes (resinas, aceites esenciales, etc.), y luz visible o UV. El estudio de estas lesiones permitió descubrir FS de origen vegetal, responsables de las lesiones.

Los primeros compuestos descritos pertenecieron a la familia química de las furanocumarinas (estructuras con un anillo furano y una benzo- α -pirano cumarina). Más concretamente, los compuestos llamados psoralenos (furanocumarinas lineales). El resumen de las primeras especies reportadas se muestra en la Tabla 3. El componente activo de *Amni majus* se identificó como un psoraleno, y es utilizado actualmente en el tratamiento de la psoriasis (Bowers, 1999).

Tabla 3: Especies vegetales vinculadas a los primeros reportes de fito-fotodermatitis

Familia	Especie	Nombre comun
Umbelliferae	<i>Ammi majus</i>	Apio cimarrón
Umbelliferae	<i>Angelica archangelica</i>	Angélica
Umbelliferae	<i>Anthriscus sylvestris</i>	Perifollo
Umbelliferae	<i>Apium graveolens</i>	Apio
Umbelliferae	<i>Daucus carota</i>	Zanahoria
Umbelliferae	<i>Foeniculum vulgare</i>	Hinojo
Umbelliferae	<i>Heracleum lanatum</i>	Apio indio
Umbelliferae	<i>Heracleum mantegazzianum</i>	Perejil gigante
Umbelliferae	<i>Heracleum sphondylium</i>	Perifollo verde
Umbelliferae	<i>Pasinaca sativa</i>	Chirivia
Umbelliferae	<i>Petroselinum crispum</i>	Perejil
Rutaceae	<i>Citrus aurantifolia</i>	Lima
Rutaceae	<i>Citrus aurantium</i>	Naranja amarga
Rutaceae	<i>Citrus bergamia</i>	Lima bergamota
Rutaceae	<i>Citrus limon</i>	Limón
Rutaceae	<i>Citrus paradissi</i>	Pomelo
Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i>	Naranja dulce
Rutaceae	<i>Dictamnus albus</i>	Hierba ardiente
Rutaceae	<i>Pelea anisata</i>	Mokihana
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i>	Ruda
Moraceae	<i>Ficus carica</i>	Ficus

El estudio posterior de las fitoalexinas vegetales (compuestos involucrados en la defensa de la planta frente a patógenos y depredadores, habitualmente producto del metabolito secundario) reveló que entre ellas existen compuestos presentes en la planta capaces de actuar como FS (foto-fitoalexinas). Estos compuestos principalmente se localizan en tejidos epidérmicos y por lo tanto en contacto con el O₂. Esto les permite en presencia de luz, la formación de ¹O₂ en fase gaseosa, donde tiene una vida media 1000 veces mayor que en fase acuosa, en caso de que la planta esté siendo atacada (Flors y Nonell, 2006).

Estos compuestos FS de origen vegetal han sido clasificados por lo general en diferentes grupos químicos: furanocumarinas (entre ellas los psoralenos); poliacetilenos, tiofenos, quinonas (entre ellas las antraquinonas); alcaloides; flavonoides; terpenos y porfirinas (Hudson y Towers, 1991; Flors y Nonell, 2006).

Entre las porfirinas, la clorofila y algunos de sus derivados, también han sido usados como FS en la TFD (Ebermann et al., 1996). En particular, si bien la clorofila no es un FS muy eficiente, compuestos derivados de esta molécula, tales como las clorinas y

bacterioclorinas, han resultado FS con alta eficacia (Nyman y Hynninen, 2004; Pandey et al., 2006).

Como ya se mencionó, algunas especies vegetales sintetizan antraquinonas. Estos compuestos poseen sistemas de electrones π extendidos, los cuales les permiten absorber luz visible y reaccionar, produciendo especies reactivas del oxígeno, en especial, $^1\text{O}_2$ (Eeberman et al., 1996). Entre las antraquinonas, figura uno de los primeros FS de origen vegetal para uso en TFD, la hipericina. Este compuesto se descubrió a partir del extracto de *Hypericum perforatum* (Korenl et al., 1996, Orellane, 2001), llamado hipericina (Agostinis et al., 2002) (Figura 8).

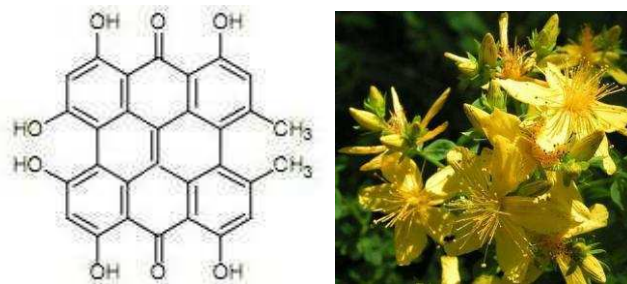


Figura 8: Fotosensibilizantes de origen vegetal

Estructura del FS de origen vegetal, Hipericina, e imagen de *Hypericum perforatum*, especie vegetal en la que fue descubierto.

En Argentina también hay reportes de la identificación de una especie, *Heterophyllaea pustulata*, un género sudamericano, también conocido como “cegedera”, cuyo extracto posee actividad fotosensibilizante (Nuñez Montoya et al., 2008). Sus principios activos son una serie de antraquinonas entre las que se destacan el soranjidiol y la rubiadina.

El hallazgo de estos FS se debe a conocimientos heredados de la medicina popular o por observación de fenómenos fortuitos de campo. Por ejemplo, tanto el descubrimiento de *Hypericum perforatum* como el de *Heterophyllaea pustulata*, se produjo a partir de la aparición de ganado con síntomas de fotosensibilización, tales como dermatitis y ceguera (Agostinis et al., 2002; Nuñez Montoya et al., 2008). Dichos síntomas eran producto de la ingesta de estas especies presentes en los campos de pastoreo, combinada con la exposición a la luz solar. Estos ejemplos grafican la diversidad de compuestos

fotoactivos y de metabolitos secundarios presentes en las plantas y la potencialidad de las mismas como fuente de FS.

Si bien existen reportes de búsquedas sistemáticas o “*screening*” de FS en especies vegetales de diferentes regiones en el planeta, las mismas se centraron en la actividad fotosensibilizantes sobre microorganismos patógenos como *C. albicans* y cepas resistentes a antibióticos de *S. aureus*, *E. coli*, entre otros (Downum et al., 1989; Jong et al., 2013). La excepción es un estudio realizado a partir de extractos vegetales de 93 especies de la flora autoctona de Malasia, donde el “*screening*” se realizó sobre una línea de células tumorales. Los compuestos FS encontrados por los autores correspondieron a estructuras tetrapirrólicas vinculadas a la feoforbida a y b, que son compuestos en la vía metabólica de la clorofila (Ong et al., 2009).

En nuestro país, no existen hasta el momento reportes de algún tipo de búsqueda sistemática o “*screening*” en especies vegetales con el fin de identificar nuevos FS para TFD.

3. Compuestos antineoplásicos

3.1 Introducción

Las drogas antineoplásicas, a diferencia de lo que ocurre con la cirugía y la radioterapia, pueden ser efectivas en las neoplasias sistémicas. En la quimioterapia continúan produciéndose avances constantemente. En los últimos años, el mayor progreso no ha sido el descubrimiento de nuevos o mejores agentes quimioterápicos, sino el desarrollo de nuevos conceptos terapéuticos. Entre éstos se encuentran el planteo de regímenes de tratamiento más efectivos para la administración combinada de drogas, incluyendo combinaciones de agentes antineoplásicos con los llamados "modificadores o moduladores de la respuesta biológica"; el conocimiento de los mecanismos de acción de muchos antineoplásicos, lo que facilita la propuesta de nuevos métodos para prevenir o minimizar la toxicidad de las drogas; la mayor comprensión de los mecanismos de resistencia a las drogas antineoplásicas; el aumento del uso de la quimioterapia sinérgica (es decir, el diseño de enfoques quimioterapéuticos para prevenir el desarrollo de micrometástasis luego de la remoción del tumor por cirugía o radioterapia) y

quimioterapia neosinérgica (es decir, la administración de drogas antes de la cirugía o radioterapia para disminuir el volumen de las neoplasias primarias grandes); y el mejor conocimiento acerca de procesos vitales como la iniciación y diseminación del tumor, implantación y crecimiento de las metástasis.

Muchos de los agentes citotóxicos más potentes actúan en fases específicas del ciclo celular y en consecuencia tienen actividad sólo en células que están en proceso de división (Figura 9). De la misma manera las neoplasias humanas que en la actualidad son más susceptibles al tratamiento quimioterápico son aquellas que tienen una gran fracción en crecimiento, es decir, un alto porcentaje de células en proceso de división.

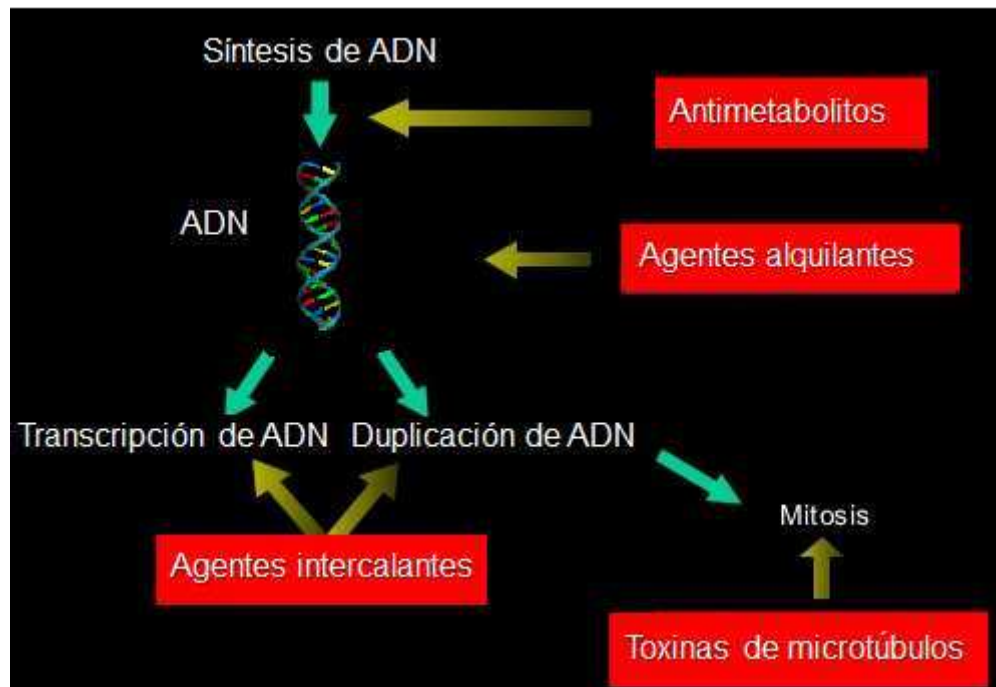


Figura 9: Resumen del sitio de acción de los compuestos antineoplásicos

El origen de los antineoplásicos puede ser natural, sintético o semisintético. Su modo de acción, al igual que su identidad química, es muy diverso y va, desde agentes alquilantes que afectan directamente el ADN (como las mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, alquilsulfonatos, etc.) y antimetabolitos que afectan la síntesis del ADN (análogos del ácido fólico, de pirimidina, de purina, etc.), hasta hormonas esteroideas o enzimas involucradas en procesos antineoplásicos, generalmente inhibidoras de la replicación y transcripción del ADN y de la síntesis proteica, como por ejemplo la L-asparaginasa.

Existen, además, fármacos que actúan sobre la mitosis celular sin afectar el ADN, como por ejemplo los denominados venenos mitóticos (como los alcaloides de la vinca o los taxanos) que se unen a los componentes del citoesqueleto, e impiden la migración de los cromosomas durante la mitosis.

3.2 Antineoplásicos de origen vegetal

El número de especies de plantas superiores (angiospermas y gimnospermas) se estima entre 250.000 y 500.000 (Ayensu y DeFilipps, 1978; Schultes, 1972; Tippo y Stern, 1977). Existe una inimaginable diversidad de metabolitos secundarios vegetales, de los cuales la mayoría no han sido estudiados. De hecho, se estima que sólo el 15% de las plantas han sido investigadas en busca de constituyentes farmacológicamente activos (Savoia 2012; Efferth et al., 2007; Verpoorte, 2000). Los productos vegetales han sido redescubiertos como herramientas importantes para el desarrollo de drogas contra el cáncer debido a la gran variedad de estructuras moleculares complejas capaces de interaccionar con dianas celulares de mamíferos (Younes et al, 2007).

Un análisis del número de agentes quimioterapéuticos aprobados para el tratamiento de pacientes (Figura 10), indica que más del 60% de ellos proviene de compuestos naturales, fármacos semisintéticos derivados de compuestos naturales, y fármacos actualmente sintetizados artificialmente, pero descubiertos como compuestos naturales (Cragg et al., 1997; Heinrich, 2010; Newman y Cragg, 2007).

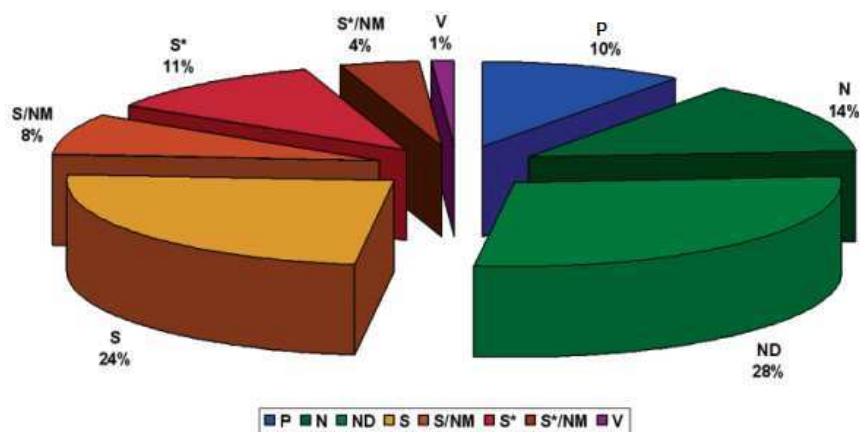


Figura 10: Origen químico de los fármacos empleados como compuestos antitumorales en el período 1946-2006 (Heinrich, 2010)

P: Péptidos grandes o proteínas aislados a partir de un organismo/célula; N: Compuesto natural (pequeñas moléculas) aislados a partir de un organismo/célula; ND: Compuestos derivados mediante síntesis semisintética a partir de compuestos naturales; S: Compuesto totalmente sintético; S*: Compuesto sintetizado artificialmente, pero descubierto como compuesto natural; NM: Compuesto mimético de compuesto natural; V: vacunas empleadas en el tratamiento de tumores.

Entre los productos de origen natural, comúnmente utilizados como antineoplásicos, se destacan los “antibióticos” antineoplásicos (bleomicina, doxorrubicina y mitomicina, entre otros), que suelen inhibir la polimerización de ácidos nucleicos, las epipodofilotoxinas (etopósido, tenipósido, etc.), que suelen ser venenos mitóticos que afectan el citoesqueleto durante la división celular, y los alcaloides vegetales como los de la *Vinca rosea* y sus derivados (vinblastina, vincristina, vindicina, etc.) (Goodman y Gilman, 2006). Estos últimos, son una muestra del potencial de las especies vegetales como importante fuente de sustancias con interés farmacológico para el tratamiento del cáncer, sobre todo de los metabolitos secundarios normalmente involucrados en la relación de la planta con su ambiente, particularmente con organismos patógenos y/o depredadores.

En 1955, el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCI) impulsó un proyecto de quimioterapia, que consistió en el “screening” de especies vegetales alrededor de todo el mundo, con el fin de hallar nuevos agentes antitumorales. En colaboración con el departamento de agricultura de Estados Unidos y los gobiernos de

60 países, se evaluaron alrededor de 35.000 especies en células de leucemia murina (Driscoll, 1984). Dentro de los compuestos descubiertos se encontraron el paclitaxel (Taxol®), uno de los antineoplásicos más utilizados en la actualidad, extraído de la corteza de *Taxus brevifolia* (Denis et al., 1988), y la camptotecina (un inhibidor de topoisomerasas), extraído de *Camptotheca acuminata* (Efferth et al., 2007). El proyecto impulsado por el NCI, perdió impulso durante los comienzos de la década del ochenta, pero fue retomado parcialmente en 1986, a partir de convenios entre el NCI y los gobiernos de los países de donde se extraían las muestras (Boyd, 1989).

Actualmente el estado chino, en colaboración con instituciones y gobiernos de la Unión Europea y los Estados Unidos, está desarrollando programas de investigación de plantas utilizadas en medicina tradicional china. Los proyectos no sólo contemplan la identificación de principios activos presentes en estas especies, sino además la sistematización de la disciplina y la incorporación de enfoques y técnicas de biología molecular e ingeniería genética, con el fin de desarrollar productos farmacológicos aptos para la comercialización a nivel mundial y optimizar su producción a gran escala. Se han identificado nuevos y diversos compuestos para tratamientos antineoplásicos en las especies *Artemisia annua*, *Indigofera tinctoria*, *Taxus chinensis* (otro miembro del género *Taxus* que produce paclitaxel), *Panax ginseng*, *Boswellia serrata* y *Curcuma longa*, entre otras. Además se identificó una especie, *Ophiorrhiza mungos*, que sintetiza la mencionada camptotecina. A partir de modernas técnicas de cultivo en biorreactores, se logró la optimización de la producción de la droga antineoplásica a partir de esta especie (Efferth et al, 2007).

La medicina tradicional de América ha utilizado las plantas para tratar gran variedad de enfermedades, incluido el cáncer. Se propuso la actividad biológica de muchos de estos preparados herbales, para la estimulación o supresión de la respuesta inmune y la acción antiproliferativa en las células tumorales. Argentina posee una abundante y diversa flora, distribuida desde regiones sub-antárticas a sub-tropicales, sin embargo, no se encuentra actualmente involucrada en ningún proyecto de investigación masiva de plantas autóctonas en búsqueda de agentes antitumorales. Han sido publicados unos pocos reportes basados en los usos etnofarmacológicos de plantas con actividad antitumoral tanto en líneas celulares como en modelos tumorales *in vivo* (Anesini et al., 1996, 1997, 1999; Barbini et al., 2006; Fernandez et al., 2002, 2003; Ibarrola et al.,

2006; Heinrich y Bremner, 2006; Lopez et al., 2005, Mongelli et al., 2000; Riveiro et al., 2004; Ruffa et al., 2002; Sampedro et al., 2004).

Los ejemplos exitosos de compuestos antitumorales vegetales citados anteriormente, remarcan la importancia del estudio y preservación de los recursos naturales y biodiversidad, como fuente de principios activos para tratamientos terapéuticos.

4. Especies reactivas del oxígeno

4.1 Introducción

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son compuestos que derivan de la molécula de O_2 por reducción química parcial. Incluyen iones de oxígeno, radicales libres, peróxidos y oxígeno singlete. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar en gran manera, lo cual puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares. Esto lleva en una situación conocida como estrés oxidativo (Jansen et al., 2013).

4.2 Radicales libres

Los radicales libres (RL) son compuestos que pueden existir en forma independiente, y que tienen uno o más electrones no apareados en su órbita externa, pudiendo tener carga positiva, negativa o neutra.

Son muy inestables y tienen tendencia a perder o ganar rápidamente electrones, por lo cual son muy reactivos. Los RL pueden intercambiar uno de los electrones no apareados con otras sustancias. También pueden unirse a otras estructuras, convirtiéndolas en radicales, dando lugar a reacciones en cascada con formación de nuevos radicales.

Estos compuestos pueden generarse intra o extracelularmente, tanto endógena como exógenamente. Endógenamente los RL se generan principalmente como producto de la

cadena de transporte electrónico, de enzimas oxidantes, células fagocíticas y reacciones de autooxidación, siendo el retículo endoplasmático, la mitocondria y los peroxisomas, las principales organelas que los producen.

Exógenamente pueden ser producidos por oxidación de fármacos, humo de tabaco, choque térmico, luz solar, reacciones ionizantes, sustancias oxidantes del glutatión y sustancias cíclicas de naturaleza oxidoreductora.

Cuando se habla de RL, en general se refiere a los RL del oxígeno. Del oxígeno se derivan, entre otros RL, el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($HO\cdot$) y el radical peroxilo ($ROO\cdot$) (Figura 11).

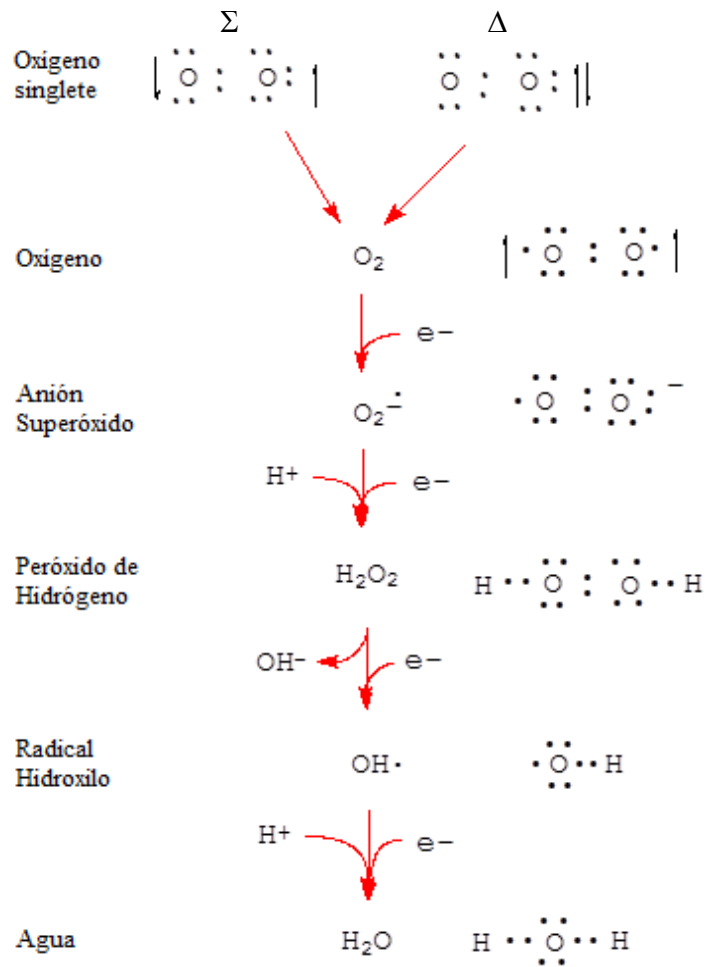
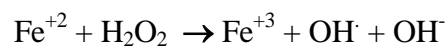


Figura 11. Cadena de reducción y excitación del oxígeno

El término ROS, incluye a los radicales libres mencionados, así como a los intermediarios reactivos del oxígeno, el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y abarca a todas las especies que son más reactivas que el oxígeno en su estado basal.

En los sistemas biológicos también existen radicales centrados en carbono, nitrógeno y azufre, los cuales son importantes iniciadores y/o propagadores de varios tipos de daños.

La fuente principal de radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) es la mitocondria, donde se genera como producto de la cadena transportadora de electrones. Este radical también puede formarse en otras reacciones en cualquier parte de la célula en la que haya moléculas de H_2O_2 y un metal catalizador, fundamentalmente el hierro. La reacción de Fenton es una de ellas:



Esto significa que el hierro, constituyente de numerosas proteínas, básicamente la hemoglobina, es también un promotor de RL. El HO[·] es extremadamente reactivo, su vida media es de 10⁻⁹ segundos e interacciona en forma instantánea con la molécula más próxima, oxidándola y, por ende, alterando su estructura. El radical HO[·] puede interaccionar con prácticamente cualquier molécula, incluyendo ácidos nucleicos, membranas lipídicas, proteínas y carbohidratos.

El radical superóxido es formado *in vivo* por la cadena transportadora de electrones en la mitocondria y por el retículo endoplasmático; también las células fagocíticas activadas son capaces de producirlo. En condiciones biológicas El O₂⁻ es poco reactivo. Sólo puede inactivar unas pocas enzimas (McCord y Russell, 1988); tiene una vida media muy corta, y no es capaz de atravesar membranas que no posean un canal aniónico específico.

La existencia de ROS es el producto de un equilibrio entre la acción de sustancias prooxidantes con otras antioxidantes (secuestrantes) que las hacen desaparecer.

El estrés oxidativo es producto de un desequilibrio entre estos agentes en favor de los prooxidantes. Muchos de los agentes prooxidantes son RL, y entre los antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión, N-acetilcisteína, vitaminas A, C y E, cinc y algunos fármacos.

Los RL pueden ser eliminados mediante sistemas enzimáticos y no enzimáticos. En particular, el anión superóxido y el radical hidroxilo son especies con un elevado potencial tóxico, por lo que las células aerobias disponen de mecanismos para bloquear sus efectos.

4.3 Oxígeno singlete

El ¹O₂ es una especie reactiva del oxígeno pero no un radical libre. Es electrofílico y se combina fácilmente con sustancias que poseen enlaces dobles o grupos funcionales con muchos electrones, como son los ácidos grasos polinsaturados, los aminoácidos con azufre, las purinas y los carotenoides. Como son capaces de atenuar este radical, estas sustancias, se denominan secuestrantes de ¹O₂.

El $^1\text{O}_2$ puede ser producido por diversas fuentes, incluidas las enzimáticas, sin embargo el mecanismo de formación de dicho compuesto de mayor importancia en sistemas biológicos se basa en la transferencia de energía desde compuestos fotoexcitados al O_2 (Fisher et al., 2013).

4.4 Compuestos antioxidantes en plantas

Durante la fotosíntesis, el metabolismo en general y situaciones de estrés (depredación, infección, estrés abiótico) se producen ROS en la célula vegetal. Como adaptación a esto, las plantas poseen secuestrantes de ROS, en particular del $^1\text{O}_2$ producido a partir de la fotoactivación de la clorofila.

Entre los compuestos más conocidos se encuentran los pigmentos carotenoides, los tocoferoles (entre ellos la vitamina E), los flavonoides, los ácidos fenólicos y otros polifenoles (Hollman et al., 2011).

El descubrimiento de nuevos compuestos antioxidantes vegetales es un campo de investigación de actual importancia, debido a su aplicación en el desarrollo tanto de fármacos, como de conservantes en alimentos (Martinez et al., 2012; Oliveira et al., 2010; Slamenova y Horvathova, 2013).

5. Infecciones bacterianas

5.1 Introducción

Las bacterias son microorganismos unicelulares sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplasmático, que se reproducen por división asexual. Poseen un único cromosoma circular, y material genético asociado en forma de plásmidos. Sus membranas no poseen esteroides y están rodeadas por una pared celular compleja que presenta dos variantes básicas: Gram positivas y Gram negativas. Las paredes celulares de las Gram positivas presentan una capa gruesa de peptidoglicano, mientras que en las Gram negativas, la capa de peptidoglicano es delgada y existe además, una segunda membrana fosfolipídica, la membrana externa (Figura 12).

Algunas bacterias carecen de pared celular y sobreviven dentro de las células de algún organismo huésped o en ambientes hipertónicos (Murray et al., 2006).

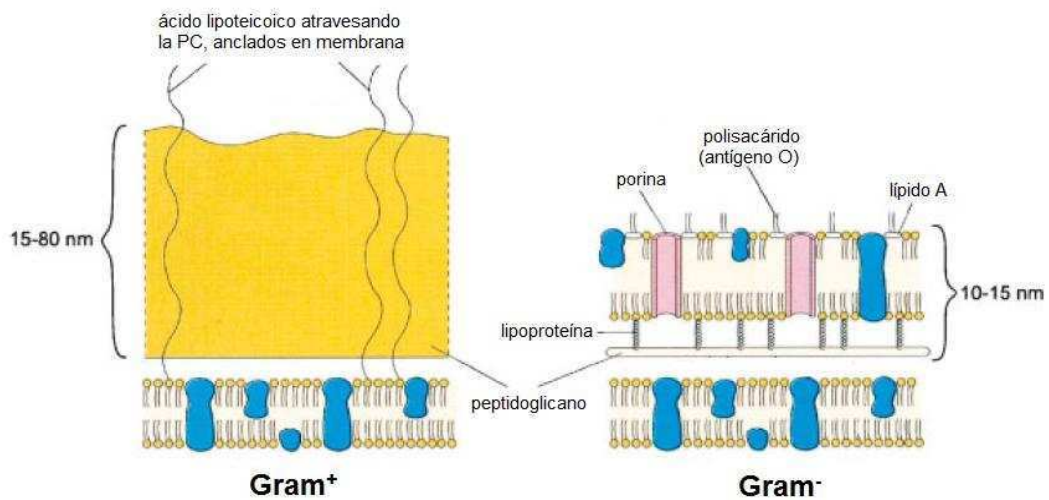


Figura 12: Diferencias estructurales y bioquímicas entre las paredes celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas

Mientras que las bacterias Gram positivas poseen pared celular compuesta fundamentalmente de peptidoglicano, en las Gram negativas esta pared posee un tamaño reducido, y está cubierta por una capa externa de lipopolisacáridos.

Estos microorganismos pueden clasificarse de forma preliminar según su tamaño (en general, de 0,5 a 5 μm), forma (esferas, bastoncillos, espirales) y disposición espacial (células aisladas, en cadenas o formando cúmulos); mientras que su clasificación definitiva se refiere a sus características bioquímicas y genéticas.

El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas; mientras algunas mantienen una relación parasitaria temporal, otras habitan en el ser humano de manera permanente.

Aunque muchas de ellas son relativamente avirulentas, otras son capaces de provocar enfermedades potencialmente mortales. La enfermedad puede deberse a los efectos tóxicos de los productos bacterianos (toxinas) o bien a la invasión de regiones corporales que inicialmente estériles (Murray et al., 2006).

5.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis es una especie bacteriana del género *Staphylococcus*. Consiste en cocos Gram-positivos arreglados en grupos (Figura 14). Se presenta frecuentemente en la piel de humanos y de animales y en membranas mucosas. Es anaerobio facultativo. Tiene la capacidad de formar biopelículas, mediante la secreción de polisacáridos. Posee una alta tasa de resistencia a múltiples antibióticos (metilina, entre ellos), si bien es sensible a la vancomicina, y a la novobiocina.

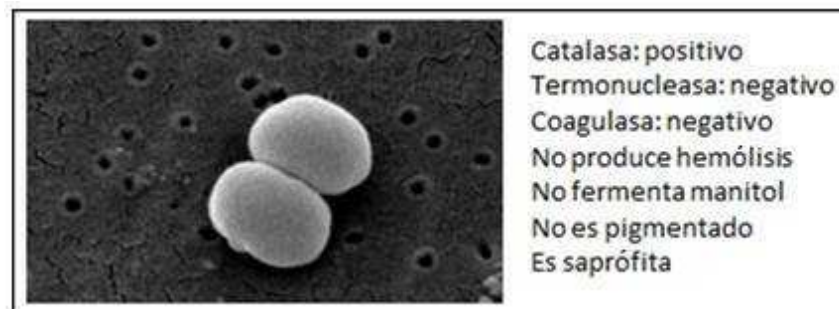


Figura 14: Imagen de microscopía electrónica y características bioquímicas de *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis está involucrado en infecciones de catéteres, implantes de prótesis, de heridas, en cistitis, septicemias, endocarditis y endoftalmitis. También puede estar involucrado en infecciones oportunistas, siendo un mediador de infecciones nosocomiales (Murray et al., 2006).

5.4 *Staphylococcus aureus*

La bacteria *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo (Figura 15) asociada al humano de forma parasítica o comensalista, ya que forma parte de la microbiota normal de la piel, vinculándose a glándulas sudoríparas para evitar condiciones de desecación. La especie es capaz de provocar enfermedades de diversa gravedad como acné, forúnculos, granos, impétigo, neumonía, osteomielitis, endocarditis, meningitis y artritis (Kaplan, 2005); infecciones que pueden llegar a ser particularmente graves en pacientes inmunodeprimidos (Brumfit y Hamilton-Miler, 1989).

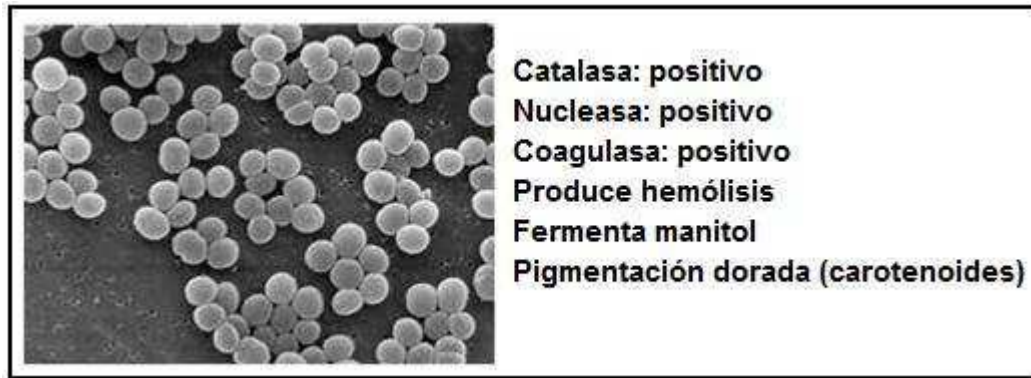


Figura 15: Imagen de microscopía electrónica y características bioquímicas de *Staphylococcus aureus*

Se trata de un organismo anaerobio facultativo. Entre otros factores de virulencia típicos de *S. aureus* se destacan diversas hemolisinas, leucocidinas y algunas clases de enterotoxinas (Madigan et al., 2009), así como diversas adhesinas necesarias para la colonización del tejido del hospedador y para la formación de biopelículas.

Una preocupación cada vez mayor referente al tratamiento de infecciones bacterianas en general, y estafilocócicas en particular, consiste en el aumento de la frecuencia de cepas multiresistentes en la población. En Argentina, la prevalencia de cepas de *S. aureus* meticilino-resistentes (SAMR) en ambientes hospitalarios alcanza ya el 50% (Gardella et al., 2005; Jericet al., 2006).

6. Antibióticos

6.1 Introducción

Los antibióticos son el recurso más útil y efectivo para el control de enfermedades infecciosas, y han sido uno de los descubrimientos más significantes de la medicina moderna. Son compuestos con la capacidad de interferir en procesos bioquímicos esenciales para el desarrollo de las bacterias, como por ejemplo la síntesis y transcripción del ADN y ARN, la síntesis de la pared celular, la síntesis proteica y el metabolismo (Figura 16).

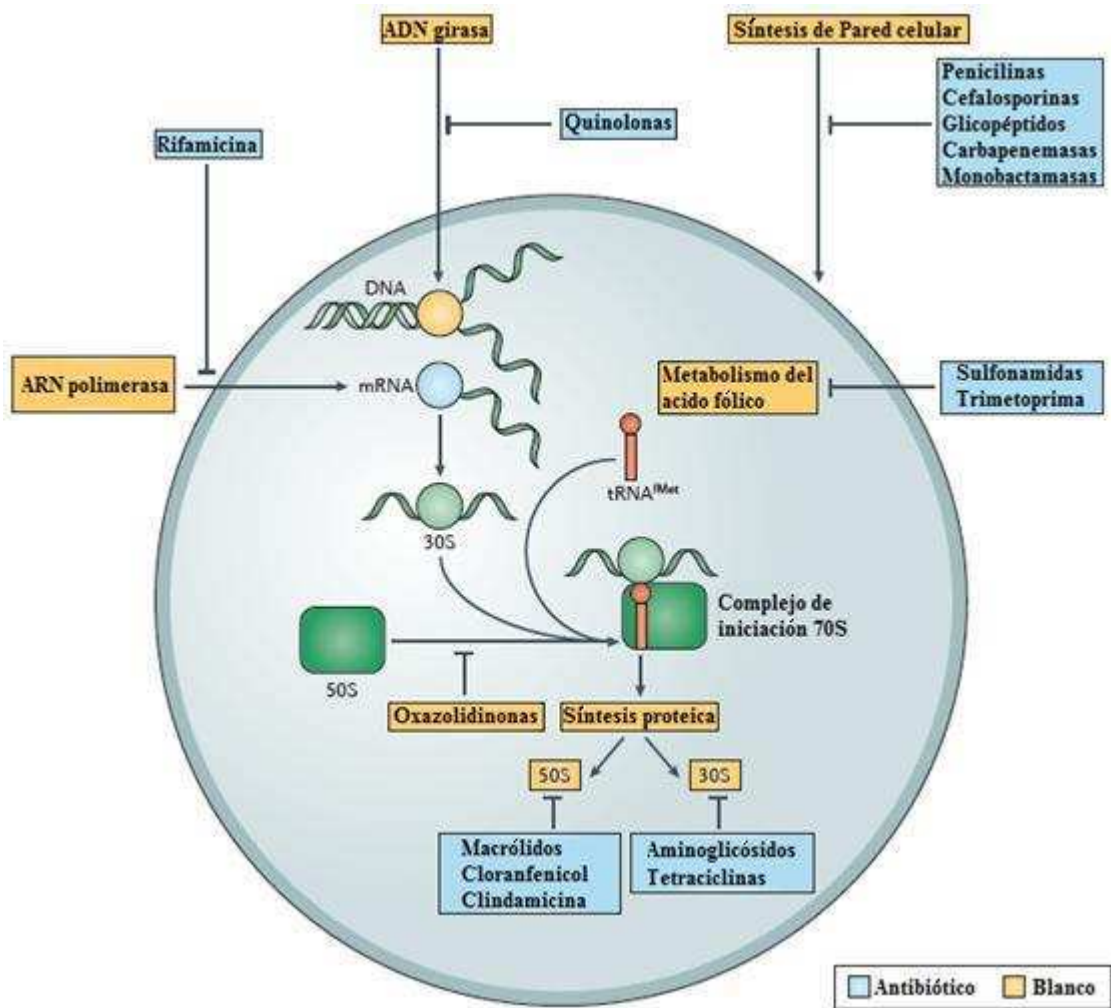


Figura 16: Blancos bioquímicos de los principales grupos de antibióticos

Casi todos los antibióticos en uso hoy en día, son compuestos que se descubrieron entre los años 1940 y 1960. La mayoría de estos compuestos fueron descubiertos a partir de un “screening” de actinomicetos derivados de muestras de suelo (Lewis, 2013).

Sin embargo, su uso indiscriminado impuso una presión de selección sobre los microorganismos patógenos, que derivó en la aparición de resistencias (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen histórico de descubrimiento de los principales antibióticos y aparición de resistencias

Clase de antibiótico; ej.	D	I	R	Mecanismo de acción	Microorganismos blanco
Sulfodrogas; prontosil	1932	1936	1942	Inhibición de la dihidropteroato sintetasa	Bacterias Gram-positivas
β-lactámicos; penicilina	1928	1938	1945	Inhibición de la biosíntesis de la pared celular	Actividad de amplio espectro
Aminoglicósidos; streptomina	1943	1946	1946	Unión a la sub unidad ribosomal 30S	Actividad de amplio espectro
Cloranfenicoles; cloranfenicol	1946	1948	1950	Unión a la sub unidad ribosomal 50S	Actividad de amplio espectro
Macrólidos; eritromicina	1948	1951	1955	Unión a la sub unidad ribosomal 50S	Actividad de amplio espectro
Tetraciclinas; clortetraciclina	1944	1952	1950	Unión a la sub unidad ribosomal 30S	Actividad de amplio espectro
Rifamicinas; rifampicina	1957	1958	1962	Unión a la sub unidad β de la ARN polimerasa	Bacterias Gram-positivas
Glicopéptidos; vancomicina	1953	1958	1960	Inhibición de la biosíntesis de la pared celular	Bacterias Gram-positivas
Quinolonas; ciprofloxacina	1961	1968	1968	Inhibición de la síntesis de ADN	Actividad de amplio espectro
Streptograminas ; streptogramina B	1963	1998	1964	Unión a la sub unidad ribosomal 50S	Bacterias Gram-positivas
Oxazolidinonas; linezolid	1955	2000	2001	Unión a la sub unidad ribosomal 50S	Bacterias Gram-positivas
Lipopéptidos; daptomicina	1986	2003	1987	Despolarización de la membrana celular	Bacterias Gram-positivas
Fidaxomicina	1948	2011	1977	Inhibición de la ARN polimerasa	Bacterias Gram-positivas
Diarilquinolinas; bedaquilina	1997	2012	2006	Inhibición de la F1FO-ATPasa	Actividad de espectro estrecho (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)

D: año de descubrimiento; I: año de introducción al mercado; R: año de la primer resistencia reportada.

La resistencia múltiple a diferentes antibióticos en microorganismos responsables de enfermedades infecciosas, tales como *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*, hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos (Boucher et al., 2009).

6.2 Resistencia a antibióticos

Los antibióticos inhiben funciones celulares esenciales de las bacterias. En contrapartida, diferentes mecanismos bioquímicos y genéticos que pareciesen explotar todas las estrategias posibles para evitar que las drogas actúen sobre su blanco, le permiten a las bacterias desarrollar resistencia frente a estos compuestos.

Los mecanismos de resistencia a antibióticos más estudiados incluyen (Figura 17):

- la destrucción del antibiótico (por ejemplo, degradación de la penicilina por β -lactamasas).
- modificación del blanco de acción (por ejemplo, la mutación en la proteína RpsL ribosomal de la sub unidad 30S confiere resistencia a la estreptomicina).
- disminución de la incorporación de la droga o incremento en la exclusión de la misma (por ejemplo, incremento en el flujo de salida de linezolid por la bomba transportadora múltidroga AcrAB-TolC).
- vías de síntesis o degradación alternativas y redundancias bioquímicas.
- sobreexpresión del blanco del antibiótico (Payne et al., 2007).

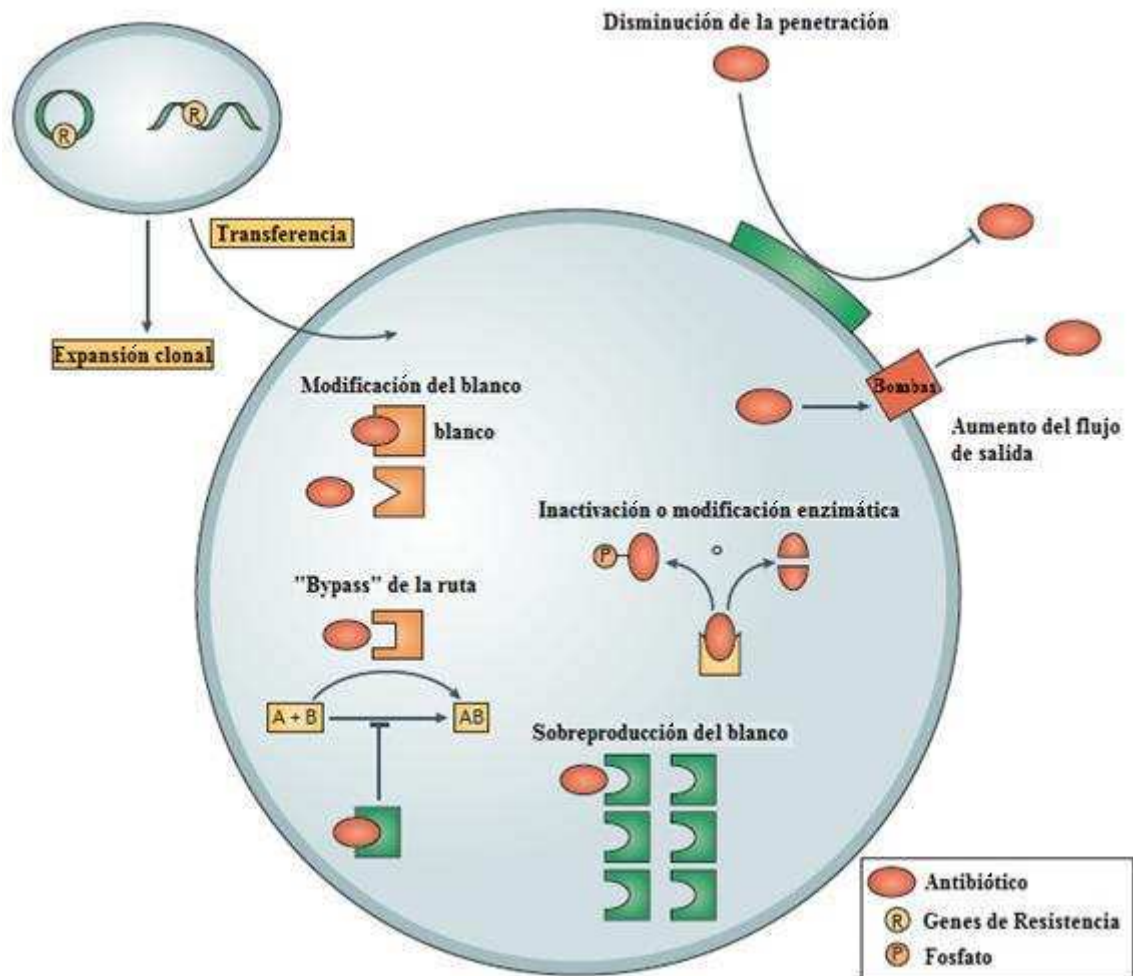


Figura 17: Mecanismos bioquímicos y genéticos vinculados a la resistencia a antibióticos

Además de los resistentes, en una población bacteriana también existen microorganismos sensibles al efecto del antibiótico, pero con la capacidad de tolerar la presencia del mismo, gracias a la capacidad de entrar en estado de latencia. Estos microorganismos, denominados persistentes, no son mutantes; son variantes fenotípicas producidas estocásticamente en la población de células en división activa y cuya abundancia relativa alcanza el 1 % en la fase tardía de crecimiento exponencial (Keren et al., 2004). Los microorganismos persistentes, son células en latencia que no se dividen, lo que explica la tolerancia a antibióticos que tienen como blancos de acción estructuras y biomoléculas características de células con alta actividad replicativa o metabólica. Son eliminados con mucha mayor lentitud por las drogas antimicrobianas y cuando los niveles de las mismas descienden, retoman su crecimiento normal (Balaban et al., 2004; Dorr et al., 2010).

Se desconocen los mecanismos involucrados en la formación de individuos persistentes (Lewis, 2010). La importancia de estos en la manifestación clínica de tolerancias a antibióticos fue recientemente demostrada, cuando se observó que elevados niveles de persistentes eran seleccionados durante tratamientos antimicrobianos en infecciones causadas por *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* (LaFleur et al., 2010; Mulcahy et al., 2010).

La participación de los microorganismos resistentes y los persistentes en las enfermedades infecciosas refractarias a antibióticos, incrementa la necesidad del descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos con la capacidad de eliminar tanto a los patógenos en división activa, como a los latentes (Lewis, 2013).

6.3 Antibióticos naturales

Desafortunadamente, los esfuerzos para el desarrollo de plataformas de alta tecnología como nuevas fuentes de antibióticos han fracasado debido a problemas como la identificación de compuestos sintéticos que efectivamente penetren en células bacterianas. No está claro por qué algunos compuestos pueden romper la barrera más restrictiva de las Gram negativas y otros no. En efecto, la presencia de una barrera eficaz de penetración y la escasez de compuestos nuevos con la capacidad de penetrarla, son los dos problemas responsables de la falta de progreso en el campo (Lewis et al., 2013).

Si bien el uso de resinas, decocciones, macerados y aceites esenciales vegetales en el tratamiento de infecciones, ha sido durante siglos una práctica habitual en medicinas tradicionales de diferentes partes del mundo; la búsqueda de compuestos naturales con actividad antimicrobiana se centró en especies bacterianas y fúngicas. La aparición de microorganismos resistentes a antibióticos, ha llevado a la Organización Mundial de la Salud a impulsar un programa de mejoramiento en el uso y control de los antibióticos conocidos, y también, al desarrollo de nuevos antibióticos. Las especies vegetales son vistas como una fuente de compuestos antimicrobianos que pueden dar respuesta a este problema. Fruto de estas estrategias, entre 2005 y 2010 se han aprobado 19 nuevos

productos para el control de infecciones bacterianas, con compuestos activos descubiertos en plantas (Abreu et al., 2012).

La identidad química de las sustancias antimicrobianas presentes en las plantas es muy diversa, y dichos compuestos suelen ser metabolitos secundarios implicados en las defensas naturales de las plantas frente a los microorganismos. Algunos de los grupos químicos más representativos se muestran en la Figura 18 y son: flavonoides, alcaloides, terpenos, quinonas, taninos y cumarinas (Savoia, 2012):

- Los flavonoides son compuestos fenólicos presentes en todas las especies de plantas terrestres. La estructura básica es el 2-fenil-benzopirano, y consiste de dos anillos bencénicos unidos a través de un anillo pirano (Figura 18). Pueden estar involucrados en las defensas bioquímicas de la planta frente a la radiación ultravioleta. En total, existen 14 clases de flavonoides diferenciados por la naturaleza química y la posición de los sustituyentes en cada anillo. Se piensa que las propiedades antibacterianas de los flavonoides provienen de su capacidad interactuar con proteínas extracelulares solubles y con las membranas bacterianas. Recientemente, dos flavonoides aislados de *Leiothrix spiralis*, una planta sudamericana, mostraron actividad bactericida frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Algunos flavonoides son efectivos frente a *Mycobacterium tuberculosis* (Savoia, 2012).

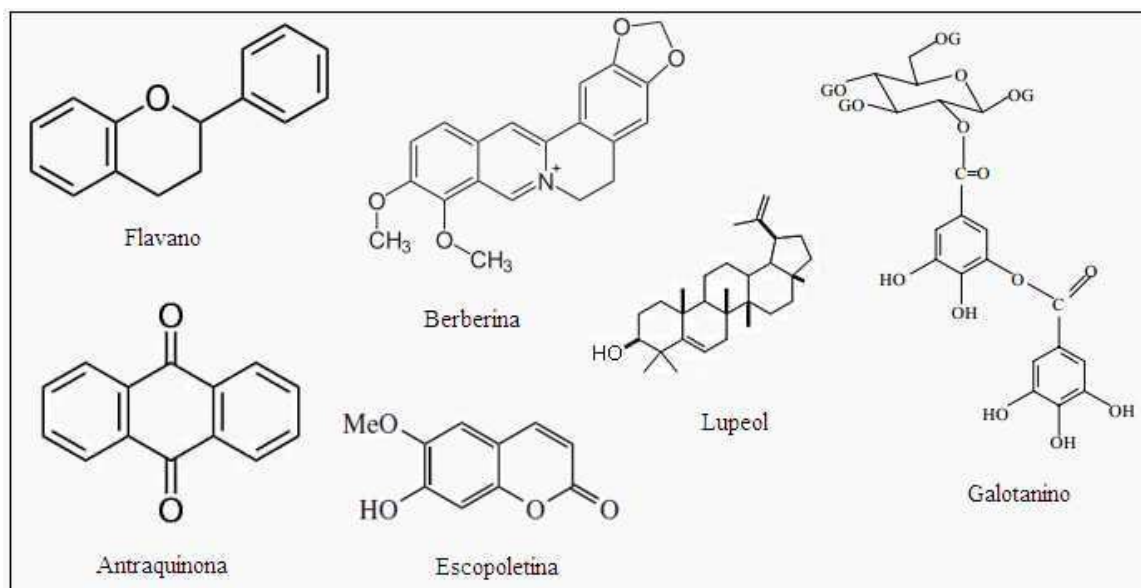


Figura 18: Compuestos pertenecientes a los principales grupos químicos de metabolitos vegetales con actividad antimicrobiana

Flavano (flavonoide), berberina (alcaloide), lupeol (terpeno), antraquinona (quinona), galotanino (tanino) y escopoletina (cumarina)

- Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno, derivados del metabolismo de los aminoácidos. Su naturaleza química es variada. No todas las familias de plantas sintetizan alcaloides; se estima que los géneros de especies que sí lo hacen representarían el 3% de las angiospermas. Algunas familias conocidas que poseen alcaloides son Amaryllidaceae, Fabaceae, Liliaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rutaceae y Solanaceae. Sus vías de acción son muy diversas: disruptores de las membranas bacterianas, agentes intercalantes del ADN, inhibidores de ARN polimerasa, girasa y topoisomerasa (Savoia, 2012).

- Los terpenos se originan por polimerización enzimática de unidades de isopreno que sufren modificaciones. La mayoría de los terpenos tienen estructuras multicíclicas, las cuales difieren entre sí no sólo en grupo funcional sino también en su esqueleto básico de carbono. Son usualmente compuestos lipofílicos, y pueden hallarse presente en resinas. Se ha descrito su actividad antibacteriana en especies Gram positivas y *M. tuberculosis*. El mecanismo de acción no se conoce completamente, pero se especula que involucra la disrupción de las membranas bacterianas (Savoia, 2012).

- Las quinonas son compuestos aromáticos con al menos dos grupos ceto como sustituyentes. Son ubicuas en la naturaleza, y forman parte de los metabolitos secundarios de plantas con potencial antimicrobiano. Pueden producir RL y acomplejarse con aminoácidos nucleofílicos de proteínas bacterianas, haciéndoles perder su función. En particular, un grupo de quinonas, las antraquinonas, poseen actividad antimicrobiana de amplio espectro, atacando proteínas de adhesión, polipéptidos de la pared microbiana y enzimas asociadas a sus membranas (Savoia, 2012).

- Los taninos son polímeros de compuestos polifenólicos presentes en casi todas las partes de la planta. Se caracterizan por su actividad antimicrobiana, debido a la inactivación de adhesinas bacterianas, enzimas y proteínas de transporte (Savoia, 2012).

- Las cumarinas son compuestos fenólicos procedentes de la ruta del ácido shikímico. Tienen función protectora en la planta, frente a radiación ultravioleta. Algunas furanocumarinas son fotosensibilizantes y se pueden utilizar para el tratamiento de la psoriasis (Savoia, 2012).

Además, los compuestos presentes en las plantas pueden actuar como complementos de antibióticos ya existentes, ayudando a revertir la resistencia a los mismos de microorganismos resistentes. Esta acción es ejercida principalmente a través de la inhibición de las bombas de exclusión de las membranas, la inhibición de mecanismos de “quorum sensing” y la formación de biopelículas (Savoia, 2012).

7 Terapia Fotodinámica antimicrobiana

7.1 Introducción

Además de su rol en terapia antitumoral, la TFD se emplea en la eliminación de microorganismos, TFD antimicrobiana (TFDA). Tiene un futuro promisorio en el tratamiento de infecciones bacterianas, virales (Segvi et al., 2013; St Denis et al., 2011 b; Kharkwal et al., 2011), micosis (Calzavara-Pinton et al., 2012; Lyon et al., 2011), y en la eliminación de eucariotas unicelulares (en particular, tripanosomas) (Baptista y

Wainwright, 2011). También se propuso su uso en la desinfección de aguas (Coppellotti et al., 2012).

La TFDA se ha implementado en el tratamiento de diversas patologías tales como úlceras crónicas, infecciones de heridas, quemaduras infectadas (Jori, 2006), y una variedad de infecciones orales y acné (Demidova y Hamblin, 2004; Kharkwal et al., 2011). Una ventaja clave en la clínica de la TFDA de las lesiones cutáneas es la buena curación y el excelente resultado cosmético post-tratamiento. Además las leishmaniasis cutáneas han sido tratadas con éxito con TFDA (Van der Snoek et al., 2008).

La ventaja de la TFDA es que se puede usar en caso de resistencias a antibióticos (Vera et al., 2012). También se han desarrollado técnicas ópticas empleando FS en el monitoreo de infecciones (Hamblin et al., 2003).

Además la TFDA de componentes celulares de la sangre se está estudiando para su uso como técnica de esterilización sanguínea, reduciendo el riesgo de transmisión de enfermedades por transfusión (Wainwright y Baptista, 2011).

Mientras que para la TFD antitumoral se utilizan como FS principalmente moléculas derivadas de un núcleo tetrapirrólico, de baja toxicidad, localización selectiva en células tumorales y con absorción de luz a longitudes de onda cercanas al infrarrojo, donde la penetración de la luz en los tejidos animales es máxima (ventana terapéutica), para la TFDA es posible utilizar otro tipo de moléculas, con máximos de absorción a longitudes de onda menores (Wainwright, 2010).

A diferencia de lo que ocurre en células de mamíferos, en las cuales el mayor daño oxidativo luego del tratamiento fotodinámico se observa en mitocondrias, membrana plasmática y lisosomas (dependiendo del tipo de FS utilizado), en células bacterianas el daño se centra en la membrana externa, con un posible rol para el daño al DNA y el daño a proteínas enzimáticas y estructurales.

7.2 Ventajas de la TFDA

Como se resume en la Figura 19, la TFDA presenta ventajas por sobre otros métodos antimicrobianos tales como su amplio espectro de acción, eficiencia frente a cepas resistentes a antibióticos, bajo potencial mutagénico, ausencia de aparición de cepas resistentes (debido a la baja especificidad en los blancos bioquímicos de acción) y la selectividad debida a la aplicación localizada del FS y/o la luz incidente (Dai et al., 2012).

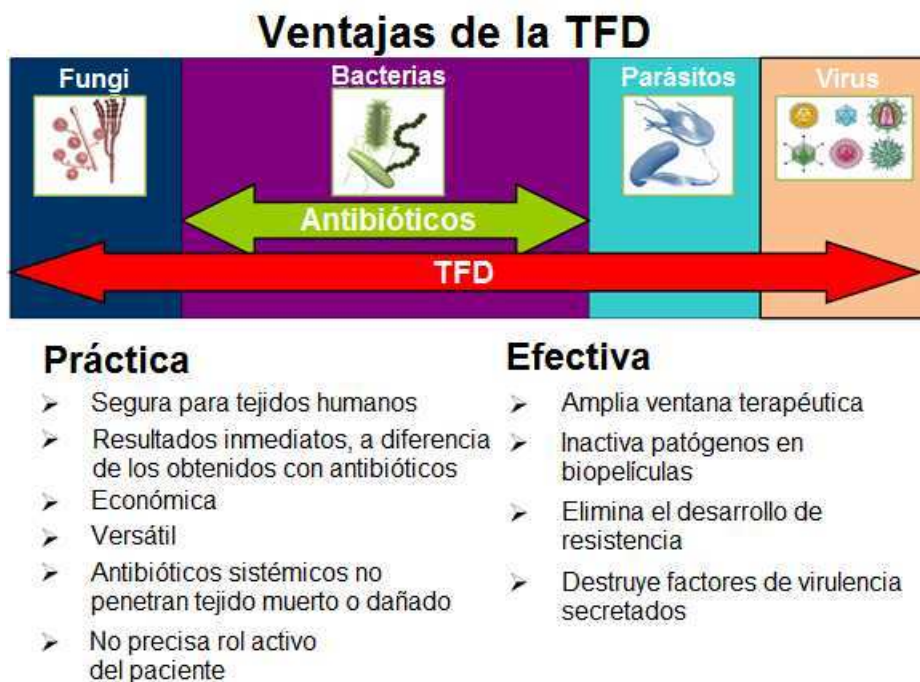


Figura 19: Principales ventajas de la TFDA sobre los antibióticos en la eliminación de patógenos

Cepas metilcilino resistentes de *Staphylococcus aureus* (MRSA) resultan sensibles a la TFDA inclusive más que la cepa sensible al antibiótico (Tang y Hamblin, 2007). Además, la ausencia de aparición de resistencias a la TFDA se investigó realizando irradiaciones seriadas subletales seguidas por la recuperación de la población parcialmente fotosensibilizada y no se detectó aparición de resistencias en hasta 10 ciclos de TFD (Tavares et al., 2010).

7.3 Diferencias entre bacterias Gram positivas y negativas y su rol en la TFDA

Las características morfológicas y bioquímicas de la membrana y pared celular en bacterias Gram positivas y Gram negativas, son importantes en cuanto a la respuesta a la TFDA.

Es un hecho demostrado que debido a las diferencias estructurales que caracterizan a ambos grupos, las bacterias Gram positivas son más sensibles a la TFDA que las Gram negativas, ya que la barrera de múltiples capas (glicocálix, lipopolisacáridos, bicapa lipídica externa, etc.) que constituye la superficie externa de las bacterias Gram negativas impide el ingreso del FS (Demidova y Hamblin, 2004). Así, el tratamiento de bacterias Gram negativas mediante TFDA puede combinarse con diversas técnicas que aumenten la permeabilidad de la pared externa, como por ejemplo la inducción de un desequilibrio electrostático en esta estructura mediante el quelado de metales divalentes utilizando ácido etilendiaminotetraacético, lo cual conduce a una desorganización de la pared como consecuencia de la repulsión entre las cargas negativas de elementos estructurales.

Los FS catiónicos tales como fenotiazinas, ftalocianinas o porfirinas, a valores de pH fisiológicos pueden, no obstante, unirse a la superficie tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas, desplazando a los metales divalentes que estabilizan las cargas negativas estructurales presentes en la superficie externa, ya que poseen constantes de afinidad de 2 a 4 órdenes de magnitud mayores. Además, debido a su carácter anfipático, el mismo FS puede actuar como elemento de desorganización de la pared. Empleando este tipo de FS, entonces, es posible fotoinactivar bacterias Gram negativas sin necesidad de un tratamiento previo (Jori, 2006). Se ha demostrado, también, que los FS catiónicos son especialmente eficientes en la erradicación de biopelículas de las bacterias Gram positivas *S. aureus* y *S. epidermidis* (Gad et al., 2004).

7.4 Fotosensibilizantes en TFDA

El coeficiente de generación de $^1\text{O}_2$ no es el único determinante en la efectividad de un FS. La actividad de éste, depende tanto de las características fisicoquímicas del mismo, como de la morfología de la bacteria a eliminar (Kuznetsova et al., 2007).

Distintos FS interactúan sobre el patógeno de distinta manera, distinguiéndose en base a esta característica tres clases de FS: a) aquellos que se unen fuertemente a la pared celular y son incorporados al interior del microorganismo, como el conjugado poli-L-lisina Clorina e6; b) los que se unen débilmente a la bacteria de forma que la producción extracelular de ROS cumple un rol importante, como el FS catiónico azul de Toluidina; y c) FS como el rojo de Bengala, que no se unen a la superficie del patógeno, sino que entran a la célula a través de un proceso controlado por difusión (Demidova y Hamblin, 2005).

La incorporación por los microorganismos del FS empleado, es importante en relación a la efectividad de la TFDA. Los FS cargados positivamente a pH fisiológico se unen más eficientemente a las paredes celulares de las bacterias y por lo tanto pueden dañarlas una vez activados por la luz. Realizando la TFDA contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, empleando diferentes porfirinas catiónicas meso-sustituidas, se observó que cuantas más cargas positivas tuviesen, mayor era la acción sobre ambos tipos de microorganismos. Los tiempos de preincubación en oscuridad con el FS también influyen, siendo más efectivos los tratamientos con mayores tiempos de incubación (Alves, 2009).

La actividad óptima en la eliminación de bacterias, hongos y protozoos patógenos se encontró en FS cargados positivamente a pH fisiológico y una moderada hidrofobicidad. Estos FS en concentraciones micromolares pueden inducir reducciones de más de 4-5 logs en la población microbiana, luego de tiempos de incubación cortos y dosis de luz bajas (Jori, 2006).

Otro factor importante en la TFDA es la densidad celular de la población microbiana a eliminar. Se ha reportado (Demidova y Hamblin, 2005) que cuanto mayor es la densidad poblacional, mayor cantidad de FS es requerido para eliminar las bacterias.

Esto se debe a la competencia de las mismas por las moléculas del FS y las especies reactivas generadas a partir de él. Así también, es necesaria una mayor concentración de FS para eliminar células fúngicas que células bacterianas. Esto se explica por el mayor tamaño de las células eucariotas y el mayor requerimiento de especies reactivas, por ende, para eliminarlas (Demidova y Hamblin, 2005).

Si bien la identidad química de los FS empleados en TFDA es muy diversa, por lo general, los más empleados son fenotiazinas, porfirinas y ftalocianinas (Calzavara-Pinton et al., 2012; St Denis et al., 2011; Kharkwal et al., 2011). En la tabla 5 se muestra un resumen de los principales FS de uso en TFDA clínica y su efecto sobre diferentes microorganismos (Wainwright, 2010):

Tabla 5: Actividad de los FS empleados en TFDA

Fotosensibilizante	Bacterias		Hongos	Virus	Protozoos
	Gram positivas	Gram negativas			
Azul de Toluidina	+	+	+	+	+
Cristal violeta	+	+	+	N/R	+
Eritrosina	+	-	N/R	N/R	N/R
Floxina B	+	-	N/R	N/R	N/R
Verde de Indocianina	+	-	N/R	N/R	N/R

+: Efectivo en la eliminación; - No efectivo en la eliminación; N/R: No reportado

Como FS control en nuestro trabajo emplearemos azul de Toluidina y Clorina e6. El Azul de Toluidina es una fenotiazina catiónica empleada comercialmente como FS (Figura 20). Se emplea en la eliminación de diferentes especies Gram positivas, Gram negativas y fúngicas; y en el tratamiento de infecciones orales y perimplantitis (Wainwright, 2010) y se ha utilizado con éxito en la eliminación de biopelículas de especies de estafilococos resistentes a antibióticos (Sharma et al., 2008).

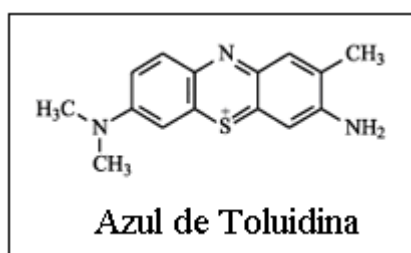


Figura 20: Estructura química del azul de Toluidina

La Clorina e6 es una porfirina derivada de la clorofila *a* (Figura 21). Absorbe luz en la región roja del espectro visible y su acción fotosensibilizante se produce principalmente mediante la producción de $^1\text{O}_2$ (Huang et al., 2012). Se ha reportado el uso de este FS tanto en TFD del cáncer, como en TFDA de microorganismos como *S. aureus* metilciclino resistentes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, siendo más efectivo frente a las dos primeras (Park et al., 2010). También ha sido utilizada en la eliminación de *Candida albicans* y se ha fusionado a anticuerpos contra *S. aureus* aumentando así, la selectividad de la TFDA (Embleton et al., 2002).

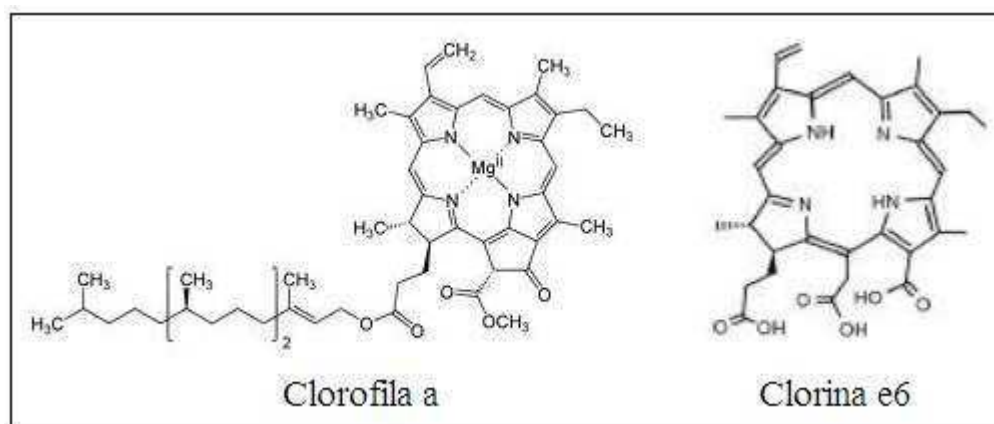


Figura 21: Estructura química de la clorofila *a* y la Clorina e6

La Hematoporfirina también ha sido empleada en TFDA, siendo efectiva frente en bacterias Gram positivas, algunas especies de micoplasmas y *C. albicans*; pero no frente a bacterias Gram negativas. Otro empleo de las porfirinas en TFDA, consiste en suministrar ALA precursor de la síntesis de porfirinas a bacterias, levaduras, hongos y parásitos eucariotas con el fin de que se acumule en ellos la Protoporfirina IX. Se ha reportado la eliminación de estos microorganismos mediante esta vía (Harris y Pierpoint, 2012).

7.5 Aplicaciones ambientales de la TFDA

La TFDA ha sido propuesta también, para su aplicación en desinfección de aguas, en reemplazo del tratamiento con cloro (Jori et al, 2011). Actualmente se realizan numerosos estudios para aplicarla en la eliminación de bacterias, hongos, virus, microorganismos eucariotas e invertebrados; de masas de agua expuestas a fuentes de luz artificiales o a la luz solar (Fabris et al., 2012a).

En uno de estos trabajos, empleando proflavina como FS, la TFDA resultó efectiva contra bacterias coliformes (termotolerantes y glucosa positivas), *Enterococcus* y *Pseudomonas*, pero no para esporas de *Clostridium*. Sin embargo, estas esporas podrían eliminarse por pasos de sedimentación y filtrado que forman parte obligada de protocolos estándar de tratamiento de aguas, haciendo posible la sustitución del cloro por el tratamiento fotodinámico, siendo necesario el posterior pasaje por carbono para la eliminación del FS y los productos de fotólisis (Kuznetsova, 2007).

Para facilitar la eliminación del FS luego de la TFDA, Magaraggia et al. (2013) desarrollaron partículas de sílicagel de 9 μm conjugadas a una porfirina anfipática tetracatiónica como FS. Estas partículas incrementaron la resistencia del FS al fotoblanqueo y permitieron la eliminación fotodinámica de *S. aureus* metilciclino resistentes y *E. coli* en hasta cuatro órdenes de magnitud. Mediante filtrado del agua, las partículas pudieron recuperarse y reutilizarse.

Se ha demostrado también, la efectividad de la TFDA en el tratamiento de aguas residuales. Se consiguió la eliminación de *Escherichia coli* empleando luz solar y porfirinas catiónicas como FS (Alves et al., 2008).

Alves et al. (2011) también han investigado la TFDA sobre la especie *Vibrio fischeri*. Utilizando porfirinas catiónicas con diferentes sustituciones, fueron capaces de eliminar el microorganismo empleando luz solar. Observaron que la fotosensibilización se produjo mejor en aguas cálidas con pHs cercanos a 7,5 y que la salinidad del agua no afectó la respuesta a la TFDA.

Las porfirinas mencionadas han sido empleadas en la eliminación de bacterias y pequeños invertebrados en tanques de siembra y cultivo de peces, aprovechando el amplio espectro de absorción de las mismas frente al espectro de la luz solar (Coppellotti et al., 2012).

Actualmente, se está estudiando el uso de la TFD en la eliminación de larvas de invertebrados que actúan como vectores de enfermedades tales como el dengue y la malaria.

Fabris et al. (2012b) han conseguido eliminar las larvas de *Anopheles gambiae* y *A. arabiensis*, mosquitos vectores de la malaria, empleando FS porfirínicos y luz solar.

Por otra parte, Lucantoni et al. (2011) reportaron la eliminación de larvas de *Aedes aegypti*, mosquito vector del dengue, a partir de una porfirina catiónica sintética e irradiación artificial, con dosis lumínicas 50 veces menores a las correspondientes a la irradiación con luz solar. La mortalidad de las larvas se produjo por daños en el tubo digestivo luego de la ingestión del FS y la irradiación.

El potencial de las aplicaciones de la TFDA a partir de una fuente de luz de costo nulo y accesible como la solar, impulsa al estudio de la misma.

7.6 Fotosensibilizantes de origen vegetal en TFDA

El rol de las plantas como fuente de principios activos se encuentra bien establecido. Algunos FS de uso en TFDA poseen, de hecho, origen vegetal, como la clorofila y otras porfirinas, aunque las principales clases de fotosensibilizantes vegetales son los polienos (acetilenos, tiofenos, tiofenoles y compuestos relacionados), furanilos, alcaloides y quinonas complejas (Ebermann et al., 1996). Se ha establecido que FS con carga positiva tienen mayor eficiencia en la eliminación de bacterias que poseen cargas negativas en sus membranas, especialmente frente a las Gram positivas (Alves et al., 2009).

La previamente mencionada Hipericina, FS aislado a partir de extractos de *H. perforatum*, también ha sido empleada en TFDA. Mediante un mecanismo de Tipo II, mediado por $^1\text{O}_2$, fue capaz de eliminar diferentes especies de *Staphylococcus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* (Agostinis et al., 2002; Hudson y Towers, 1991).

Las antraquinonas descubiertas en *Heterophyllaea pustulata*: soranjidiol, rubiadina y (s)5,5'-bisoranjidiol (Figura 22) también han sido empleadas como FS en TFDA. Estos compuestos tienen la capacidad de generar anión superóxido y oxígeno singlete en oscuridad, lo que les confiere toxicidad intrínseca frente a microorganismos como *S.*

aureus. Sin embargo, la actividad bactericida se incrementa con la irradiación en un mecanismo mediado por el $^1\text{O}_2$ (Comini et al., 2011).

Se han reportado la existencia de compuestos FS llamados hipocrelinas, presentes en *Hypocrella bambusae* y *Shiria bambusicola*, dos plantas utilizadas en la medicina tradicional china. Estos compuestos han sido eficaces en la eliminación de bacterias Gram positivas, pero no en la de Gram negativas (Hudson y Towers, 1991).

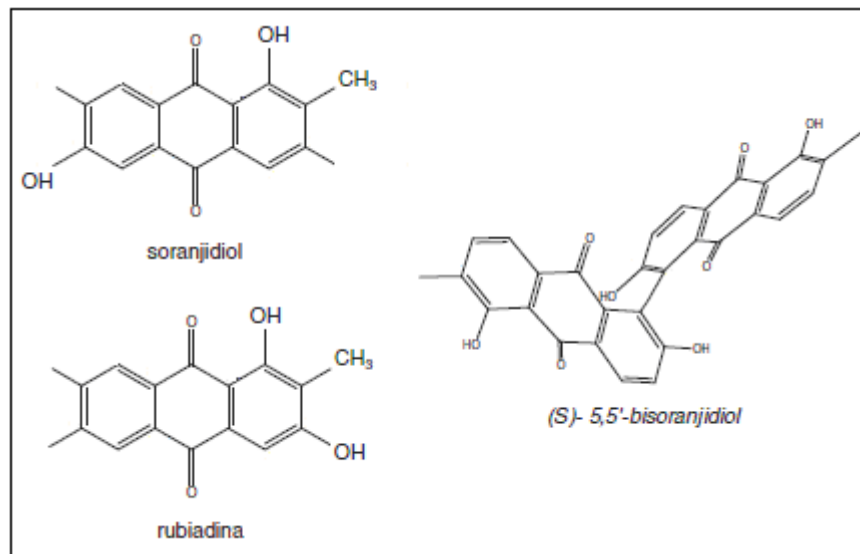


Figura 22. Antraquinonas descubiertas en *Heterophyllaea pustulata*, empleadas como FS en TFDA

En cuanto a reportes de extractos vegetales empleados como FS, se ha reportado que los extractos de etanol y hexano de *Alternanthera brasiliana* y *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae) resultaron fotosensibilizantes para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Candida dubliniensis*. Ambos extractos se obtuvieron a partir de la planta completa y absorbieron luz de longitud de onda entre 650 y 700 nm. El mecanismo de acción fue vía producción de $^1\text{O}_2$. Al analizar la composición química de los extractos mediante métodos cromatográficos y espectrofotométricos, los autores detectaron la presencia de esteroides, triterpenos y flavonoides (Andreazza et al., 2013; Gasparetto et al., 2010).

Por otra parte, extractos etanólicos de tallos y hojas de la especie vegetal *Costus cf. arabicus* han resultado fotosensibilizantes sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus*

aureus. Este tratamiento potenció la acción de los antibióticos sobre cepas resistentes de los dos microorganismos. De esta forma, la TFDA y el uso tradicional de antibióticos pueden actuar sinérgicamente (Cunha et al, 2011).

Han sido informados, además, dos “screenings” de compuestos FS vegetales para uso en TFDA, llevados a cabo en los EEUU y México; y en Borneo. En el primer caso, se estudiaron especies vegetales de regiones áridas y semiáridas del sur-oeste de los EEUU y norte de México, testeando la actividad fototóxica de extractos metanólicos de 115 especies vegetales (pertenecientes a 57 géneros y 8 familias) frente a *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Se encontró que la mayoría de las especies de la familia *Asteraceae*, en particular las del género *Helianthus*, poseen la capacidad de inhibir los mencionados microorganismos en presencia de radiación UVA. Resultados similares se encontraron empleando la especie *Larrea tridentata* (*Zygophyllaceae*). Algunas de estas especies presentaron además de su actividad como FS, actividad antimicrobiana en oscuridad. Sin embargo, la actividad FS fue mucho más efectiva sobre la viabilidad de los microorganismos (Downum et al., 1989).

Respecto al estudio realizado para encontrar nuevos FS a partir de plantas terrestres en Sarawak, Borneo, entre 2004 y 2008 se estudiaron 2400 extractos de 888 plantas, donde fueron reportadas nuevas especies cuyos extractos fueron FS en bacterias y hongos. Actualmente se están llevando a cabo los aislamientos de los compuestos activos (Jong et al., 2013).

REFERENCIAS

Abreu AC, McBain AJ, Simões M (2012) Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat Prod Rep.* 29(9):1007-1021.

Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte P A (2002) Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol.* 34:221-241.

Allevato MA (2006) Terapia fotodinâmica. *Act Terap Dermatol.* 29:302-311.

Alvarez MG, Prucca C, Milanesio ME, Durantini EN, Rivarola V (2006) Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C60 dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(12):2092-2101.

Alves E, Carvalho CM, Tomé JP, Faustino MA, Neves MG, Tomé AC, Cavaleiro JA, Cunha A, Mendo S, Almeida A (2008) Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35(11):1447-1454.

Alves E, Costa L, Carvalho CM, Tomé JP, Faustino MA, Neves MG, Tomé AC, Cavaleiro JA, Cunha A, Almeida A (2009) Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* 9:70.

Alves E, Faustino MA, Tomé JP, Neves MG, Tomé AC, Cavaleiro JA, Cunha Â, Gomes NC, Almeida A (2011) Photodynamic antimicrobial chemotherapy in aquaculture: photoinactivation studies of *Vibrio fischeri*. *PLoS One.* 6(6):e20970.

American Cancer Society (2011) *Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition.* Atlanta: American Cancer Society.

Anderson GG, O'Toole GA (2008) Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:85–105.

Andreazza NL, de Lourenco CC, Siqueira CA, Sawaya AC, Lapinski TF, Gasparetto A, Khouri S, Zamuner SR, Munin E, Salvador M (2013) Photodynamic inactivation of yeast and bacteria by extracts of *alternanthera brasiliana*. *Curr Drug Targets*. 14(9):1015-1022.

Anesini C, Genaro A, Cremaschi G, Sterin Borda L, Cazaux C, Borda E (1996) Immunomodulatory activity of *Larrea divaricata* Cav. *Fisioter*. 52: 329-333.

Anesini C, Boccio J, Cremaschi G, Genaro A, Zubillaga M, Sterin Borda L, Borda E (1997) In vivo antitumour and acute toxicity study of *Larrea divaricata* Cav. *Extract Phytother Res*. 11: 521-523.

Anesini C, Genaro A, Cremaschi G, Sterin Borda L, Borda E (1999) Antimitogenic effect of *Larrea divaricata* Cav: Participation in arachidonate metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 122: 245–252.

Arvelo F, Merentes E, Cotte C (2000) Multidrug or pleiotropic resistance. *Acta Cient Venez*. 51(1):45-52.

Ayensu ES, DeFilipps RA (1978) *Endangered and Threatened Plants of the United States*. Smithsonian Institution Press and World Wildlife Fund, Washington, DC.

Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 305, 1622–1625.

Baptista MS, Wainwright M (2011) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. *Braz J Med Biol Res*. 244(1):1-10.

Barbini L, Lopez P, Ruffa J, Martino V, Ferraro G, Campos R, Cavallaro L (2006) Induction of apoptosis on human hepatocarcinoma cell lines by an alkyl resorcinol isolated from *Lithraea molleoides*. *World J Gastroenterol*. 12: 5959-5963.

Ben Amor T, Jori G (2000) Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. *Insect Biochem Mol Biol.* 30: 915-925.

Blanchard EM, Hesketh PJ (2008) Nausea and Vomiting. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* 8th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2639-2646.

Bonnet R (2000) Chemical aspect of photodynamic therapy. Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam, ISBN 90-5699-248-1; ISSN 1029-3654 291-305.

Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J (2009) Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.*48(1):1-12.

Bowers AG (1999) Phytophotodermatitis. *Am J Contact Dermat.* 10(2):89-93

Boyd MR (1989) Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen. *Principles and Practice of Oncology Updates.* 3:1-12.

Brancaleon L, Moseley H (2002) Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 17(3):173-186.

Brumfitt W, Hamilton-Miller J. (1989) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med.* 320:1188-1196.

Calzavara-Pinton P (1995) Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours. *J Photochem Photobiol B.* 29(1):53-57.

Calzavara-Pinton P, Rossi MT, Sala R, Venturini M (2012) Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochem Photobiol.* 88(3):512-522.

Chapman J, Stobbe C, Arnfield M (1991) Oxygen dependency of cell killing in vitro by light-activated Photofrin II. *Radiat Res.* 126: 73-79.

Colton C, Yao J, Grossman Y, Gilbert D (1991) The effect of xanthine/xanthine oxidase generated reactive oxygen species on synaptic transmission. *Free Radic Res Commun.* 14(5-6):385-393.

Comini LR, Montoya SC, Páez PL, Argüello GA, Albasa I, Cabrera JL (2011) Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *J Photochem Photobiol B.* 102(2):108-114.

Coppellotti O, Fabris C, Soncin M, Magaraggia M, Camerin M, Jori G, Guidolin L (2012) Porphyrin photosensitised processes in the prevention and treatment of water- and vector-borne diseases. *Curr Med Chem.* 19(6):808-819.

Corrigan RM, Rigby D, Handley P and Foster TJ (2007) The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiol.* 153:2435-2446.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM (1997) Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod.* 60: 52-60

Cunha FA, Matias EF, Brito SV, Ferreira FS, Braga JM, Costa JG, Coutinho HD (2011) In vitro antibacterial, phototoxic, and synergistic activity of ethanol extracts from *Costus cf. arabicus* L. *J Med Food.* 2011 14(9):964-968.

Curiel DT, Gerritsen WR, Krul MR (2000). Progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 7:1197-1199.

Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates RA, Astrakas C, St Denis TG, Ribeiro MS, Mylonakis E, Hamblin MR, Tegos GP (2012) Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Front Microbiol.* 3:120.

De Rosa MC, Crutchley RJ (2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem.* Vol 233-234: 351-371.

Dellinger M (1996) Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol.* 64: 182-187.

Demidova TN, Hamblin MR (2004) Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 17(3):245-254.

Demidova TN, Hamblin MR (2005) Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(6):2329-2335.

Dorr T, Vulic M, Lewis K (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* 8.

Downum KR, Villegas S, Rodriguez E, Keil DJ (1989) Plant photosensitizers: A survey of their occurrence in arid and semiarid plants from North America. *J Chem Ecol.* 15(1):345-355.

Drenkard E (2003) Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5:1213–1219.

Driscoll J S (1984) The preclinical new drug research program of the National Cancer Institute. *Cancer Treat Rpt.* 68:63-76.

Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 9(1):R6.

Ebermann R, Alth G, Kreitner M, Kubin A (1996) Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. *J Photochem Photobiol B.* 36:95-97.

Efferth T, Fu Yu-jie, Zu Y, Schwarz G, Konkimalla V, Wink M (2007) Molecular Target-Guided Tumor Therapy with Natural Products Derived from Traditional Chinese Medicine. *Curr Med Chem.* 14:2024-2032.

Embleton ML, Nair SP, Cookson BD, Wilson M (2002) Selective lethal photosensitization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using an IgG-tin (IV) chlorin e6 conjugate. *J Antimicrob Chemother.* 50(6):857-864.

Escrig E, Aliño SF (1997). Terapia génica del cáncer. *Farm Clin.* 14:259-269.

Fabris C, Soncin M, Jori G, Habluetzel A, Lucantoni L, Sawadogo S, Guidolin L, Coppellotti O (2012 a) Effects of a new photoactivatable cationic porphyrin on ciliated protozoa and branchiopod crustaceans, potential components of freshwater ecosystems polluted by pathogenic agents and their vectors. *Photochem Photobiol Sci.* 11(2):294-301.

Fabris C, Ouédraogo RK, Coppellotti O, Dabiré RK, Diabaté A, Di Martino P, Guidolin L, Jori G, Lucantoni L, Lupidi G, Martena V, Sawadogo SP, Soncin M, Habluetzel A (2012 b) Efficacy of sunlight-activatable porphyrin formulates on larvae of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *An. arabiensis*: a potential novel biolarvicide for integrated malaria vector control. *Acta Trop.* 123(3):239-243.

Farr S, Kogoma T (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev.* 55: 561-585.

Fernandez T, CerdaZolezziP, Risco E, Martino V, Lopez P, Clavin M, Hnatyszyn O, Canigueral S, Hajos S, Ferraro G, Alvarez E (2002) Immunomodulating properties of Argentine plants with ethnomedicinal use. *Phytomed.* 9: 546–552.

Fernández T, Cerdá Zolezzi P, Aulicino P, Caldas Lopes E, Wagner ., Ricco R, Hajos S, Gurni A, Alvarez E (2003). Immunobiological features of the galactosidelectin L-Lc isolated from the Argentine mistletoe *Ligariacuneifolia*. *J Ethnopharmacol.* 85: 81-92.

Fischer BB, Hideg É, Krieger-Liszky A (2013) Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxid Redox Signal*. 18(16):2145-2162.

Flors C, Nonell S (2006) Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenalenonephytoalexins. *Acc Chem Res*. 39(5):293-300.

Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR (2004) Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(6):2173-2178.

Garcia SB, Park HS, Novelli M, Wright NA.(1999) Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. *J Pathol*.187(1):61-81.

Gasparetto A, Lapinski TF, Zamuner SR, Khouri S, Alves LP, Munin E, Salvador MJ (2010) Extracts from *Alternanthera maritima* as natural photosensitizers in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B*. 99(1):15-20.

Girotti A (1990) Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem Photobiol*. 51: 497-509.

Kaplan S (2005) Implications of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community-acquired pathogen in pediatric patients. *Infect Dis Clin North Am*. 2005; 19:747-757.

Kharkwal GB, Sharma SK, Huang Y, Dai T, Hamblin MR (2011) Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers Surg Med*. 43(7): 755–767.

Kuznetsova NA, Makarov DA, Kaliya OL, Vorozhtsov GN (2007) Photosensitized oxidation by dioxygen as the base for drinking water disinfection. *J Hazard Mater*. 2007 146(3):487-491.

Gardella N, Picasso R, Predari SC, Lasala M, Foccoli M, Benchetrit G, Famiglietti A, Catalano M, Mollerach M and Gutkind G (2005) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Buenos Aires Teaching Hospitals: replacement of the multidrug resistant South American clone by another susceptible to rifampin, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev Arg Microbiol.* 37:156-160

Goodman, Gilman (2006) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Ed McGray-Hill, 11va Edición.

Gossner L, Stolte M, Sroka R, Rick K, May A, Hahn E, Ell C (1998) Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid. *Gastroenterol.* 114: 448-455.

Grant W, Hopper C, MacRobert A, Speight P, Bown S (1993) Photodynamic therapy of oral cancer: photosensitisation with systemic aminolaevulinic acid. *Lancet.* 342: 147-148.

Grebenova D, Cajthamlova H, Bartosova J, Marinov J, Klamova H, Fuchs O, Rca Z (1998) Selective destruction of leukaemic cells by photo-activation of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin-IX. *J Photochem Photobiol.* 47: 74-81.

Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ (1995) Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of fnb genes. *Mol Microbiol*17:1143-1152.

Grossweiner LI (1994) The science of phototherapy, Chap. 8. In: Photodynamic therapy. London, CRC Press. 139-155.

Haagensen JAJ, Klausen M, Ernst RK, Miller SI, Folkesson A, Tolker-Nielsen T, Molin S(2007) Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol.* 189:28–37.

Hamblin MR, Zahra T, Contag CH, McManus AT, Hasan T (2003) Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections in vivo. *J Infect Dis.* 187(11):1717-25.

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70.

Harris F, Pierpoint L (2012) Photodynamic therapy based on 5-aminolevulinic acid and its use as an antimicrobial agent. *Med Res Rev.* 32(6):1292-1327.

He X, Sikes R, Thomsen S, Chung L, Jacques S (1994) Photodynamic therapy with Photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. *Photochem Photobiol.* 59: 468-473.

Henderson BW, Dougherty TJ (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 55: 145-157.

Heinrich M, Bremner P (2006) Ethnobotany and ethnopharmacy--their role for anti-cancer drug development. *Curr Drug Targets.* 7:239-245.

Heinrich M (2010) Ethnopharmacology and drug development. In: *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology.* Mander L, Lui H-W. (Eds.), Elsevier, Oxford.

Hollman PC, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, Richling E, Serafini M, Scalbert A, Sies H, Vidry S (2011) The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr.* 141(5):989S-1009

Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyentayev T, Tanaka M, Hamblin MR (2012) Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med.* 44(6):490-499.

Hudson JB, Towers GH (1991) Therapeutic potential of plant photosensitizers. *Pharmacol Ther.* 49(3):181-222.

Ibarrola D, Hellion-Ibarrola M, Alvarenga N, Ferro E, Hatakeyama N, Shibuya N, Yamazaki M, Momose Y, Yamamura S, Tsuchida K (2006) Cardiovascular Action of Nuatigenosido from *Solanum sisymbriifolium*. *Pharm Biol.* 44: 378-381.

Jansen R, Wang SQ, Burnett M, Osterwalder U, Lim HW (2013) Photoprotection: Part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. *J Am Acad Dermatol.* 69(6):853.e1-853.

Jeric PE, Matteo M, Ramirez MS, Couto E, Tokumoto M and Centron D (2006) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates reveals the spreading of a new clone in Buenos Aires city. *Medicina (Buenos Aires)* 66:36-39.

Jichlinski P, Leisinger H (2001) Photodynamic therapy in superficial bladder cancer: past, present and future. *Urol Res.* 29:396-405.

Jong WW, Tan PJ, Kamarulzaman FA, Mejin M, Lim D, Ang I, Naming M, Yeo TC, Ho AS, Teo SH, Lee HB (2013) Photodynamic activity of plant extracts from sarawak, borneo. *Chem Biodivers.* 10(8):1475-1486.

Johnson M, Cockayne A, Morrissey JA (2008) Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires *ica* and the secreted protein Emp. *Infect Immun.* 76:1756-1765.

Jori G (1990) Photosensitized processes in vivo: proposed phototherapeutic applications. *Photochem Photobiol.* 52: 439-443.

Jori G, Schindl L, Schindl A, Polo L (1996) Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized process in vivo. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 102: 101-107.

Jori G, Brown SB (2004) Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci.* 5: 403-405.

Jori G (2006) Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 25(1-2):505-519.

Jori G, Magaraggia M, Fabris C, Soncin M, Camerin M, Tallandini L, Coppellotti O, Guidolin L (2011) Photodynamic inactivation of microbial pathogens: disinfection of water and prevention of water-borne diseases. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 30(3):261-271.

Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K (2004) Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett.* 230, 13–18.

Kelly C, Brown N, Reed M, Ackroyd R (2002) The use of 5-aminolevulinic acid as a photosensitizer in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem Photobiol Sci.* 1:158-168.

Kessel D, Arroyo AS (2007) Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photochem Photobiol Sci.* 6, 1290–1295.

Kessel D, Oleinick NL (2009) Initiation of autophagy by photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* 453, 1-16.

Kessel D, Oleinick NL (2010) Photodynamic therapy and cell death pathways. *Methods Mol Biol.* 635, 35-46.

Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR (2011) Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med.* 43(7):755-767.

Koren H, Schenk GM, Jindra RH, Alth G, Ebermann R, Kubin A, Koderhold G, Kreitner M (1996) Hypericin in phototherapy. *J Photochem Photobiol B.* 36: 113-119.

Kufe D, Weichselbaum R (2003) Radiation therapy: activation for gene transcription and the development of genetic radiotherapy-therapeutic strategies in oncology. *Cancer Biol Ther.* 2(4):326-329.

Kuznetsova NA, Makarov DA, Kaliya OL, Vorozhtsov GN (2007) Photosensitized oxidation by dioxygen as the base for drinking water disinfection. *J Hazard Mater.* 146(3):487-491.

LaFleur MD, Qi Q, Lewis K (2010) Patients with longterm oral carriage harbor high-persister mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54, 39–44.

Lawrence TS, Ten Haken RK, Giaccia A (2008). Principles of Radiation Oncology. In: DeVita VT Jr., Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

Lewis K (2010) Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 64,357–372.

Lewis K (2013) Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 12(5):371-387.

Li XZ, Nikaido H (2004) Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64, 159–204.

Lomovskaya O, Lewis K (1992) Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci.* 89, 8938–8942.

López P, Ruffa MJ, Cavallaro L, Campos R, Martino V, Ferraro G (2005) 1,3-dihydroxy-5-(tridec-4',7'-dienyl) benzene: a new cytotoxic compound from *Lithraea molleoides*. *Phytomed.* 12: 108-111.

Lucantoni L, Magaraggia M, Lupidi G, Ouedraogo RK, Coppellotti O, Esposito F, Fabris C, Jori G, Habluetzel A (2011) Novel, meso-substituted cationic porphyrin molecule for photo-mediated larval control of the dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(12):e1434.

Lyon JP, Moreira LM, de Moraes PC, dos Santos FV, de Resende MA (2011) Photodynamic therapy for pathogenic fungi. *Mycoses* 54(5):265-271.

Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D (2009) *Brock Biology of Microorganisms*, 12th edition. Pearson Education Inc.

Magaraggia M, Jori G, Soncin M, Schofield CL, Russell DA (2013) Porphyrin-silica microparticle conjugates as an efficient tool for the photosensitised disinfection of water contaminated by bacterial pathogens. *Photochem Photobiol Sci.* 12(12):2170-2176.

Malik Z, Hanania J, Nitzan Y (1990) Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B.* 5(3-4):281-93.

Martínez A, Conde E, Moure A, Domínguez H, Estévez RJ (2012) Protective effect against oxygen reactive species and skin fibroblast stimulation of *Couroupita guianensis* leaf extracts. *Nat Prod Res.* 26(4):314-322.

McCord JM, Russell WJ (1998) Inactivation of creatine phosphokinase by superoxide during reperfusion injury. *Basic Life Sci.* 49:869-873.

Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E Lopez JA, Foster TJ, Penadés JR, Lasa I (2009) Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 191:832-843.

Miyamoto Y, Umebayashi Y, Nishisaka T (1999) Comparison of phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol.* 53: 53-59.

Moan J, Berg K, Kvam E, Western A, Malik Z, Ruck A, Schneckenburger H (1992) Intracellular localization of photosensitizers. *Ciba Found Symp.* 146: 95-111.

Molpus K L, Kato D, Hamblin MR, Lilge L, Bamberg M, Hasan T (1996) Intraperitoneal therapy of human epithelial ovarian carcinomatosis in a xenograft murine model. *Cancer Res.* 56:1075-1082.

Momma T, Hamblin M, Wu H, Hasan T (1998) Photodynamic therapy of orthotopic prostate cancer with benzoporphyrin derivative: local control and distant metastasis. *Cancer Res.* 58: 5425-5431.

Mongelli E, Pampuro S, Coussio J, Salomon H, Ciccía G (2000) Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. *J Ethnopharmacol.* 71: 145-151.

Morton CA, Brown SB, Collins S, Ibbotson S, Jenkinson H, Kurwa H, Langmack K, Mckenna K, Moseley H, Pearse A D, Stringer M, Taylor DK, Wong G, Rhodes LE (2002) Guidelines for topical photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 146 (4): 552-567.

Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K (2010) Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol.* 192, 6191–6199.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (2006) *Microbiologia Medica 5^{ta} Edicion (Medical Microbiology 5th Edition)* Elsevier, Madrid.

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

Newman DJ, Cragg GM (2007) Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod* 70, 461-477.

Noodt B, Berg K, Stoke T, Peng Q, Nesland J (1996) Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX. *Br J Cancer.* 74: 22-29.

Núñez Montoya SC, Comini LR, RumieVittar B, Fernández IM, Rivarola VA, Cabrera JL (2008) Phototoxic effects of *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *Toxicon*. 51:1409-1415.

Nyman ES, Hynninen PH (2004) Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 73:1-28.

Oliveira AP, Silva LR, Ferreres F, Guedes de Pinho P, Valentão P, Silva BM, Pereira JA, Andrade PB (2010) Chemical assessment and in vitro antioxidant capacity of *Ficus carica latex*. *J Agric Food Chem*. 58(6):3393-3398.

Ong CY, Ling SK, Ali RM, Chee CF, Samah ZA, Ho AS, Teo SH, Lee HB (2009) Systematic analysis of in vitro photo-cytotoxic activity in extracts from terrestrial plants in Peninsula Malaysia for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 96(3):216-222.

Orellane C (2001) St John's wort helps to fight bladder cancer. *Lancet Oncol*. 2:399.

Palucka K, Bueno H, Fay J, Banchereau J (2011) Dendritic cells and immunity against cancer. *J intern. Med*. 269:64-73.

Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T (2008) Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Mol Microbiol* 68:223–240.

Pandey RK, Goswami LN, Chen Y, Gryshuk A, Missert JR, Oseroff A, Dougherty TJ (2006) Nature: a rich source for developing multifunctional agents. Tumor-imaging and photodynamic therapy. *Lasers Surg Med*. 38: 445-467.

Park JH, Moon YH, Bang IS, Kim YC, Kim SA, Ahn SG, Yoon JH (2010) Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6. *Lasers Med Sci*. 25(5):705-710.

Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL (2007) Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Rev Drug Discov.* 6, 29–40.

Penning LC, Dubbelman TM (1994) Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anti-Cancer Drugs.* 5: 139-146.

Pervaiz S, Olivo M (2006) Art and science of photodynamic therapy. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol.* 33(5-6):551-556.

Prinsze C, Dubbelman T, Van Steveninck J (1990) Protein damage induced by small amounts of photodynamically generated singlet oxygen or hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Acta.* 1038: 152-157.

Qadri T, Poddani P, Javed F, Tunér J, Gustafsson A (2010) A short-term evaluation of Nd:YAG laser as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontal inflammation. *J Periodontol.* 81(8):1161-1166.

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

Rebeiz, CA, Montazer-Zouhoor, A, Hopen, HJ, Wu, SM. (1984) Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology. *Enzyme Microb Tech.* 6: 390-396.

Ris HB (2005) Photodynamic therapy as an adjunct to surgery for malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* 49 Suppl 1:S65-68.

Riveiro ME, Shayo C, Monczor F, Fernández N, Baldi A, De Kimpe N, Rossi J, Debenedetti S, Davio C (2004) Induction of cell differentiation in human leukemia U-937 cells by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Cancer Lett.* 210: 179-188.

Rosenberg SA (1984). Adoptive immunotherapy of cancer: accomplishments and prospects. *Cancer Treat Rep.* 68(12):233–255.

Röeder B (1998) Photobiophysical parameters, Chap. 1.2. In: Moser, J. G., Ed, *Photodynamic tumor therapy, 2nd and 3rd generation photosensitizers*. Amsterdam, Harwood Academic Publishers. 9-20.

Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L (2002) Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *J Ethnopharmacol.* 79: 335-339.

Sampedro MC, Artola RL, Murature M, Murature D, Ditamo Y, Roth GA, Kivatinitz S (2004) Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation. *Int Immunopharmacol.* 4: 411-418.

Savoia D (2012) Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol.* 7(8):979-990.

Slamenova D, Horvathova E (2013) Cytotoxic, anti-carcinogenic and antioxidant properties of the most frequent plant volatiles. *Neoplasma.* 60(4):343-354.

Schultes RE (1972) The future of plants as sources of new biodynamic compounds. In: *Plants in the Development of Modern Medicine*, Swain T (Eds). Cambridge, MA, Harvard University Press.

Schultz WA (2005) An Introduction to Human Cancers. *Molecular Biology of Human Cancers*. Estados Unidos. Editorial: Springer. P 11-22.

Sevgi M, Toklu A, Vecchio D, Hamblin MR (2013) Topical Antimicrobials for Burn Infections - an Update. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 8(2):121-129

Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P (2008) Toluidine blue- mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(1):299-305.

Sharman WM, Allen CM, van Lier J E (1999) Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*. 4: 507-517

St Denis TG, Aziz K, Waheed AA, Huang YY, Sharma SK, Mroz P, Hamblin MR (2011 a) Combination approaches to potentiate immune response after photodynamic therapy for cancer. *Photochem Photobiol Sci*. 10(5):792-801.

St Denis TG, Dai T, Izikson L, Astrakas C, Anderson RR, Hamblin MR, Tegos GP (2011 b) All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence* 2(6):509-520.

Stockert J, Juarranz A, Villanueva A (2004) Photodynamic therapy: selective uptake of photosensitizing drugs into tumor cells. *Curr Topics Pharmacol*. 8: 185-217.

Tang HM, Hamblin MR, Yow CM (2007) A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *J Infect Chemother*. 13(2):87-91.

Tavares A, Carvalho CM, Faustino MA, Neves MG, Tomé JP, Tomé AC, Cavaleiro JA, Cunha A, Gomes NC, Alves E, Almeida A (2010) Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs*. 8(1):91-105.

Tomio L, Calzavara F, Zorat P L, Corti L, Polico C, Reddi E, Jori G, Mandoliti G (1984) Photoradiation therapy for cutaneous and subcutaneous malignant tumors using hematoporphyrin. *Prog Clin Biol Res*. 170:829-840.

Tippo O, Stern WL (1977) *Humanistic Botany*, Norton, New York.

Untch M, Thomssen C (2010). Clinical practice decisions in endocrine therapy. *Cancer Investigation*; 28 Suppl., 1:4–13.

- Van der Snoek EM, Robinson DJ, van Hellemond JJ, Neumann HA (2008) A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 22(8):918-922.
- Vera DM, Haynes MH, Ball AR, Dai T, Astrakas C, Kelso MJ, Hamblin MR, Tegos GP (2012) Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. *Photochem Photobiol.* 88(3):499-511.
- Verpoorte R (2000) Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *J Pharm Pharmacol.* 52: 253–262.
- Villanueva A, Vidania R, Stockert JC, Cañete M, Juarrans A (2002) Photodynamic effects on cultured tumor cells. Cytoskeleton alterations and cell death mechanisms, Chap. 3. In: H.S. Nalwa Ed, *Handbook of Photochemistry and Photobiology*. American Scientific Publishers, Valencia., 4: 79-117.
- Wan S, Parrish JA, Anderson RR, Medden M (1981) Transmittance of nonionizing radiation in human tissue. *Photochem Photobiol.* 34: 979-984.
- Wainwright M (2003) Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *Int J Antimicrob Agents.* 21: 510-520.
- Wainwright M (2004) Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci.* 5: 406-411.
- Wainwright M (2010) 'Safe' photoantimicrobials for skin and soft-tissue infections. *Int J Antimicrob Agents.* 36(1):14-18.
- Wainwright M, Baptista MS (2011) The application of photosensitisers to tropical pathogens in the blood supply. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 8(3):240-248.
- Wilson J, Van Hillesberg R, Van der Berg J, Kort W, Terpstra O (1991) Photodynamic therapy for gastrointestinal tumors. *J Gastroenterol.* 188: 20-25.

Younes RN, Varella AD, Suffredini IB (2007) Discovery of new antitumoral and antibacteril drugs from brazilian plant extracts using high throughput screening. *Clinics* 62(6):763-768.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la actividad fotosensibilizante, antitumoral y antimicrobiana de una colección de extractos de plantas de Argentina; y evaluar su potencial uso en el tratamiento del cáncer, infecciones superficiales y la eliminación de microorganismos presentes en el agua.

Objetivos parciales

- Generar una colección de extractos a partir de especies vegetales representantes de la flora de Argentina.
- Estudiar la actividad de estos extractos como agentes citotóxicos en oscuridad y como agentes fotosensibilizantes en líneas celulares tumorales.
- Evaluar la selectividad de los extractos activos comparando su acción foto- y citotóxica entre líneas tumorales vs. líneas no tumorales.
- Investigar los mecanismos de acción de los extractos identificados con mayor citotoxicidad e intentar la identificación y el aislamiento de los principios activos.
- Evaluar la actividad antimicrobiana en oscuridad de los diferentes extractos, y su actividad fotosensibilizante sobre diferentes cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas.
- Determinar vías de acción y optimizar las condiciones para la eliminación de microorganismos mediante TFDA empleando fuentes de luz artificiales y naturales.
- Evaluar el potencial de la TFDA en la eliminación selectiva de microorganismos internalizados en células eucariotas.
- Desarrollar nuevas metodologías para la evaluación de las capacidades fotosensibilizantes de nuevos extractos mediante iluminación directa de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Reactivos y solventes empleados

Se utilizaron ALA, Azul de Tripán, Azul de Toluidina, MTT (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazolio), TRITC-faloidina, triptofano y manitol, de Sigma Chem. Co., USA.

Verteoporfina liposomada fue de Conifarma, Argentina. Clorina e6 (Ce6) de Frontier Scientific Inc, Logan, USA y temoporfin marca Foscan® de Biolitec Pharma ltd., Irlanda.

ProLong® Gold Antifade Reagent, el marcador fluorescente Singlet Oxygen Sensor Green, el anticuerpo secundario Alexa 488 anti-ratón y el anticuerpo anti alfa-tubulina fueron de Invitrogen Life Technology Corporation.

Sulfato de Vinblastina fue de Laboratorios Filaxis S.A., Argentina.

Se emplearon Clorofila *a* y *b*, ampicilina y azida sódica de Fluka.

Los solventes empleados fueron de grado analítico.

2 Colección de extractos vegetales

2.1 Recolección de muestras vegetales

Las muestras vegetales se recolectaron durante los períodos primavera y verano en el Jardín Botánico de la Facultad de Agronomía de la UBA, Lucien Hauman, donde las especies son cultivadas libres de pesticidas y agroquímicos.

La identificación y clasificación de las especies vegetales se realizó en colaboración con el Ing. Agr. Juan José Valla, director del Jardín. Los ejemplares de muestra son mantenidos en el herbario del mencionado Jardín Botánico y se identificaron como número de Boelcke. La nomenclatura de las especies (nombres científicos) concuerda con Cabrera y Zardini (1978), Huziker (1984), Zuloaga y Morrone (1996, 1999) y Zuloaga et al (2009). Los nombres vernáculos fueron obtenidos de De la Peña y Pensiero (2004).

Se recolectaron un total de 64 especies y se separaron las diferentes partes (hoja, y en caso de poseer, flor y fruto). En un caso se recogieron raíces adventicias. Cabe destacar que no existen reportes de fototoxicidad en ninguna de estas especies.

2.2 Preparación de los extractos

Las muestras (100 - 200 gr de material) se procesaron el mismo día de la recolección. Se lavaron con agua destilada, se secaron y se homogenizaron utilizando una procesadora automática a máxima velocidad durante 3 minutos o bien, un homogenizador Ultra Turrax T-50 en el caso de aquellas muestras de escasa cantidad (20-50 gr). Se utilizó metanol absoluto o agua destilada según corresponda. Luego de la homogenización, se dejaron macerar durante 24 horas a 4°C, se centrifugaron 10 minutos a 10.000 g y se filtraron, para eliminar los residuos sólidos.

Posteriormente, los extractos acuosos fueron liofilizados a sequedad, mientras que los extractos metanólicos se concentraron utilizando un evaporador rotatorio bajo presión reducida, previamente a la liofilización hasta sequedad para eliminar trazas del solvente (Figura 1).

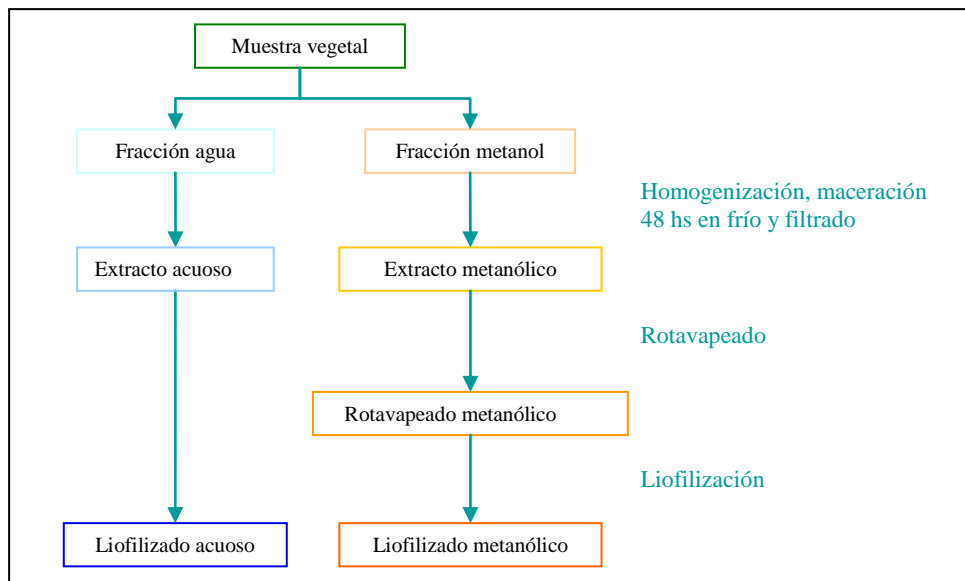


Figura 1: Esquema de extracción y preparación de los extractos vegetales

Los rendimientos obtenidos fueron de 4-5%. Una vez obtenidos los extractos sólidos, se mantuvieron a -20°C y en recipientes herméticos.

Tabla 1: Lista de extractos vegetales y resumen de los resultados obtenidos en esta Tesis respecto a su toxicidad y fototoxicidad en líneas celulares y bacterias

Especie	Parte	Solvente	Citotox cél	TFD cél	Bacte- ricida	TFDA bacter.
<i>Abutilon pictum</i> (Hoo. & Arn.) Walp.	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Aristolochia esperansae</i> Kuntze	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Amaranthus quitensis</i> Kunth	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Berberis ruscifolia</i> Lam	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Bromelia balansae</i> Mez	Fruto	Metanol	No	No	No	No
	Fruto	Agua	No	No	No	No
<i>Brugmansia arborea</i> (L.) Lagerh.	Flor	Metanol	No	No	No	No
		Agua	No	No	No	No
<i>Ceiba speciosa</i> (A. St.-Hil.) Ravenna	Flor	Metanol	No	No	No	No
		Agua	No	No	No	No
<i>Cestrum parquii</i> L Herit.	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E.	Raíz	Metanol	No	No	No	Sí
<i>Citharexylum montevidense</i> (Spreng.) Mold.	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Clematis hilarii</i> (A. St.-Hil.) Speg.	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	Sí	Sí	No	-
<i>Collaea argentina</i> Griseb	Flor	Metanol	No	Sí	No	No
		Agua	No	Sí	No	No
	Hoja	Metanol	Sí	No	Sí	-
<i>Colletia paradoxa</i> (Spreng.) Escal.	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	Flor	Metanol	No	No	No	No
		Agua	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	Sí	Sí	Sí	-
		Agua	Sí	No	Sí	No
<i>Commelina erecta</i> L.	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Cordia trichotoma</i> (Vell.) Arrab. Ex Steud	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Condalia montana</i> A. Cast.	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Cyphomandra betacea</i> (Cav.) Sendtn	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Dicliptera tweediana</i> Nees	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Dodonaea viscosa</i> L. Jacq.	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Duranta serratifolia</i> (Griseb.) Kuntze	Fruto	Metanol	No	No	No	No
<i>Ephedra tweediana</i> Fisch. & C.A. Mey.	Fruto	Metanol	No	No	No	No
		Hoja	Metanol	No	Sí	No
		Agua	No	Sí	No	No
<i>Erythrina falcata</i> Benth.	Flor	Metanol	No	No	No	No
		Agua	No	No	No	No
<i>Eupatorium unifolia</i> Sch. Bip.	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Gnaphalium gaudichaudianum</i> Cabrera	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Hyaloseris andrada limae</i> Crist. & Cabr.	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Iochroma australe</i> Griseb.	Flor	Metanol	Sí	No	Sí	No
		Agua	Sí	No	Sí	No
	Hoja	Metanol	Sí	Sí	Sí	-
		Agua	Sí	No	Sí	No
<i>Ipomoea alba</i> Hook	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Ipomoea bonariensis</i> Hook.	Flor	Metanol	Sí	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-

<i>Ipomoea cairica</i> (L.) Sweet	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	Sí	Sí	No	-
<i>Ipomoea fistulosa</i> Mart. ex Choisy	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Jacaranda mimosifolia</i> D. Don	Flor	Metanol	Sí	No	No	No
		Agua	No	No	Sí	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
		Agua	No	No	No	No
<i>Lantana camara</i> L.	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Macfadyena unguis cati</i> (L.) A.H. Gentry	Flor	Metanol	No	Sí	No	No
		Agua	No	No	No	No
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Oxalis latifolia</i> Kunth	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Parkinsonia aculeata</i> L.	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Passionaria pasiflora</i> L.	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Patagonula americana</i> L.	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Pavonia sepium</i> A. St.-Hil.	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Petunia integrifolia</i> Lindl.	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Prosopis kuntzei</i> Harms Kuntze.	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Prunus cerasifera</i> Ehrh.	Hoja	Metanol	No	Sí	Sí	-
<i>Prunus subcoriacea</i> (Chodat & Hassl.)	Flor	Metanol	No	No	No	No
		Agua	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	Sí	-
		Agua	No	No	No	No
<i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers	Flor	Metanol	No	No	No	No
		Agua	No	No	No	No
<i>Rivina humilis</i> L.	Fruto	Metanol	No	No	No	No
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Ruellia britoniana</i> Leonard	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Ruellia capitata</i> Ness.	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Ruellia elegans</i> Poir.	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Ruellia nudiflora</i> (Engelm. & Gray) Urban.	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Ruellia ritasacea</i> (Pohl) Ezc.	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Scutia buxifolia</i> Reissek	Hoja	Metanol	No	Sí	Sí	-
		Agua	No	No	No	No
<i>Sesbania punicea</i> (Cav.) Benth.	Flor	Metanol	Sí	No	No	No
	Hoja	Metanol	Sí	Sí	No	-
<i>Solanum amygdalyfolium</i> Steud.	Flor	Metanol	Sí	No	No	No
	Hoja	Metanol	Sí	Sí	No	-
<i>Solanum chacoense</i> Bitter	Flor	Metanol	Sí	No	No	No
	Hoja	Metanol	Sí	Sí	No	-
	Raiz	Metanol	Sí	No	No	No
	Papa	Metanol	Sí	No	No	No
<i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam.	Flor	Metanol	Sí	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Solanum verbascifolium</i> L.	Flor	Metanol	Sí	No	No	Sí
		Agua	Sí	No	No	No
	Hoja	Metanol	Sí	Sí	No	-
		Agua	No	No	No	-
<i>Solidago chilensis</i> Meyen	Flor	Metanol	No	No	No	No
<i>Tabebuia chrysotricha</i> (Mart. Ex DC.) Standl.	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. Ex DC.) Standl.	Flor	Metanol	No	No	No	No
		Agua	No	No	No	No

<i>Tabernaemontana australi</i> (Müell. Arg) Miers	Flor	Metanol	No	No	No	No
	Hoja	Metanol	No	Sí	No	-
<i>Tecoma Stans</i> (L.) Juss. Ex Kunth	Flor	Metanol	No	No	No	Sí
<i>Xanthium cavanillesii</i> Schouw	Hoja	Metanol	Sí	Sí	No	-
	Fruto	Metanol	Sí	No	No	No

Las primeras tres columnas indican: especies estudiadas, partes de la planta a partir de la cual se realizaron las extracciones y solvente utilizado. Las últimas cuatro columnas indican los experimentos en los que se empleó cada extracto y el resultado de los mismos. **Citotox. cél:** toxicidad en oscuridad sobre líneas celulares; **TFD cél:** fototoxicidad sobre línea celular LM2; **Bactericida:** toxicidad en oscuridad sobre bacterias *S. epidermidis* en suspensión; **TFDA bacter.:** fototoxicidad sobre bacterias *S. epidermidis* en suspensión. **Sí:** presencia de actividad tóxica/fototóxica; **No:** ausencia de actividad tóxica/fototóxica; **—:** no determinado.

3 Estudios en líneas celulares

3.1 Líneas celulares utilizadas

LM2. Línea derivada del adenocarcinoma mamario murino espontáneo M2 (Galli et al., 2000), obtenida del Instituto Roffo, Buenos Aires, Argentina. Las células se cultivaron en medio RPMI, suplementado con 2 mM L-glutamina y 5% suero fetal bovino (SFB).

HB4a y HB4a-Ras. La línea celular HB4a es una línea clonal, no transformada ni tumorigénica y deriva de tejido epitelial luminal de mama normal, cuya inmortalización fue obtenida por transfección del antígeno LT del virus SV40 (Stamps et al., 1994). Su derivada tumoral, HB4a-Ras, transfectada con el plásmido pEJ, contiene 6,6Kb del genoma del oncogén H-Ras (Val/12 Ras) (Harris et al., 1995). Ambas líneas fueron provistas por el Profesor O'Hare del laboratorio de cáncer de mama de University College London, Reino Unido y se mantuvieron en medio RPMI con L-glutamina 2 mM, suplementado con 10% SFB, 5 µg/ml de hidrocortisona y 5 µg/ml de insulina.

PAM212. Línea de queratinocitos murinos transformados espontáneamente, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), USA. Fueron cultivadas en medio RPMI con L-glutamina 2 mM y suplementado con 5% de SFB.

HaCat. Línea de queratinocitos humanos transformados espontáneamente cultivado en medio RPMI con L-glutamina 2 mM y suplementado con 5% de SFB.

B16-F10. Es una línea de células de melanoma obtenida de la ATCC y mantenida en medio F12 con L-glutamina 2 mM y 5% de SFB.

A549. Línea de carcinoma de pulmón bronquioalveolar humano, obtenida de la ATCC, cultivada en medio RPMI con glutamina 2 mM suplementado con 5% de SFB.

MB49. Células de cáncer de vejiga murino obtenidas de la ATCC y cultivadas en medio RPMI 1640 con L-glutamina 2 mM suplementado con 5% SFB.

F3II. Células de carcinoma sarcomatoide mamario F3II, establecidas a partir del clonaje de un tumor mamario aparecido espontáneamente en ratones BALB/c. Cultivadas en RPMI con L-glutamina 2 mM suplementado con 5% SFB.

Todas las líneas se mantuvieron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y los medios fueron suplementados con 80 µg/ml de gentamicina.

3.2 Determinación del número de células

El número de células sembradas por pocillo se determinó por conteo de células viables en hemocitómetro, en presencia del colorante vital de exclusión azul de Tripán.

3.3 Ensayo de viabilidad del MTT

La viabilidad de los cultivos celulares luego de los diferentes tratamientos se determinó mediante el ensayo del MTT (Denzinot & Lang, 1986), método basado en la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, el cual se ha demostrado que se correlaciona bien con otros métodos de evaluación de toxicidad fotodinámica, tales como el ensayo de formación de colonias (Evans et al., 1997). Luego de los tratamientos, se agregó en cada pocillo, 0,5 mg/ml de MTT, y las placas se incubaron a 37°C durante 1 h. Como resultado se obtuvieron cristales de formazán que se disolvieron en dimetilsulfóxido, y la absorbancia de la solución obtenida se cuantificó a 560 nm en un lector de placas (Spectra Count, Packard USA).

3.4 Determinación de citotoxicidad en oscuridad de los extractos vegetales

Se sembraron las células (5×10^4 /ml), en placas de 24 pocillos. Luego de 24 horas, y una vez en fase exponencial de crecimiento, se incubaron con los extractos vegetales a diferentes concentraciones en el rango de 10 – 250 $\mu\text{g/ml}$ en medio completo por 24 h en oscuridad. Luego se cambió el medio por medio fresco y se realizó el ensayo del MTT para determinar la viabilidad celular.

La CI_{50} (concentración inhibitoria 50) se definió como la concentración de extracto necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50% respecto al control sin extracto. Las CI_{50} se expresaron en $\mu\text{g/ml}$ con su respectivo desvío estándar (95% de confianza). Los valores se calcularon a partir de regresión lineal de las curvas de viabilidad en función de concentración de extracto. El coeficiente de variación [desvío estándar/media x 100 (%)] estuvo por debajo del 12% en todos los experimentos.

A partir de estos mismo experimentos se determinaron las máximas concentraciones no tóxicas de los extractos para ser empleadas en los ensayos de fotosensibilización, donde la citotoxicidad fue menor al 20%.

3.5 Observación de la morfología celular

Luego de los tratamientos respectivos, se fijaron las células crecidas sobre cubreobjetos con paraformaldehído 4% durante 15 minutos. Posteriormente, se las incubó con azul de Toluidina 25 $\mu\text{g/ml}$ por un minuto. Se montaron en bálsamo de Canadá y se observó la morfología celular en microscopio óptico.

3.6 Inmunofluorescencia para alfa-tubulina

Las células sembradas sobre cubreobjetos se fijaron con metanol frío (-20°C) durante 10 minutos y se rehidrataron en PBS. Se permeabilizaron con Tritón X-100 0,5% en PBS durante 30 minutos. Luego se incubaron con una dilución 1:2000 del anticuerpo primario monoclonal anti-alfa-tubulina durante 1 h a 37°C .

Luego del lavado con PBS, las células se incubaron con una dilución 1:250 de anticuerpo conjugado anti-ratón Alexa 488 durante 1 h a 37°C en oscuridad. Finalmente se lavaron con PBS y se montaron con ProLong para su observación en un microscopio de Fluorescencia Olympus BX61, equipado con una lámpara de Mercurio HBO 100 W y el correspondiente filtro para microscopía de fluorescencia azul (450-490 nm, filtro de excitación BP 490).

3.7 Inmunofluorescencia para F-actina

Las células se fijaron con metanol frío y se permeabilizaron con Tritón X-100. Para la detección de F-actina, las células se incubaron con TRITC-Faloidina (1:100 de una solución 1 mg/ml en 0,1 % BSA) durante 30 minutos a 37°C y luego se realizaron lavados con PBS. Los preparados fueron montados en portaobjetos con ProLong.

3.8 Determinación de contenido de ADN por citometría de flujo en células LM2 incubadas con extractos citotóxicos

Para el análisis del ciclo celular se utilizó el kit para citometría de flujo “Propidium Iodide/RNase” (Sigma, Missouri, Mo, USA). El mismo contiene el fluorocromo yoduro de propidio, que posee la capacidad de unirse estequiométricamente al ADN, permitiendo su cuantificación del ADN intracelular. Debido a que este compuesto también se une al ARN de doble hebra, las células deben ser tratadas con ARNasa para asegurarse que la unión del fluorocromo al ADN sea específica.

Las células se cultivaron en un frasco de cultivo de 75 cm² (1x10⁵ células/ml, 10 ml) durante 48 h, en presencia de los extractos citotóxicos (CI₅₀). Se realizaron controles con vinblastina (0,015 µg/ml) y controles de células sin tratamiento.

Tras la incubación, se recogió el sobrenadante del cultivo y se tripsinizaron las células adheridas, las cuales se juntaron con el sobrenadante y se centrifugaron (1500 rpm, 5 min). Se resuspendieron en 1 ml de etanol 70 % en PBS y se incubaron a 4°C durante 20 min. Inmediatamente antes del pasaje por citómetro, se volvieron a centrifugar (4000 rpm, 10 min), y se resuspendieron en una solución de PBS que contenía yoduro de propidio 50 µg/ml y ARNasa 200 µg/ml, empleando 1 ml de solución de marcado por

cada 10^6 células, dejándose incubar durante 30 min a 37°C en oscuridad y se analizaron mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo marca Becton Dickinson, USA. Para cada muestra se analizó la fluorescencia roja procedente de 10.000 células empleado longitudes de onda de excitación de 488 nm y emisión de 620 nm. Para el análisis del ciclo celular, las células se seleccionaron en una gráfica FSC/SSC. Las fases del ciclo celular SubG1, G0/G1, S y G2/M se graficaron en un histograma de fluorescencia de ioduro de propidio (FL)/n° de células. Los datos se analizaron empleando el software WinMDI 2.8 (Microsoft). Se determinaron los porcentajes de cada una de las subpoblaciones celulares. Los resultados (medias \pm desvío estándar) se obtuvieron tras la realización de 2 experimentos independientes.

3.9 Determinación de la capacidad migratoria de células LM2 incubadas con los extractos citotóxicos seleccionados

Las células LM2 fueron sembradas en placas de 6 pocillos (1×10^5 células/ml) y se incubaron a 37°C hasta confluencia. Se realizaron heridas empleando un tip estéril de 200 μl , se cambió el medio y se agregaron los extractos vegetales a CI_{50} . Luego de 24 h, se retiró el medio y se fijaron las células con formaldehído 4% en PBS a 4°C . Seguidamente, se realizó una tinción de las monocapas celulares con cristal violeta y se fotografiaron los diferentes tratamientos. Se incluyó un control sin tratar, que se fijó, tiñó y fotografió inmediatamente después de realizar las heridas, y un control sin tratamiento que se fijó a las 24 h. Las imágenes se tomaron con un microscopio Olympus BX61 y una cámara Olympus Q-color 5 usando el objetivo de 40X.

La cuantificación de la motilidad celular se realizó midiendo la distancia entre el frente de invasión y el borde de la herida, en 6 campos tomados al azar para cada tratamiento, empleando el software CorelDRAW Graphics Suite X4 (Microsoft). Las diferencias en la migración celular se determinaron mediante el *t*-test de Student para medias pareadas.

3.10 Fototoxicidad de extractos en células

Para el “screening” de compuestos FS, se sembraron las células (5×10^4 /ml) en placas de 6 pocillos, 24 h después se renovó el medio y se colocaron los diferentes extractos a la

máxima concentración no citotóxica. Luego de incubar 24 h en medio con suero a 37° C en presencia del extracto, las células se iluminaron durante 60 min (equivalente a 1,8 J/cm²) con un banco de dos tubos fluorescentes desde abajo y a una distancia de 20 cm. Posteriormente, se cambió el medio por medio con suero libre de extracto y se dejaron las células 19 h a 37° C para realizar luego el ensayo de MTT.

Para analizar los resultados se determinó la dosis lumínica letal 50 (DL₅₀) como el tiempo de iluminación luego del cual se obtiene el 50% de viabilidad celular. Las DL₅₀ se expresaron en minutos con su respectivo desvío estándar (95% de confianza). Los valores se calcularon a partir de la regresión lineal de las curvas de viabilidad en función de tiempo de irradiación. El coeficiente de variación [desvío estándar/media x 100 (%)] estuvo por debajo del 12% en todos los experimentos.

3.11 Fuente lumínica para TFD de células

Se emplearon dos tubos fluorescentes (Osram L 36W/10), que emiten en un espectro de luz entre 400 y 700 nm, con un máximo a los 600 nm (zona roja del espectro). La energía fue de 0,5 mW/cm² determinada con un con un medidor de potencia FieldMaster y un sensor PM10 (Coherent Inc., USA).

3.12 Microscopía de fluorescencia de células expuestas a los extractos FS

Se sembraron células LM2 (5x10⁴/ml) sobre cubreobjetos; 24 h después se renovó el medio y se incubaron las células durante 24 h en presencia de los extractos con actividad fotosensibilizante. Los cubreobjetos se montaron directamente sobre los portaobjetos con una gota de PBS, y la observación se llevó a cabo en un microscopio Olympus BX51, equipado con una lámpara de mercurio HBO y excitación ultravioleta (filtro U-MWU2, con filtro de excitación de 330-385 y 420 nm de emisión) y cámara de fotos Olympus Q-color 5.

3.13 Análisis de la composición de los extractos vegetales FS en células por HPLC

Las muestras de *Combretum fruticosum* (hoja, metanol) y *Scutia buxifolia* (hoja, metanol) fueron analizadas mediante HPLC por el equipo del Dr Ian Eggleston, en el

laboratorio de Química Medicinal del Departamento de Farmacología y Farmacia de la Universidad de Bath, Reino Unido.

Las muestras de ambos extractos se disolvieron en metanol y se analizaron con AcCN:MeOH:EtOH:H₂O; 85:9:3:3, como mezcla de solventes de elusión. Se corrió además una muestra patrón de clorofila *b* disuelta en metanol.

Se utilizó un detector de absorción UV-vis seteado para $\lambda = 214$ y 435 nm, longitudes de onda particularmente adecuadas para la detección de macrociclos pirrólicos meso-sustituídos y un detector de fluorescencia seteado a $\lambda_{exc} = 435$ nm y $\lambda_{em} = 635$ nm para detección de clorofilas.

3.14 Protección del extracto metanólico de hoja de *C. argentina* frente a la TFD

El protocolo base de los experimentos de protección de TFD consistió en sembrar células (5×10^4 /ml) y luego de 48 h, se cambió el medio por medio sin suero, las células se incubaron con ALA 1 mM, verteporfín 3 mM o temoporfin 3 mM durante tres horas, y se irradiaron con el sistema de iluminación para células. Inmediatamente, se cambió el medio sin suero por medio conteniendo 5% SFB, las células se incubaron 24 h en estufa y se realizó el ensayo del MTT.

Para testear la posible fotoprotección por el extracto de *C. argentina*, el mismo se agregó en diferentes puntos del protocolo (Figura 2), tal como se detalla a continuación: Tratamiento A: *C. argentina* 24 h después de la siembra y hasta el cambio de medio luego de la irradiación; Tratamiento B: durante las 3 h de incubación en oscuridad con el FS y hasta el cambio de medio luego de la irradiación; Tratamiento C: sólo durante la irradiación; Tratamiento D: durante el tiempo posterior a la irradiación y hasta la determinación de viabilidad; Tratamiento E: luego de 24 h de sembradas y hasta el ensayo de viabilidad. En aquellos casos donde fue necesario, se volvió a agregar el extracto luego del cambio de medio. Las concentraciones de *C. argentina* utilizadas fueron 10, 20, 40 y 70 $\mu\text{g/ml}$. Se realizó el control de fotoprotección, incubando las células con el secuestrante de $^1\text{O}_2$ triptofano 8 mM desde 24 h después de la siembra hasta el cambio de medio luego de la irradiación (Tratamiento A).

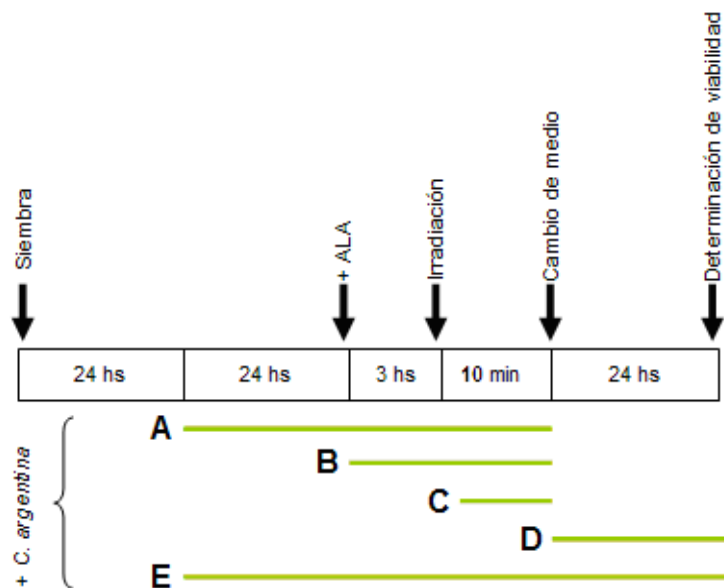


Figura 2: Esquema experimental de irradiaciones en ALA-TFD e incubaciones con el extracto de *C. argentina*

3.15 Exposición a radiación UV-A de células LM2 incubadas con extracto metanólico de hoja de *C. argentina*

Se sembraron células LM2 (5×10^4 /ml) en placas de 6 pocillos y 48 h después se irradiaron durante 6 min empleando una lámpara con dos luminarias de radiación UV-A, con pico de emisión en los 365 nm modelo EN-280L (Spectronics Corporation, NY, USA). Posteriormente, se cambió el medio por medio con suero libre de extracto y se dejaron las células 24 h a 37°C para realizar luego la determinación de viabilidad por el MTT.

Para testear la potencial protección del extracto de *C. argentina* sobre el daño UV-A, el mismo se agregó en una concentración de $40 \mu\text{g/ml}$ en dos momentos diferentes del protocolo: Tratamiento 1: sólo durante la irradiación; Tratamiento 2: 24 h después de la siembra y hasta el cambio de medio luego de la irradiación (Figura 3).

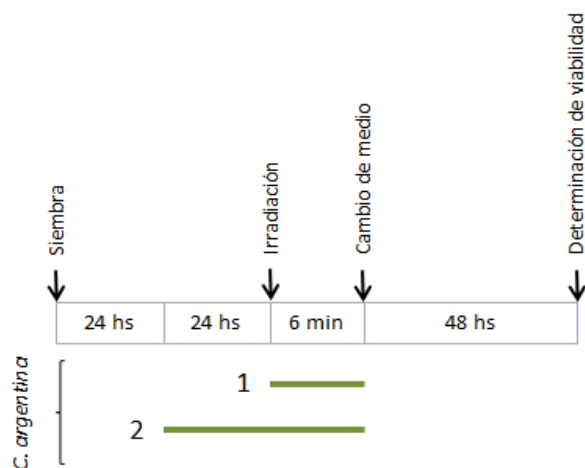


Figura 3: Esquema experimental de irradiaciones con luz UV-A en células LM2 incubadas con extracto de *C. argentina*

3.16 Tratamiento estadístico

En todos los experimentos, las diferencias entre los grupos se establecieron con el *t*-test de Student, considerando significativas las diferencias cuando $p < 0,05$. Se realizaron para los ensayos celulares, 3 experimentos independientes al menos por duplicado.

4 Experimentos en bacterias

4.1 Cepas bacterianas utilizadas

Se emplearon aislados clínicos de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (especies Gram+), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-) provistos por el Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM), CONICET-UBA. *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa* se conservaron por repiques en agar tripteína de soya (TSA) de Laboratorios Britania S.A., Buenos Aires, Argentina, y para *E. Coli* se utilizó agar Luria Bertani (LBA). Todos los cultivos y subcultivos de las tres líneas en medio líquido se incubaron a 37°C y agitación en condiciones de aerobiosis.

Para los experimentos con bacterias en suspensión se realizó un cultivo overnight de 18 h y el subsecuente subcultivo a partir de una alícuota del mismo. Se utilizó medio

líquido tripteína de soya (TS) de Laboratorios Britania, para cultivar *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, y medio líquido Luria Bertani (LB) para *E. Coli*. Los subcultivos se dejaron incubar hasta que alcanzaran la fase exponencial de crecimiento. Luego se centrifugaron, se realizaron tres lavados y la resuspensión final con buffer fosfato de sodio (PBS) 10 mM a pH 7,4, se diluyó hasta una concentración final de 2×10^8 UFC/ml.

4.2 Ensayos de determinación de actividad antimicrobiana

Se hizo un “screening” para testear la actividad bactericida de una colección de extractos vegetales en la especie *S. epidermidis*. Suspensiones de bacterias (10^8 UFC/ml) fueron expuestas a diferentes concentraciones de los extractos (5 – 500 µg/ml) durante 50 min en oscuridad. Luego se realizaron diluciones seriadas que se plaquearon en TSA o LBA. Después de 24 h de incubación en estufa a 37 °C, se realizó el recuento de colonias y la determinación de UFC/ml. Ha sido propuesto que si un extracto vegetal posee una CIM menor a 0,1 mg/ml es un buen antimicrobiano, si $0,1 \text{ mg/ml} < \text{CIM} < 0,6 \text{ mg/ml}$ es un antimicrobiano moderado, y si la CIM es mayor a 0,6 mg/ml es un antimicrobiano débil (Cos et al., 2006).

Se determinaron además, las máximas concentraciones no tóxicas de los extractos para ser empleadas en los ensayos de fotosensibilización, donde la reducción de la viabilidad bacteriana fue menor al 20%.

4.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los extractos vegetales

Suspensiones diluidas de las diferentes especies bacterianas (10^7 UFC/ml) fueron sembradas en placas de 96 pocillos en medio Mueller Hinton, con diferentes concentraciones de los extractos que previamente (ítem 4.2) habían sido determinados como bactericidas. Se dejaron incubar a 37 °C en oscuridad durante 24 h. Se evidenció el crecimiento de las bacterias mediante la aparición de turbidez en el medio respecto al control sembrado sin bacterias y se corroboró mediante la siembra de una alícuota del cultivo en placa de agar. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada extracto, como aquella concentración a la que no se registró aparición de turbidez.

Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de cada extracto, se extrajeron 100 µl de los pocillos en los cuales no se observó crecimiento visible de la bacteria (inhibición de crecimiento); que fueron inoculados en placas con TSA. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se comprobó la ausencia o presencia de colonias en las placas. Se determinó la CMB como la menor concentración de extracto que inhibió el crecimiento de colonias. Se utilizó como control positivo un inóculo bacteriano, y como control negativo, PBS estéril. El control antibacteriano, se realizó empleando el antibiótico ampicilina, siendo las cepas empleadas, sensibles al mismo.

4.4 “Screening” de posibles FS en bacterias

Para realizar el “screening” general de fototoxicidad, en placas de 24 pocillos, se incubaron 500 µl de suspensión de *S. epidermidis* (10^8 UFC/ml) con los extractos a la mayor concentración no tóxica durante 10 minutos en oscuridad. Luego se irradiaron las suspensiones durante 60 minutos ($1,8 \text{ J/cm}^2$) empleado la fuente lumínica para irradiación de células descrita en 3.11. Finalmente se realizaron diluciones seriadas y se plaquearon en TSA. Después de 24 h de incubación en estufa a 37 °C, se realizó el recuento de colonias y la determinación de UFC/ml. Los extractos que indujeron una reducción de la viabilidad de al menos el 50% respecto al control con extracto no irradiado, fueron considerados como fototóxicos, ampliándose posteriormente su estudio.

Se utilizaron los FS Azul de Toluidina y Clorina e6 como controles positivos de fototoxicidad.

4.5 Fuente lumínica para TFDA

En los ensayos de TFDA, las irradiaciones se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos y los controles de oscuridad fueron colocados en el sistema de irradiación envueltos en papel aluminio. Las placas se colocaron sobre un panel de vidrio y se expusieron a un arreglo de 2 lámparas halógenas de tungsteno GE Quartzline (500 W, General Electric Co., Cleveland, OH, USA) ubicadas a 25 cm de distancia desde abajo. La irradiancia fue de alrededor de 23 mW/cm^2 en la superficie de la muestra, medida con un medidor de potencia FieldMaster y un sensor PM10 (Coherent Inc., USA). El espectro de

emisión de la lámpara se midió en un fluorómetro Photon Technology International Quanta Master (USA). El espectro corregido se muestra en la Figura II.3 de la sección Resultados y Discusión.

Para evitar el sobrecalentamiento, se trabajó en cuarto refrigerado y se utilizó un sistema de ventilación y filtros de agua de 5 cm de ancho ubicados entre la muestra y las lámparas.

4.6 TFDA en medio sólido

Se realizó el ensayo de TFDA en medio sólido, suplementando el agar TSA antes de su solidificación, con soluciones estériles de los FS. Se dejó solidificar el TSA en pocillos de 22 mm de diámetro. Seguidamente se sembraron alícuotas de 15 μ l de diluciones seriadas de suspensiones bacterianas de *S. epidermidis* 10^8 UFC/ml. Las placas se incubaron durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, y posteriormente se irradiaron durante 90 min con el sistema de iluminación para TFDA descrito en 4.5. Finalmente, se incubaron las placas en oscuridad a 37 °C por 48 h. Se contó el número de colonias formadas en cada pocillo. Se realizó un control negativo con TSA al que se le agregó agua destilada.

4.7 Espectros de absorción y fluorescencia del extracto de *S. verbascifolium*

Los espectros de absorción y fluorescencia ($\lambda_{exc}=418$ nm) de soluciones de *S. verbascifolium* preparadas en PBS fueron registrados en un espectrofotómetro Hewlett Packard modelo 8452A (Hewlett Packard, USA) y un fluorómetro Perkin Elmer LS55, respectivamente. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico y se trabajó a 25°C.

4.8 Ensayo de unión y captación de extracto de *S. verbascifolium*

Se resuspendió en PBS un cultivo de *S. epidermidis* en fase exponencial de crecimiento. Se incubó la suspensión de bacterias durante diferentes tiempos con el extracto de *S. verbascifolium* a una concentración de 50 μ g/ml. A continuación se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet con las bacterias se lavó con PBS y se volvió a

centrifugar dos veces. Luego se incubó con una solución de lisis (50% etanol/ 10% SDS/40% PBS) a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó la muestra y se analizó la fluorescencia del sobrenadante (fluorómetro Perkin Elmer LS55) empleando una longitud de excitación de 418 nm y de emisión de 679 nm. La concentración del extracto se determinó a través de curvas estándar de fluorescencia versus concentración. Este valor se dividió por el número de UFC/ml en la muestra para determinar los pg de extracto por célula bacteriana.

4.9 Microscopía de fluorescencia de bacterias incubadas con *S. verbascifolium*

Se incubaron suspensiones bacterianas de *S. epidermidis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* con extracto de *S. verbascifolium* (50 µg/ml) durante 5 minutos. Se tomó una gota y se montó sobre un portaobjetos. Las observaciones y fotografías se realizaron utilizando un fotomicroscopio Olympus BX51, equipado con una lámpara de mercurio HBO de 100 W y filtro UV (365 nm, filtro de excitación UG-1).

4.10 Fotodegradación de FS

Se irradiaron soluciones de los FS en el sistema de luz descrito en 4.5. La cinética de la fotodegradación de *S. verbascifolium* se estudió siguiendo el decaimiento de fluorescencia (F) del pico de emisión a 671 nm. El espectro de fluorescencia se registró usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico, empleando un fluorómetro Perkin Elmer LS55. La solución de *S. verbascifolium* se preparó en DMSO: PBS (10:90). Se graficó la emisión de fluorescencia con λ de excitación de 418 nm. Además, la fotodegradación se midió siguiendo el decaimiento del pico de absorbancia a 670 nm empleando un espectrofotómetro Hewlett Packard modelo 8452A.

La fotodegradación de las soluciones acuosas de Clorina e6 y azul de Toluidina se midió por el decaimiento de los picos de fluorescencia (F) (λ_{ex} = 405 nm, λ_{em} = 650 nm y λ_{ex} = 606 nm, λ_{em} = 657 nm, respectivamente).

Las constantes de fotodegradación observadas (k_{obs}) se obtuvieron por ajuste de cuadrados mínimos de la curva de: $\ln (F_o/F_t)$ versus tiempo de irradiación (t), de la parte

lineal del decaimiento de fluorescencia, de acuerdo a lo descrito en Caminos & Durantini (2006).

4.11 Estudios de mecanismos fotoquímicos en la TFDA con *S. verbascifolium*

Se trabajó con suspensiones de *S. epidermidis* 10^8 UFC/ml irradiadas durante 120 min con la fuente lumínica para TFDA de la sección 4.5, en presencia de *S. verbascifolium* 50 µg/ml y azida sódica o manitol 100 mM en PBS a pH 7,4. Se realizaron controles iluminando las soluciones con los secuestrantes NaN_3 o manitol en ausencia de *S. verbascifolium*. Al final de la irradiación se tomaron alícuotas de cada tratamiento para la determinación de las UFC/ml. Se realizó un control incubado con extracto en oscuridad durante 120 min. Las soluciones de azida sódica y manitol se prepararon en agua destilada inmediatamente antes de los experimentos.

Para inducir condiciones anaeróbicas durante la TFDA, se gaseó con nitrógeno la suspensión bacteriana 5 min antes de la irradiación, y durante los 120 min que transcurrió la misma. Se incluyó un control donde se irradió la suspensión bacteriana gaseada con nitrógeno, en ausencia de extracto de *S. verbascifolium*.

4.12 TFDA empleando *S. verbascifolium* y luz solar

Se incubaron las suspensiones de *S. epidermidis* (10^8 UFC/ml) en botellas estériles de plástico de 25 cm², con *S. verbascifolium* 50 µg/ml, azul de Toluidina 100 µM y Clorina e6 10 µM. Como controles de FS de hoja se emplearon *S. buxifolia* (100 µg/ml) y *C. fruticosum* (100 µg/ml). Luego de pre-incubar en oscuridad durante 10 minutos, se expusieron las bacterias a la luz solar (60-120 mW/cm², medido con medidor de potencia FieldMaster con sensor PM10, Coherent Inc., USA). Las irradiaciones se llevaron a cabo entre las 11 AM y las 16 PM, durante los meses de diciembre y enero en Buenos Aires. Para evitar el calentamiento excesivo, se utilizaron filtros de agua de 3 cm de ancho, interpuestos entre la luz solar y las botellas con las bacterias. Las mediciones de potencia lumínica se realizaron empleando los mismos filtros a fin de evitar las contribuciones de la radiación en el infrarrojo y el ultravioleta. La temperatura de las muestras se monitoreó y se mantuvo a 25 °C. A diferentes tiempos de irradiación,

se tomaron alícuotas bacterianas y se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en TSA y se determinaron las UFC/ml luego de 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.

4.13 Cromatografía en capa delgada de extracto de *S. verbascifolium*

Se prepararon soluciones de *S. verbascifolium* en metanol y clorofila *a* en etanol, y se sembraron sobre una placa de sílica gel, empleando como solvente de elusión una mezcla de éter de petróleo/acetona 3:1. Las bandas de cada compuesto se observando bajo luz visible y UV.

4.14 Tratamiento estadístico

Los valores reportados de UFC/ml representan la media \pm desvío estándar de tres experimentos independientes. Cada condición experimental se realizó por duplicado. Se evaluó la significancia de las diferencias entre dos medias mediante el *t* test de Student, considerando las diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

5 TFDA en bacterias internalizadas en queratinocitos

5.1 Internalización de *S. epidermidis* y *S. aureus* en queratinocitos PAM212

Se sembraron células PAM212 (5×10^4 células/ml) en placas de 12 pocillos, y fueron cultivadas en medio RPMI con gentamicina 100 $\mu\text{g/ml}$. Luego de 48 h a 37°C se retiró el medio, se realizaron dos lavados con PBS estéril, y se reemplazó por medio sin antibiótico.

Estos cultivos celulares se incubaron con suspensiones bacterianas de *S. epidermidis* o *S. aureus* en etapa exponencial de crecimiento. Se emplearon diferentes multiplicidades de infección (MOI) de 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000, definiendo MOI como UFC/número de células. Luego de 1 h de incubación con las bacterias, se retiró el medio y se realizaron tres lavados con PBS estéril. Posteriormente se repuso el medio con gentamicina 100 $\mu\text{g/ml}$, se suplementó con lisostafina 20 $\mu\text{g/ml}$ y las células se incubaron durante 1 h a 37 °C. Finalmente se retiró el medio, se lavó tres veces con PBS estéril y se repuso el medio sin antibiótico.

Durante la puesta a punto de las condiciones de infección, se realizó el ensayo de MTT para determinar la viabilidad de las células PAM212, 7 h después de haber sido infectadas a las diferentes MOI mencionadas.

5.2 TFDA de *S. aureus* o *S. epidermidis* internalizados en queratinocitos

Una vez obtenidos los cultivos de queratinocitos infectados con *S. epidermidis* o *S. aureus*, se incubaron durante 1 h en estufa en oscuridad con PBS estéril con extracto metanólico de flor de *S. epidermidis* 50 µg/ml o azul de Toluidina 1 µM para permitir la entrada del FS a las células y el contacto con las bacterias internalizadas. A continuación, se irradiaron los cultivos empleando la fuente de luz descrita en 4.5 durante diferentes tiempos 30, 60 y 120 minutos.

Después de 4 h de finalizada la TFDA, se determinó en paralelo la viabilidad de los queratinocitos y el número de UFC/ml luego del tratamiento. Y a partir de los resultados obtenidos se calculó en número de CFU por queratinocito viable como parámetro de selectividad de la TFDA.

Para ello, una vez irradiados los cultivos, se retiró el PBS y se incubaron los queratinocitos con 100 µl de tripsina a 37° C durante 5 minutos para desprenderlos. Seguidamente, se agregaron 900 µl de Tritón 0,025 % en agua destilada estéril, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron alícuotas de 100 µl en placas de TSA. Luego de 24 h se determinó el número de UFC/ml.

En un set de experimentos en paralelo, una vez irradiados los cultivos, se retiró el PBS y se agregó medio con gentamicina y se incubaron 4 h en estufa a 37° C para dejar progresar un eventual daño fotodinámico. Seguidamente, se retiró el medio, se realizaron tres lavados con PBS estéril y se incubaron los queratinocitos con 100 µl de tripsina a 37° C durante 5 min para lograr su desprendimiento y posterior conteo. Se inactivó la tripsina agregando 100 µl de medio con RPMI con suero y se realizó el recuento de células mediante tinción con el colorante vital de exclusión azul de Tripán.

6 Reacciones de identificación y extracciones de principios activos de extractos vegetales citotóxicos

6.1 Ensayos de identificación para alcaloides

Se prepararon los reactivos para la reacción de Dragendorff para alcaloides. Reactivo A: subnitrato de bismuto (4 gr) en 10 ml de HNO₃. Reactivo B: KI (11,35 gr) en 12,5 ml de agua. Se mezcló el reactivo A con el B, y se dejó decantar 20 minutos, se filtró el nitrato de potasio resultante y se diluyó el filtrado con 50 ml de agua destilada. Se disolvió una muestra sólida de extracto vegetal a testear en 250 µl de esta solución. La aparición de precipitados color naranja es indicador de positividad (Shriner et al., 1999).

Como control positivo de alcaloides se utilizó una muestra de cafeína (Lab. Montpellier, Argentina).

6.2 Ensayo de identificación para antraquinonas

Se maceró 1 gr de extracto vegetal en tolueno. Se agregó NaOH 5% (reacción de Borntrager) y se tomó como resultado positivo, la aparición de coloración rosada en la fase acuosa (Shriner et al., 1999). Como control positivo, se empleó 9,10-dioxoantraceno (Fluka, USA).

6.3 Ensayo de identificación para saponinas

Se mezclaron 0,5 ml de solución de extracto vegetal (90:10 agua: metanol) con 0,5 ml de agua destilada. La aparición de espuma luego de agitación se interpretó como resultado positivo (Shriner et al., 1999). El control utilizado fue una muestra de dioscina de Sigma Co.

6.4 Ensayo de identificación para glúcidos

Se mezclaron 2 ml de solución acuosa de extracto y se mezcló con 1 ml del reactivo de Fehling. Se calentó a baño María durante 10 minutos y se interpretó como positivo la aparición de precipitado rojo (Shriner et al., 1999). Como control positivo se empleó una muestra de glucosa marca Anedra, Argentina.

6.5 Ensayo de identificación para taninos

Se mezclaron 2 ml de solución de extracto vegetal con 2 ml de FeCl_3 15%. El resultado positivo del ensayo fue la aparición de precipitado azul/negro (Shriner et al., 1999). Como control positivo se empleó una muestra de ácido tánico Mallinckrodt, USA.

6.6 Extracción de alcaloides

Se tomaron alícuotas de alrededor de 100 mg de extractos metanólicos secos de *S. chacoense* y *I. australe*, se disolvieron en HCl 1 M, se mezclaron en ampolla de decantación con etanol y se separó la fase acuosa. Posteriormente, se agregó NaOH 1 M a dicha fase hasta alcanzar un pH 10 y se extrajo con CHCl_3 . La fase orgánica se concentró en evaporador rotatorio y se liofilizó hasta sequedad, obteniéndose el extracto enriquecido en alcaloides (Shriner et al., 1999). Se corroboró la presencia de alcaloides con el ensayo cualitativo de identificación previamente descripto.

7. Determinaciones de especies reactivas del oxígeno *in vitro* a partir de la iluminación de los extractos fotoactivos

7.1 Método colorimétrico para medir estado oxidante total

Se realizó un ensayo basado en la oxidación del ión ferroso a ión férrico en medio ácido, para medir estado oxidante total de una muestra (Erel, 2005).

Se utilizaron dos reactivos: el reactivo 1 fue preparado disolviendo naranja de xilenol, NaCl y glicerol en H_2SO_4 ; el reactivo 2 fue preparado disolviendo sulfato ferroso amónico y o-dianisidina dihidroclorina en H_2SO_4 . Se mezclaron 225 μl del reactivo 1 y 35 μl de diluciones de los extractos irradiadas y sin irradiar en el sistema de luz descripto en 4.5, en pocillos de placas de 96. Seguidamente, se agregaron 11 μl del reactivo 2, y se incubó la solución durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se cuantificó la generación de ión férrico por la modificación de absorbancia de naranja de xilenol a 560 nm medida en espectrofotómetro de arreglo de diodos modelo 8452 (Hewlett Packard, USA).

7.2 Método para determinación de oxígeno singlete en muestras vegetales irradiadas basado en la oxidación del triptofano

Se empleó un método basado en la fotodegradación del triptofano a partir del oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) generado por un FS luego de ser irradiado (Cañete & Villanueva, 1990). Se incubó a temperatura ambiente una solución de triptofano 10^{-5} M en PBS y se agregaron los FS. Se llevó a cabo la irradiación durante 40 minutos con el sistema de luz descrito en 4.5. Finalmente, se cuantificó la emisión de fluorescencia del triptofano ($\lambda_{\text{ex}} = 280\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 350\text{ nm}$) con o sin irradiación. Se realizó un control irradiando la solución de triptofano sin el agregado de compuestos FS.

7.3 Determinación de oxígeno singlete mediante un marcador fluorescente en muestras vegetales irradiadas

Para la detección de oxígeno singlete, se utilizó el marcador fluorescente “Singlet Oxygen Sensor Green”, de Invitrogen. Esta sonda ha sido descrita para el estudio de $^1\text{O}_2$ en soluciones acuosas. Es altamente específica para este compuesto ya que no detecta a radicales hidroxilo ni superóxido (Rota et al., 1999).

Se prepararon soluciones de cada FS en PBS, a las que se les agregó el marcador y se irradiaron durante distintos tiempos con el sistema iluminación descrito en 4.5. Se incluyeron controles que permanecieron en oscuridad, y seguidamente se cuantificó fluorométricamente la producción de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 504\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525\text{ nm}$).

REFERENCIAS

Cabrera AL, Zardini EM (1978) Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires, Ed. Acme, Buenos Aires.

Caminos DA, Durantini EN (2006) Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin. *Bioorg Med Chem* 14 (12): 4253-4259.

Cañete M, Villanueva A (1990) Photodynamic properties of toluidine blue characterized by fluorescence and absorption spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* Vol. 46A, No. 8, pp. 1265-1267.

Casas A, Perotti C, Fukuda H, Rogers L, Butler AR, Batlle A (2001) ALA and ALA hexyl ester-induced porphyrin synthesis in chemically induced skin tumours: the role of different vehicles on improving photosensitization. *Br J Cancer*. 85(11):1794-1800.

Cos P, Maes L, Sindambiwe JB, Vlietinck AJ, Berghe VD. Bioassays for antibacterial and antifungal activities. Biological screening of plant constituents. Training manual. Trieste: UNIDO-ICS (United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology); 2006: 19–28

De la Peña M, Pensiero J F (2004) Plantas Argentinas. Catálogo de Nombres Comunes, L.O.L.A., Buenos Aires.

Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 89: 271-277.

Evans P, Whiteman M, Tredger M, Halliwell B (1997) Antioxidant properties of Sadenosyl- L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids. *Free Rad Biol Med*. 23: 1002-1008.

Erel O (2005) A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 38(12):1103-1111.

Galli S, Colombo L, Vanzuli S, Daroqui M, Vidal M, Jasnis A, Lustig E, Eiján A (2000) Characterization of a fibroblastoid mammary carcinoma cell line (LM2) originated from a mouse adenocarcinoma. *Int J Oncol.* 17: 1259-1265.

Harris R, Eichholtz T, Hiles I, Page M, O'Hare M (1999) New model of ErbB-2 overexpression in human mammary luminal epithelial cells. *Int J Cancer.* 80: 477-484.

Hunziker AT (1984) Los géneros de fanerogamas de Argentina. Claves para su identificación, Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires.

Rota C, Chignell CF, Mason RP (1999) Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med.* 27(7-8):873-81.

Shriner RL, Fuson RC, Curtin DY (1999) Identificación sistemática de compuestos orgánicos, Ed Limusa S.A., México.

Stamps AC, Davies SC, Burman J, O'Hare M J (1994) Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. *Int J Cancer.* 57:865-874.

Zuloaga FO, Morrone O (1996) Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina. I. Pteridophyta, Gymnospermae y Angiospermae (Monocotyledoneae), Monogr. Syst. Bot., Missouri Bot. Garden, St. Louis.

Zuloaga FO, Morrone O (1999) Catalogo de las plantas vasculares de la República Argentina. II. Dicotyledoneae, Monogr. Syst. Bot., Missouri Bot. Garden, St. Louis.

Zuloaga FO, Morrone O, Belgrano M (2009) Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur, Monogr. Syst. Bot., Missouri Bot. Garden, St. Louis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

I RESULTADOS EN LINEAS CELULARES

I.1 “Screening” de compuestos antitumorales *per ser*

I.1.1 Determinaciones de citotoxicidad de los extractos vegetales

I.1.2 Acción de los extractos citotóxicos sobre la morfología celular y el citoesqueleto de las células LM2

I.1.3 Reacciones de identificación de grupos funcionales y extracción de alcaloides a partir de extractos citotóxicos

I.1.4 Contenido de ADN en células LM2 incubadas con los extractos citotóxicos de mayor citotoxicidad

I.1.5 Efectos de los extractos citotóxicos de mayor actividad sobre la capacidad migratoria *in vitro* de células LM2

I.1.6 Discusión

I.2 Compuestos fotosensibilizantes para células a partir de extractos vegetales

I. 2.1 “Screening” de fototoxicidad en células LM2

I.2.2 Fototoxicidad de *S. buxifolia* y *C. fruticosum* en líneas HB4a, HB4a-Ras y PAM212

I.2.3 Microscopía de fluorescencia de células LM2 incubadas con los extractos FS

I.2.4 Fotosensibilización con clorofila *a* en células LM2

I.2.5 Análisis de los extractos de *C. fruticosum* y *S. buxifolia* por HPLC

I.2.6 Discusión

I.3 Fotoprotección a partir del extracto de hoja de *Collaea argentina*

I.3.1 Efecto fotoprotector de *C. argentina* frente a TFD

I.3.2 Fotoprotección de *C. argentina* frente a TFD con los FS verteporfin y temoporfin en células LM2

I.3.3 Exposición a radiación UV-A de células LM2 incubadas con extracto de *C. argentina*

I.3.4 Discusión

I.4 Conclusiones de los resultados en células

I.5 Referencias

I RESULTADOS EN LINEAS CELULARES

I.1 “Screening” de compuestos antitumorales *per ser*

I.1.1 Determinaciones de citotoxicidad de los extractos vegetales

Se estudió la citotoxicidad de los 113 extractos realizados a partir de 64 especies vegetales argentinas (Tabla I.1). Para ello se incubaron células de la línea de carcinoma mamario murino LM2 con diferentes concentraciones de los extractos vegetales en condiciones de oscuridad durante 24 horas.

Tabla I.1: Especies vegetales estudiadas en el “screening” de compuestos antitumorales

Especie	Nombre comun	Familia
<i>Abutilon pictum</i> (Hoo. & Arn.) Walp.	Farolito japonés	Malvaceae
<i>Aristolochia esperansae</i> Kuntze	Buta	Aristolochiaceae
<i>Amaranthus quitensis</i> Kunth	Yuyo colorado	Amaranthaceae
<i>Berberis ruscifolia</i> Lam	Espina amarilla	Berberidaceae
<i>Bromelia balansae</i> Mez	Caraguatá	Bromeliaceae
<i>Brugmansia arborea</i> (L.) Lagerh.	Floripón	Solanaceae
<i>Ceiba speciosa</i> (A. St.-Hil.) Ravenna	Palo borracho	Malvaceae
<i>Cestrum parquii</i> L Herit.	Duraznillo negro	Solanaceae
<i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E.	Cortinas del cielo	Vitaceae
<i>Citharexylum montevidense</i> (Spreng.) Mold.	Tarumá	Verbenaceae
<i>Clematis hilarii</i> (A. St.-Hil.) Speg.	Flámula	Ranunculaceae
<i>Collaea argentina</i> Griseb	Flor del niño	Fabaceae
<i>Colletia paradoxa</i> (Spreng.) Escal.	Curamanuel	Rhamnaceae
<i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz	Flor de cepillos	Combretaceae
<i>Commelina erecta</i> L.	Flor de Sta. Lucía	Commelinaceae
<i>Cordia trichotoma</i> (Vell.) Arrab. Ex Steud	Petiribí	Boraginaceae
<i>Condalia montana</i> A. Cast.	Piquillín negro	Rhamnaceae
<i>Cyphomandra betacea</i> (Cav.) Sendtn	Tomate andino	Solanaceae
<i>Dicliptera tweediana</i> Nees	Canario rojo	Acanthaceae
<i>Dodonaea viscosa</i> L. Jacq.	Dodonea	Sapindaceae
<i>Duranta serratifolia</i> (Griseb.) Kuntze	-	Verbenaceae
<i>Ephedra tweediana</i> Fisch. & C.A. Mey.	Tramontana	Ephedraceae
<i>Erythrina falcata</i> Benth.	Seibo de Jjuy	Fabaceae
<i>Eupatorium unifolia</i> Sch. Bip.	-	Asteraceae
<i>Gnaphalium gaudichaudianum</i> Cabrera	-	Asteraceae
<i>Hyaloseris andrada limae</i> Crist. & Cabr.	-	Asteraceae
<i>Iochroma australe</i> Griseb.	Sacha pera	Solanaceae
<i>Ipomoea alba</i> Hook	Flor de la luna	Convolvaceae
<i>Ipomoea bonariensis</i> Hook.	Campanilla	Convolvaceae
<i>Ipomoea cairica</i> (L.) Sweet	Flor canaria	Convolvaceae
<i>Ipomoea fistulosa</i> Mart. ex Choisy	Mandiruyá	Convolvaceae
<i>Jacaranda mimosifolia</i> D. Don	Jacarandá	Bignoniaceae
<i>Lantana camara</i> L.	Lantana	Verbenaceae
<i>Macfadyena unguis cati</i> (L.) A.H. Gentry	Uña de gato	Bignoniaceae
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	Palán-palán	Solanaceae

<i>Oxalis latifolia</i> Kunth	-	Oxalidaceae
<i>Parkinsonia aculeata</i> L.	Cina cina	Fabaceae
<i>Passionaria pasiflora</i> L.	Burucuyá	Passifloraceae
<i>Patagonula americana</i> L.	Guayubirá	Boraginaceae
<i>Pavonia sepium</i> A. St.-Hil.	Malva del monte	Malvaceae
<i>Petunia integrifolia</i> Lindl.	Petunia salvaje	Solanaceae
<i>Prosopis kuntzei</i> Harms Kuntze.	Itin	Leguminosae
<i>Prunus cerasifera</i> Ehrh.	Mirabolán	Rosaceae
<i>Prunus subcoriacea</i> (Chodat & Hassl.)	Perdiguero bravo	Rosaceae
<i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers	Flor de San Juan	Bignoniaceae
<i>Rivina humilis</i> L.	Inchiquil	Phytolaccaceae
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Robina	Fabaceae
<i>Ruellia britoniana</i> Leonard	Petunia mejicana	Acanthaceae
<i>Ruellia capitata</i> Ness.	-	Acanthaceae
<i>Ruellia elegans</i> Poir.	-	Acanthaceae
<i>Ruellia nudiflora</i> (Engelm. & Gray) Urban.	Hierba lombriz	Acanthaceae
<i>Ruellia ritasacea</i> (Pohl) Ezc.	-	Acanthaceae
<i>Scutia buxifolia</i> Reissek	Coronillo	Rhamnaceae
<i>Sesbania punicea</i> (Cav.) Benth.	Sesbania	Fabaceae
<i>Solanum amygdalifolium</i> Steud.	Jazmín de Córdoba	Solanaceae
<i>Solanum chacoense</i> Bitter	Papa salvaje	Solanaceae
<i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam.	Espina colorada	Solanaceae
<i>Solanum verbascifolium</i> L.	Fumo bravo	Solanaceae
<i>Solidago chilensis</i> Meyen	Vara de oro	Asteraceae
<i>Tabebuia chrysotricha</i> (Mart. Ex DC.) Standl.	Guayacán	Bignoniaceae
<i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. Ex DC.) Standl.	Lapacho rosado	Bignoniaceae
<i>Tabernaemontana australi</i> (Müell. Arg) Miers	Sapiranguí	Apocynaceae
<i>Tecoma Stans</i> (L.) Juss. Ex Kunth	Guarán amarillo	Bignoniaceae
<i>Xanthium cavanillesii</i> Schouw	Abrojo grande	Asteraceae

Las especies vegetales estudiadas pertenecen a las familias Acanthaceae, Amaranthaceae, Apocynaceae, Aristolochiaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Bignoniaceae, Boraginaceae, Bromeliaceae, Commelinaceae, Convulvaceae, Combretaceae, Ephedraceae, Fabaceae, Leguminosae, Malvaceae, Oxalidaceae, Passifloraceae, Phytolaccaceae, Ranunculaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Sapindaceae, Solanaceae, Verbenaceae y Vitaceae, las cuales son representativas de la flora de la región central y norte de la Argentina.

Se probó el efecto de los extractos sobre la viabilidad celular en el rango de 10 - 250 µg/ml. Los extractos que indujeron el 50% de mortalidad celular en la línea LM2 a concentraciones iguales o menores de 100 µg/ml, fueron considerados como citotóxicos. En todos los casos, los extractos acuosos resultaron menos tóxicos que los extractos metanólicos provenientes de la misma especie. Cuando los extractos correspondientes a

flor y hoja de una misma planta resultaron citotóxicos en la línea LM2, se eligió la fracción que mostró mayor actividad.

Trece extractos metanólicos de diferentes especies vegetales (pertenecientes a 7 familias) resultaron citotóxicos. Los mismos fueron: *Clematis hilarii* hoja, *Collaea argentina* (BAA 2664) hoja, *Combretum fruticosum* (BAA 19362) hoja, *Iochroma australe* (BAA 26662) hoja, *Ipomoea bonariensis* (BAA 26665) flor, *Ipomoea cairica* (BAA 6841) hoja, *Jacaranda mimosifolia* (BAA 26658) flor, *Sesbania punicea* flor (BAA 15457), *Solanum amygdalifolium* (BAA 26659) flor, *Solanum chacoense* (BAA 26661) hoja, *Solanum sisymbriifolium* (BAA 26660) flor, *Solanum verbascifolium* (BAA 26663) flor y *Xanthium cavanillesii* hoja.

Los que ejercieron la mayor toxicidad fueron: *I. australe* = *S. chacoense* > *J. mimosifolia* = *S. punicea* > *S. sisymbriifolium* = *X. cavanillesii* = *I. cairica* > *S. verbascifolium* = *C. hilarii* = *S. amygdalifolium* = *C. argentina* > *C. fruticosum* > *I. bonariensis*.

Los extractos citotóxicos seleccionados se testearon en seis líneas celulares adicionales: 3 tumorales y 3 no tumorales (dos de origen humano y una de origen murino, para cada caso). Las líneas tumorales fueron: melanoma humano B16-F10, carcinoma de pulmón humano A549, y carcinoma de vejiga murino MB49. Las no tumorales fueron: queratinocitos humanos HaCat, queratinocitos murinos PAM212 y la línea epitelial de mama de origen humano HB4a.

Todos los extractos fueron citotóxicos de forma dosis dependiente, en todas las líneas empleadas (Figuras I.1, I.2 y I.3). En líneas generales, y a excepción de las líneas celulares resistentes, el rango de CI_{50} de los extractos altamente citotóxicos fue 10 – 60 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 1.2).

Si bien hubo variabilidad en el efecto de cada extracto en las diversas líneas, pudo observarse que el extracto de mayor actividad en todos los tipos celulares, fue el de *S. chacoense* (Figura I.1). Los valores de CI_{50} de éste estuvieron entre 5 – 16 $\mu\text{g/ml}$, con excepción de la línea B16-F10, donde fue de 24 $\mu\text{g/ml}$. Esto significa que dicha especie resulta altamente citotóxica para células de diferentes orígenes.

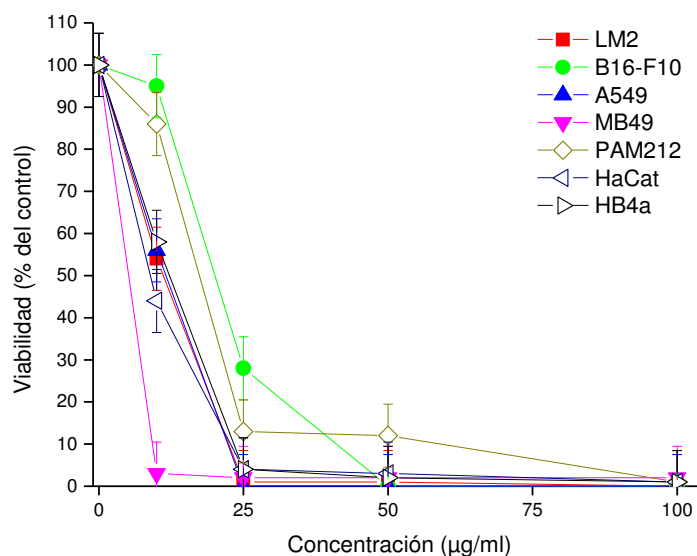


Figura I.1: Citotoxicidad de *S. chacoense*

Las células se incubaron durante 24 h con distintas concentraciones de *S. chacoense* hoja y se determinó la viabilidad celular por el ensayo del MTT

Los extractos de *I. australe* (CI₅₀ 11 – 61 µg/ml), *J. mimosifolia* (CI₅₀ 18 – 133 µg/ml), *S. sisymbriifolium* (CI₅₀ 21 – 56 µg/ml), *C. hilarii* (CI₅₀ 12 – 53 µg/ml), *S. amygdalifolium* (CI₅₀ 30 – 71 µg/ml), *S. punicea* (CI₅₀ 13 – 175 µg/ml) y *X. cavanillesii* (CI₅₀ 29 – 127 µg/ml) también resultaron altamente citotóxicos en todas las líneas, con la excepción de *J. mimosifolia* y *X. cavanillesii* en la línea tumoral de pulmón humano A549, y *S. punicea* en la línea epitelial mamaria humana, HB4a, todos los extractos tuvieron CI₅₀s <60 µg/ml.

Por otra parte, los extractos de *S. verbascifolium* (CI₅₀ 53 - >250 µg/ml), *C. argentina* (CI₅₀ 56 - >250 µg/ml) e *I. bonariensis* (CI₅₀ 72 – 185 µg/ml), fueron de actividad moderada, siendo los dos primeros, incapaces de inducir el 50% de mortandad en la línea de melanoma humano, B16-F10, en el rango de las concentraciones con las que se trabajó.

C. fruticosum (CI₅₀ 19 – 150 µg/ml), e *I. cairica* (CI₅₀ 8 – 120 µg/ml), mostraron gran variabilidad en su toxicidad inducida, siendo alta o moderadamente citotóxicos según la línea analizada.

La línea celular más susceptible a cada extracto fue variable, y algunos extractos ejercieron su mayor toxicidad frente a una línea tumoral, mientras otros lo hicieron sobre una no tumoral. No se encontró correlación entre el tiempo de duplicación de las líneas y la sensibilidad a los extractos.

Empleando el extracto de flor de *I. cairica*, las líneas tumorales fueron más sensibles que las no tumorales. Para el resto de los extractos, no se observó selectividad general por las líneas tumorales. Sin embargo, analizando cada caso en particular, encontramos que algunas de las líneas tumorales fueron más sensibles a determinados extractos que las normales.

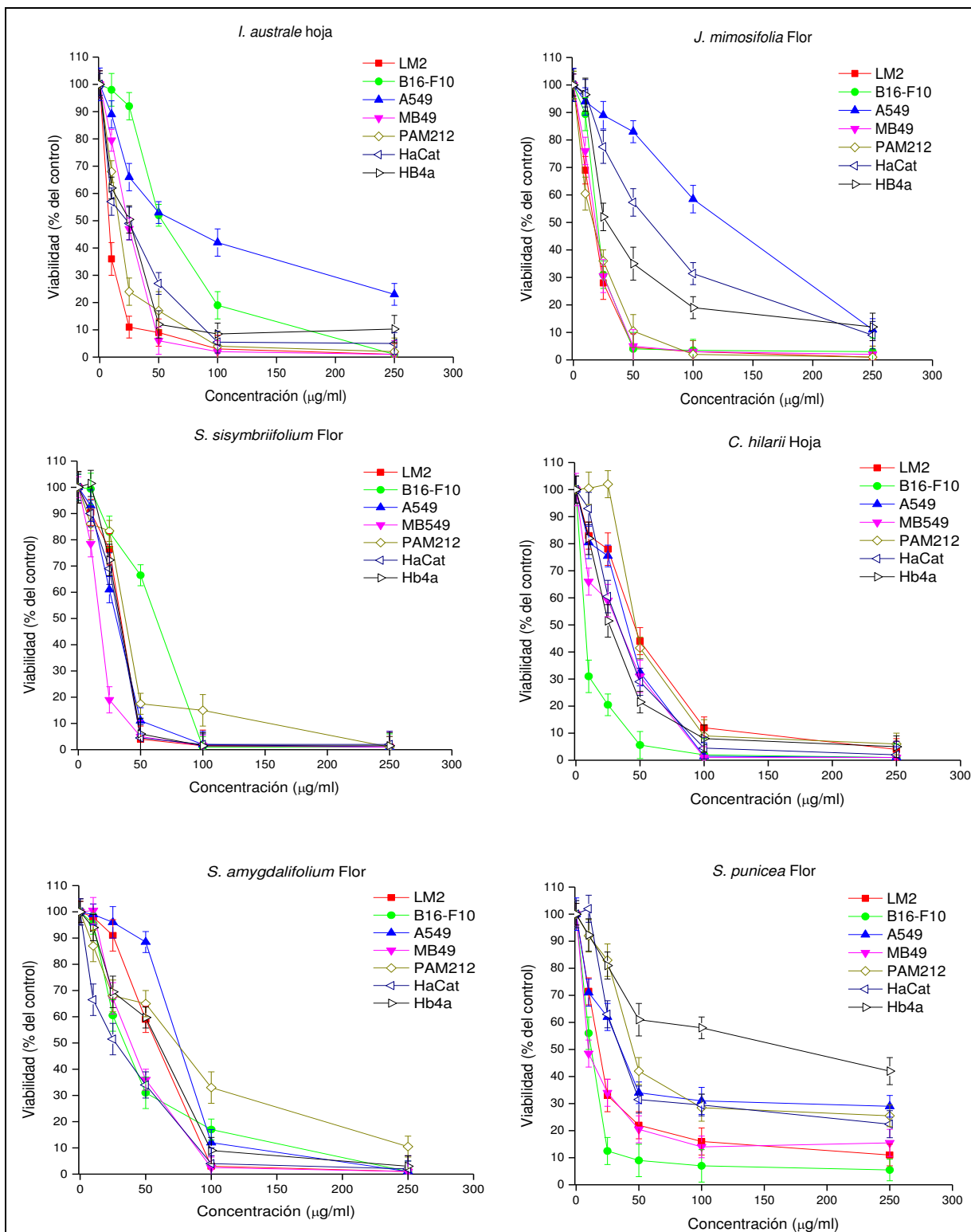


Figura I.2: Citotoxicidad de extractos de *I. australe* hoja, *J. mimosifolia* flor, *S. sisymbriifolium* flor, *C. hilarii* hoja, *S. amygdalifolium* flor y *S. punicea* flor

Las células se incubaron durante 24 h con distintas concentraciones de los extractos vegetales y se determinó la viabilidad celular por el ensayo del MTT.

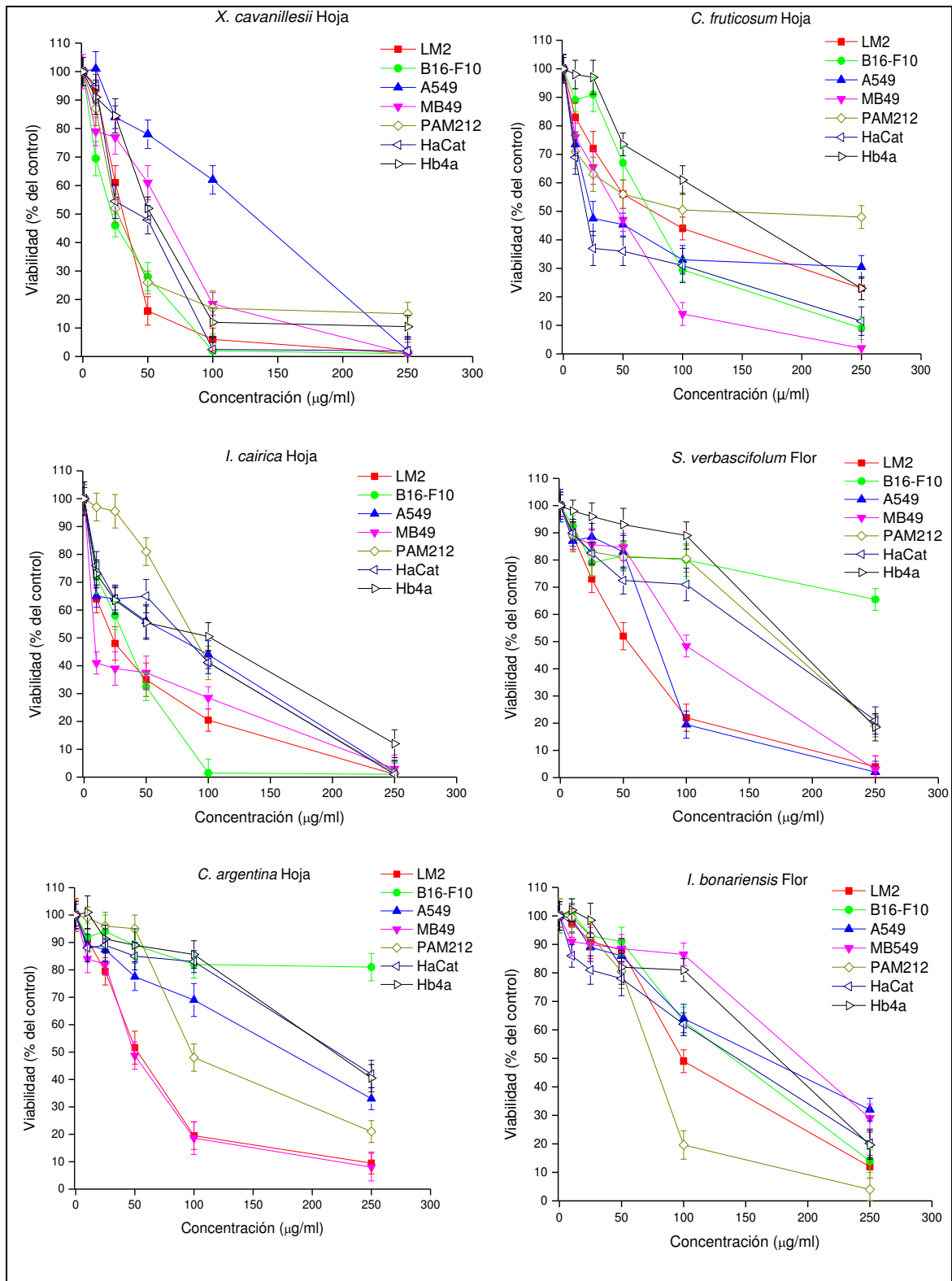


Figura I.3: Citotoxicidad de extractos de *X. cavanillesii* hoja, *C. fruticosum* hoja, *I. cairica* hoja, *S. verbascifolium* flor, *C. argentina* hoja e *I. bonariensis* flor

Las células se incubaron durante 24 h con distintas concentraciones de los extractos vegetales y se determinó la viabilidad celular por el ensayo del MTT.

Tabla I.2: Citotoxicidad de los extractos vegetales en un panel de líneas celulares

	LM2	B16-F10	A549	MB49	PAM212	HaCat	HB4a
<i>S. chacoense</i>	12 ± 4	24 ± 6	12 ± 3	5 ± 3	16 ± 8	10 ± 6	13 ± 3
<i>I. australe</i>	11 ± 5	61 ± 3	49 ± 4	25 ± 3	16 ± 2	28 ± 5	25 ± 5
<i>J. mimosifolia</i>	22 ± 4	24 ± 5	133 ± 2	22 ± 5	18 ± 6	68 ± 3	25 ± 2
<i>S. sisymbriifolium</i>	30 ± 5	56 ± 3	30 ± 3	21 ± 5	35 ± 5	30 ± 5	31 ± 5
<i>C. hilarii</i>	53 ± 2	12 ± 3	45 ± 4	39 ± 3	49 ± 5	44 ± 5	30 ± 3
<i>S. amygdalifolium</i>	57 ± 3	36 ± 3	70 ± 5	45 ± 4	71 ± 4	30 ± 2	56 ± 3
<i>S. punicea</i>	25 ± 3	13 ± 4	35 ± 5	15 ± 4	60 ± 5	37 ± 5	175 ± 5
<i>X. cavanillesii</i>	31 ± 4	29 ± 6	127 ± 3	59 ± 5	31 ± 5	50 ± 3	56 ± 3
<i>C. fruticosum</i>	75 ± 4	82 ± 6	23 ± 5	50 ± 3	111 ± 5	19 ± 4	150 ± 5
<i>I. cairica</i>	31 ± 4	40 ± 4	88 ± 3	8 ± 2	95 ± 3	78 ± 4	105 ± 5
<i>S. verbascifolium</i>	53 ± 4	> 250	71 ± 4	96 ± 3	160 ± 4	155 ± 3	165 ± 4
<i>C. argentina</i>	56 ± 5	> 250	169 ± 3	55 ± 4	100 ± 9	219 ± 4	222 ± 3
<i>I. bonariensis</i>	101 ± 4	147 ± 3	169 ± 3	185 ± 4	72 ± 4	139 ± 3	159 ± 3

Valores de CI_{50} de los extractos que resultaron citotóxicos en el “screening”. Se distinguen por color diferentes rangos de toxicidad según el valor de CI_{50} (0-25 ■ , 25-100 ■ , 100-250 □ µg/ml).

En cuanto al análisis de las diferentes líneas, en general las murinas fueron más sensibles a los extractos que las humanas. La línea de células mamarias humanas normales HB4a fue la más resistente a los efectos de 6 extractos (*S. punicea*, *C. fruticosum*, *I. cairica*, *S. verbascifolium*, *C. argentina*, *I. bonariensis*). Por otra parte, la mayor resistencia frente a los extractos se registró para los casos de *S. verbascifolium* y *C. argentina* sobre las células de melanoma B16-F10. Por otra parte, las células de carcinoma de pulmón humano A549 fueron las más resistentes a *J. mimosifolia*, *C. argentina*, *I. bonariensis* y *X. cavanillesii*.

En cuanto a las líneas más sensibles, la línea de adenocarcinoma murino LM2 fue la que más respondió a 6 extractos (*S. chacoense*, *I. australe*, *J. mimosifolia*, *S. sisymbriifolium*, *S. punicea* y *X. cavanillesii*). La de adenocarcinoma de vejiga murino MB49 fue de las más sensibles también a 6 de los extractos (*S. chacoense*, *I. australe*, *J. mimosifolia*, *S. sisymbriifolium*, *S. punicea* e *I. cairica*).

La línea de queratinocitos murinos PAM212 fue la más sensible a 4 de los extractos (*I. australe*, *J. mimosifolia*, *X. cavanillesii* e *I. bonariensis*) y la más resistente a otros 5 (*C. hilarii*, *S. amygdalifolium*, *C. fruticosum*, *I. cairica* y *S. verbascifolium*).

I.1.2 Acción de los extractos citotóxicos sobre la morfología celular y el citoesqueleto de las células LM2

A continuación se analizaron los efectos de los extractos más citotóxicos sobre la morfología, los microtúbulos y los filamentos de actina de las células LM2, por ser la línea con la cual se hizo el “screening” inicial. Para ello se trabajó con concentraciones de extracto subletales, donde se indujo la reducción de viabilidad del 50% de viabilidad (CI₅₀s) (Figuras I.4 y I.5).

La tinción con azul de Toluidina, reveló que todos los extractos afectaron la morfología celular a diferentes niveles, modificando la forma y tamaño del citoplasma y el núcleo. Los extractos que más fuertemente afectaron al núcleo fueron *S. chacoense*, *S. amygdalifolium*, *S. punicea*, *X. cavanillesii*, *S. sisymbriifolium*, *I. bonariensis* y *C. argentina*. Estos extractos indujeron condensación nuclear y contracción del citoplasma.

C. argentina y *S. punicea* provocaron además una reducción del citoplasma muy notoria con la consecuente aparición de células de menor tamaño con forma redondeada. El extracto de *I. australe*, y en menor proporción *C. hilarii* también indujeron la formación de células con forma ahusada, junto con la modificación de la morfología nuclear, y la aparición de grandes prolongaciones citoplasmáticas.

S. amygdalifolium indujo la aparición de células con forma estrellada, al igual que *X. cavanillesii* y *C. fruticosum*. Mientras *J. mimosifolia*, *S. chacoense* y *C. hilarii* indujeron cambios dramáticos a nivel del citoplasma, llevando a una fuerte reducción del mismo y la formación de grandes prolongaciones.

Se observó, además, la aparición de vacuolas intracitoplasmáticas como consecuencia del tratamiento de las células LM2 con *S. sisymbriifolium*, *S. chacoense* y *C. argentina*.

Como control positivo de daño a microtúbulos se empleó el compuesto antitumoral vinblastina. Con este tratamiento, se observaron células con citoplasmas muy reducidos y de forma irregular, además de condensación de cromatina.

Los microtúbulos se observaron organizados en las células LM2 sin tratamiento, formando una red alrededor del núcleo, y se encontraron uniformemente distribuidos en el citoplasma.

Los 13 extractos que resultaron citotóxicos, indujeron cambios en la organización de los microtúbulos, que se correlacionaron con los cambios en la morfología celular previamente descritos. Luego de los tratamientos, la desestabilización, condensación y agregación de los microtúbulos se hizo evidente en todos los casos. Los microtúbulos dejaron de distribuirse homogéneamente en el citoplasma y se dispusieron en diferentes regiones intracelulares. Estos resultados indican, que si bien los extractos vegetales hallados alteran la organización de los microtúbulos, no producen la despolarización de los mismos.

El tratamiento con vinblastina indujo la aparición de estructuras aberrantes, formadas por microtúbulos no polimerizados, mostrando signos de arresto del ciclo celular.

En las células inmunoteñidas para F-actina se evidenciaron también los cambios en la morfología celular inducidos por los extractos. Además, la expresión y distribución de esta proteína de microfilamentos se vio alterada. En el control se observó una distribución homogénea de largos filamentos de actina atravesando toda la célula. Esta distribución se alteró en todos los tratamientos con los extractos citotóxicos y con vinblastina, pudiéndose observar en la mayoría de ellos, una disminución en el número y la cantidad de fibras de estrés y distribuciones aberrantes y heterogéneas a nivel subcelular, donde la F-actina se concentró en focos citoplasmáticos principalmente en las zonas periféricas de la célula (fotografías no mostradas). A medida que progresó el daño celular, se observó la aparición de células con formas redondeadas donde sólo quedaron vestigios de actina filamentosa.

En el caso de células tratadas con *I. bonariensis* y *J. mimosifolia*, donde la célula tomó forma ahusada, se observó la presencia de actina desorganizada en las finas prolongaciones citoplasmáticas.

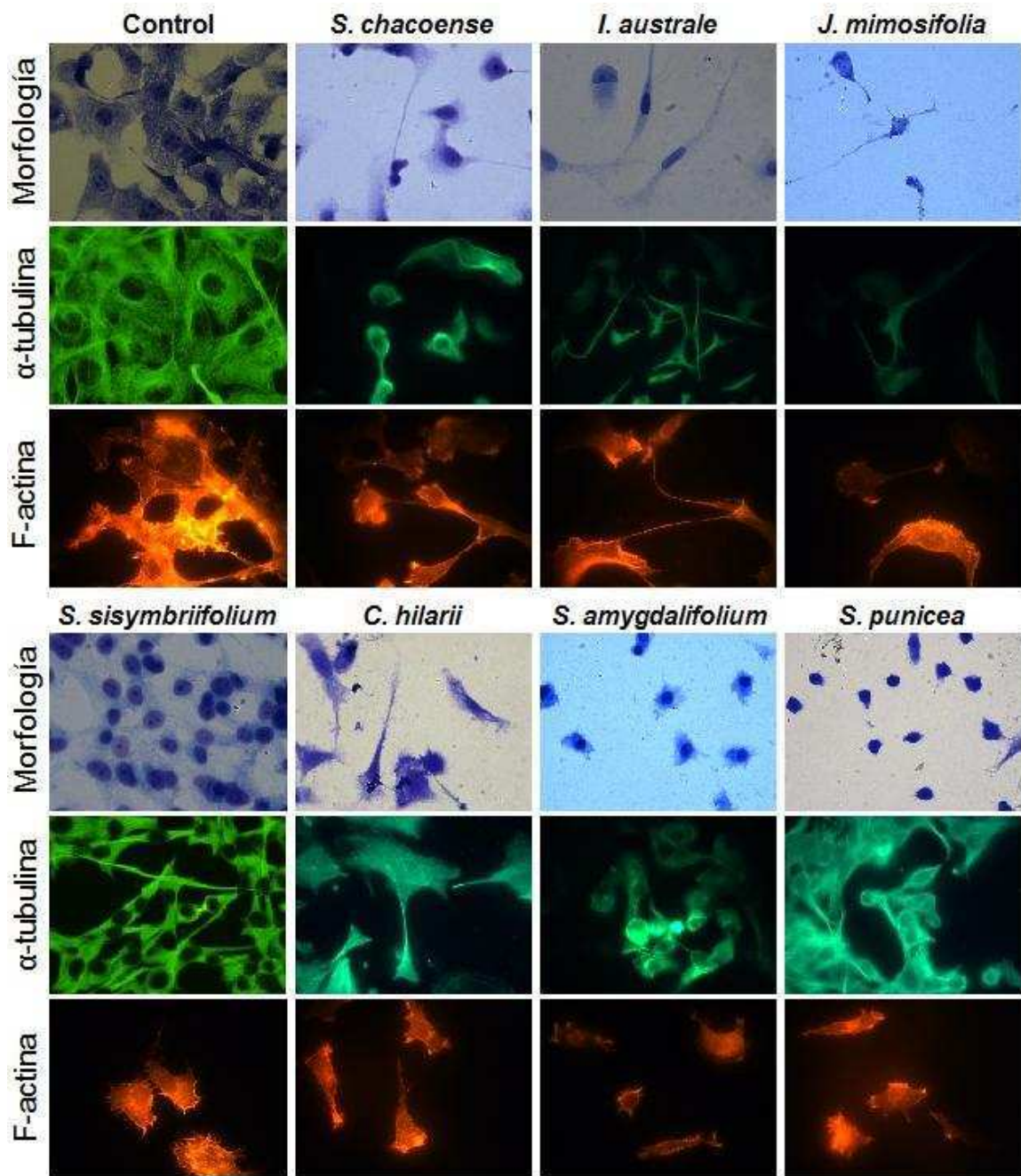


Figura I.4: Imágenes de morfología por Azul de Toluidina, microtúbulos y microfilamentos en células LM2 expuestas a extractos citotóxicos y control sin tratar

Las células se sembraron sobre portaobjetos y se expusieron durante 24 h a CI_{50} s de los extractos. Las células se fijaron y se llevaron a cabo las tinciones y se observaron en microscopio de fluorescencia. Control: células sin tratamiento. Aumento: 100X.

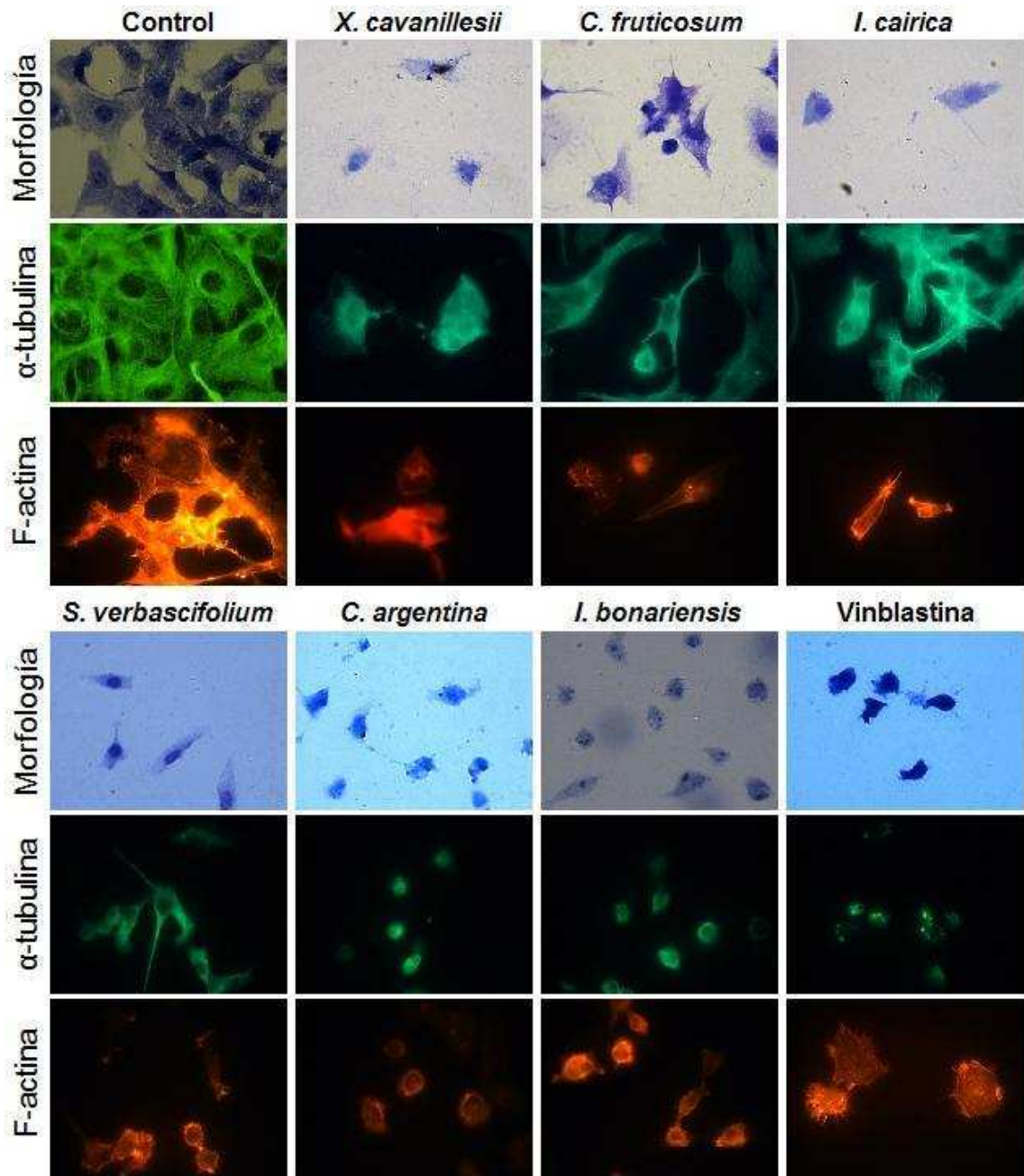


Figura I.5: Imágenes de morfología por azul de Toluidina, microtúbulos y microfilamentos en células LM2 expuestas a extractos citotóxicos y vinblastina y control sin tratar

Las células se sembraron sobre portaobjetos y se expusieron durante 24 h a CI_{50} s de los extractos. Las células se fijaron y se llevaron a cabo las tinciones y se observaron en microscopio de fluorescencia. Control: células sin tratamiento. Se muestran además las imágenes de células tratadas con vinblastina 0,025 μ g/ml. Aumento: 100X.

I.1.3 Reacciones de identificación de grupos funcionales y extracción de alcaloides a partir de extractos citotóxicos

Se llevaron a cabo reacciones de identificación de grupos funcionales, como primera aproximación para la determinación de la identidad química de los compuestos activos presentes en los extractos vegetales que mostraron mayor citotoxicidad.

Se realizaron pruebas para detectar presencia de alcaloides, antraquinonas, saponinas, glúcidos y taninos. Compuestos pertenecientes a estos grupos químicos, normalmente forman parte del metabolismo secundario de las plantas, y han sido descritos como compuestos antitumorales. Los resultados se indican en la Tabla I.3. Como controles positivos de cada una de estas reacciones se emplearon caféina (alcaloide), 9,10-dioxoantraceno (antraquinona), dioscina (saponina esteroide), glucosa (glúcido) y ácido tánico (tanino). Cada uno de estos compuestos resultó positivo específicamente en la prueba para su grupo químico.

Tabla I.3: Resultados de reacciones de identificación de compuestos presentes en los extractos vegetales citotóxicos

	Alcaloides	Antraquinonas	Saponinas	Glúcidos	Taninos
<i>S. chacoense</i>	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>I. australe</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
<i>J. mimosifolia</i>	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>S. sisymbriifolium</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<i>C. hilarii</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
<i>S. amygdalifolium</i>	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
<i>S. punicea</i>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>X. cavanillesii</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>C. fruticosum</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
<i>I. cairica</i>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
<i>S. verbascifolium</i>	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
<i>C. argentina</i>	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>I. bonariensis</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

Teniendo en cuenta los resultados positivos para la presencia de alcaloides, compuestos reportados en bibliografía como altamente citotóxicos, se realizó una extracción para enriquecer en alcaloides, a partir de los extractos de *S. chacoense* hoja, *I. australe* hoja y *J. mimosifolia* flor (los tres extractos de mayor actividad citotóxica), obteniendo rendimientos entre 0,2 y 2,3 %. Las primeras dos especies pertenecen a la familia

Solanaceae, familia en la cual otras especies han sido descritas como productoras de alcaloides.

A continuación se incubaron células LM2 con los extractos de *S. chacoense*, *I. australe* y *J. mimosifolia* enriquecidos en alcaloides a diferentes concentraciones, y se compararon los resultados con los de citotoxicidad de los extractos originales (Figura I.6). En el caso de *S. chacoense*, la fracción enriquecida en alcaloides tuvo menor efecto sobre la viabilidad celular comparando con el extracto original ($CI_{50} = 81 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ vs $CI_{50} = 12 \pm 4 \mu\text{g/ml}$), indicando que la actividad citotóxica de esta planta no se debería a su contenido de alcaloides.

Por otra parte, la fracción enriquecida en alcaloides de *I. australe* tuvo un efecto citotóxico significativamente mayor que el del extracto crudo ($CI_{50} = 2 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ vs. $CI_{50} = 11 \pm 5 \mu\text{g/ml}$). Esto nos estaría indicando que el compuesto activo citotóxico presente en el extracto, quedó retenido mayoritariamente en la fracción enriquecida en alcaloides.

De manera similar, la fracción enriquecida en alcaloides del extracto de *J. mimosifolia* también fue más efectiva que el extracto crudo original ($CI_{50} 4 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ vs. $22 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ respectivamente).

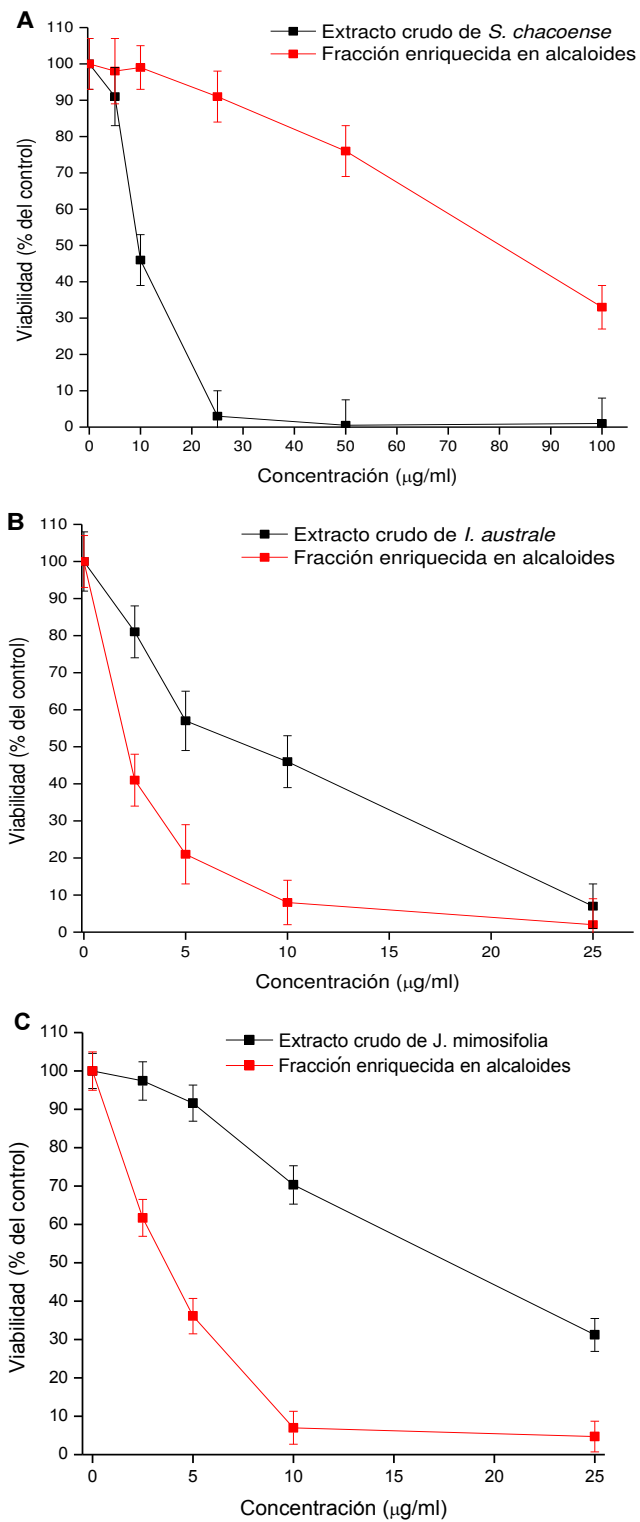


Figura I.6: Toxicidad de los extractos citotóxicos enriquecidos en alcaloides

Las fracciones enriquecidas en alcaloides de *S. chacoense* (A), *I. australe* (B) y de *J. mimosifolia* (C), se incubaron durante 24 h con células LM2 y su citotoxicidad se determinó por MTT en comparación con el extracto crudo.

Se continuó testeando el efecto de la fracción enriquecida en alcaloides del extracto metanólico de *I. australe* hoja debido a la mayor disponibilidad del material. Se determinó la citotoxicidad en diferentes líneas celulares (B16-F10, A549, MB49, PAM212 y HaCat). En todas ellas las CI_{50} s de la fracción enriquecida en alcaloides fueron significativamente menores respecto a las del extracto original (Figura I.7).

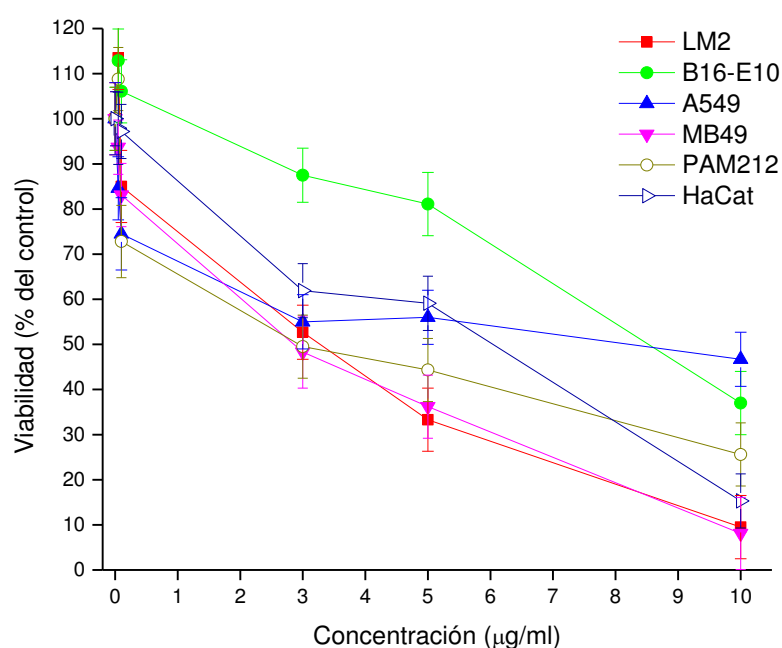


Figura I.7: Toxicidad de una fracción de *I. australe* enriquecida en alcaloides sobre un panel de líneas celulares

Una fracción enriquecida en alcaloides de *I. australe* se incubó durante 24 h con las células y su citotoxicidad se determinó por MTT.

Luego de calculadas las CI_{50} s de la fracción de alcaloides, se evidenció que las líneas A549 y B16-F10 fueron más resistentes que el resto (Tabla I.4). Cabe notar que la sensibilidad particular de cada línea celular al extracto original no se modificó con la purificación del mismo.

Tabla I.4: CI₅₀s del extracto original de *I. australe* y de su correspondiente fracción enriquecida en alcaloides en un panel de líneas celulares

Línea celular	CI ₅₀ Fracción alcaloides (µg/ml)	CI ₅₀ Extracto original (µg/ml)
LM2	2 ± 4	11 ± 5
B16-F10	8 ± 5	61 ± 3
A549	8 ± 4	49 ± 4
MB49	3 ± 5	25 ± 3
PAM212	4 ± 4	16 ± 2
HaCat	6 ± 5	28 ± 5
HB4a	6 ± 4	25 ± 5

I.1.4 Contenido de ADN en células LM2 incubadas con los extractos citotóxicos de mayor citotoxicidad

Se continuó evaluando la acción de los tres extractos de mayor toxicidad obtenidos en la sección I.1.1 (*S. chacoense*, *I. australe* y *J. mimosifolia*), junto con la fracción enriquecida en alcaloides de *I. australe* y el extracto de *I. cairica*. Este último fue elegido por ser el único extracto donde se observó selectividad por las células de origen tumoral.

Empleando la tinción del ADN con yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo, se determinó el contenido del mismo en una población de células LM2 tratadas durante 48 h con los extractos. De esta manera, se pudo determinar el porcentaje de células en las diferentes etapas del ciclo celular (G0/G1, S y G2/Mitosis). Las células con contenido de ADN menor a G0/G1, se identificaron como muertas o en proceso de muerte celular programada. Se llevó a cabo un control del veneno mitótico vinblastina, antineoplásico que produce arrestos en el ciclo celular (Figura I.8).

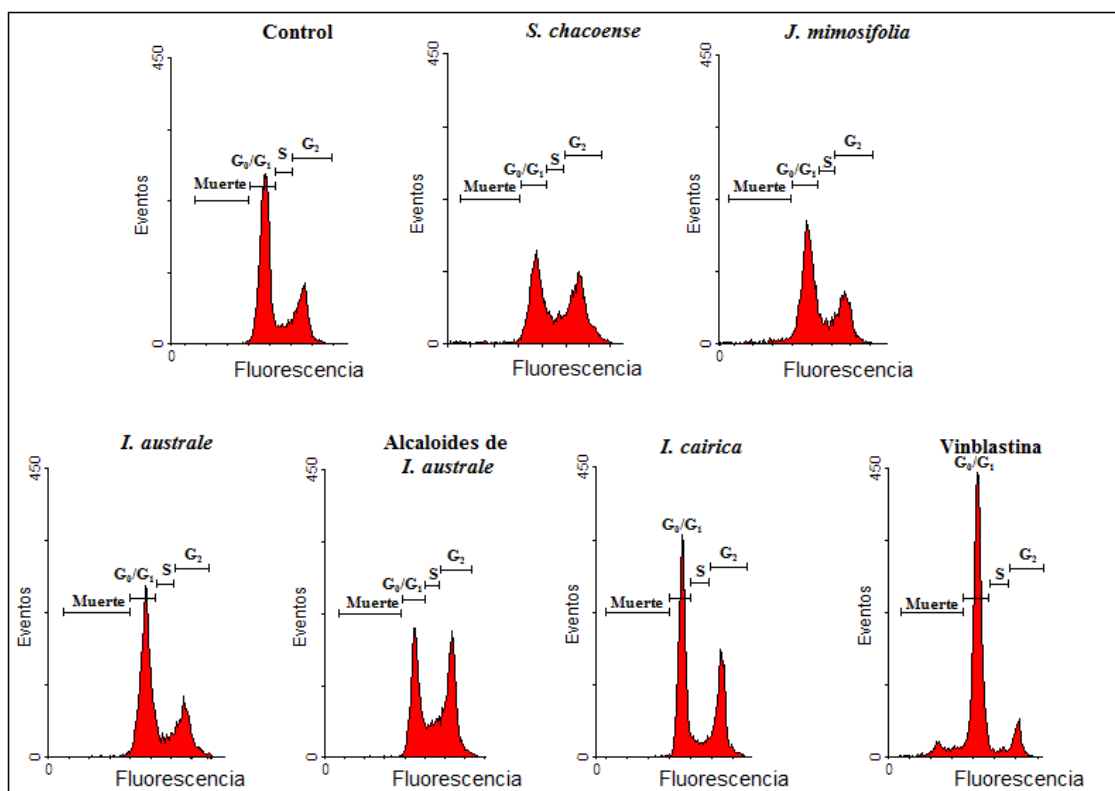


Figura I.8: Ciclo celular de células LM2 tratadas con extractos citotóxicos

Células LM2 (1×10^6) fueron incubadas durante 48 h en medio con suero en presencia de extractos vegetales a (CI_{50} s). Posteriormente, las células se fijaron y el contenido de ADN se cuantificó por citometría de flujo luego de tinción con yoduro de propidio. Se indican las diferentes regiones correspondientes a diferentes fases del ciclo celular, según el contenido de ADN. Se utilizó vinblastina ($0,015 \mu\text{g/ml}$) como tratamiento control de alteraciones en el ciclo celular, y se incluyó un control sin tratamiento.

Los porcentajes calculados de cada una de las fases del ciclo celular para cada tratamiento se muestran en la Figura I.9.

El extracto de *S. chacoense* disminuyó significativamente la subpoblación en G_0/G_1 y en fase S respecto al control sin tratar, e incrementó la cantidad de células en apoptosis con contenido de ADN inferior a G_0/G_1 , sugiriendo que el mismo induce tanto arrestos en el ciclo celular como muerte por apoptosis.

En las células tratadas con el extracto de *J. mimosifolia* se comprobó el aumento significativo de células en sub G_1 , sin diferencias en el resto de las subpoblaciones respecto al control.

En los tratamientos con la fracción enriquecida en alcaloides de *I. australe*, los cambios en el ciclo celular fueron marcados, registrándose disminuciones significativas en la subpoblación en G0/G1, mientras que la proporción de la subpoblación en G2/Mitosis se duplicó, demostrando en este caso un claro arresto de las células en la fase de mitosis. Por el contrario, los extractos crudos de *I. cairica* y de *I. australe*, no alteraron significativamente el ciclo celular.

En las células tratadas con vinblastina se observaron uno de los cambios en el patrón del ciclo celular más marcados, con el aumento significativo de las subpoblaciones en G0/G1 y sub G1, y la disminución, también significativa, de las subpoblaciones en S y G2/Mitosis, mostrando una acción principal como desencadenante de muerte celular programada y de arresto en G0/G1.

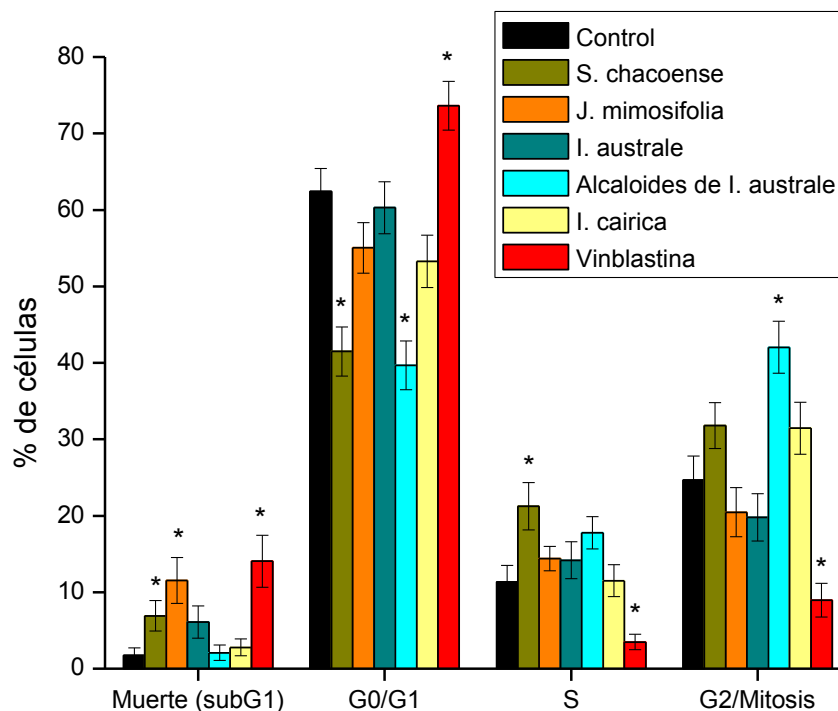


Figura I.9: Porcentaje de células LM2 en cada fase del ciclo celular luego del tratamiento con los extractos vegetales y vinblastina

Análisis de los porcentajes de subpoblaciones graficando los datos de la Figura I.8. * $p < 0,05$ respecto al control

I.1.5 Efectos de los extractos citotóxicos de mayor actividad sobre la capacidad migratoria *in vitro* de células LM2

Para evaluar el efecto de los extractos seleccionados sobre la capacidad de migratoria de las células LM2, se realizó un ensayo de migración en herida (Figura I.10). A partir de estas imágenes, se cuantificó la motilidad celular, que es proporcional al porcentaje de cobertura de las heridas (Figura I.11).

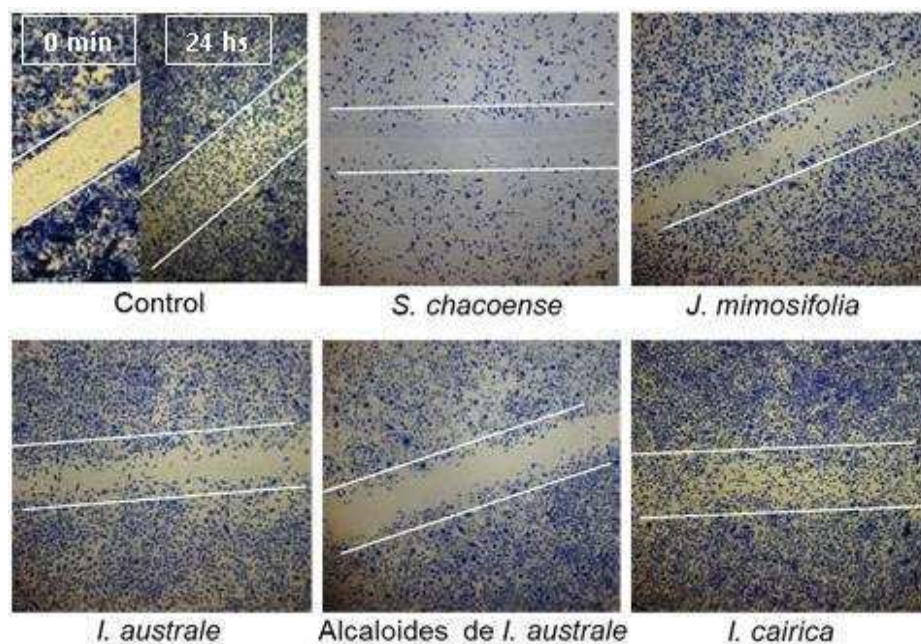


Figura I.10: Migración en herida de células LM2 luego de 24 h de incubación con extractos citotóxicos

Células LM2 se incubaron durante 24 hs luego de realizada la herida, en presencia de los extractos vegetales a $CI_{50}S$. Luego de este tiempo, las monocapas se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y se fotografiaron con un aumento 40X. Se muestra también una microfotografía del control sin tratamiento inmediatamente después de realizada la herida y luego de 24 hs de migración.

En las heridas control sin tratamiento se observó la cobertura total de la herida luego de 24 h, o sea que el porcentaje de cobertura de la herida fue del 100%. Idénticos resultados se obtuvieron en las células incubadas con el extracto de *I. cairica*. Por otra parte, los extractos de *J. mimosifolia* y *S. chacoense* disminuyeron significativamente la motilidad celular, siendo los porcentajes de cobertura de las heridas de $55 \pm 5 \%$ y $26 \pm$

5 % respectivamente. El extracto de *I. australe*, también redujo significativamente la capacidad migratoria de las células LM2 (71 ± 5 % de cobertura), y más aún, el extracto enriquecido en alcaloides de esta especie, indujo una mayor reducción de la migración celular (42 ± 5 % de cobertura). De esta forma, la fracción enriquecida en alcaloides de *I. australe* fue más efectiva en la inhibición de la migración celular que el extracto original.

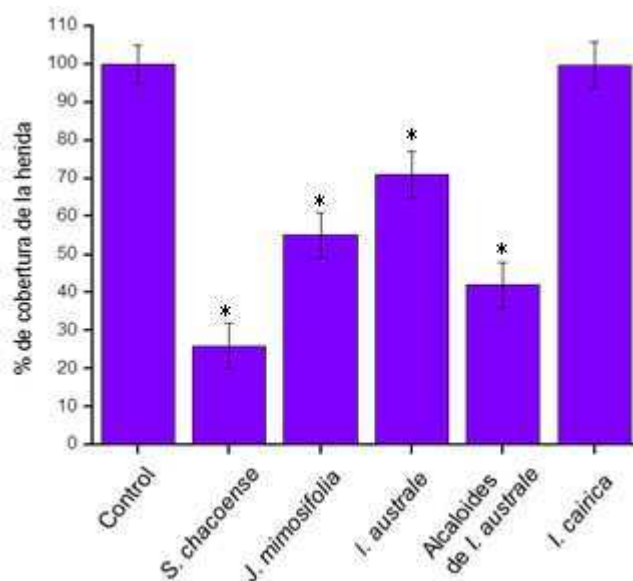


Figura I.11: Porcentaje de migración de células LM2 tratadas con los extractos citotóxicos respecto al control

Se cuantificó la motilidad celular mediante la medición de la distancia entre los dos frentes invasores de células, en seis campos microscópicos seleccionados al azar. El grado de cierre de la herida, se expresa como porcentaje de cobertura de la herida en comparación con el control sin tratamiento. *p <0,05.

I.1.6 Discusión

Se estudió una colección de 113 extractos vegetales. Se encontraron 13 extractos metanólicos con alta actividad citotóxica sobre 4 líneas celulares tumorales y 3 líneas no tumorales. Las especies con alta actividad incluyeron 4 pertenecientes al género *Solanum* (familia Solanaceae), conocido por poseer una amplia variedad de alcaloides, los cuales pueden resultar de moderados a altamente citotóxicos para humanos y animales. Sin embargo, no existen reportes del contenido de alcaloides ni de la actividad

biológica de otros compuestos presentes en las especies de solanáceas estudiadas en este trabajo, *Iochroma australe*, *Solanum amygdalifolium* y *Solanum sisymbriifolium*, vinculadas al tratamiento del cáncer.

En nuestro “screening” en general, las líneas murinas parecieron ser más sensibles a los efectos citotóxicos de los extractos vegetales. Por otro lado, la línea de melanoma humano B16-F10 fue la más resistente a los extractos de *C. argentina*, *I. australe*, *S. chacoense* y *S. sisymbriifolium*. Esto no es sorprendente, ya que los melanomas son usualmente muy resistentes frente a los tratamientos antineoplásicos convencionales (Lazescu et al., 2013).

En esta tesis se testeó la citotoxicidad de fracciones de los extractos de *S. chacoense* e *I. australe* enriquecidas en alcaloides, y se vio que mientras que la primera no resultó de mayor toxicidad que el extracto crudo, la fracción de *I. australe* sí lo fue, demostrando que los alcaloides se encuentran involucrados en la actividad de esta solanácea.

Existen reportes (Lorenzen et al., 2001) que indican que *Solanum chacoense*, el compuesto que mostró la mayor citotoxicidad contra las siete líneas celulares empleadas, posee un alto contenido de glicoalcaloides, los cuales le confieren propiedades insecticidas frente a un amplio rango de insectos, sin embargo en el presente trabajo no se ha vinculado su acción citotóxica específicamente al contenido de alcaloides.

Se sabe que el principal compuesto de *Solanum verbascifolium* también es un glicoalcaloide, la solasodina. Además, los compuestos: solaverbascina, solasodieno, solafloridina y tomatidenol fueron identificados en *S. verbascifolium* (An et al., 2006; Dopke et al., 1976; Verbist et al., 1977). En un estudio llevado a cabo con plantas de la medicina tradicional vietnamita, *S. verbascifolium* exhibió alta actividad citotóxica frente a diferentes líneas tumorales (Thu et al., 2010), sin embargo, se encontraron notables variaciones en el contenido de alcaloides esteroidales de la planta en diferentes regiones geográficas. Cabe destacar que las diferentes partes de la planta poseen diferente contenido de los compuestos, y en el presente trabajo hemos empleado la flor de *S. verbascifolium*.

En Paraguay, la raíz de *Solanum sisymbriifolium* ha sido usada en medicina tradicional con propiedades diuréticas y antihipertensivas (Ibarrola et al., 2006). Sin embargo, hasta la fecha no se han reportado efectos antitumorales para esta planta.

Sin embargo, otras especies del género *Solanum* han sido utilizadas en la medicina tradicional china en el tratamiento del cáncer. Los alcaloides aislados de *S. nigrum* afectan la estructura y función de la membrana de la célula tumoral, interfieren la síntesis de ADN y ARN, y alteran el ciclo celular (An et al., 2006). Se ha demostrado que la solamargina, un glicoalcaloide esteroideal aislado de *S. incanum*, induce apoptosis en varias líneas tumorales (Li et al., 2011). A nivel inmunológico, extractos de *S. lyratum* han inducido efectos inmunomoduladores en ratones portadores de tumores (Liu et al., 2010).

Algunos trabajos indican que las hojas y la corteza de la raíz de *Jacaranda mimosifolia* contienen iridoides, triterpenos, quinonas, flaconas, ácidos grasos, acetónidos, e inclusive, trazas de alcaloides (Chisholm et al., 1962; Gambaro et al., 1988; Moharram et al., 2007; Prakash et al., 1980; Sankara-Subramanian et al., 1972, 1973). Además, se conoce que la jacaranona, el constituyente más importante aislado de especies del género Jacarandá, posee actividad antitumoral (Gachet et al., 2009; Hardinge et al., 1963). Sin embargo, no hay datos de los componentes presentes en las flores, ni reportes de actividad antitumoral de sustancias encontradas en *J. mimosifolia*. En nuestro trabajo hemos podido correlacionar la acción citotóxica de este extracto, al menos en parte, con el contenido de alcaloides.

No existen reportes sobre compuestos aislados en especies del género *Collaea* ni de la actividad antitumoral de los mismos. Sin embargo, a nivel de familia, las especies de fabáceas usualmente poseen alcaloides en niveles variables. Proantocianinas y flavonoides están también usualmente presentes en especies de esta familia (Marles et al., 2003; Reed et al., 1995; Salunkhe et al., 1982) y algunos de ellos poseen actividad antitumoral (Jo et al., 2005; Lee et al. 2010; Mathan et al., 2011).

Las especies del género *Ipomoea* han sido ampliamente estudiadas en medicinas tradicionales de diversos países. Se ha estudiado su contenido de sustancias con actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (Hamsa et al., 2011; Kurata et al.,

2007; Lin et al., 2008). Muchos tipos de alcaloides, incluidos los del ergot, han sido aislados de algunas de estas especies (Abou-Chaar et al., 1970; Friedman et al., 1989; Stauffacher et al., 1969; Weber et al., 1976), y algunos de ellos mostraron actividad antitumoral, principalmente relacionada a la inmunomodulación y regulación de la angiogénesis (Hamsa et al., 2010).

Ipomoea cairica fue la especie que mostró la máxima selectividad por las células tumorales en nuestro estudio. Existen reportes del aislamiento de lignanos y cumarinas con actividad antitumoral, además de alcaloides indólicos citotóxicos (Paska et al., 1996; Meira et al., 2012). Por otra parte, no existen reportes de la actividad biológica de compuestos de *I. bonariensis*.

Especies del género *Clematis*, tales como *Clematis argentea* y *Clematis ganpiniana* han sido estudiadas por su contenido de saponinas triterpenoides, compuestos con actividad citotóxica en líneas de leucemia humana (HL-60), carcinoma hepatocelular (Hep-G2) y de glioblastoma (U251MG) (Ding et al., 2009; Hai et al., 2012). *Clematis hirsuta*, la especie de este género hallada en este trabajo como antitumoral, presenta antecedentes de uso etnofarmacológico en el tratamiento de enfermedades cutáneas, pero no existen reportes sobre su actividad citotóxica.

El género *Xanthium* posee muchas especies tóxicas y se han reportado casos de intoxicación del ganado en zonas donde estas especies crecen como malezas (Méndez et al., 1998). Existen reportes de sesquiterpenos efectivos en el tratamiento de úlceras y como antibacterianos en general (Olivaro et al., 2009; Penissi et al., 2009; Schmidt et al., 2009), obtenidos a partir de *Xanthium cavanillesii*, pero ninguno vinculado a actividad antitumoral de los compuestos presentes en esta especie.

Algunas especies del género *Sesbania* han sido investigadas por sus efectos citotóxicos frente a tumores. Inclusive el extracto metanólico de una de ellas, *S. grandiflora*, fue utilizado en un ensayo con ratones portadores de tumores, resultando efectivo como antitumoral (Sreelatha et al., 2011). Existe un sólo reporte de *S. punicea*, pero el extracto etanólico resultó citotóxico frente a la línea celular de leucemia P-388, pero el compuesto responsable de la citotoxicidad no fue identificado (Powell et al., 1976).

La familia Combretaceae, contiene especies que han sido utilizadas en medicina tradicional de diferentes regiones del planeta, como México, Brasil, Etiopía y Bangladesh (Angeh et al., 2006; Asres et al., 2001; Braga et al., 2000; Zamora-Martinez et al., 1992). Compuestos extraídos de un miembro de esta familia, *Calycopteris floribunda*, tales como el flavonoide pachipodol, mostró actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer de colon (Ali et al., 2008).

Combretum imberbe, perteneciente al género *Combretum*, también posee un compuesto triterpenoide con actividad anti-proliferativa y citotóxica contra las líneas celulares K-562 de leucemia humana, L-929 de fibroblastocitos y HeLa de cáncer cérvico-uterino (Angeh et al., 2006). En cuanto a *Combretum fruticosum*, existen reportes de citotoxicidad de extractos acuosos y etanólicos las sobre células de carcinoma nasofaríngeo humano KB. (Abbott et al., 1966; Zamora-Martínez et al., 1992).

En general, excepto por las líneas resistentes, las CI_{50} s de los extractos con actividad citotóxica presentados en este trabajo, estuvo en el rango de 10 - 150 $\mu\text{g/ml}$, y más específicamente, los extractos más activos tuvieron CI_{50} s de 10-60 $\mu\text{g/ml}$. Este rango está dentro del reportado para extractos crudos de plantas de varias familias que poseen compuestos con actividad antitumoral (Dzhambazov et al., 2002; Efferth et al., 2008; Shi et al., 2008; Singh et al., 2009; Xiao et al., 2008) y hasta de compuestos purificados (Li et al., 2002; Sobhani et al., 2002), y se encuentra de acuerdo con los criterios establecidos por el NCI para que un extracto vegetal sea considerado como citotóxico.

Con la hipótesis de que los extractos citotóxicos hallados pudiesen contener alcaloides como principio activo, utilizamos vinblastina (alcaloide de la Vinca) como control de inhibición de despolarización de los microtúbulos (Zhou et al., 1992). Alcaloides de algunas especies del género *Solanum*, como *S. berthaultii* han sido estudiados y se ha determinado que alteran la estructura y función tanto de los microtúbulos como de la F-actina (Bao-Quan et al., 2009; Liu et al., 2009).

Los trece extractos con los que se trabajó indujeron en la línea LM2, la desestabilización, condensación y agregación de los microtúbulos, aunque no se observó la despolarización de los mismos, efecto típico de los alcaloides de la Vinca.

Por otro lado, se seleccionaron para realizar determinaciones de alteraciones en el ciclo celular y capacidad migratoria en las células LM2 los extractos de *S. chacoense*, *I. australe* y *J. mimosifolia*, por su alta citotoxicidad y el extracto de *I. cairica*, por su “selectividad”. Empleamos también el extracto enriquecido en alcaloides de *I. australe* y el antineoplásico vinblastina como control.

El extracto de *S. chacoense* disminuyó la subpoblación celular con contenido de ADN característico en fases G0/G1. Se especula que esta subpoblación se encuentra principalmente en la fase G1 del ciclo celular, ya que la línea LM2, es una línea tumoral en activa división donde la población de células quiescentes estaría muy reducida, de tal manera que el extracto de *S. chacoense*, que había sido el de mayor actividad citotóxica, parece interferir el ciclo celular arrojándolo en G1, además de desencadenar muerte por apoptosis, evidenciado por un aumento en la subpoblación en sub G1.

El extracto de *J. mimosifolia* también aumentó el número de células en sub G1 sin cambios en el resto de las subpoblaciones de cada fase del ciclo.

La fracción enriquecida en alcaloides de *I. australe* modificó también el ciclo celular en las células LM2. Se observó disminución en la población en G1 y aumento de G2, actuando como un inhibidor de la mitosis. Cabe señalar que si bien las diferencias no fueron significativas, empleando el extracto original se registraron más células en apoptosis que con la fracción de los alcaloides.

El extracto de *I. cairica* no modificó significativamente las fases del ciclo celular, lo que llevaría a pensar que el efecto citotóxico observado independiente del arresto del ciclo.

Existen numerosos compuestos presentes en especies vegetales de las que se han informado efectos similares, tales como el extracto etanólico de *Pterdon pubescens*, planta utilizada como medicinal en Brasil, con la capacidad de inhibir la expresión de Ciclina D1 y de E2 -dos reguladores del ciclo celular fundamentales en la progresión del mismo- arrojando el ciclo en G1 e induciendo apoptosis en células de leucemia K562 (Pereira et al., 2010). También un compuesto fenólico, el 1'-acetoxi-4-O-isoalirileugenol aislado a partir de extractos etanólicos de *Glossogyne tenuifolia*, tiene

la capacidad de arrestar el ciclo en G1, en células de cáncer de pulmón A549 (Hsu et al., 2008).

Finalmente, señalamos que a pesar de ser un veneno mitótico que debería arrestar las células en mitosis, la vinblastina indujo aumentos en la población de Sub G1 y G1 y disminuciones en las fases S y G2. Resultados similares fueron reportados por otros autores tanto para vinblastina como para otros agentes antimitogénicos. Fabbri et al. (2006), han descripto que el docetaxel, un agente estabilizante de microtúbulos, induce durante las primeras horas de tratamiento, que la subpoblación en G2/Mitosis aumente, y disminuya G0/G1 y S, como es de esperar. Sin embargo, a medida que transcurre el tratamiento con la droga, y se desencadena la apoptosis luego del arresto celular, la población en G0/G1 comienza a aumentar porcentualmente y la de G2/Mitosis a descender hasta invertirse respecto a la situación inicial. Similares resultados se han encontrado empleando vinblastina luego de 24 h de tratamiento, donde el porcentaje de subpoblación en G1 se incrementa respecto al control y el de G2 disminuye (Salerni et al., 2010).

En cuanto a las modificaciones sobre la capacidad migratoria celular, nuestros resultados indican que los extractos crudos de *S. chacoense*, *J. mimosifolia*, *I. australe* y la fracción enriquecida en alcaloides de este último, fueron capaces de inhibir la migración celular en la línea LM2. Por el contrario, *I. cairica* no indujo efectos significativos sobre la misma.

De acuerdo a los efectos observados tanto en la acción citotóxica como el impacto sobre la migración celular de los extractos analizados, postulamos la existencia de múltiples mecanismos de acción de los mismos en la disminución de la progresión tumoral.

Otros autores han descripto recientemente la presencia de dos alcaloides fenantrénicos en la especie vegetal *Pancreatium maritimum*, con la capacidad de inhibir la proliferación y migración celular en la línea de cáncer de próstata metastásico humano PC-3. Estos efectos se detectaron aún en ausencia de citotoxicidad de los compuestos. Esta clase de alcaloides ha sido identificada por su potencial uso en control de proliferación y migración tumoral (Ibrahim et al., 2013). Por otro lado, dos nuevos compuestos aislados

de la corteza de *Crataeva nurvala*, uno de ellos un alcaloide, inhibieron la migración en células HeLa y PC-3 (Sinha et al., 2013).

Existen otros compuestos vegetales con actividad inhibidora de la migración celular, tales como el sesquiterpeno Artemisina derivado de *Artemisia annua*, que ejerce sus efectos a través de múltiples vías de señalización celular; el lignano homokiol, uno de los compuesto bioactivos presentes en el género *Magnolia*, que fue capaz de inhibir la migración celular en cultivos de líneas tumorales de pulmón, interfiriendo con la vía de señalización de la β -catenina; flavonoides de la planta medicinal *Oroxylum indicum* con capacidad inhibitoria de la migración celular, vinculada a la inhibición de proteasas; y los alcaloides de *Pachysandra terminalis* capaz de inhibir la migración celular al interferir con las β -integrinas (Firestone y Sundar, 2009; Lalou et al., 2013; Singh y Katiyar, 2013; Zhai et al., 2012).

I.2 Compuestos fotosensibilizantes para células a partir de extractos vegetales

I. 2.1 “Screening” de fototoxicidad en células LM2

Luego de estudiar la toxicidad y determinar las concentraciones citotóxicas para cada extracto en el Capítulo I.1, se determinó la actividad fototóxica de la colección de extractos. Para ello se trataron células de la línea LM2 con TFD empleando los extractos a sus máximas concentraciones no citotóxicas.

Los extractos de todas las hojas de la colección mostraron actividad fotosensibilizante sobre las células LM2, con diferentes niveles de actividad por lo cual inferimos que la presencia de clorofilas o derivados de la misma estarían siendo los causantes de este patrón. La excepción fue el extracto de *C. argentina*, donde no se registró actividad fotosensibilizante de ningún tipo.

Se observaron además, dos extractos correspondientes a flores, que resultaron levemente fototóxicos. Estos extractos pertenecieron a las especies *Collaea argentina* y *Macfadyena unguis- cati*.

Se tomaron los dos extractos metanólicos de hoja con mayor actividad y se realizaron experimentos de TFD con diferentes tiempos de irradiación. Los extractos seleccionados fueron *Scutia buxifolia* (BAA 18877) hoja y *Combretum fruticosum* hoja. Se determinaron los valores de DL₅₀ para cada uno, los cuales fueron de 20 min para *S. buxifolia* y de 7 min para *C. fruticosum* (Figura I.2.1). El extracto metanólico de hoja de *C. fruticosum* fue uno de los extractos que resultó citotóxico en oscuridad en células, como previamente se detalló en I.1. Para realizar la TFD se empleó dicho extracto a 10 µg/ml, concentración a la cual la toxicidad en oscuridad es menor al 10% en las diferentes líneas celulares empleadas.

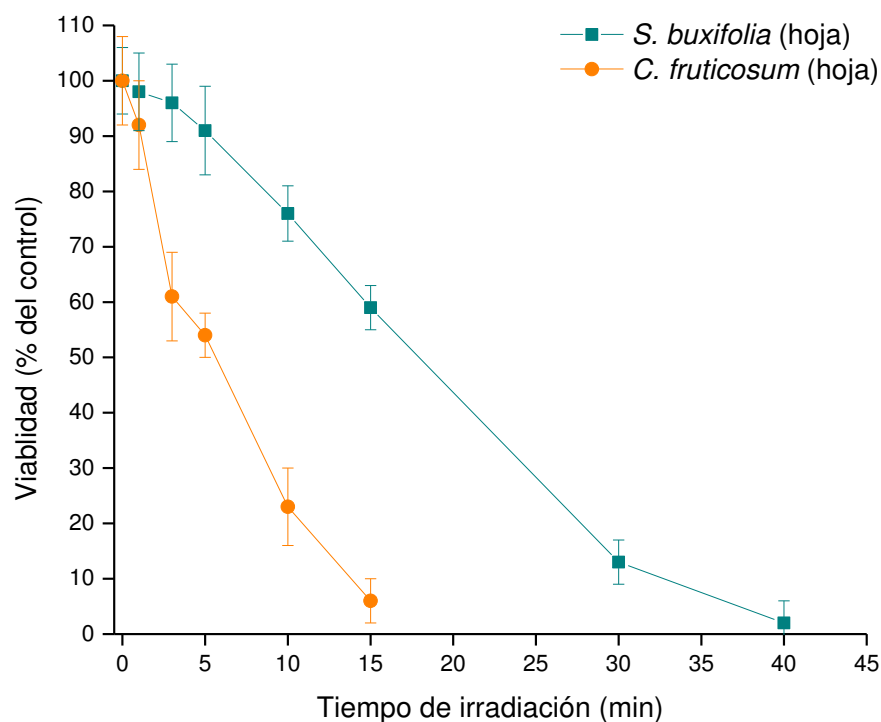


Figura I.2.1: Fototoxicidad de los extractos de hoja de *S. buxifolia* y *C. fruticosum*

Se incubaron las células 24 h en presencia de los extractos metanólicos de *S. buxifolia* (50 $\mu\text{g/ml}$) y *C. fruticosum* hoja (10 $\mu\text{g/ml}$) y se irradiaron durante distintos tiempos. Se expresa la viabilidad respecto al control con extracto y sin irradiar.

En la Figura I.2.2 se muestran los resultados de fototoxicidad de los extractos florales metanólicos que resultaron levemente fototóxicos. *C. argentina* indujo una $DL_{50} = 85$ min) y *Macfadyena unguis-cati* (O. Boelcke Nro 838), una $DL_{50} = 110$ min, mientras que las fracciones acuosas correspondientes, resultaron menos fotoactivas.

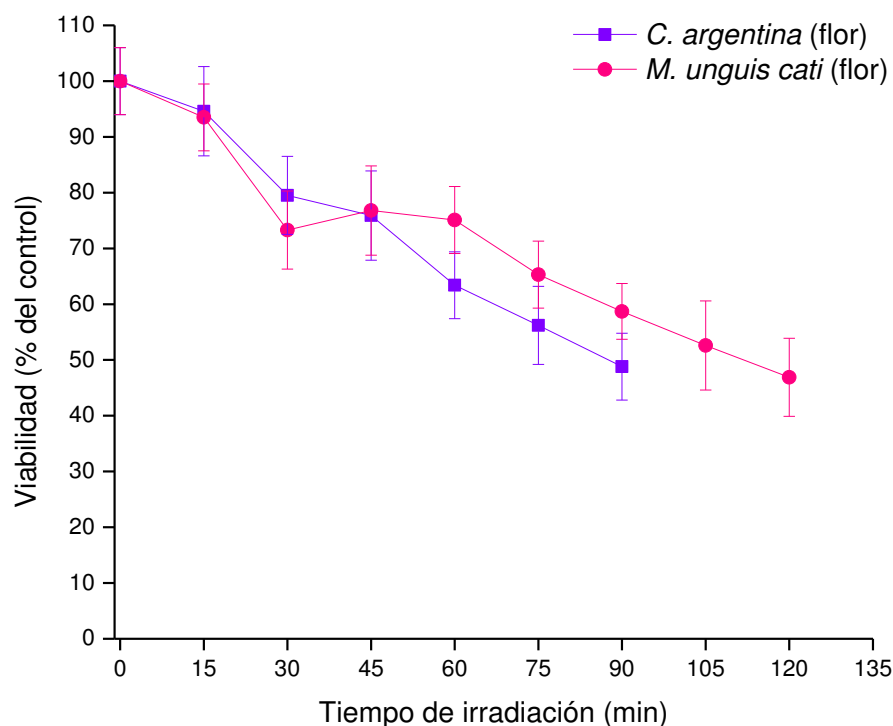


Figura I.2.2: Fototoxicidad de extractos de flor de *M. unguis-cati* y *C. argentina* en células LM2

Se incubaron las células 24 h en presencia de los extractos metanólicos de *M. unguis-cati* y *C. argentina* flor (100 µg/ml) y se irradiaron durante distintos tiempos. Se expresa la viabilidad respecto al control con extracto y sin irradiar.

Debido a que las DL_{50} de estos extractos florales fueron superiores a 60 min, mientras que en el caso de los extractos de hoja, esos tiempos fueron de 20 min para *S. buxifolia*, y de 7 min para *C. fruticosum*; se seleccionaron estos últimos dos extractos para continuar con el trabajo en TFD sobre diferentes líneas celulares.

I.2.2 Fototoxicidad de *S. buxifolia* y *C. fruticosum* en líneas HB4a, HB4a-Ras y PAM212

Una vez determinada la fototoxicidad de los extractos de *S. buxifolia* y *C. fruticosum* en la línea LM2, se pasó a probar la selectividad de los mismos por las células tumorales. Para ello se usó el par de líneas celulares no tumoral/tumoral, HB4a de epitelio luminal mamario normal inmortalizada y su derivada HB4a-Ras, transfectada establemente con el oncogén Ras. Se emplearon concentraciones de extracto no citotóxicas en oscuridad para estas líneas.

Empleando el extracto de *C. fruticosum* la línea tumoral HB4a-Ras ($DL_{50} = 10$ min) resultó más sensible a la TFD que la línea no tumoral HB4a ($DL_{50} = 22$ min). Un patrón similar se observó con el extracto de *S. buxifolia*, con el cual la fototoxicidad de HB4a-Ras fue mayor ($DL_{50} = 13$ y 45 min para HB4a-Ras y HB4a respectivamente) (Figura I.2.3).

Los queratinocitos murinos normales PAM212 resultaron más resistentes a la TFD con *C. fruticosum* ($DL_{50} = 22$ min) y *S. buxifolia* ($DL_{50} = 60$ min), en comparación con las células tumorales, demostrando la selectividad de la TFD *in vitro*, por las células cancerígenas empleando los extractos foliáceos.

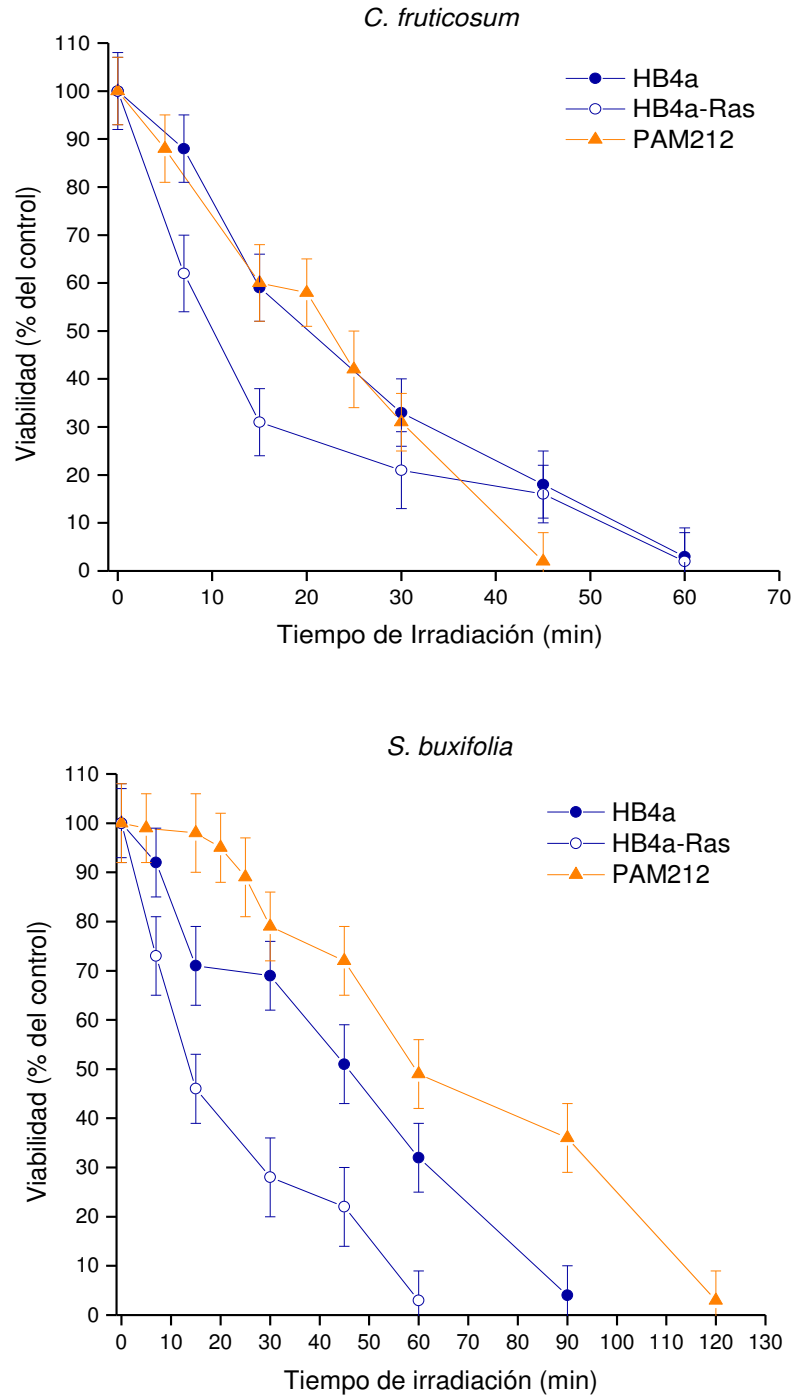


Figura I.2.3: Fototoxicidad de los extractos metanólicos de hoja de *S. buxifolia* y *C. fruticosum* en las líneas HB4a, HB4a-Ras y PAM212

Se incubaron las células 24 h en presencia de los extractos metanólicos de *S. buxifolia* y *C. fruticosum* hoja (50 µg/ml y 10 µg/ml respectivamente) y se irradiaron durante distintos tiempos. Se expresa la viabilidad respecto al control con extracto y sin irradiar.

I.2.3 Microscopía de fluorescencia de células LM2 incubadas con los extractos FS

En la Figura I.2.4 se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células LM2 expuestas a los extractos fotosensibilizantes. Los controles sin exposición a extractos presentaron autofluorescencia azul, luego de ser excitados con filtro UV. Cuando las células fueron incubadas con los extractos foliáceos de *C. fruticosum*, *S. buxifolia* y *C. argentina* flor se observó la aparición de una fluorescencia roja, característica de compuestos tetrapirrólicos. La misma fue más marcada en el caso de *C. argentina*. Empleando filtros azul y verde no se observó emisión de fluorescencia.

Células expuestas al extracto de flor de *M. unguis-cati* no emitieron fluorescencia en ninguno de los canales.

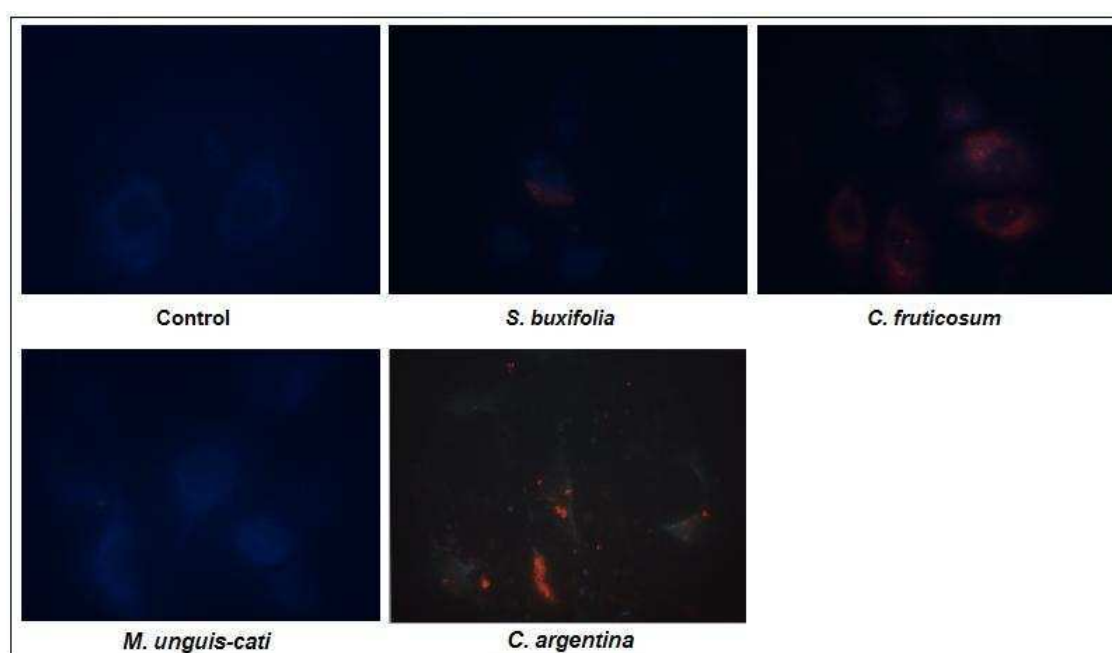


Figura I.2.4: Microscopía de fluorescencia de células LM2 expuestas a *S. buxifolia*, *C. fruticosum*, *C. argentina* y *M. unguis-cati*

Células LM2 se incubaron 24 h en presencia de extractos de *Combretum fruticosum* (hoja, metanol) 10 µg/ml, *Scutia buxifolia* (hoja, metanol) 100 µg/ml, *C. argentina* (flor, metanol) 100 µg/ml y *M. unguis-cati* (flor, metanol) 100 µg/ml. Se observaron en microscopio de fluorescencia con filtro de excitación UV. Control: células sin extracto.

I.2.4 Fotosensibilización con clorofila *a* en células LM2

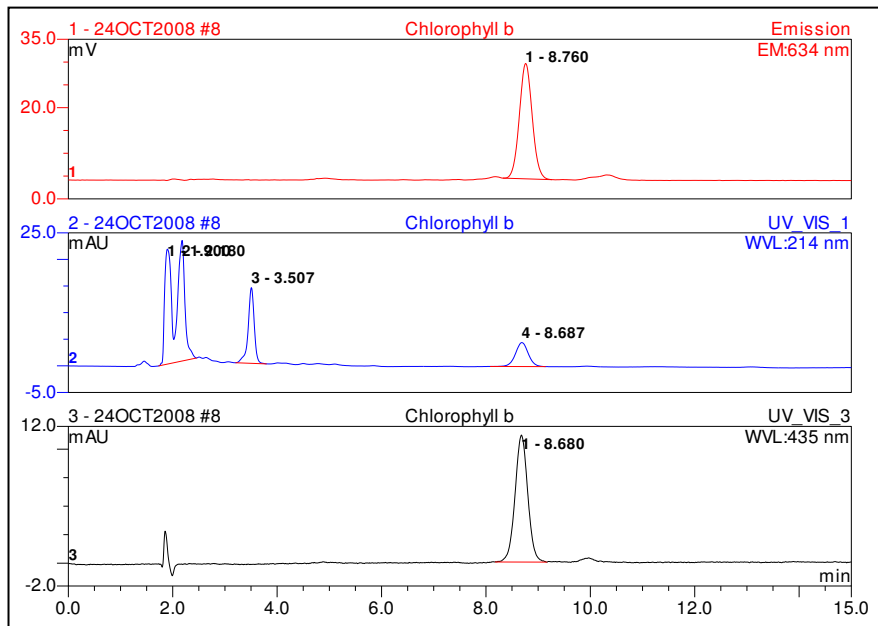
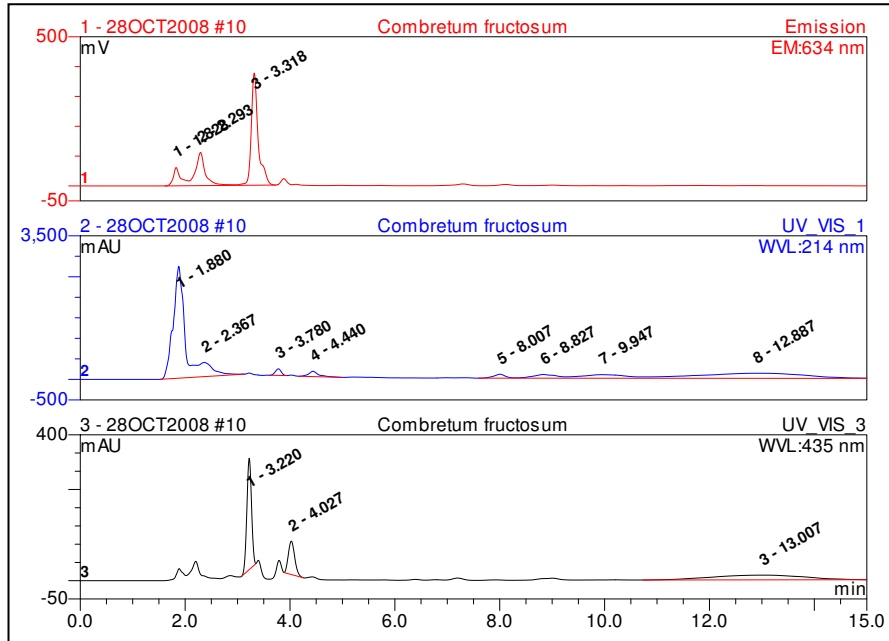
Dado que la clorofila es un FS en células aunque poco eficiente (Nyman y Hynninen, 2004), y que casi todos los extractos metanólicos de hoja de las diferentes especies vegetales mostraron algún grado de fototoxicidad, se llevaron a cabo experimentos para descartar dicha molécula como el principio activo responsable de los efectos fototóxicos en los extractos de *C. fruticosum* y *S. buxifolia*. Los ensayos se realizaron empleando clorofila *a*, clorofila mayoritaria en plantas superiores.

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad de la clorofila *a* en la línea celular LM2. Para ello se utilizaron diferentes concentraciones desde 1 a 500 µg/ml, pudiéndose determinar que la clorofila *a* no era citotóxica en dicho rango de concentraciones. A continuación se realizó la TFD, incubando las células con 50 µg/ml de clorofila *a*, siendo esta la máxima concentración fototóxica de extractos vegetales empleada, y en estas condiciones no se registró fototoxicidad (datos no graficados).

I.2.5 Análisis de los extractos de *C. fruticosum* y *S. buxifolia* por HPLC

Con el fin de identificar compuestos mayoritarios derivados de las clorofilas en los extractos metanólicos de hoja de *C. fruticosum* y *S. buxifolia*, se realizaron análisis por HPLC y se compararon con los espectros de un patrón de clorofila *b*.

En la Figura I.2.5 se muestran los espectros de *C. fruticosum*, *S. buxifolia* y clorofila *b*. Tanto en la muestra de *C. fruticosum* como en la de *S. buxifolia*, no se observaron picos a los tiempos de retención obtenidos en la muestra de clorofila *b* (8,7 min), lo que indicaría que dicho compuesto no se encuentra en los extractos analizados. Asimismo, el análisis de los picos obtenidos en el canal seteado a 435 nm a tiempos de retención bajos (entre 1 y 5 min), indicaría la presencia de compuestos tetrapirrólicos diferentes a la clorofila *b* en ambos extractos.



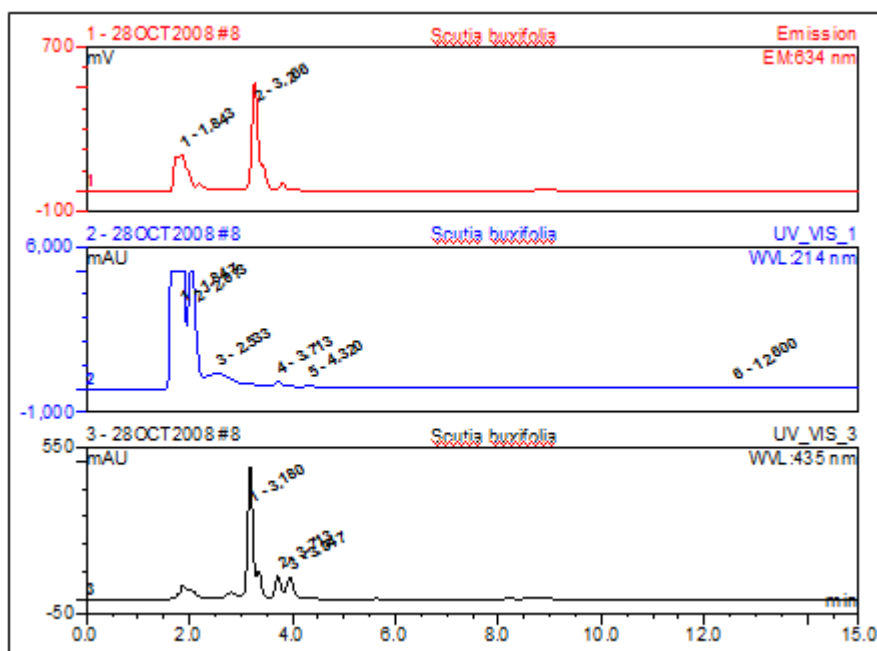


Figura I.2.5: Espectros de HPLC del extracto metanólico de hoja de *C. fruticosum*, *S. buxifolia* y clorofila *b*

La detección se realizó mediante medición de fluorescencia (excitación a 435 nm, emisión a 634 nm) y absorbancia a 214 nm y 435 nm.

I.2.6 Discusión

Se analizaron las propiedades fotoactivas de una colección de extractos vegetales argentinos, con el fin de hallar nuevos compuestos fotosensibilizantes para ser usados en Terapia Fotodinámica.

El “screening” de los extractos se realizó en la línea celular tumoral murina LM2, y se encontró actividad fotosensibilizante en niveles variables en todos los extractos metanólicos pertenecientes a hojas, con la excepción del extracto de hoja de *Collaea argentina*. Los que presentaron la mayor actividad fototóxica fueron *Combretum fruticosum* y *Scutia buxifolia*.

Entre los extractos correspondientes a flores, frutos y raíces, se encontraron dos extractos con leve pero significativa actividad fotosensibilizante. Los mismos fueron los extractos metanólicos de flor de *Collaea argentina* y *Macfadyena unguis-cati*. Los tiempos de irradiación necesarios para inducir reducciones de viabilidad de al menos el

50% con estos extractos, estuvieron por encima de 1 hora de irradiación; mientras que en el caso de los extractos de hoja, esos tiempos fueron de 20 min para *S. buxifolia* y de 7 min para *C. fruticosum*. Por lo tanto se seleccionaron estos últimos dos extractos, para continuar con el trabajo. Seguidamente, se evaluó la selectividad de dichos extractos como FS, comparando su actividad fototóxica en las líneas HB4a, HB4a-Ras y en la línea de queratinocitos PAM212. Al utilizar ambos extractos, se observó selectividad en su acción antitumoral, siendo las líneas tumorales LM2 y HB4a-Ras más sensibles a la TFD que las líneas normales PAM212 y HB4a.

A su vez, es importante destacar que las líneas de epitelios glandulares (LM2, HB4a y HB4a-Ras), tanto normales como tumorales, resultaron más sensibles a la TFD que la línea de queratinocitos PAM212, resultados que concuerdan con estudios previos de sensibilidad a la TFD (Rodríguez et al., 2011).

Se realizaron análisis para descartar a la clorofila como el principio fotoactivo presente en los extractos metanólicos de *S. buxifolia* hoja y *C. fruticosum* hoja. Para ello, se realizaron ensayos de determinación de fototoxicidad utilizando como potencial FS a la clorofila *a*. Los resultados indicaron que la clorofila *a* no es capaz de dar cuenta del efecto fototóxico observado en los extractos. Por lo tanto, si bien los extractos de *S. buxifolia* y *C. fruticosum*, poseen seguramente una cierta cantidad de clorofila *a*, su concentración no sería suficiente para dar cuenta de la fototoxicidad observada.

Se realizaron además, análisis mediante HPLC, que descartaron la presencia de clorofila *b* en los extractos, por comparación con una muestra de referencia. Estos estudios, indicarían además, la presencia de compuestos tetrapirrólicos diferentes a la clorofila *b* en ambos extractos. Esto concuerda con las imágenes de microscopía de fluorescencia, donde se observó un compuesto fluorescente presente en los extractos. Se destaca que en el caso del extracto de *C. fruticosum*, que fue el de mayor fototoxicidad ($DL_{50} = 7$ min a $10 \mu\text{g/ml}$), su fluorescencia intracelular fue de mayor intensidad que la de *S. buxifolia*.

Compuestos porfirínicos tales como las clorofilas o las bacterioclorofilas, han sido reportados como FS. La clorofila no es buen FS para su uso en TFD antitumoral debido a su alta tendencia a la agregación y baja solubilidad en los fluidos fisiológicos, sin

embargo ha representado una base para la síntesis de nuevos FS a partir de modificaciones sintéticas. Algunos de los compuestos obtenidos por esta vía tales como las clorinas han sido testeados en estudios preclínicos y clínicos (Bellnier et al., 1993; Pandey et al., 1996; Yoo et al., 2013;).

Los valores de DL_{50} determinados para nuestros extractos en células LM2 son un poco mayores que los empleados para otras sustancias fotosensibilizantes de uso común en TFD en las mismas líneas celulares utilizadas en este trabajo (Casas et al., 2001; Rodriguez et al., 2007), aunque éstas se tratan de compuestos purificados.

Los resultados obtenidos en este trabajo, estarían indicando que el/los principio/s activo/s de nuestros extractos de hoja serían compuestos tetrapirrólicos probablemente relacionados con la vía de síntesis o degradación de las clorofilas.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos a partir de un “screening” de 93 especies de plantas Malasia, donde se reportó el hallazgo de cuatro compuestos FS con estructuras vinculadas a las feoforbidas a y b (compuestos tetrapirrólicos). Estos autores proponen que los compuestos FS presentes en plantas terrestres estarían principalmente vinculados a estructuras tetrapirrólicas, y compuestos FS no tetrapirrólicos serían menos frecuentes o de menor actividad en líneas celulares (Ong et al., 2009).

Nuestros estudios, realizados *in vitro*, constituirían una primera etapa en el análisis de la potencial función fototóxica de los extractos de especies vegetales autóctonas argentinas estudiados. Es necesario realizar el aislamiento del compuesto activo para continuar con las determinaciones de fototoxicidad *in vivo*.

I.3 Fotoprotección a partir del extracto de hoja de *Collaea argentina*

I.3.1 Efecto fotoprotector de *C. argentina* frente a TFD

La falta de fotoactividad del extracto metanólico de hoja de *C. argentina* en el “screening” en células LM2 (sección I.2.1), llevó a pensar en la posibilidad de que en dicho extracto se encontrasen sustancias protectoras frente a los productos fototóxicos de los extractos foliáceos.

Para testear esta hipótesis, se realizaron experimentos de TFD utilizando el fotosensibilizador ALA (ácido 5-aminolevúlico) y el extracto de *C. argentina* como potencial fotoprotector. El ALA, compuesto no fototóxico *per se*, es el precursor en la vía de síntesis de las porfirinas. Al ser incorporado y metabolizado por las células, estimula la producción de protoporfirina IX, compuesto fotosensibilizante.

Las condiciones de concentración de ALA, tiempos de incubación y dosis lumínicas para la ALA-TFD ya han sido puestos a punto en la línea LM2 en trabajos anteriores (Perotti et al., 2002). El esquema experimental utilizado se muestra en la Figura 2 de Materiales y Métodos, donde se señalan los diferentes momentos del protocolo de ALA-TFD en los que se realizó el agregado del extracto de *C. argentina*, con el objetivo de investigar el punto clave en que se estaría dando la potencial fotoprotección.

De esta forma, se incubó el extracto de *C. argentina*: 24 h antes de la ALA-TFD durante la incubación con ALA y durante la irradiación (Tratamiento A); durante la incubación con ALA y durante la irradiación (Tratamiento B); sólo durante la irradiación (Tratamiento C), durante las 19 h posteriores a la irradiación (Tratamiento D); y durante todas las etapas de la ALA-TFD hasta el ensayo de viabilidad celular por MTT (Tratamiento E).

Cabe señalar que el extracto metanólico de hoja de *C. argentina* resultó citotóxico en oscuridad en las células LM2 (sección I.1.1) siendo la CI_{50} de $56 \pm 5 \mu\text{g/ml}$. Es por ello que en primea instancia, se determinó la toxicidad en oscuridad de diversas concentraciones del extracto (10, 20, 40 y 70 $\mu\text{g/ml}$) en los diferentes tratamientos (A-E).

Como puede apreciarse, durante el Tratamiento A, a bajas concentraciones de *C. argentina* (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$), la toxicidad *per se* del extracto fue menor al 20 % respecto al control sin tratar. A concentraciones más altas, 40 y 70 $\mu\text{g/ml}$, la toxicidad de *C. argentina* aumentó al $41 \pm 5 \%$ y $75 \pm 5 \%$, respectivamente. En el Tratamiento B, el extracto exhibió menos citotoxicidad con las concentraciones más altas, ya que el tiempo de incubación se redujo. Esta reducción de la toxicidad *per se* del extracto, se hizo más evidente en el Tratamiento C, ya que en éste, el tiempo de incubación de las células con el extracto es de tan sólo 10 min (durante la irradiación). El Tratamiento D muestra nuevamente que existen efectos citotóxicos de la incubación con el extracto a las dos concentraciones más altas (40 y 70 $\mu\text{g/ml}$). En cuanto al Tratamiento E, el mismo implica el tiempo de incubación más largo en presencia del extracto. Con este tratamiento se registraron las disminuciones de viabilidad más marcadas en todo el rango de concentraciones empleado. En resumen, la viabilidad celular disminuyó con tiempo de incubación y con el incremento de la concentración de *C. argentina*.

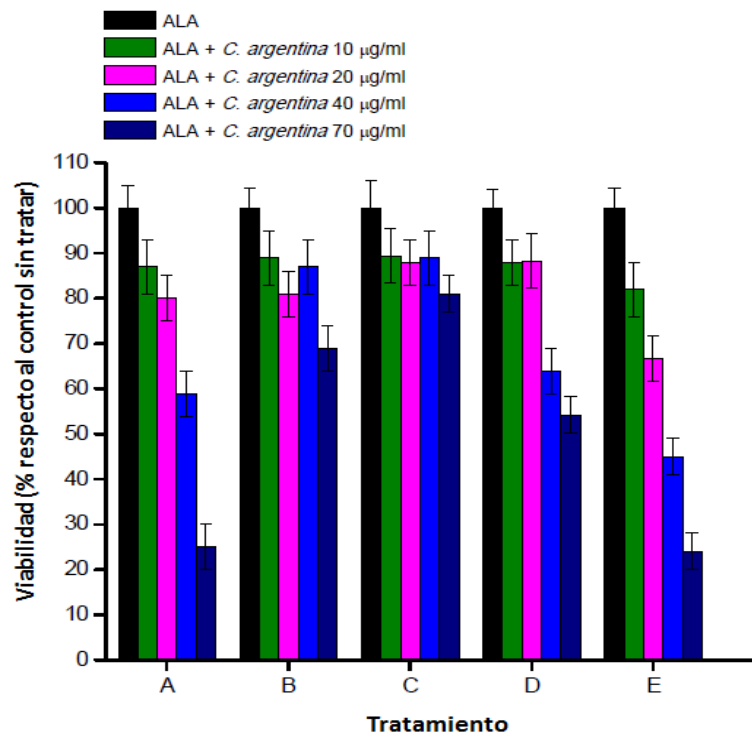


Figura I.3.1: Citotoxicidad en oscuridad de *C. argentina* sobre la línea LM2 para los diferentes tratamientos

Las células LM2 fueron incubadas en presencia de *C. argentina* durante diferentes periodos de tiempo según el esquema experimental descrito Materiales y Métodos. Los resultados corresponden al porcentaje de viabilidad respecto al control sin tratamiento.

A continuación se realizaron experimentos de ALA-TFD co-incubando con el extracto de *C. argentina* a diferentes concentraciones y modalidades de incubación según los Tratamientos A-E (Figura I.3.2), y los porcentajes de viabilidad celular luego de la ALA-TFD se relativizaron al control en oscuridad para cada concentración tratado con *C. argentina*.

Los resultados obtenidos indican que en el control incubado con ALA y sin *C. argentina* fue efectiva la ALA-TFD, y se pudo observar una reducción de la viabilidad celular dependiente de la dosis lumínica (DL₅₀: 6,4 min), mientras que el ALA en oscuridad no afectó la viabilidad celular.

Incubando las células LM2 con extracto de *C. argentina* según el tratamiento A, se observó que a las dos concentraciones más bajas (10 y 20 µg/ml) no se registraron efectos protectores del extracto frente a la TFD. Sin embargo, cuando la concentración más alta (40 y 70 µg/ml) se observó fotoprotección total del extracto de *C. argentina* frente al ALA-TFD, de manera tal que el tratamiento fotodinámico no indujo muerte celular (Figura I.3.2 A).

Cuando el extracto de *C. argentina* se agregó durante las 3 h de incubación con ALA y durante la irradiación (Tratamiento B) la fotoprotección obtenida fue más baja que con el Tratamiento A, y nuevamente, sólo se observó con las concentraciones más altas de *C. argentina* (Figura I.3.2 B). Mientras que en el control sin extracto, la ALA-TFD luego de 10 min de irradiación, indujo la muerte del 98 ± 5 % de las células respecto al control en oscuridad; en las células incubadas con 40 y 70 µg/ml estas reducciones fueron del 75 ± 5 % y 40 ± 5 %, respectivamente.

Con el agregado de *C. argentina*, sólo durante la irradiación en la ALA-TFD (Tratamiento C), los efectos de fotoprotección se evidenciaron solamente durante los primeros 5 minutos de irradiación a las concentraciones más altas de extracto. A este tiempo, la mortandad celular inducida en el control sin extracto fue del 44 %, mientras que con *C. argentina* 40 y 70 µg/ml, estas reducciones fueron del 19 ± 5 % y 9 ± 5 %, respectivamente. Luego de los 5 minutos de irradiación, los efectos protectores del extracto frente a ALA-TFD, dejaron de registrarse (Figura I.3.2 C).

Cuando se agregó el extracto una vez finalizada la irradiación y se mantuvo hasta la evaluación del fotodaño (Tratamiento D), no se registraron efectos fotoprotectores en ninguna concentración testeada (Figura I.3.2 D).

Finalmente, en el protocolo de incubación continua con el extracto durante todas las etapas de la ALA-TFD (Tratamiento E), los efectos fotoprotectores de *C. argentina*, nuevamente se observaron con las dos concentraciones mayores. La mortalidad celular respecto al control en oscuridad, inducida luego de 10 min de irradiación, fue del 26 ± 5 % para la concentración 70 $\mu\text{g/ml}$ y del 31 ± 5 % para 40 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en el control sin *C. argentina* la misma fue del 98 ± 5 % (Figura I.3.2 E).

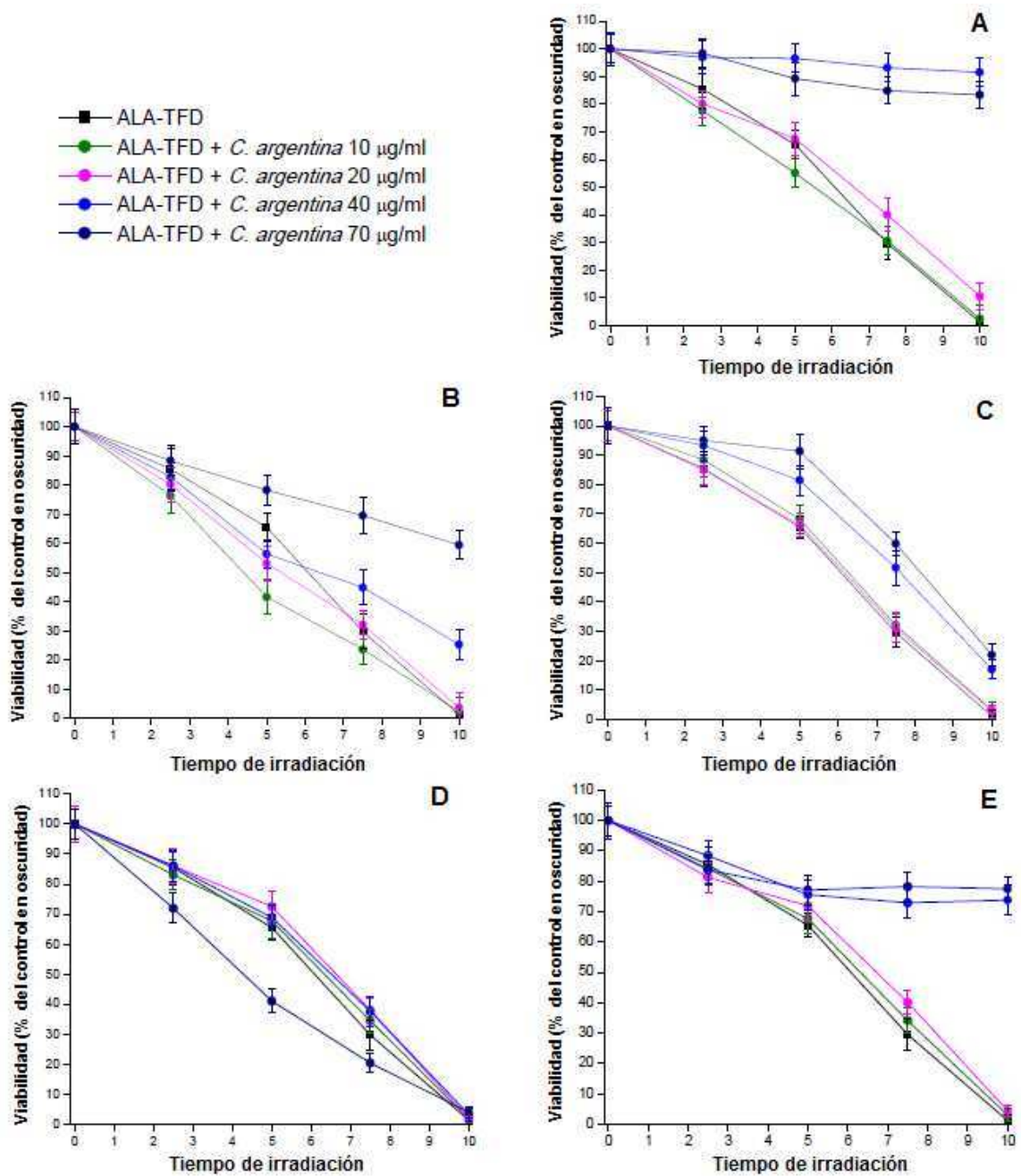


Figura I.3.2: Fotoprotección de *C. argentina* frente a la ALA-TFD en células LM2

Se probaron diferentes protocolos de incubación con el extracto a diferentes concentraciones tal como se indica en el esquema experimental mostrado en Materiales y Métodos. Los paneles A, B, C, D y E muestran los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos representados en el esquema experimental. La concentración de ALA empleada fue 0,6 mM, el tiempo de exposición a la misma fue de 3 h y la irradiación se hizo a tiempos variables entre 2 y 10 min. La viabilidad celular se expresó respecto al control en oscuridad para cada tratamiento y concentración de extracto.

Para comparar la protección del extracto en los diferentes tratamientos y entre las diferentes concentraciones, se calculó el índice de fotoprotección de *C. argentina* como el cociente entre la viabilidad luego de irradiación de 10 min de ALA-TFD y la viabilidad del control en oscuridad para cada concentración de extracto en cada tratamiento. Estos valores se muestran en la Tabla I.3.1.

Valores cercanos a uno, indican fotoprotección del extracto, mientras valores cercanos a cero, señalan que bajo estas condiciones, el extracto no fue eficaz para proteger a las células de la fototoxicidad inducida por la ALA-TFD.

A partir de estos resultados, se seleccionaron las condiciones del Tratamiento A (incubación con el extracto, 24 h previa a la irradiación y durante la misma) y la concentración de *C. argentina* de 40 µg/ml para continuar con los experimentos de fotoprotección. Se utilizó el criterio de priorizar el mayor efecto fotoprotector, con la menor citotoxicidad *per se* posible de *C. argentina*.

Tabla I.3.1: Índice de fotoprotección de *C. argentina* contra ALA-TFD en células LM2 luego de 10 min de irradiación

<i>C. argentina</i>	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	70 µg/ml
Tratamiento A	0,02	0,10	0,92	0,84
Tratamiento B	0,02	0,04	0,25	0,59
Tratamiento C	0,02	0,02	0,17	0,21
Tratamiento D	0,02	0,02	0,06	0,03
Tratamiento E	0,02	0,06	0,69	0,74

Cada valor se calculó como la viabilidad celular luego de 10 min de ALA-TFD/viabilidad luego de la incubación en oscuridad con *C. argentina* (toxicidad *per se* del extracto).

Bajo el Tratamiento A, se comparó el efecto de la ALA-TFD empleando *C. argentina* y triptofano, secuestrante de oxígeno singlete, conocido compuesto fotoprotector frente a esta terapia (Perotti et al., 2002). Los resultados se muestran en la Figura I.3.3. Se observó que el compuesto indujo alrededor de un 10% de reducción en la viabilidad celular respecto al control con ALA en oscuridad. Los efectos fotoprotectores del triptofano fueron de tal magnitud que la ALA-TFD no fue efectiva en los tiempos de irradiación de hasta 10 min. Asimismo, tal como se mostró en la Figura 1.3.2 A, *C. argentina* fue igualmente fotoprotector total, aunque a expensas de una toxicidad *per se* del 40%.

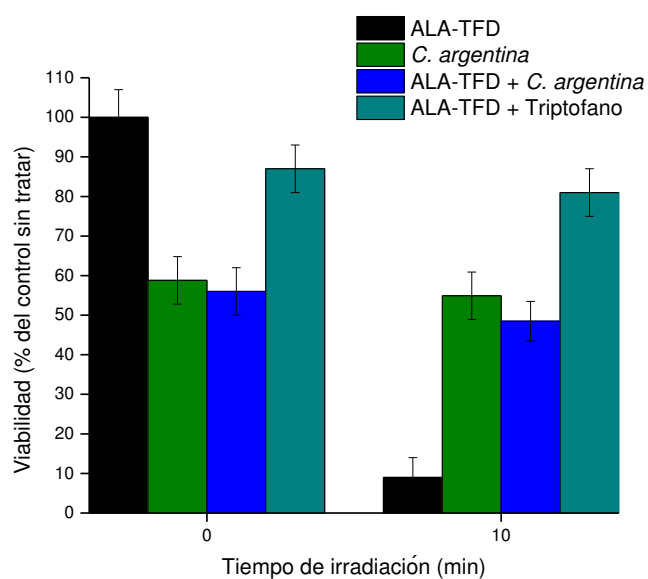


Figura I.3.3: Resultados de fotoprotección de ALA-TFD en presencia de extracto metanólico de hoja de *C. argentina* o triptófano en células LM2

Se empleó el Tratamiento A de ALA-TFD empleando *C. argentina* 40 $\mu\text{g/ml}$ y triptofano 8 mM respectivamente. La concentración de ALA empleada fue 0,6 mM y el tiempo de exposición al mismo fue de 3 h. El tiempo de irradiación fue de 10 min. La viabilidad se expresó respecto al control sin tratar.

I.3.2 Fotoprotección de *C. argentina* frente a TFD con los FS verteporfin y temoporfin en células LM2

A continuación, se probó la fotoprotección del extracto de *C. argentina* en células LM2, frente a otros dos FS de uso clínico, verteporfin y temoporfin. Para ello se llevó a cabo el protocolo de incubación con extracto de *C. argentina* a diferentes concentraciones según el Tratamiento A (Figura I.3.4).

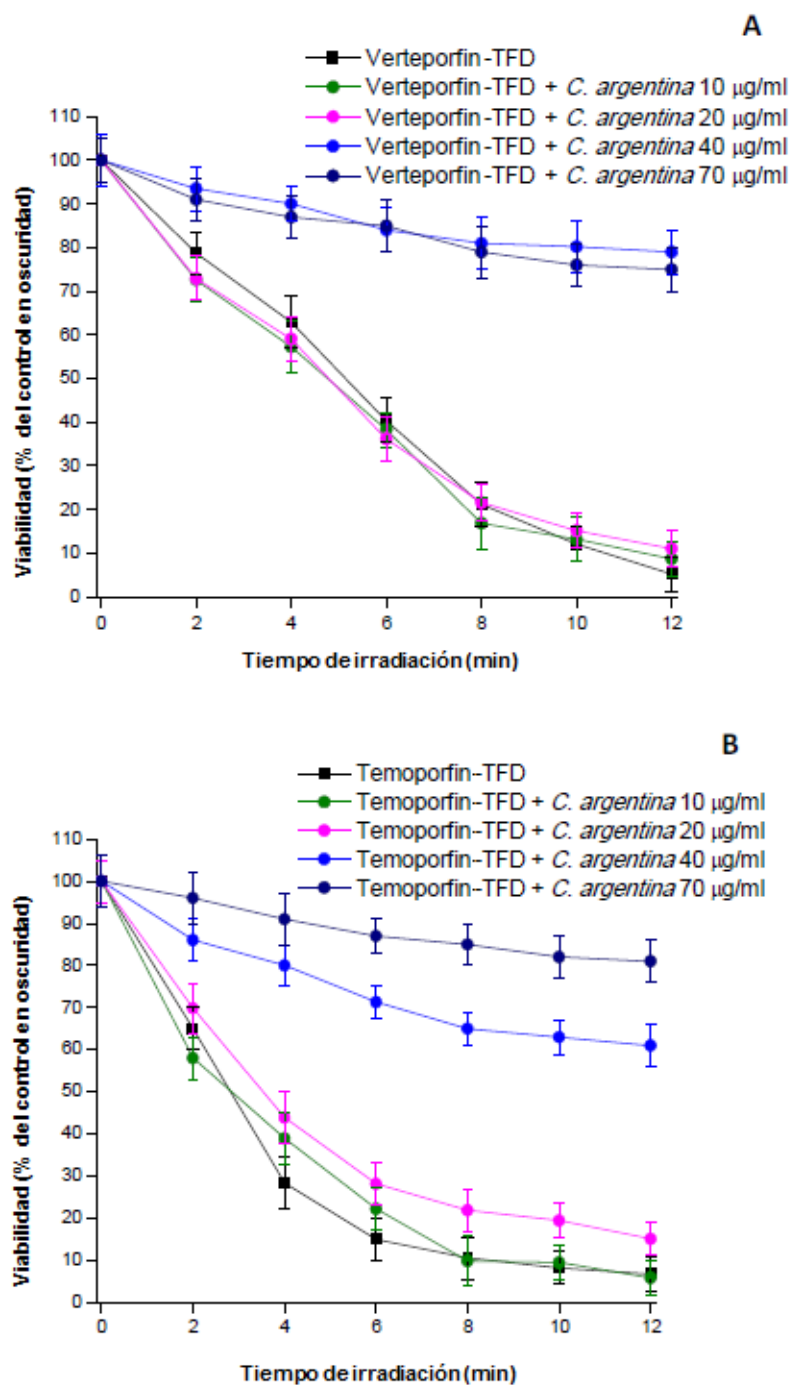


Figura I.3.4: Fotoprotección de *C. argentina* frente a TFD con diferentes FS

Se realizó la TFD de células LM2 en presencia de distintas concentraciones del extracto de *C. argentina* según el Tratamiento A. Las concentraciones de FS empleadas fueron verteporfin 3 mM (A) y temoporfin 2,5 mM (B), los tiempos de incubación fueron de 3 h, y la irradiación se hizo a tiempos variables entre 2 y 10 min. La viabilidad se expresó respecto al control en oscuridad con extracto.

De manera similar a lo observado para ALA-TFD, las concentraciones de 10 y 20 µg/ml, no resultaron protectoras frente a la TFD con ninguno de los FS. Por el contrario,

empleando 40 y 70 µg/ml de extracto, se observó fotoprotección frente a TFD con ambos FS.

A partir de los resultados obtenidos, se compararon los índices de fotoprotección del extracto de *C. argentina* frente a los 3 diferentes FS empleados en este estudio, utilizando el Tratamiento A (Tabla I.3.2). Se puede observar la mayor fotoprotección a partir de las dos concentraciones altas del extracto para todos los FS, siendo la protección mayor frente a ALA-TFD, mientras que la protección frente a TFD con verteporfin y temporfin fue levemente menor.

Tabla I.3.2: Índices de fotoprotección de *C. argentina* frente a TFD con diferentes FS

FS	Concentración de <i>C. argentina</i>			
	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	70 µg/ml
ALA (PpIX)	0,02	0,10	0,92	0,84
Verteporfin	0,09	0,12	0,79	0,75
Temporfin	0,06	0,15	0,61	0,81

Los índices se calcularon como: la viabilidad celular luego de 10 min de TFD/viabilidad luego de la incubación en oscuridad con *C. argentina* (toxicidad *per se* del extracto)

Finalmente se probó la fotoprotección de *C. argentina* frente a TFD-ALA en otro adenocarcinoma mamario murino, llamado F3II. Empleando esta línea celular, se detectaron nuevamente efectos de fotoprotección del extracto ante la ALA-TFD pero los mismos son menores que lo hallado en las células LM2 (índice de fotoprotección: 0,33 para Tratamiento A y concentración de 40 µg/ml), lo cual se correlaciona con una menor toxicidad *per se* del extracto (Figura I.3.5).

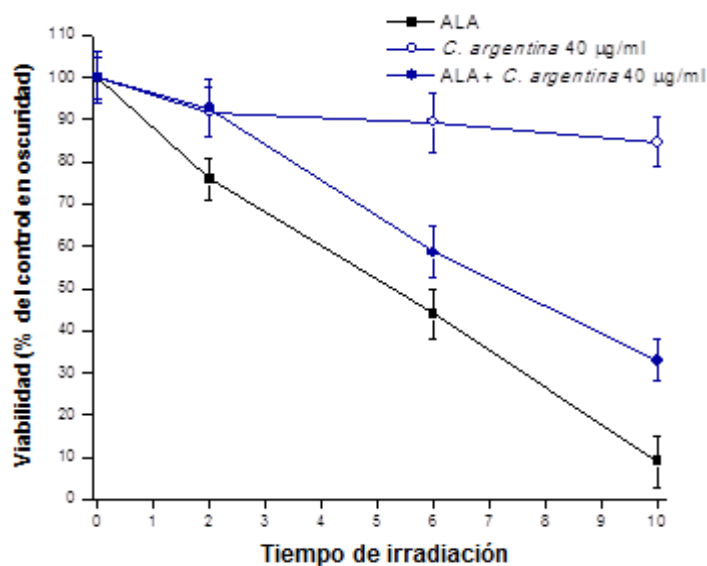


Figura I.3.5: Fotoprotección de ALA-TFD por *C. argentina* en células F3II

Se realizó el Tratamiento A en células F3II empleando *C. argentina* 40 µg/ml. La concentración de ALA empleada fue 0,6 mM, el tiempo de exposición fue de 3 h y la irradiación fue de tiempos variables. La viabilidad se expresó respecto al control en oscuridad con extracto.

I.3.3 Exposición a radiación UV-A de células LM2 incubadas con extracto de *C. argentina*

Se realizaron además, determinaciones para probar el posible efecto del extracto de *C. argentina* sobre la línea celular LM2 luego de ser expuesta a radiación UV-A.

Las células se trataron según dos protocolos diferentes esquematizados en la Figura 3 de Materiales y Métodos: Tratamiento 1: exposición a *C. argentina* sólo durante la irradiación y Tratamiento 2: exposición durante 24 h previas a la irradiación y durante la misma, empleando siempre una concentración del extracto de 40 µg/ml. Bajo estas condiciones, no se observaron efectos protectores del extracto frente a la irradiación UVA (datos no mostrados).

I.3.4 Discusión

Comprobamos la actividad fotoprotectora del extracto metanólico de hoja de *C. argentina* frente a la ALA-TFD en la línea de adenocarcinoma mamario murino LM2.

El efecto fotoprotector del extracto dependió de la concentración del mismo, y del tiempo de incubación previo a la ALA-TFD, siendo detectable a partir de los 40 µg/ml e incubación durante al menos 3 h con las células. Se realizaron determinaciones en base a condiciones que optimizan la relación de compromiso entre la fotoprotección frente a ALA-TFD y la citotoxicidad *per se* en oscuridad del extracto. Estas condiciones fueron: concentración de 40 µg/ml e incubación de 24 h previa a la irradiación. Concentraciones menores a la elegida no mostraron efectos fotoprotectores apreciables mientras que la de 70 µg/ml, resultó excesivamente citotóxica.

Respecto a la incubación con el extracto, los efectos fotoprotectores más fuertes se obtuvieron a partir de incubaciones largas de 24 y 48 h. Sin embargo, durante este último tiempo de incubación con el extracto los efectos citotóxicos del mismo se incrementaron, reduciendo en forma drástica la viabilidad celular. La adición de *C. argentina* sólo durante la irradiación o bien sólo después de la misma, no resultó fotoprotectora, lo cual podría llevar a pensar que el compuesto precisa un tiempo prolongado para ingresar a la célula. Estos resultados concuerdan con aquéllos obtenidos por nuestro grupo sobre la fotoprotección frente a ALA-TFD de compuestos como el triptofano, glutatión reducido, N-acetyl-L-cisteína, melatonina, L-metionina, L-cisteína, manitol y glicina, donde la preincubación de 24 h previa a la irradiación (y durante la misma) fue la condición a la que mejor se desarrolló la fotoprotección de los compuestos (Perotti et al., 2002). La protección de *C. argentina* fue comparable a la del triptofano, el cual actúa como secuestrante de oxígeno singlete.

Existen unos pocos reportes de fotoprotección ante la TFD. Existe un trabajo acerca de la fotoprotección de nitroimidazoles en la línea celular emt-6 de tumor mamario murino, frente a TFD empleando Photofrin como FS (Santus et al., 1992).

Una de las desventajas de la TFD es la retención del FS durante largos periodos, inclusive semanas, luego del tratamiento, con el consecuente daño cutáneo aparejado. Se ha descrito al oxígeno singlete como el compuesto involucrado en reacciones de fotosensibilización cutánea tanto en ensayos *in vitro*, como en estudios en ratas expuestas a TFD con hematoporfirina como FS, empleando 1,3 difenilisobenzofurano y triptofano como fotoprotectores (Hogikyan, 1991). Resulta de gran importancia hallar

un compuesto que permita sobrellevar estos efectos secundarios de la TFD durante el tratamiento y posteriormente al mismo.

Las plantas poseen sistemas bioquímicos para atenuar los efectos nocivos de las especies oxidantes, en particular aquellas producidas a partir de las reacciones fotoquímicas durante la fotosíntesis. Las xantofilas y los carotenoides forman parte de estas defensas antioxidantes, entre otras familias de compuestos. Además de los compuestos mencionados, las plantas son capaces de sintetizar otras moléculas en respuesta a estrés abiótico y biótico, comúnmente denominadas metabolitos secundarios. Algunos de estos compuestos han sido reportados como fotoprotectores y/o antioxidantes. El β -caroteno y diversos flavonoides se encuentran normalmente en las membranas del cloroplasto para proteger del daño causado por el oxígeno singlete, en particular la fotoperoxidación de los lípidos. Se han detectado efectos de secuestro de oxígeno singlete a partir de extractos lipídicos de plantas (Ferrari-Iliou et al., 1993).

Por otra parte, los polifenoles sintetizados en plantas superiores, en respuesta a estrés, forman parte de las defensas antioxidantes, y han sido utilizados en terapias antitumorales convencionales (Korkina, 2013). El polifenol de origen vegetal, curcumina, es capaz de inhibir la apoptosis desencadenada por los daños oxidativos del oxígeno singlete generado durante TFD en células de carcinoma epidérmico humano A431 (Chan et al., 2004).

En cuanto al uso de extractos vegetales crudos, ha sido informado que la administración oral y/o tópica de extractos de *Polypodiumleucotomos*, helecho originario de las regiones tropicales de América, resultó fotoprotectora para las células de Langerhans de la epidermis frente a la terapia con UV-A y psoralenos empleados en el tratamiento de vitiligo (Gonzalez et al., 1997). En la presente tesis, *C. argentina* no ejerció acción protectora frente a luz UV, demostrando especificidad por la inhibición de mecanismos fotoquímicos.

Como se mencionó anteriormente, no existen reportes acerca de la composición de *C. argentina*, ni de sus efectos fotoprotectores. Empleando pruebas cualitativas, pudimos corroborar la presencia de antraquinonas, saponinas, hidratos de carbono y taninos, como algunos de los grupos funcionales presentes en el extracto de *C. argentina*. Sin

embargo, no conocemos la composición fitoquímica exacta de esta planta, ni de sus compuestos involucrados en la fotoprotección observada.

I.4 Conclusiones de los resultados en células

Trece extractos metanólicos mostraron alta actividad citotóxica *per se* sobre las cuatro líneas celulares tumorales y tres líneas no tumorales empleadas. Se observó selectividad por las tumorales empleando el extracto de *I. cairica*.

Las CI_{50} de los extractos con alta actividad, estuvieron entre 10 - 150 $\mu\text{g/ml}$, y dejando de lado las células resistentes, el rango fue de 10-60 $\mu\text{g/ml}$. Estas cifras se encuentran dentro del rango de citotoxicidad esperado para extractos crudos de plantas con actividad antitumoral y hasta de compuestos purificados que se consideran altamente eficaces. Se comprobó en la línea LM2, la desestabilización, condensación y agregación de los microtúbulos, luego de la incubación con los extractos a concentraciones subletales.

Las especies con actividad citotóxica incluyeron 4 especies pertenecientes al género *Solanum* de la familia Solanaceae, conocida por poseer una amplia variedad de alcaloides. Sin embargo, no existen reportes del contenido de alcaloides ni de la actividad biológica de otros compuestos presentes en las especies de solanáceas estudiadas en este trabajo. Se comprobó la presencia de alcaloides en 8 de los extractos de mayor actividad citotóxica, pero sólo comprobamos en *I. australe* y *J. mimosifolia* que los mismos serían los responsables de la citotoxicidad observada sobre las líneas celulares empleadas.

Se seleccionaron 5 extractos para determinar cómo afectan los mismos al ciclo celular y la capacidad migratoria de las células LM2. Se emplearon: i) los 3 extractos de mayor actividad citotóxica (*S. chacoense*, *I. australe* y *J. mimosifolia*), ii) el extracto que exhibió selectividad por las líneas tumorales, *I. cairica*, iii) una fracción enriquecida en alcaloides de *I. australe*. El extracto de *S. chacoense* -que fue el de mayor actividad citotóxica- y la fracción de alcaloides de *I. australe*, alteraron significativamente el ciclo celular y la capacidad migratoria de las células, demostrando que además de actuar como citotóxicos, algunos compuestos pueden alterar la progresión tumoral.

Al analizar las propiedades fotoactivas de la colección de extractos vegetales, con el fin de hallar nuevos FS para ser usados en la TFD del cáncer, se encontró actividad

fotosensibilizante en niveles variables en todos los extractos de hojas, a excepción de *Collaea argentina*. Entre esos extractos, los metanólicos de las hojas de *Combretum fruticosum* y *Scutia buxifolia* presentaron la mayor actividad fototóxica. Se evaluó la selectividad de dichos extractos como FS, comparando su actividad fototóxica en una línea no tumoral, su línea derivada tumoral transfectada con el oncogén Ras, y una línea de queratinocitos no tumorales, y se observó selectividad por las tumorales. Se realizaron análisis para determinar la presencia de clorofila y su posible rol como FS presente en estos extractos. Los resultados obtenidos la descartaron como el compuesto responsable de los efectos observados, y evidenciaron la presencia de otro compuesto tetrapirrólico como potencial responsable de la actividad de los extractos.

En cuanto a los extractos correspondientes a flores, frutos y raíces, se encontraron dos extractos con leve pero significativa actividad fotosensibilizante. Los extractos metanólicos de flor de *C. argentina* y *M. unguis-cati* fueron fototóxicos pero empleando altas dosis lumínicas de 85 y 110 min, respectivamente. Si bien estos extractos mostraron menor fotoactividad que los extractos de *C. fruticosum* ($DL_{50} = 7$ min) y *S. buxifolia* ($DL_{50} = 20$ min), esto podría deberse a la menor concentración del compuesto activo FS en el extracto.

Los valores de DL_{50} determinados para los extractos obtenidos están en el orden de los obtenidos para FS sintéticos de uso clínico en TFD en las mismas líneas celulares utilizadas en este trabajo, aunque este factor depende fuertemente de la concentración empleada, y es difícil de comparar ya que se trata de compuestos purificados.

Por otra parte, comprobamos la actividad fotoprotectora del extracto metanólico de hoja de *C. argentina* en las células de adenocarcinoma LM2, frente a la TFD empleando ALA (como pro-FS), verteporfin y temoporfin. El efecto fotoprotector del extracto dependió de la concentración del mismo, y del tiempo de incubación previo a la terapia. La protección del extracto fue comparable a la del triptofano. Hasta el momento, no existen otros reportes acerca de la composición de *C. argentina*, ni de sus efectos fotoprotectores. Si bien, existen numerosos reportes acerca de compuestos presentes en plantas con actividad protectora frente a radiación UV, este es uno de los pocos estudios sobre protección frente a TFD a partir de un compuesto vegetal.

I.5 Referencias

Abbott BJ, Leiter J, Hartwell JL (1966) Screening Data from the Cancer Chemotherapy National Service Center Screening Laboratories. XXXIV. *Plant Extracts Cancer Res.* 26:761-928.

Abou-Chaar CI (1970) Alkaloids of an Ipomoea seed known as Kaladana in Pakistan. *Nature.* 225(5233):663.

Ali HA, Chowdhury AK, Rahman AK, Borkowski T, Nahar L, Sarker SD (2008) Pachypodol, a flavonol from the leaves of *Calycopteris floribunda*, inhibits the growth of CaCo 2 colon cancer cell line in vitro. *Phytother Res.* 22(12):1684-1687.

An L, Tang JT, Liu XM, Gao NN (2006) Review about mechanisms of anti-cancer of *Solanum nigrum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 31: 1225-1260.

Angeh JE, Huangb X, Sattler I, Swan GE, Dahse H, Eloff JN (2007) Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). *J Ethnopharmacol* 110: 56–60.

Asres K, Bucar F, Edelsbrunner S, Kartnig T, Hoger G, Thiel W (2001) Investigations on Antimycobacterial Activity of Some Ethiopian Medicinal Plants. *Phytother Res* 15:323–326.

Bao-Quan L, Lifeng J, Lei Z, Jiejie L, Shuli H, Ming Y (2006) Phosphorylation of microtubule-associated protein SB401 from *Solanum berthaultii* regulates its effect on microtubules. *J Integr Plant Biol.* 51:235-242.

Barnes LD, Giuliano EA, Ota J (2010) Cellular localization of Visudyne as a function of time after local injection in an in vivo model of squamous cell carcinoma: an investigation into tumor cell death. *Vet Ophthalmol.* 13(3):158-165.

Bellnier DA, Henderson BW, Pandey RK, Potter WR, Dougherty TJ (1993) Murine pharmacokinetics and antitumor efficacy of the photodynamic sensitizer 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a. *J Photochem Photobiol B*. 20(1):55-61.

Braga FC, Wagner H, Lombardi JA, Braga de Oliveira A (2000) Screening Brazilian plant species for in Vitro inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomedicine*. 6(6):447-452.

Casas A, Fukuda H, Di Venosa G, Batlle A (2001) Photosensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy. *Br J Cancer*. 85:279-284.

Chan WH, Wu HJ (2004) Anti-apoptotic effects of curcumin on photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells. *J Cell Biochem*. 92(1):200-212.

Chisholm M J, Hopkins CY (1962) Isolation and structure of a newconjugated triene fatty acid. *J Org Chem*. 27: 3137–3139.

Ding Q, Yang LX, Yang HW, Jiang C, Wang YF, Wang S (2009) Cytotoxic and antibacterial triterpenoids derivatives from *Clematis ganpiniana*. *J Ethnopharmacol*. 26(3):382-385

Döpke W, Mola IL, Hess U (1976) Alkaloid and steroid sapogenin content of *Solanum verbascifolium*. *L Pharmazie*. 31:656.

Du HY, Li Y, Olivo M, Yip GW, Bay BH (2006) Differential up-regulation of metallothionein isoforms in well-differentiated nasopharyngeal cancer cells in vitro by photoactivated hypericin. *Oncol Rep*. 16(6):1397-1402.

Dzhambazov B, Daskalova S, Monteva A, Popov N (2002) In vitro screening for antitumour activity of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae) extracts. *Biol Pharm Bull*. 25: 499-504.

Efferth T, Kahl S, Paulus K, Adams M, Rauh R, Boechzelt H, Hao X, Kaina B, Bauer R (2008) Phytochemistry and pharmacogenomics of natural products derived from

traditional Chinese medicine and Chinese materia medica with activity against tumor cells. *Mol Cancer Ther.* 7:152-161.

Fabbri F, Carloni S, Briigliadori G, Zoli W, Lapalombella R, Marini M (2006) Sequential events of apoptosis involving docetaxel, a microtubule-interfering agent: a cytometric study. *BMC Cell Biol.* 7:6.

Ferrari R, D'Arcy-Lameta A, Iliou JP, De Paula FM, Da Silva JV, Mazliak P (1993) In vitro photodynamic lipid peroxidation of total lipophilic extracts from leaves of bean plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1166:48-54.

Firestone GL, Sundar SN (2009) Anticancer activities of artemisinin and its bioactive derivatives. *Expert Rev Mol Med.* 11:e32.

Friedman M, Dao L, Gumbmann MR (1989) Ergot alkaloid and chlorogenic acid content in different varieties of morning-glory (*Ipomoea* spp.) seeds. *J Agric Food Chem.* 37: 708-712.

Gachet MS, Schühly W (2009) Jacaranda an ethnopharmacological and phytochemical review. *J Ethnopharmacol.* 121: 14-27.

Gambaro V, Garbarino JA, Galeffi C, Nicoletti M, Messana I, Marini-Bettolo GB (1988) Constituents of *Jacaranda mimosaeifolia*. *Rev Lat Quim.* 19:17-19.

Hai W, Cheng H, Zhao M, Wang Y, Hong L, Tang H, Tian X (2012) Two new cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Clematis argenteifolia*. *Fitoterapia.* 83(4):759-764.

Hamsa TP, Kuttan G (2011) Anti-angiogenic activity of *Ipomoea obscura* extract and Ipobscurine-A. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 33(3):488-497.

Hamsa TP, Kuttan G (2011) Evaluation of the Anti-inflammatory and Anti-tumor Effect of *Ipomoea obscura* (L) and Its Mode of Action Through the Inhibition of Pro Inflammatory Cytokines, Nitric Oxide and COX-2. *Inflammation.* 34:171-183.

Hardinge MG, Courville DA, Hardinge M, Fujikawa B, Harvey R (1963) Action of plant extracts on transplanted mouse tumors. *Screening data II*. 23: 981-1010.

Hogikyan ND, Richard MD, Hayden E, McLearn P (1991) Cutaneous Photoprotection Using a Hydroxyl Radical Scavenger in Photodynamic Therapy. *Am J Otolaryngol*. 12:5.

Hsu HF, Hounng JY, Kuo CF, Tsao N, Wu YC (2008) Glossogin, a novel phenylpropanoid from *Glossogyne tenuifolia*, induced apoptosis in A549 lung cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 46(12):3785-3791.

Ibarrola D, Hellion-Ibarrola M, Alvarenga N, Ferro E, Hatakeyama N, Shibuya N, Yamazaki M, Momose Y, Yamamura S, Tsuchida K (2006) Cardiovascular Action of Nuatigenosido from *Solanum sisymbriifolium*. *Pharm Biol*. 44: 378-381.

Ibrahim SR, Mohamed GA, Shaala LA, Youssef DT, El Sayed KA (2013) New alkaloids from *Pancratium maritimum*. *Planta Med*. 79(15):1480-1484.

Jo EH, Kim SH, Ra JC, Kim SR, Cho SD, Jung JW, Yang SR, Park JS, Hwang JW, Aruoma OI, Kim TY, Lee YS, Kang KS (2005) Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett*. 23:239-247.

Kavitha M, Swamy MJ (2006) Thermodynamic Studies on the Interaction of Water-soluble Porphyrins with the Glucose/Mannose-specific Lectin from Garden Pea (*Pisum sativum*) *IUBMB Life*. 58(12):720-730.

Korkina LG, Pastore S, Dellambra E, De Luca C (2013) New molecular and cellular targets for chemoprevention and treatment of skin tumors by plant polyphenols: a critical review. *Curr Med Chem*. 20(7):852-868.

Kurata R, Adachi M, Yamakawa O, Yoshimoto M (2007) Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *J Agric Food Chem*. 55:185-90.

Lalou C, Basak A, Mishra P, Mohanta BC, Banik R, Dinda B, Khatib AM (2013) Inhibition of tumor cells proliferation and migration by the flavonoid furin inhibitor isolated from *Oroxylum indicum*. *Curr Med Chem*. 20(4):583-91.

Lazescu A, Gruia M, Anghel R, Glavan D (2013) Monitoring the production of reactive oxygen species in experimental melanoma. *J Med Life*. 6(3):235-239.

Lee YS, Kim HK, Lee KJ, Jeon HW, Cui S, Lee YM, Moon BJ, Kim YH (2010) Inhibitory effect of glyceollin isolated from soybean against melanogenesis in B16 melanoma cells. *BMB Rep*. 43:461-467.

Li X, Zhao Y, Wu WK, Liu S, Cui M, Lou H (2011) Solamargine induces apoptosis associated with p53 transcription-dependent and transcription-independent pathways in human osteosarcoma U2OS cells. *Life Sci*. 88: 314-312.

Li M, Ciu JR, Ye Y, Min JM, Zhang LH, Wang K, Gares M, Cros J, Wright M, Leung-Tack J (2002) Antitumor activity of Z-ajoene, a natural compound purified from garlic: antimetabolic and microtubule-interaction properties. *Carcinogenesis*. 23:573-579.

Lin RJ, Chen CY, Lo WL (2008) Cytotoxic activity of *Ipomoea cairica*. *Nat Prod Res*. 22:747-753.

Liu SH, Shen XH, Wei XF, Mao XH, Huang T (2010) Immunomodulatory activity of butanol extract from *Solanum lyratum* in tumor-bearing mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 33:100-106.

Liu BQ, Jin L, Zhu L, Li J, Huang S, Yuan M (2009) Phosphorylation of microtubule-associated protein SB401 from *Solanum berthaultii* regulates its effect on microtubules. *J Integr Plant Biol*. 51:235-242.

Lorenzen JH, Balbyshev NF, Lafta AM, Capser H, Tian X, Sagerdo B (2001) Resistant potato selections contain leptine and inhibit development of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol*. 94:1260-1267.

Marles MA, Ray H, Gruber MY (2003) New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry*. 64: 367-683.

Mathan G, Fatima G, Saxena AK, Chandan BK, Jaggi BS, Gupta BD, Qazi GN, Balasundaram C, Anand Rajan KD, Kumar VL, Kumar V (2011) Chemoprevention with Aqueous Extract of *Butea monosperma* flowers results in normalization of nuclear morphometry and inhibition of a proliferation marker in liver tumors. *Phytother Res*. 3:324-328.

Mendez MC, dos Santos RC, Riet-Correa F (1998) Intoxication by *Xanthium cavanillesii* in cattle and sheep in southern Brazil. *Vet Hum Toxicol*. 40(3):144-147.

Moharram FA, Marzouk MSA (2007) A novel phenylethanoid dimer and flavonoids from *Jacaranda mimosaeifolia*. *Z Naturforsch B*. 62:1213-1220.

Olivaro C, Vazquez A (2009) A new bioactive xanthanolate from *Xanthium cavanillesii*. *Nat Prod Res*. 23(4):388-392.

Ong CY, Ling SK, Ali RM, Chee CF, Samah ZA, Ho AS, Teo SH, Lee HB (2009) Systematic analysis of in vitro photo-cytotoxic activity in extracts from terrestrial plants in Peninsula Malaysia for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol. B*. 96 (3):216-222.

Pandey G, Fatma T, Komath SS (2009) Specific Interaction of the Legume Lectins, Concanavalin A and Peanut Agglutinin, with Phycocyanin. *Photochem Photobiol*. 85: 1126–1133.

Pandey RK, Goswami LN, Chen Y, Gryshuk A, Missert JR, Oseroff A, Dougherty TJ (2006) Nature: a rich source for developing multifunctional agents. Tumor-imaging and photodynamic therapy. *Lasers Surg Med*. 38:445-467.

Paska C, Carrara M, Innocenti G, Cima L, Laszlo M (1996) Antitumor compounds from *Ipomoea cairica* (L.) sweet cell cultures. *Toxicology Letters* 88, Supplement 1, 104-104(1)

Penissi AB, Vera ME, Mariani ML, Rudolph MI, Ceñal J P, de Rosas JC, Fogal TH, Tonn CE, Favier LS, Giordano O S, Piezzi RS (2009) Novel anti-ulcer alpha,beta-unsaturated lactones inhibit compound 48/80-induced mast cell degranulation. *Eur J Pharmacol.* 612(1-3):122-130

Pereira MF, DE Almeida Simão T, Dalmau SR, Albano RM, Coelho MG, DE Carvalho Sabino KC (2010) *Pterodon pubescens* seed extract induces the cell cycle arrest of leukemic cells by deregulating cyclin D1 and E2 mRNA levels. *Oncol Lett.* (3):533-536.

Perotti C, Casas A, Del C Batlle A M. (2002) Scavengers protection of cells against ALA-based photodynamic therapy-induced damage. *Lasers Med Sci.* 17(4):222-229.

Powell RG, Smith CR, Madrigal RV (1976) Antitumor activity of *Sesbania vesicaria*, *S. punicea*, and *S. drummondii* seed extracts. *Planta Med.* 30(1):1-8.

Prakash L, Garg G (1980) Chemical examination of the root barks of *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don and *Tabebuia pentaphylla* (Linn). *Hemsl Pharmazie.* 35:649.

Reed JD (1995) Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J Anim Sci.* 73:1516-1528.

Rodriguez L, Di Venosa G, Batlle A, MacRobert A, Casas A (2007) Response to ALA-based PDT in an immortalised normal breast cell line and its counterpart transformed with the Ras oncogene. *Photochem Photobiol Sci.* 6:1306-1310.

Rodriguez L, Di Venosa G, Mamone L, Gandara L, Batlle A, Casas A (2011) Respuesta a la Terapia Fotodinámica en células vasculares, tumorales y normales. *Medicina Bs As,* 71 (Supl. III):137.

Salerni BL, Bates DJ, Albershardt TC, Lowrey CH, Eastman A (2010) Vinblastine induces acute, cell cycle phase-independent apoptosis in some leukemias and lymphomas and can induce acute apoptosis in others when Mcl-1 is suppressed. *Mol Cancer Ther.* 9(4):791-802.

Salunkhe DK, Jadhav SJ, Kadam SS, Chavan JK (1982) Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 17:277-305.

Sankara-Subramanian S, Nagarajan S, Sulochana N (1973) Hydroquinone from the leaves of *Jacaranda mimosaeifolia*. *Phytochem.* 12:220–221.

Sankara-Subramanian S, Nagarajan S, Sulochana N (1972) Flavonoids of eight bignoniaceous plants. *Phytochemistry.* 11:1499.

Santus R, Stobbe CC, McPhee MS, Chapman JD (1992) Protectiona gainst Light-ActivatePd hotofrinI IK illing of Tumor Cells by Nitroimidazoles. *Radiation Res.* 130:31-37.

Schmidt C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luik S, Flores E M, Bittencourt C F, Zanetti G D, Heinzmann B M, Laufer S, Merfort I (2009) Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J Ethnopharmacol.* 122(3):523-532.

Shi Y, Sahu RP, Srivastava SK (2008) Triphala inhibits both in vitro and in vivo xenograft growth of pancreatic tumor cells by inducing apoptosis. *BMC Cancer.* 8: 294.

Singh AP, Singh RK, Kim KK, Satyan KS, Nussbaum R, Torres M, Brard L, Vorsa N (2009) Cranberry proanthocyanidins are cytotoxic to human cancer cells and sensitize platinum-resistant ovarian cancer cells to paraplatin. *Phytother Res.* 23:1066-1074.

Singh T, Katiyar SK (2013) Honokiol inhibits non-small cell lung cancer cell migration by targeting PGE₂-mediated activation of β -catenin signaling. *PLoS One.* 8(4):e60749.

Sinha S, Mishra P, Amin H, Rah B, Nayak D, Goswami A, Kumar N, Vishwakarma R, Ghosal S (2013) A new cytotoxic quinolone alkaloid and a pentacyclic steroidal glycoside from the stem bark of *Crataeva nurvala*: study of anti-proliferative and apoptosis inducing property. *Eur J Med Chem.* 60:490-496.

Sreelatha S, Padma P R, Umasankari E (2011) Evaluation of anticancer activity of ethanol extract of *Sesbania grandiflora* (Agati Sesban) against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *J Ethnopharmacol.* 134(3):984-987.

Stauffacher D, Niklaus P, Tschertter H, Weber HP, Hofmann A (1969) Cycloclavin, a new alkaloid from *Ipomoea hildebrandtii* Vatke. 71. Ergot alkaloids. *Tetrahedron.* 25:5879-5887.

Sobhani AM, Ebrahimi SA, Mahmoudian M (2002) An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. seeds extract and its beta-carboline alkaloids. *J Pharm Pharm Sci.* 1:19-23.

Tekrony AD, Kelly NM, Fage BA, Cramb DT (2011) Photobleaching kinetics of Verteporfin and Lemuteporfin in cells and optically trapped multilamellar vesicles using two-photon excitation. *Photochem Photobiol.* 87(4):853-861.

Thu NB, Trung TN, Ha DT, Khoi NM, Hung TV, Hien TT, Namhui Y, Bae K (2010) Screening of Vietnamese Medicinal Plants for Cytotoxic Activity. *Nat Prod Sci.* 16:43-49.

Verbist JF, Monnet R, Dobremenz JR (1977) Identification and quantification of steroidal alkaloids from Nepalese Solanum species. *Planta Med.* 11:40-42.

Weber JM, Ma TS (1976) Microchemical investigations of medicinal plants. XIV. Identification of the alkaloids in the leaves of *Ipomoea violacea* using preparative thin layer chromatography and solid probe mass spectrometry. *Mikrochim Acta.* (2-3 Pt 1):227-242.

Xiao Y, Yang FQ, Li SP, Hu G, Lee SM, Wang YT (2008) Essential oil of Curcuma wenyujin induces apoptosis in human hepatoma cells. *World J Gastroenterol.* 14:4309-4318.

Yoon I, Yia Zhu L, Young K S (2013) Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Clin Endosc.* 46:7-23

Yow CM, Chen JY, Mak NK, Cheung NH, Leung AW (2000) Cellular uptake, subcellular localization and photodamaging effect of temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative. *Cancer Lett.* 157(2):123-131

Zamora-Martínez MC, de Pascual Pola CN (1992) Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. *J Ethnopharmacol.* 35(3):229-257.

Zhai HY, Zhao C, Zhang N, Jin MN, Tang SA, Qin N, Kong DX, Duan HQ (2012) Alkaloids from *Pachysandra terminalis* inhibit breast cancer invasion and have potential for development as antimetastasis therapeutic agents. *J Nat Prod.* 75(7):1305-1311.

Zhou XJ, Rahmani R (1992) Preclinical and clinical pharmacology of vinca alkaloids. *Drugs.* 4:1-16.

CAPÍTULO II

II. RESULTADOS EN BACTERIAS

II.1 Compuestos antimicrobianos

II.1.1 Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas

II.1.2 Discusión

II.2 Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA)

II.2.1 “Screening” de fototoxicidad en bacterias

II.2.2 TFDA sobre bacterias en suspensión empleando *S. verbascifolium* como FS

II.2.3 Unión de *S. verbascifolium* a bacterias

II.2.4 TFDA sobre bacterias en medio sólido empleando *S. verbascifolium* como FS

II.2.5 Fotodegradación de *S. verbascifolium*

II.2.6 Mecanismos de fotosensibilización de *S. verbascifolium*

II.2.7 TFDA empleando *S. verbascifolium* como FS y luz solar como fuente lumínica

II.2.8 Cromatografía en capa delgada de extracto de flor *S. verbascifolium*

II.2.9 Discusión

II.3 Conclusiones de los resultados en bacterias

II.4 Referencias

II. RESULTADOS EN BACTERIAS

II.1 Compuestos antimicrobianos

II.1.1 Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas

Se realizó un “screening” de toxicidad de los extractos vegetales en la especie Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*. Se probaron todos los extractos de la colección descrita en la Tabla 1 de la sección Materiales y Métodos, en los cuales se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los mismos sobre *S. epidermidis*.

Se encontraron 11 extractos con actividad bactericida. Los mismos correspondieron a 7 especies: *Collaea argentina* (hoja, metanol), *Combretum fruticosum* (hoja, agua y metanol), *Iochroma australe* (flor y hoja, metanol y agua), *Jacaranda mimosifolia* (flor, agua), *Prunus subcoriacea* (hoja, metanol), *Prunus cerascifera* (hoja, metanol) y *Scutia buxifolia* (hoja, metanol). En el caso de *I. australe* y *C. fruticosum*, diferentes solventes de extracción y/o diferentes partes de la planta resultaron con actividad bactericida, entonces se seleccionó el extracto que presentó actividad más marcada para seguir el estudio con las demás especies bacterianas. Tanto en *I. australe* como en *C. fruticosum*, el extracto con mayor actividad correspondió a la fracción hoja, metanol.

Se testeó la actividad antibacteriana de los 7 extractos seleccionados, para ser empleados con las bacterias las Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, y las Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. En las Tablas II.1 y II.2 se muestran las especies que resultaron inhibitorias del crecimiento bacteriano y bactericidas, respectivamente.

El extracto de *S. buxifolia* resultó el que posee mayor efecto antibacteriano sobre la especie *S. epidermidis*, mientras que *J. mimosifolia* fue el más efectivo contra *E. faecalis*; por su parte, la especie *I. australe*, resultó la de mayor actividad antibacteriana sobre *S. aureus*.

En cuanto a la CIM sobre las bacterias Gram positivas (Tabla II.1), los extractos de *S. buxifolia*, *C. argentina*, *C. fruticosum* y *J. mimosifolia*, fueron los que mayor actividad mostraron, eliminando a *S. epidermidis* a concentraciones iguales o menores de 2,5 mg/ml. Con la excepción de este último extracto, estos también fueron los que presentaron mayor actividad frente a *S. aureus*, junto con el de *I. australe*, que fue el más eficiente de todos. Contra la especie *E. faecalis*, los extractos más efectivos fueron *C. argentina* = *I. australe* > *S. buxifolia*.

Los extractos de *P. cerascifera* y *P. subcoriacea*, mostraron actividad sólo frente a *S. epidermidis*, no teniendo actividad bacteriostática frente a las otras dos especies bacterianas Gram positivas.

Tabla II.1: Concentración inhibitoria mínima de los extractos vegetales en especies bacterianas Gram positivas

	CIM (mg/ml)		
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>S. buxifolia</i>	1,75	5	10
<i>C. argentina</i>	2,5	5	5
<i>J. mimosifolia</i>	2,5	10	2,5
<i>C. fruticosum</i>	2,5	5	20
<i>I. australe</i>	5	2,5	5
<i>P. cerascifera</i>	5	>50	>50
<i>P. subcoriacea</i>	10	>50	>50
Ampicilina	0,001	0,001	0,002

Las CIM de cada extracto se correlacionaron bien con su actividad bactericida (Tabla II.2), siendo nuevamente los extractos de *S. buxifolia*, *C. argentina*, *J. mimosifolia*, *I. australe* y *C. fruticosum* los de mayor actividad bactericida en *S. epidermidis*. El extracto de *I. australe* fue el más efectivo contra *S. aureus* y *E. faecalis*, eliminando las bacterias totalmente a concentraciones de 5 mg/ml. *P. cerasifera*, sólo fue bactericida frente a *S. epidermidis*, mientras que *P. subcoriacea* no lo fue en ninguna de las tres cepas Gram positivas con las que se trabajó.

S. aureus y *E. faecalis*, resultaron menos sensibles a la acción bacteriostática y bactericida de los extractos que *S. epidermidis* (Tablas II.1 y II.2).

El control con ampicilina 10 µg/ml resultó bactericida en todas las especies bacterianas estudiadas.

Tabla II.2: Concentración mínima (CMB) de los extractos vegetales en especies bacterianas Gram positivas

	CMB (mg/ml)		
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>S. buxifolia</i>	2,5	15	20
<i>C. argentina</i>	2,5	7.5	7.5
<i>J. mimosifolia</i>	2,5	20	10
<i>C. fruticosum</i>	5	15	>50
<i>I. australe</i>	5	5	5
<i>P. cerasifera</i>	7,5	>50	>50
<i>P. subcoriacea</i>	>50	>50	>50
Ampicilina	0,010	0,010	0,010

En cuanto a la actividad de los extractos sobre las especies Gram negativas, *J. mimosifolia* fue el único extracto que resultó levemente inhibitorio sobre el crecimiento de las especies Gram negativas *E. coli* (CIM =15 mg/ml) y *P. aeruginosa* (CIM> 20 mg/ml). Ninguno de los extractos fue bactericida frente a las Gram negativas (datos no graficados).

II.1.2 Discusión

Encontramos extractos pertenecientes a 7 especies vegetales que mostraron actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano y bactericida sobre las especies Gram positivas con las que trabajamos. Las mismas pertenecieron a las familias Rahmnaceae, Bignoniaceae, Solanaceae, Combretaceae, Rosaceae y Fabaceae, todos ellos, grupos donde han sido descritas especies cuyos extractos y/o compuestos presentaron actividad antimicrobiana (Kalayou et al., 2012; Awouafack et al., 2013; de Morais Lima et al., 2012; Miyasaki et al., 2013; Torres et al., 2013).

Por otra parte, a excepción del extracto acuoso de flor de *J. mimosifolia*, ninguno de los extractos resultó efectivo contra las especies Gram negativas empleadas, y el mencionado extracto, sólo inhibió el crecimiento a concentraciones mayores a 10 mg/ml. Ha sido informado que extractos etanólicos de la corteza y de hojas de esta especie han resultado efectivos en la eliminación de *E. coli*, *S. aureus* y *Bacillus cereus*.

Existen otros reportes de “screening” de actividad antibacteriana a partir de extractos metanolicos de especies vegetales argentinas. En ellos, se han reportado especies con

CIMs de entre 0,08 a 0,5 mg/ml (una de ellas perteneciente al grupo Solanaceae) y, al igual que en nuestro trabajo, las especies Gram negativas resultaron poco sensibles a los extractos, con la excepción de *P. aeruginosa* frente al extracto de *Astronium balansae*, siendo la CIM 0,25 mg/ml (Salvat et al., 2001; 2004).

Los experimentos llevados a cabo para la determinación de los valores de CIM y CMB, estuvieron en concordancia con los propuestos por el Comité Europeo para Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades infecciosas (ESCMID). Ha sido propuesto que si un extracto vegetal posee una CIM menor a 0,1 mg/ml es un buen antimicrobiano, si $0,1 \text{ mg/ml} < \text{CIM} < 0,6 \text{ mg/ml}$ es un antimicrobiano moderado, y si la CIM es mayor a 0,6 mg/ml es un antimicrobiano débil. Para compuestos purificados la CIM debe ser menor a 0,01 mg/ml para ser buen antimicrobiano, $0,01 \text{ mg/ml} < \text{CIM} < 0,1 \text{ mg/ml}$ para ser antimicrobiano moderado, y si es mayor a 0,1 mg/ml se lo considera débil (Rios et al., 2005; Cos et al., 2006; Kuete et al., 2010,).

Aunque hay diferencias entre autores, en el criterio para clasificar la efectividad de un compuesto purificado o un extracto crudo como antimicrobiano, existe consenso general en considerar como antimicrobiano a un extracto cuya CIM en un ensayo *in vitro* de susceptibilidad se encuentre por debajo de 1 mg/ml (Simões, 2009; Radulovic et al., 2013).

Teniendo en cuenta este criterio generalizado, podemos concluir que los extractos encontrados en este trabajo, no son compuestos efectivos como antimicrobianos, ya que las CIMs de los mismos se hallan en el orden de magnitud de los mg/ml, por encima del límite mencionado.

Sin embargo, debemos señalar que existen reportes de extractos de especies vegetales empleadas en medicinas tradicionales, que han sido considerados como buenos antimicrobianos aún con CIMs ente 1 y 50 mg/ml, por lo que la actividad de nuestros extractos estaría en el mismo orden de magnitud que la de especies empleadas medicinalmente (Pesewu et al., 2007; Abioye et al., 2013, Amin et al., 2013, Kim et al., 2012).

Cabe destacar que dentro de los extractos con mayor actividad, se reportaron especies no estudiadas anteriormente como bactericidas: *C. fruticosum*, *C. argentina*, *I. australe*, *P. subcoriacea* y *P. cerascifera*. Pudimos confirmar además la actividad antimicrobiana de los extractos de *S. buxifolia* y *J. mimosifolia*, reportados anteriormente como antibacterianos (Boligon et al., 2012; Rojas et al., 2006).

Los reportes sobre la actividad antimicrobiana de *S. buxifolia* indican que esta especie es efectiva frente a diversas especies Gram positivas y Gram negativas, siendo los extractos realizados con solventes orgánicos a partir de la corteza de dicho árbol, los de mayor actividad (CIM en el rango de los 0,125 a 0,5 mg/ml) (Boligon et al., 2012).

En cuanto a *C. fruticosum*, se conoce la actividad antimicrobiana de compuestos encontrados en otras 36 especies del género Combretum, y también ha sido descrito el uso de especies de este género en medicinas tradicionales, en el tratamiento de infecciones, malaria y desórdenes digestivos (de Moraes Lima et al., 2012).

Existen reportes de especies del género Prunus con actividad antimicrobiana. Extractos acuosos y metanólicos de *Prunus armeniaca* fueron eficientes contra *S. aureus* y *E. coli*. (Yi et al., 2009). Se informó, además, que la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de plantas utilizadas en la medicina tradicional de Turquía, entre las que se encuentra *Prunus lauruceasus*, mostraron efectos frente a especies Gram positivas, Gram negativas y también frente a especies fúngicas. Sin embargo, la actividad de cada planta es variable frente a los diferentes tipos de microorganismos (Dulger, 2004). Se aislaron además compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana, a partir de extractos etanólicos de semillas de *Prunus mume*, planta utilizada por la medicina tradicional china. Estos compuestos mostraron actividad frente a bacterias Gram positivas y negativas (Daozong et al., 2011). Sin embargo, no existen reportes de *Prunus cerasifera* ni de *Prunus subcoriacea* las dos especies bactericidas sobre *S. epidermidis* estudiadas en este trabajo.

Respecto a *I. australe* y *C. argentina*, no hay reportes sobre la actividad antimicrobiana de estas especies ni de sus géneros. Sí los hay, en cambio, de sus respectivas familias, Solanaceae y Fabaceae, de las cuales otras especies han sido utilizadas en medicinas tradicionales de América, África y Asia (Kalayou et al., 2012; Ma et al., 2011; Khan et

al., 2013). Nuestros estudios indicaron la presencia de alcaloides y taninos en *I. australe* y de saponinas, antraquinonas y taninos en *C. argentina*. Compuestos pertenecientes a estos grupos han sido reportados como antimicrobianos (Lewis 2013; Coleman et al., 2010).

Dentro de la serie de extractos donde no registramos actividad antimicrobiana en este trabajo, se encuentran extractos pertenecientes a especies en las cuales sí se había reportado dicha actividad. Principalmente las diferencias entre nuestros extractos y los reportados en estas especies antimicrobianas, radica en la parte de la planta a partir de la cual se trabajó. Por ejemplo, está bien descrita la actividad antimicrobiana de *Tabebuia impetiginosa* a partir de la corteza de este árbol (Park et al., 2006; Gomez-Castellanos et al., 2009). En cambio, el extracto floral no mostró los mismos efectos. Un patrón similar ocurrió con la corteza de *Prosopis kuntzei* (especie activa frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*), y *Rivina humilis*; y las semillas de *Robina pseudoacacia*, en las cuales fue hallado un péptido de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas (Salvat et al., 2004; Salvat et al., 2001; Tallas-Ogras et al., 2005).

Ha sido descrita, además, la actividad antimicrobiana y antifúngica de extractos de fruto de *Cyphomandra betacea* (CIMs en el orden de los microgramos) y extractos etanólicos de los tallos de *Aristolochia esperanzae* (Ordoñez et al., 2006; Pacheco et al., 2010). Nuestros extractos con estas especies, en cambio, fueron de flor y hoja, y flor, respectivamente.

Otros autores han trabajado a partir de aceites esenciales, y en consecuencia han conseguido aislar compuestos volátiles antimicrobianos en *Lantana camara*. Nuestros extractos metanólicos a partir de flor y hoja en esta especie, en cambio, no resultaron antimicrobianos (Kurade et al., 2010).

También existen reportes sobre extractos antimicrobianos de especies que en nuestro trabajo no lo resultaron, pero que fueron realizados a partir de diferentes solventes de extracción. Este fue el caso de *Dodonea viscosa* y *Xanthium cavanillesii*, donde al emplear solventes orgánicos como n-hexano, los autores encontraron compuestos activos frente a diferentes especies de *Streptococcus* y *Bacillus subtilis* (Khurram et al.,

2009; Schmidt et al., 2009). También ha sido reportado que extractos de cloroformo de *Comelina erecta*, presentaron actividad frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *M. tuberculosis* (Cerderias et al., 2001).

Estudios basados en conocimientos etnobotánicos de medicinas tradicionales, entre otras, las de Camerún, Malasia, Brasil y en especial China han obtenido buenos resultados al describirse y aislarse nuevos y efectivos compuestos antimicrobianos (Negri et al., 2012; Kuete et al., 2010; Zuo et al., 2012; Chew et al., 2011). Compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, quinonas, alcaloides y terpenoides presentes en las resinas vegetales son algunos ejemplos de estos descubrimientos (Savoia et al., 2012; Kuete et al., 2010).

Respecto a la tendencia observada sobre la mayor resistencia de las especies Gram negativas a los extractos vegetales descritos en nuestro trabajo, concuerda con la bibliografía ya que en líneas generales, los compuestos derivados de plantas han resultado siempre más eficientes contra especies Gram positivas (Hsieh et al., 1998).

Las especies bacterianas Gram negativas poseen resistencias a muchos compuestos antibióticos debido, entre otros factores tales como la mayor complejidad de la pared y membranas celulares, a la presencia de bombas de exclusión, en particular el sistema AcrAB-TolC (Piddock, 2006). Existen compuestos capaces de interferir con estas bombas y sinergizar de esta manera, con otros compuestos antimicrobianos. Este es el caso del geraniol encontrado en extractos de *Helicrysum italicum*, inhibidor de las bombas de exclusión en bacterias Gram negativas y potenciador del efecto del cloranfenicol sobre estos microorganismos (Lorenzi, 2009).

Otras vías de acción de los compuestos vegetales, son la inhibición en la formación de biopelículas y los mecanismos de quorum sensing, además de las vías tradicionales de interferencia en procesos bioquímicos de síntesis de componentes de los microorganismos y disrupciones en las paredes y membranas bacterianas (Savoia et al., 2012).

Cabe destacarse en este punto que el primer enfoque de esta tesis fue el de realizar un “screening” sobre potenciales FS antibacterianos, y como objetivo secundario, el de

estudiar la actividad antimicrobiana *per se* de los mismos. En este sentido, debemos reconocer que el enfoque etnofarmacológico sería el de elección en los trabajos de búsqueda de nuevos antibióticos vegetales,

Si bien no se encontró un extracto con fuerte actividad antimicrobiana, nuestros resultados significan un punto de partida en el estudio de especies locales con dicha actividad. La mayoría de los compuestos vegetales con actividad antimicrobiana permanecen desconocidos (Simões, 2009). Es necesario el desarrollo de métodos estandarizados de extracción y purificación de compuestos para su aislamiento y caracterización (Negi et al., 2012).

II.2 Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA)

Se estudió la colección de extractos vegetales, con el fin de detectar potenciales compuestos FS para uso en TFDA. Se descartaron los extractos de hojas y tallos para evitar posibles interferencias con la clorofila en el proceso de fotosensibilización, de manera que se estudiaron 74 extractos de flores, frutos y raíces de 53 especies vegetales. Los mismos se señalan en la Tabla 1 de la sección Materiales y Métodos.

II.2.1 “Screening” de fototoxicidad en bacterias

El “screening” general de fototoxicidad se llevó a cabo en la especie bacteriana *S. epidermidis* empleando la fuente de iluminación de 2 tubos fluorescentes para TFD de células descrito en 3.11 de Materiales y Métodos, irradiado durante una hora, y se encontró actividad fotoactiva en los extractos metanólicos de tres plantas: *Solanum verbascifolium* flor, *Tecoma stans* flor y *Cissus verticillata* raíz. Las reducciones de viabilidad bacteriana fueron de 2 órdenes de magnitud para el primero de los extractos y de un orden para las otros dos (datos no mostrados).

Con el fin de aumentar los efectos de la TFDA, se implementó un nuevo sistema de irradiación más potente, que consistió en dos focos halógenos, descrito en 4.5 de Materiales y Métodos. Empleando este nuevo sistema, el extracto de *S. verbascifolium* redujo la viabilidad bacteriana en 4 órdenes de magnitud, mientras que los extractos de *T. stans* y *C. verticillata* lo hicieron en 2 y 3 órdenes, respectivamente (Figura II.1).

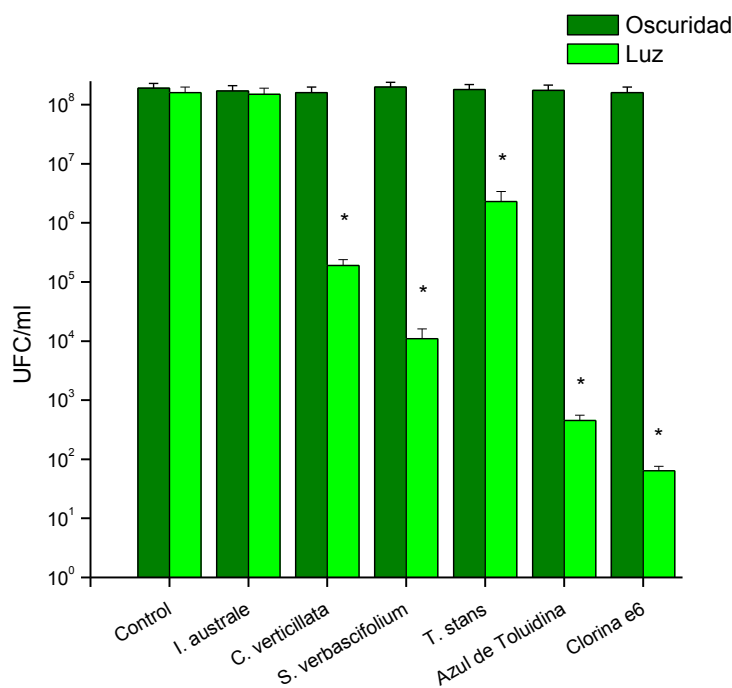


Figura II.1: Respuesta a la TFDA de *S. epidermidis* empleando extractos vegetales fotoactivos en bacterias

Suspensiones de *S. epidermidis* se preincubaron con los extractos durante 1 h y se irradiaron durante 40 min. Se empleó la mayor concentración no bactericida de los 3 extractos (500 µg/ml). Se incluyeron controles de FS azul de Toluidina (30 µg/ml, 100 µM) y Clorina e6 (0,6 µg/ml, 10 µM). Control: inóculo bacteriano sin tratamiento.

En los controles positivos de la TFDA, empleando dos FS sintéticos puros, como Clorina e6 (FS neutro) y azul de Toluidina (FS catiónico), se obtuvieron reducciones en la viabilidad bacteriana de 6 y 7 órdenes, respectivamente. Se muestran los resultados del extracto metanólico de *Iochroma australe* flor como control negativo de extracto que no mostró actividad fotosensibilizante.

Los tres extractos mencionados también resultaron FS en *S. aureus* (Figura II.2), aunque la sensibilidad a la TFDA de esta bacteria fue menor en todos los casos. Nuevamente el extracto de *S. verbascifolium* resultó el de mayor actividad, reduciendo el número de UFC/ml en 3 órdenes de magnitud. La reducción de la viabilidad tanto con *C. verticillata*, como con *T. stans* fue de 2 órdenes de magnitud. Los FS control azul de Toluidina y Clorina e6 redujeron en 5 y 4 órdenes de magnitud las UFC/ml luego de la irradiación.

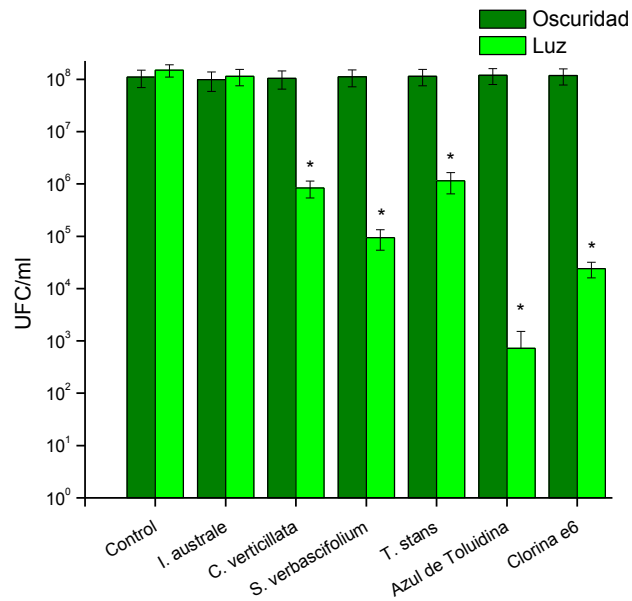


Figura II.2: Respuesta a la TFDA de *S. aureus* empleando extractos vegetales fotoactivos en bacterias

Suspensiones de *S. aureus* se preincubaron con los extractos durante 1 h y se irradiaron durante 40 min. Se empleó la mayor concentración no bactericida de los 3 extractos (500 µg/ml). Se incluyeron controles de FS azul de Toluidina (30 µg/ml, 100 µM) y Clorina e6 (0,6 µg/ml, 10 µM). Control: inóculo bacteriano sin tratamiento.

Ninguno de los extractos resultó efectivo frente a *E. coli* o *P. aeruginosa*, pero estas bacterias fueron poco sensibles también (reducción de un orden de magnitud) frente a Clorina e6 y azul de Toluidina en las concentraciones empleadas.

II.2.2 TFDA sobre bacterias en suspensión empleando *S. verbascifolium* como FS

A continuación se decidió estudiar exhaustivamente el extracto de *S. verbascifolium*, por ser el de máxima fotoactividad. Se estudió el espectro de absorción del extracto y se encontró un pico de absorbancia a los 671 nm, coincidente con la región de mayor emisión de la fuente lumínica descrita en el ítem 4.5 de Materiales y Métodos, empleada en la TFDA (Figura II.3).

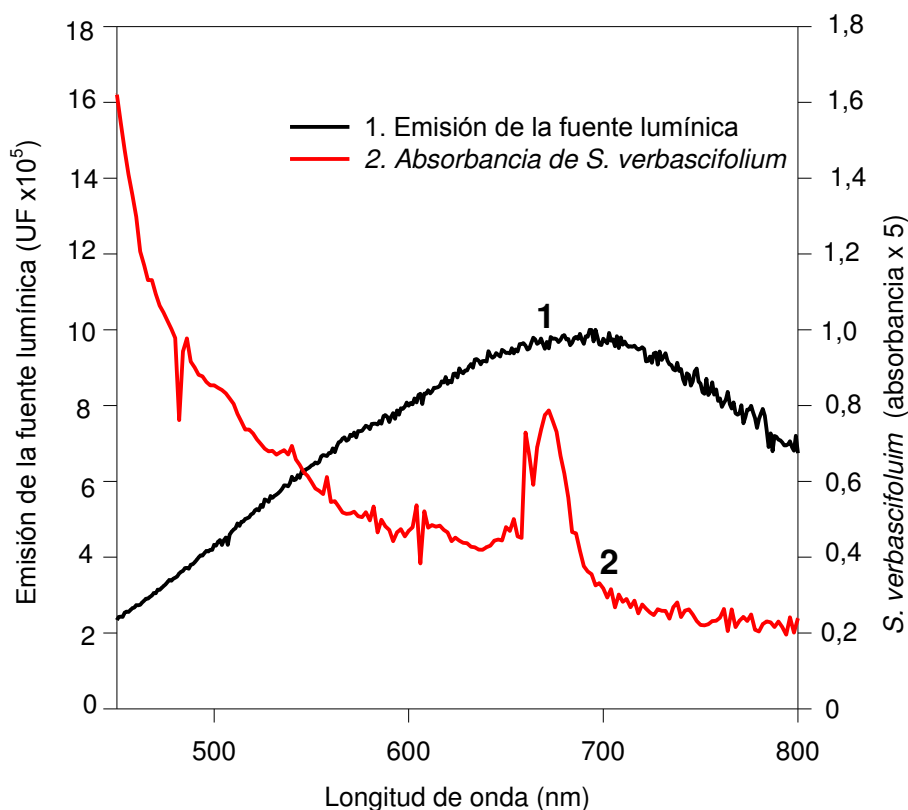


Figura II.3: Espectro de absorción del extracto de *S. verbascifolium* en DMSO:PBS (10:90) y espectro de emisión de la lámpara de tungsteno utilizada para la TFDA

Se fotosensibilizaron suspensiones bacterianas de *S. epidermidis* utilizando diferentes concentraciones de *S. verbascifolium*, en el rango 5 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Figura II.4). Con la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvo una reducción de dos órdenes de magnitud en la viabilidad, mientras que a partir de la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ en adelante, la reducción fue de cuatro órdenes de magnitud. Se eligió la concentración 50 $\mu\text{g/ml}$ para llevar a cabo el resto de los experimentos, por ser la menor concentración a la que se obtuvieron los mayores efectos fotosensibilizantes.

Se probaron también, diferentes tiempos de pre-incubación de la bacteria en oscuridad en presencia del extracto, antes de la irradiación. Los cultivos de *S. epidermidis*, incubados en oscuridad con *S. verbascifolium* durante 10 minutos y posteriormente irradiados, redujeron en 3,5 órdenes las UFC/ml, mientras que incubaciones en oscuridad a mayores tiempos, indujeron reducciones de 4 órdenes. En los siguientes experimentos se emplearon pre-incubaciones de 10 min.

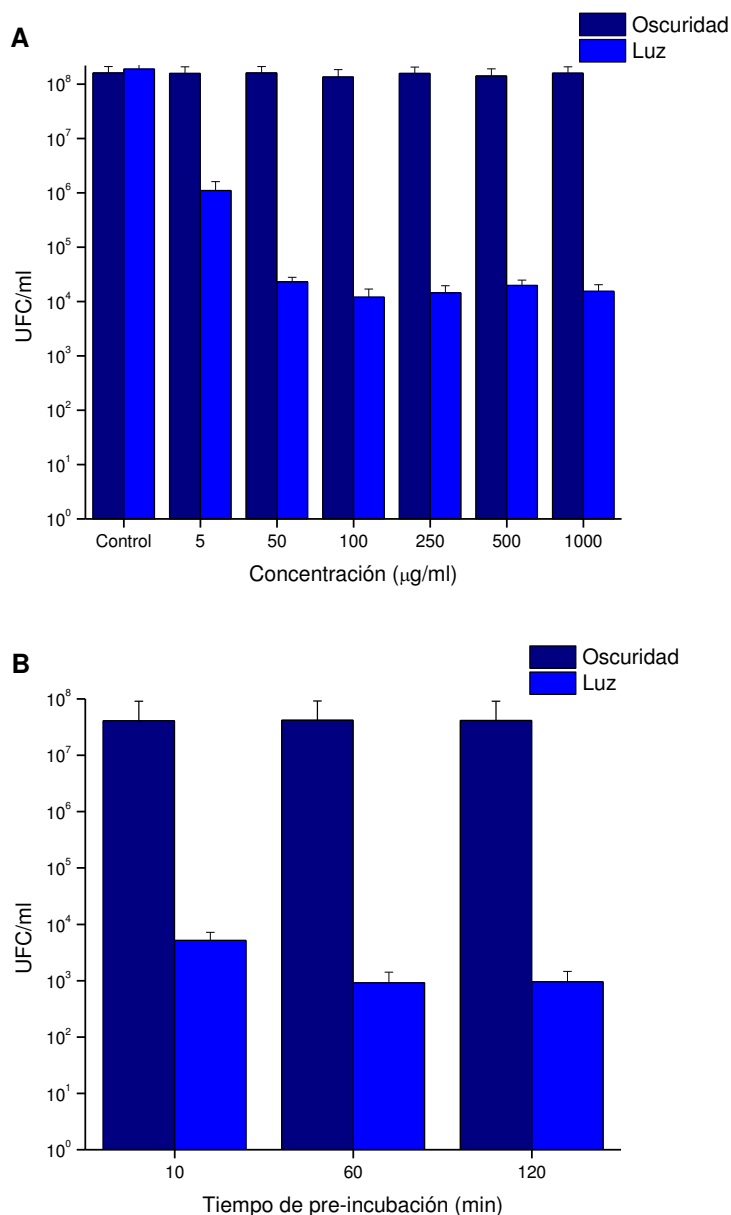


Figura II.4: Fotoinactivación de *S. epidermidis* empleando diferentes concentraciones de *S. verbascifolium*

Suspensiones de *S. epidermidis* se expusieron al extracto de *S. verbascifolium* flor en el rango 5 – 1000 µg/ml con pre-incubación de 1 hora e irradiación de irradiación 40 min (A), y con diferentes tiempos de pre-incubación con *S. verbascifolium* 50 µg/ml y 40 min de irradiación (B).

En estas condiciones de concentración y pre-incubación en oscuridad, el tratamiento fotodinámico de *S. epidermidis* utilizando el extracto de *S. verbascifolium* como fotosensibilizante (Figura II.5), muestra una reducción de UFC/ml dependiente del tiempo de irradiación. A partir de los 20 min de irradiación, la reducción de las UFC se

hace significativa ($p < 0,001$). Luego de 40 minutos de irradiación, la viabilidad bacteriana se reduce en 4 órdenes de magnitud, mientras que a los 180 minutos la reducción es de 6 órdenes, comparada a los controles sin irradiar. La fotosensibilización con los controles de FS azul de Toluidina y Clorina e6, indujo la eliminación total de la bacteria luego de 150 y 60 minutos de exposición a la luz, respectivamente. Los controles sin irradiar expuestos a los FS y el control sin FS expuesto a la irradiación, no exhibieron reducciones en la viabilidad bacteriana, respecto al control sin FS ni irradiación.

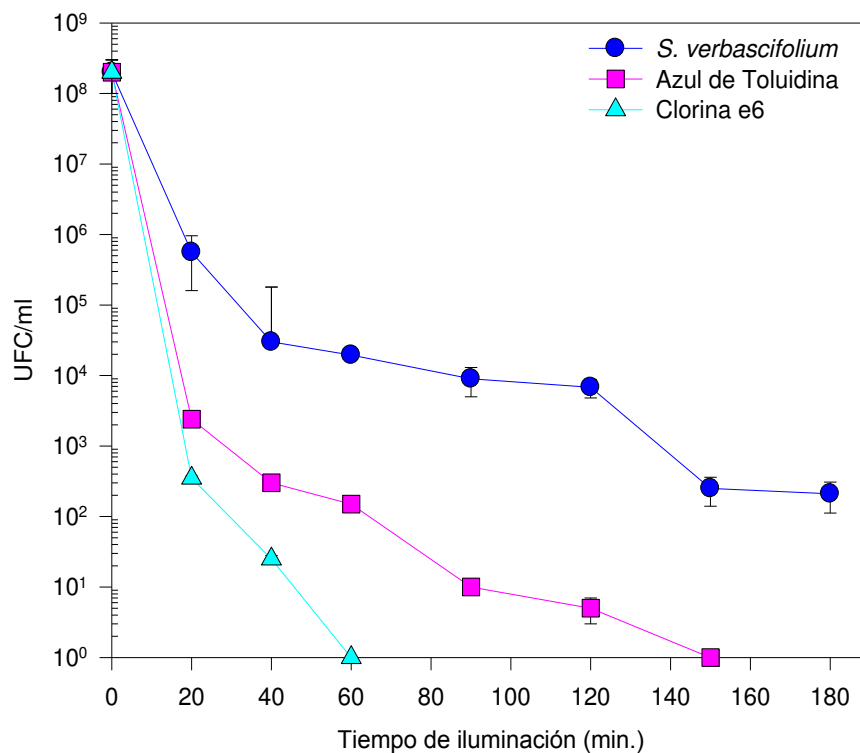


Figura II.5: Fotoinactivación de *S. epidermidis* utilizando el extracto de *S. verbascifolium* y diferentes dosis de luz

La suspensión bacteriana fue pre incubada en oscuridad durante 10 min con 50 $\mu\text{g/ml}$ del extracto e irradiada durante diferentes tiempos. Se incluyeron como controles de FS, tratamientos con azul de Toluidina (100 μM) y Clorina e6 (10 μM).

II.2.3 Unión de *S. verbascifolium* a bacterias

A continuación se estudió el espectro de fluorescencia del extracto de *S. verbascifolium*, detectándose un pico de emisión de fluorescencia, en la región correspondiente al rojo del espectro, a los 671 nm (recuadro de la Figura II.6 A). Dicho pico se utilizó para

estimar la cantidad de extracto incorporado y/o unido a la bacteria, mediante el estudio de la fracción unida a la bacteria y microscopía de fluorescencia.

Se incubaron suspensiones de *S. epidermidis* en oscuridad con el extracto y se realizaron determinaciones de incorporación a diferentes tiempos de incubación. La Figura II.6 A muestra cómo rápidamente, el extracto se une a la bacteria y se alcanza un *plateau* en la incorporación/unión del mismo. La cantidad de extracto unido a la bacteria luego de 5 minutos de incubación se estimó en $12 \pm 1,5$ pg/UFC. La Figura II.6 B es una imagen de la suspensión bacteriana incubada 5 minutos con el extracto en oscuridad. Puede observarse la emisión de fluorescencia en bacterias aisladas y zonas de mayor intensidad correspondiente a agregados bacterianos. Se comprueba la rápida unión del extracto a la membrana bacteriana.

La fluorescencia de las suspensiones de *P. aeruginosa* y *E. coli* incubadas con *S. verbascifolium* fue indetectable.

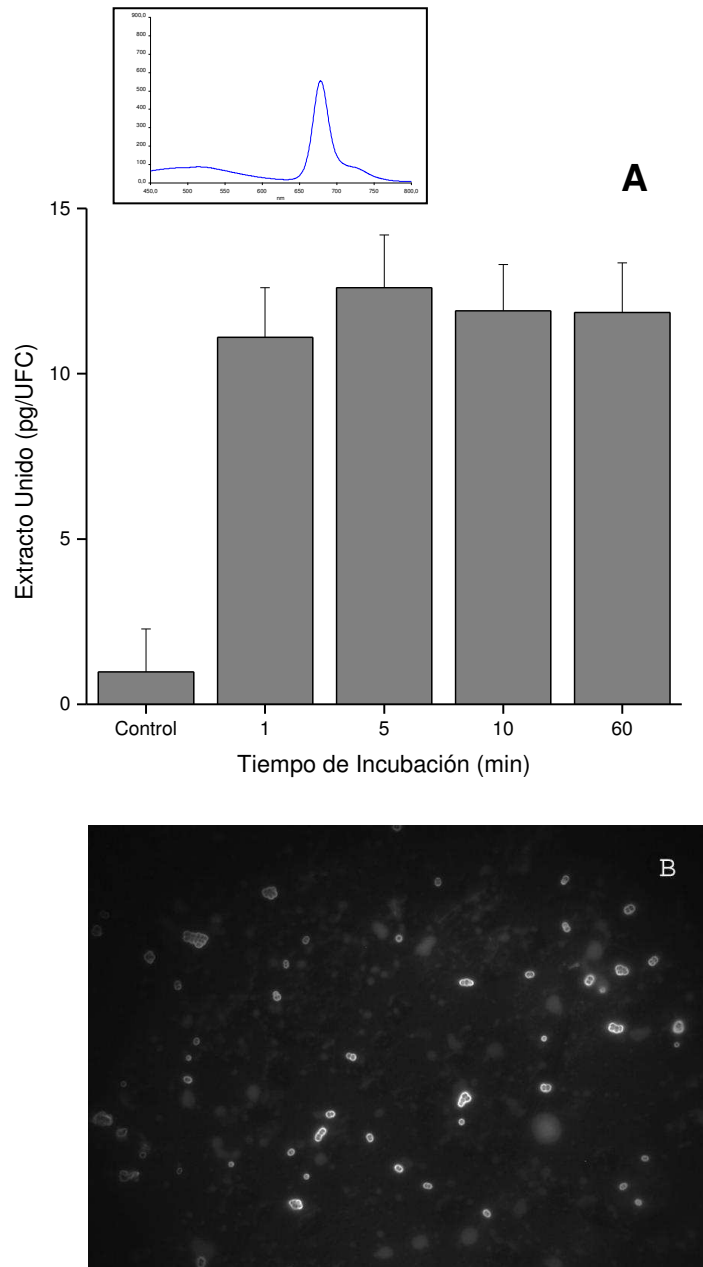


Figura II.6: Unión y/o incorporación del extracto de *S. verbascifolium* a las bacterias *S. epidermidis*.

Se incubaron suspensiones de *S. epidermidis* en presencia del extracto, y la cantidad del mismo incorporado y/o unido a la bacteria se cuantificó por fluorescencia (en el recuadro se indica el pico de emisión de fluorescencia principal del extracto a $\lambda_{ex} = 418$ nm) (A). Microscopía de fluorescencia de la suspensión de *S. epidermidis* expuesta 5 minutos al extracto de *S. verbascifolium* (50 μ g/ml). Filtro UV, aumento: 100X (B).

II.2.4 TFDA sobre bacterias en medio sólido empleando *S. verbascifolium* como FS

Se realizaron determinaciones de fotoactividad en agar suplementado con extracto de *S. verbascifolium* luego de sembrar suspensiones de *S. epidermidis* y someter a TFDA. La

Figura II.7 muestra que el extracto de *S. epidermidis* indujo una reducción de 4 órdenes de magnitud la formación de colonias después de la TFDA. Los controles con azul de Toluidina y Clorina e6, redujeron la viabilidad en 4,5-5 órdenes de magnitud.

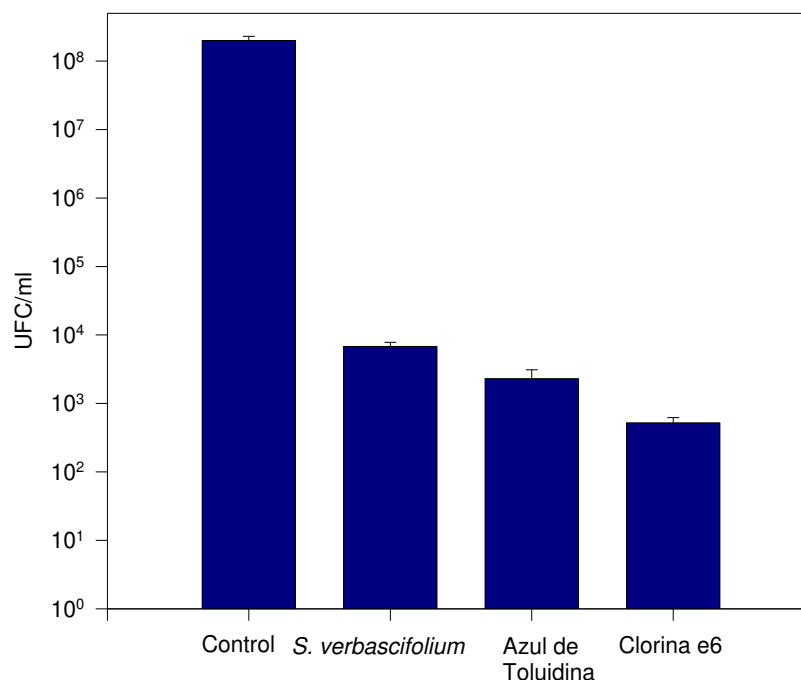


Figura II.7: Ensayo de susceptibilidad de *S. epidermidis* a TFDA en agar

Se agregó *S. verbascifolium*, azul de Toluidina y Clorina e6 al agar TSA en concentraciones finales de 50 $\mu\text{g/ml}$, 10 μM y 100 μM respectivamente. A continuación se sembraron suspensiones bacterianas sobre el agar, y se irradiaron durante 90 minutos. Se determinaron las UFC/ml, luego de la TFDA.

II.2.5 Fotodegradación de *S. verbascifolium*

Se evaluó la fotodegradación del extracto de *S. verbascifolium* en comparación a los FS sintéticos azul de Toluidina y Clorina e6, a través del decaimiento de la emisión de fluorescencia luego de la irradiación (Figura II.8). Las constantes de fotodegradación observadas (k_{obs}) fueron de $4,01 \times 10^{-4}/\text{seg}$, $5,01 \times 10^{-4}/\text{seg}$ y $2,94 \times 10^{-4}/\text{seg}$ para *S. verbascifolium*, azul de Toluidina y Clorina e6, respectivamente. Se observó, por lo tanto, que el decaimiento de la fluorescencia del extracto inducido por la luz se encuentra dentro del mismo orden de magnitud que el de los FS comerciales mencionados. El principio fotoactivo de *S. verbascifolium* fue, inclusive, menos lábil que la Clorina e6 bajo el sistema de irradiación empleado. Se observó además, un ligero

corrimiento del pico de fluorescencia producto de la iluminación del extracto, que fue de los 671 nm a los 669 nm.

Paralelamente al seguimiento de los picos de fluorescencia, se estudió el decrecimiento de los picos de absorbancia de las soluciones de extracto de *S. verbascifolium* (670 nm), Azul de Toluidina (606 nm) y Clorina e6 (406 nm). Los resultados obtenidos fueron consistentes con las K_{obs} determinadas mediante el seguimiento de los picos de fluorescencia (datos no mostrados).

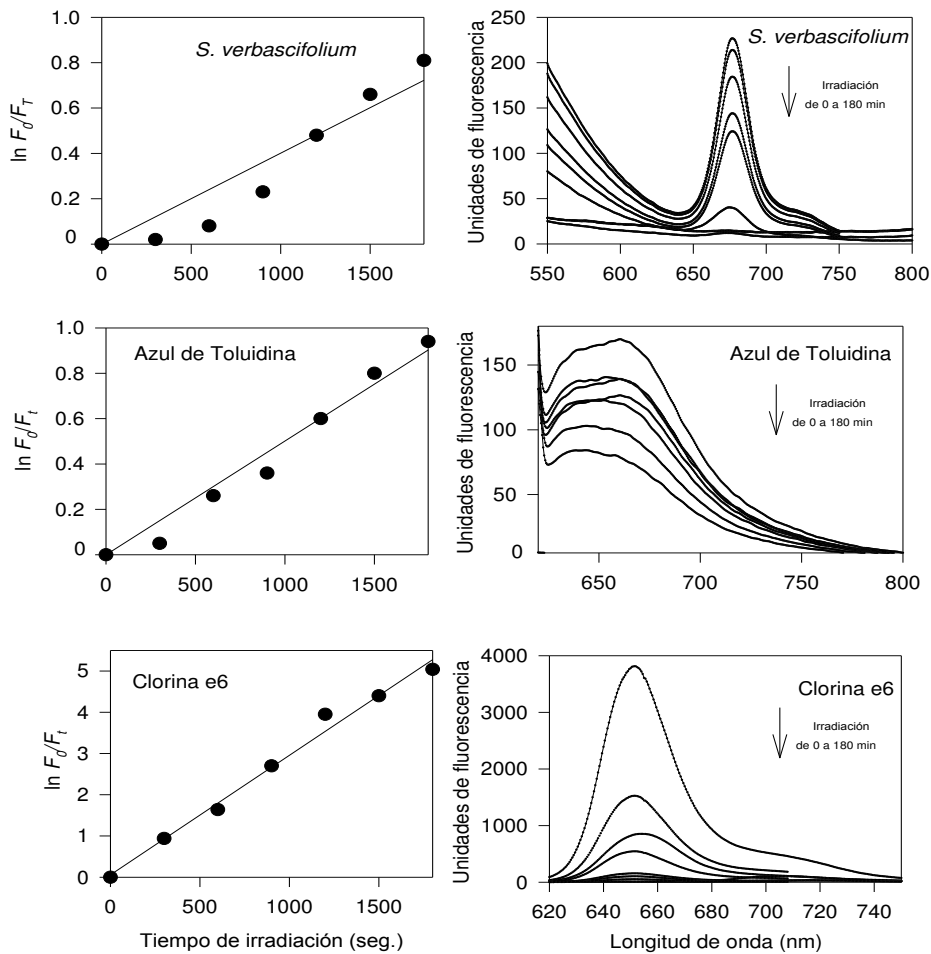


Figura II.8: Fotodegradación de *S. epidermidis*, azul de Toluidina y Clorina e6

Se muestra el decaimiento de la fluorescencia de las soluciones de *S. verbascifolium* (50 $\mu\text{g/ml}$), azul de toluidina (100 μM) y Clorina e6 (10 μM), inducido por la iluminación con una lámpara de tungsteno. Panel de la derecha: espectros a diferentes tiempos de irradiación. Panel de la izquierda: $\ln F_0/F_t$ en la región lineal del decaimiento de fluorescencia de los principales picos de emisión de cada solución.

A continuación, se realizaron experimentos de TFDA empleando como FS las mismas soluciones irradiadas en la Figura II.8. La fotodegradación de las soluciones induce descensos significativos en la inactivación bacteriana comparando con las soluciones control, no expuestas previamente a la luz ($p < 0.001$). Las soluciones fotodegradadas de *S. verbascifolium* y azul de Toluidina indujeron reducciones de 3 órdenes de magnitud la fototoxicidad inducida por los FS mantenidos en oscuridad. La fotodegradación de la solución de Clorina e6 indujo una disminución de al menos 4 órdenes en su fotoactividad, en comparación con Clorina e6 en oscuridad (Figura II.9).

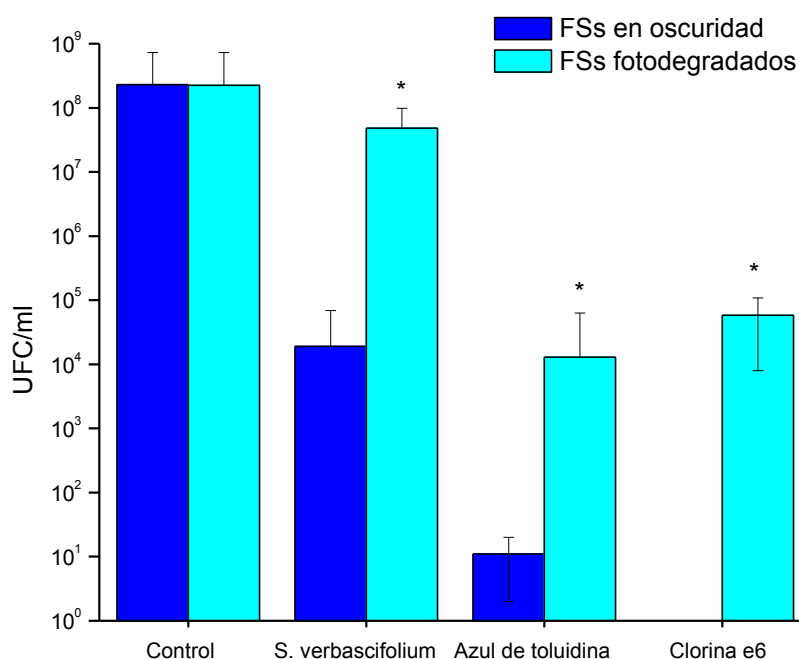


Figura II.9: TFDA sobre *S. epidermidis* empleando soluciones fotodegradadas de FS

Se emplearon soluciones de *S. verbascifolium* (50 µg/ml), azul de toluidina (100 µM) y Clorina e6 (10 µM) que sufrieron fotodegradación previa a la TFDA durante 180 minutos en las condiciones de la Figura II.8. Seguidamente se emplearon en TFDA de *S. epidermidis* en suspensión, empleando paralelamente FS mantenidos en oscuridad. Control: bacterias sin tratamiento. $p < 0,001$ respecto a los FS en oscuridad.

II.2.6 Mecanismos de fotosensibilización de *S. verbascifolium*

Para comprender mejor los mecanismos subyacentes a la fotosensibilización inducida por el extracto vegetal, se estudió la TFDA con *S. verbascifolium* en presencia de ion azida, manitol y atmósfera de nitrógeno (Figura II.10).

El agregado de azida sódica, secuestrante de oxígeno singlete, produjo una drástica inhibición de la fotoinactivación de *S. epidermidis* inducida por TFDA-*S. verbascifolium*. Bajo estas condiciones, tan sólo se redujo la viabilidad de la bacteria en un orden de magnitud luego de la irradiación durante 120 minutos, en contraposición con los 4 órdenes de magnitud del tratamiento TFDA-*S.verbascifolium*, demostrando la participación del oxígeno singlete en la fotoinactivación a partir del extracto.

En contraste, sólo se observó un menor pero significativo efecto protector del manitol, secuestrante del radical hidroxilo (2,5 órdenes en la reducción de UFC/ml vs. 4 órdenes de reducción en la TFDA control con *S. verbascifolium*, $p < 0,01$).

El desplazamiento del oxígeno mediante gaseado con nitrógeno, impidió completamente la inactivación fotoinducida de la bacteria por parte del extracto.

Los controles con azida sódica, manitol y atmósfera de nitrógeno, irradiados sin extracto de *S. verbascifolium*, no mostraron inactivación de la bacteria.

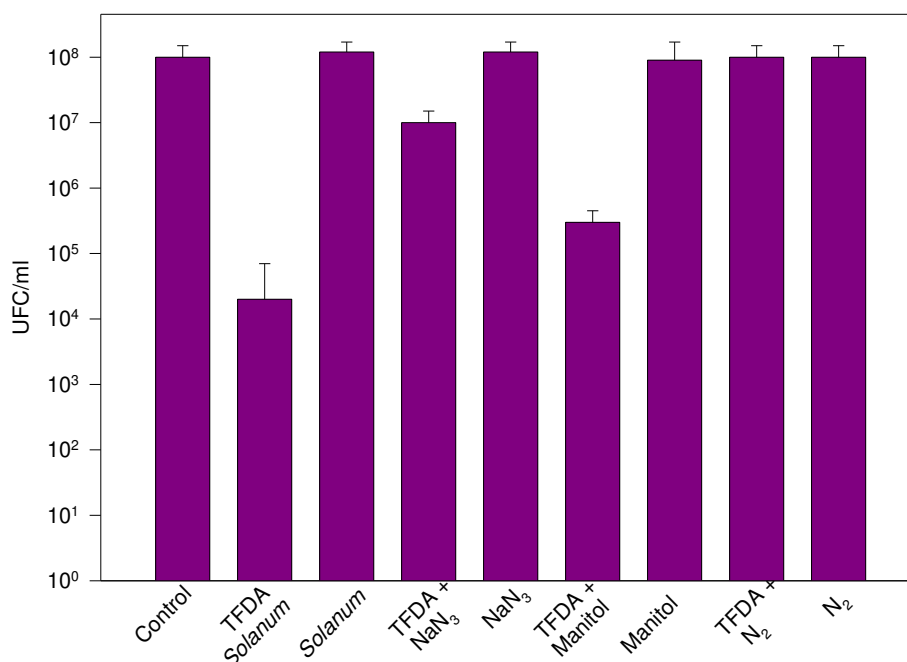


Figura II.10: TFDA con el extracto de *S. verbascifolium* como FS. Efecto del oxígeno y de secuestrantes de oxígeno singlete y radical hidroxilo

La TFDA se llevó a cabo en presencia de 50 µg/ml de *S. verbascifolium* e irradiando 120 minutos en presencia de NaN₃ o manitol 100 mM a pH 7,4 en PBS. Se llevaron a cabo controles irradiando los secuestrantes en ausencia de *S. verbascifolium*. Para inducir las condiciones anaeróbicas, se gaseó N₂ durante la irradiación. Se determinaron las UFC/ml al final del experimento. TFDA= TFDA con *Solanum verbascifolium*

II.2.7 TFDA empleando *S. verbascifolium* como FS y luz solar como fuente lumínica

Finalmente, se llevó a cabo la TFDA mediada por *S. verbascifolium* utilizando como fuente lumínica la luz solar. La Figura II.11 muestra una abrupta caída en la supervivencia de la bacteria luego de la exposición a la luz solar en presencia del extracto. El descenso en la población microbiana fue de 4 órdenes de magnitud a los 30 minutos de exposición, de 5 órdenes luego de 60 minutos, y hubo erradicación total de la bacteria, luego de 120 minutos de luz solar. Mientras que a tiempos de exposición cortos (30 min), los efectos de *S. verbascifolium* fueron similares a los del azul de Toluidina, Clorina e6 fue más efectiva (5 órdenes de reducción de UFC/ml). A períodos de irradiación más largos (120 min), *S. verbascifolium* fue mejor FS en comparación con azul de Toluidina. Se incluyeron además dos extractos de hoja correspondientes a

los que resultaron más efectivos en fotosensibilización celular en el Capítulo I.2 de esta tesis. Estos resultaron muy pobres en la TFDA de *S. epidermidis*. Mientras que *S. buxifolia* prácticamente no fotosensibilizó, *C. fruticosum* lo hizo en forma débil, obteniendo una reducción menor a los 2 órdenes de magnitud en las CFU/ml respecto al control sin tratamiento.

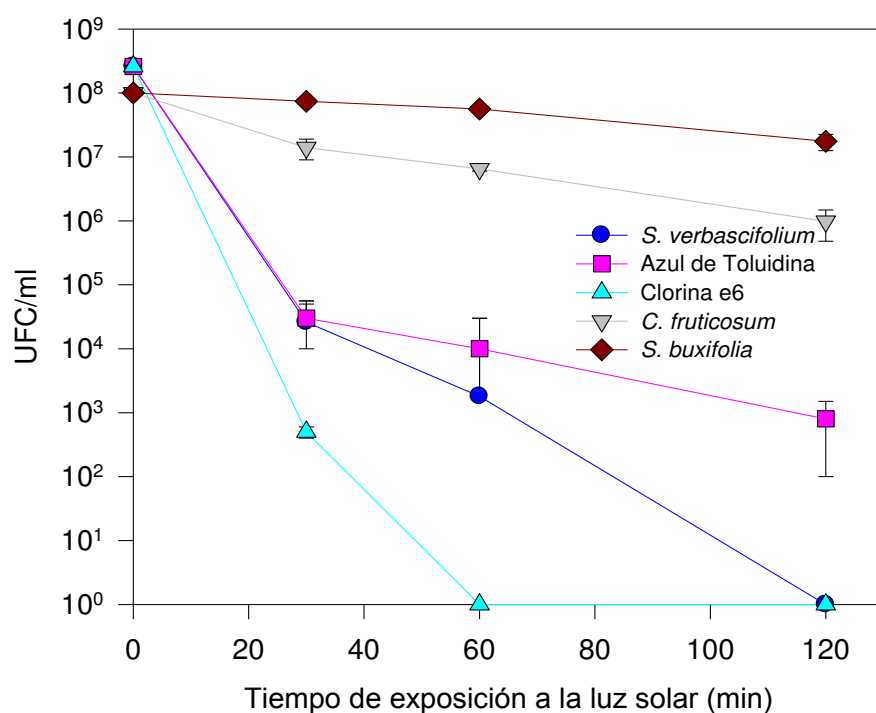


Figura II.11: Fotoinactivación de *S. epidermidis* empleando luz solar

Se pre-incubó 10 min una suspensión de *S. epidermidis* con diferentes FS (*S. verbascifolium* flor 50 µg/ml, *C. fruticosum* hoja 10 µg/ml, *S. buxifolia* hoja 50 µg/ml, azul de Toluidina 100 µM y Clorina e6 10 µM) y se expuso directamente a la luz solar. A diferentes tiempos de iluminación, se tomaron alícuotas de cada tratamiento (controles en oscuridad incluidos) y se sembraron en TSA. Se determinó el número de UFC/ml.

II.2.8 Cromatografía en capa delgada de extracto de flor *S. verbascifolium*

Como método sencillo y disponible para una rápida identificación de los compuestos fluorescentes del extracto que resultó como mejor fotosensibilizante en bacterias, hicimos una corrida de TLC del mismo, empleando un patrón de clorofila *a* (Figura II.12). En la calle de clorofila se observó una única banda bajo luz UV (relación al frente de corrida 0,97). En la calle correspondiente a *S. verbascifolium*, se pudo

detectar también una única banda de menor relación al frente (0,45), lo cual descarta la presencia de clorofila *a* en el extracto, y sugiere la presencia de al menos un compuesto fluorescente de menor hidrofobicidad que la clorofila *a*.

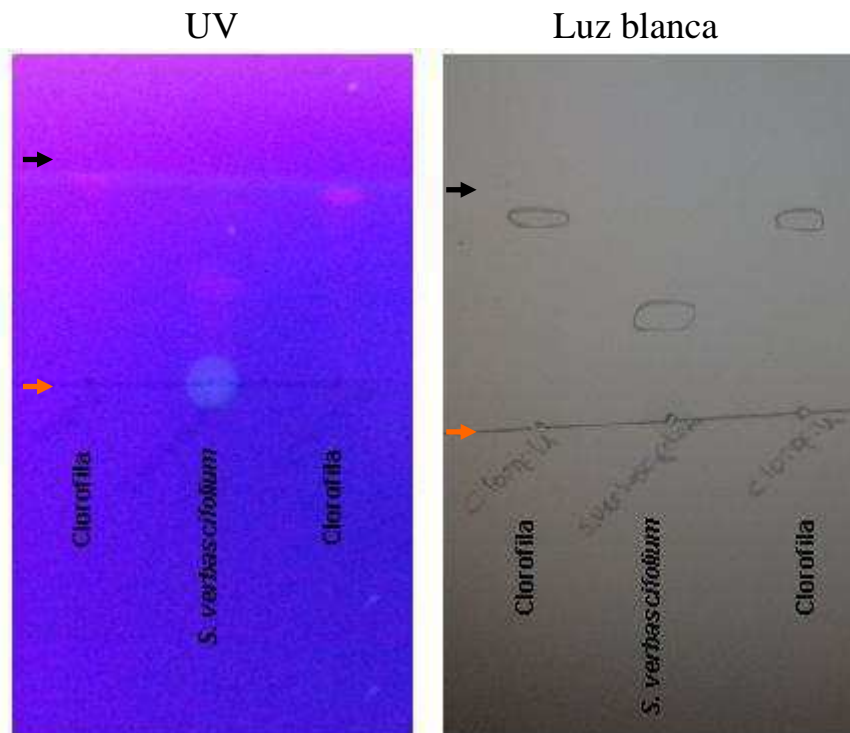


Figura II.12: Cromatografía en capa delgada de extracto de *S. verbascifolium* y clorofila *a*
La imagen de la izquierda corresponde a la observación bajo luz UV de la placa y la de la derecha, bajo luz blanca, donde las bandas observadas con la luz UV se marcaron con lápiz sobre la placa. La flecha color naranja indica el punto de siembra en la placa y la flecha negra, el frente de corrida del solvente de elusión.

II.2.9 Discusión

Llevamos a cabo el “screening” de nuestra colección de extractos vegetales en busca de aquéllos con actividad fotosensibilizante sobre bacterias. Encontramos que los extractos metanólicos de *Solanum verbascifolium* flor, *Tecoma stans* flor y *Cissus verticillata* raíz resultaron fotosensibilizantes en las bacterias Gram positivas *S. epidermidis*. Empleando *T. stans* y *C. verticillata*, obtuvimos reducciones de 2 y 3 órdenes, respectivamente, en las UFC/ml luego de irradiar con luz artificial. El extracto que resultó más fotoactivo fue el de *S. verbascifolium*, que indujo la reducción de la

viabilidad bacteriana en 4 órdenes de magnitud luego de 40 minutos de irradiación (55 J/cm²). Los controles positivos empleando FS conocidos como azul de Toluidina y Clorina e6 durante la irradiación con luz artificial, fueron más efectivos que los extractos vegetales sobre *S. epidermidis*. Sin embargo, las concentraciones no son comparables ya que empleamos extractos crudos de plantas y no compuestos purificados.

Las especies Gram negativas, *E. coli* y *P. aeruginosa* no fueron sensibles a la TFDA con ninguno de los tres extractos empleados, pero fueron levemente sensibles a la TFDA con Clorina e6 (FS neutro) y azul de toluidina (FS catiónico). Se sabe que las bacterias Gram negativas son más resistentes a la TFDA con la mayoría de los FS comúnmente usados, ya que los compuestos antimicrobianos y los FS poseen más dificultades en alcanzar la membrana celular que en el caso de las Gram positivas (Hamblin et al., 2004; Alves et al., 2008). Se cree que los FS catiónicos tienen mayor afinidad por los fosfolípidos negativamente cargados de las bacterias Gram negativas y entran más fácilmente en comparación con los FS neutros o aniónicos. Esta noción concuerda con la dependencia de la carga positiva en la acción de los péptidos antimicrobianos (Jiang et al., 2008; Taheri-Araghi et al., 2007). Basándonos en esta evidencia, suponemos que *S. verbascifolium* contiene probablemente moléculas fotosensibilizantes neutras o catiónicas, ya que no detectamos ni daño fotodinámico, ni unión en la superficie de las especies Gram negativas.

El ensayo de TFDA sobre bacterias creciendo en agar, fue una modificación del típico test de susceptibilidad a antibióticos. Teniendo en cuenta la susceptibilidad de las bacterias al FS presente en el medio sólido luego de la irradiación, consideramos que éste sería un buen modelo para el “screening” de nuevos compuestos FS, ya que se trata de una metodología bien establecida y sencilla de llevar a cabo.

Se estudió la identidad de la especie reactiva del oxígeno implicada en la *S. verbascifolium*-TFDA mediante el uso de secuestrantes del ¹O₂ como el anión azida, y de radicales libres OH[·] como el manitol.

Muchos trabajos asumen que el ¹O₂ es la única especie de importancia en TFDA (Maisch et al., 2007; Spesia et al., 2010), mientras que otros autores que atribuyen el

efecto bactericida a radicales libres como el HO[·] (Martin et al., 1987). Huang et al (2012) han formulado la hipótesis de que las bacterias Gram negativas son más susceptibles al HO[·], mientras que las Gram positivas son más susceptibles al ¹O₂, y que las deficiencias en la inhibición con NaN₃, podrían reflejar deficiencias en la unión del secuestrante al microambiente de la bacteria o deficiencias en la penetración del NaN₃ en la pared celular. Nosotros encontramos que la fotoactividad empleando *S. verbascifolium* como FS, fue dependiente de la presencia de oxígeno, siendo inhibida fuertemente por NaN₃ y en menor medida por manitol, demostrando así, la dependencia principalmente de oxígeno singlete y en menor medida de radical hidroxilo, a través de reacciones del tipo II y tipo I, respectivamente.

Tanto las fuentes de luz coherentes como las no coherentes pueden utilizarse en la inactivación de bacterias (Calin et al., 2009). Nosotros elegimos como fuente de luz, una del segundo tipo, empleando lámparas que generan un espectro de emisión continuo con picos de emisión en las longitudes de onda visibles y el infrarrojo cercano, la cual consideramos más apropiada para experimentos con extractos vegetales donde el pico de absorción del FS es desconocido. En el presente trabajo, empleamos dosis de luz para inactivar *S. epidermidis* del mismo orden de magnitud que las usadas por otros autores que emplearon lámparas de Tungsteno para fotosensibilizar diversas especies bacterianas utilizando porfirinas, azul de Toluidina, fenotiazina, rosa de Bengala y Merocianina 540 (Jori et al., 2011; Caminos et al., 2006; Tak-Wah et al., 2005; Tegos et al., 2006; Demidova et al., 2005; Hsiao-Yin et al., 2004).

Considerando el espectro de emisión de la luz solar y la alta potencia lumínica durante el verano en Sudamérica, es destacable que la fotosensibilización de *S. verbascifolium* fue más eficiente con luz solar, induciendo la erradicación total de *S. epidermidis* luego de 120 minutos de exposición, mientras que con la fuente de luz artificial se indujo, bajo condiciones similares, 4 órdenes de magnitud en la reducción de viabilidad. También la respuesta de los FS sintéticos fue diferente entre la luz solar y la artificial. Mientras que *S. verbascifolium* fue menos efectivo que azul de Toluidina con la irradiación de lámpara, fue igual o mejor FS con la exposición a la luz solar. Además, la cinética de la reducción de viabilidad fue diferente para cada FS comparando ambas fuentes de luz (Figuras II.2.5 y II.2.11), mostrando que la respuesta del FS a la luz solar es particular

de cada compuesto, y que la ventaja de usar luz solar en TFDA es la explotación del espectro de absorción entero de cada FS.

El espectro de absorción medido para el extracto metanólico de *S. verbascifolium* mostró un claro pico en la región espectral entre los 650 y 690 nm. El espectro de emisión de la lámpara cubrió una amplia región entre los 500 y 800 nm, la cual incluyó el pico del extracto en la región visible. Las fuentes de luz artificial parecen ser más apropiadas para el uso en tejidos infectados con bacterias, teniendo en cuenta que la ventana terapéutica se localiza entre los 600 y 1000 nm, longitudes de onda donde se produce la mejor absorción de la luz por los tejidos.

Por otra parte, además, las constantes de fotodegradación (que fueron calculadas en este trabajo luego de iluminación con una fuente de luz artificial), podrían diferir cuando se usa luz solar, y esto podría modificar la eficiencia de fotosensibilización de productos naturales como el extracto de *S. verbascifolium* durante la irradiación, cambiando por lo tanto, su fotoactividad en comparación a otros FS.

Tras la iluminación, todos los FS son químicamente modificados o incluso degradados. Esto resulta del ataque directo de los ROS o el oxígeno singlete a las moléculas del FS, y este proceso tiene una alta probabilidad de ocurrir en el ambiente biológico donde está el FS, en cercana proximidad a las moléculas reactivas. La fotomodificación y fotodegradación pueden ser identificadas mediante espectroscopia, como una disminución en la absorbancia o la emisión de fluorescencia (Plaetzer et al., 2009; Bonnett et al., 2001; Kunz et al., 2002). En el extracto de *S. verbascifolium* la fotodegradación se produjo en menor medida que en la Clorina e6, un FS conocido de uso en TFDA, indicando que el principio fotoactivo de la planta no es especialmente fotolábil. Además, el extracto fotodegradado siguió siendo fotoactivo aún después de 180 minutos de exposición a una fuente de luz artificial. Vale la pena destacar que la constante de fotodegradación calculada a través del decaimiento del pico de absorbancia a 670 nm de *S. verbascifolium* fue muy similar a la calculada a través del decaimiento de la intensidad de emisión de fluorescencia durante la irradiación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es probable que el principal compuesto fluorescente en el extracto metanólico de flor de *S. verbascifolium* (pico de emisión de fluorescencia a 671 nm), sea el compuesto fotosensibilizante. Esta hipótesis, se ve

reforzada por el hecho de que, al igual que con otros FS, el compuesto fluorescente a 671 nm se une rápidamente a la superficie de las bacterias, ejerciendo su actividad desde el lado externo de la membrana, lo que concuerda con el tiempo corto de pre-incubación necesario para ejercer su efecto. En el caso de porfirinas purificadas, varios autores han afirmado que la fuerza impulsora de la unión del FS catiónico a los grupos funcionales negativamente cargados de la superficie de la bacteria, es exclusivamente electrostática, ya que el proceso de unión y pegado se completa dentro de un período de tiempo muy corto. Algunos reportes independientes indican que extender el tiempo de incubación previo a la irradiación de 5 minutos a 1- 2 horas no tiene efectos en la cantidad de FS unido a las células microbianas (Wainwright et al., 1998; Jori et al., 2003, 2004, 2011).

Algunos derivados de la clorofila poseen macrociclos y representan productos intermediarios de degradación, tales como feofitina, clorofilidas y feoforbida. Estos productos son propensos a emitir fluorescencia alrededor de 670 nm (Yamauchi et al., 1997; Johnson-Flanagan et al., 1996) y son también propensos a estar presentes en flores jóvenes durante el desarrollo de los pétalos (Pykes et al., 1998). Sin embargo, es de destacar que el resto de los extractos de flores procesados en idénticas condiciones, no resultaron fotoactivos.

Por otra parte, la mayoría de los pigmentos responsables de los colores en las plantas superiores son carotenoides (carotenos, xantofilas), flavonoides (chalconas, antocianinas, flavonas, flavonoles) y betalinas (betaxantinas, betacianinas). Estos compuestos han sido ampliamente descritos como antioxidantes, y enmascararían en todo caso, potenciales compuestos fotoactivos de la planta (Da Silva et al., 2012; Gandía-Herrero et al., 2012; Stahl et al., 2012; Feedman et al., 2009). Sin embargo su rol en la protección contra la TFDA es controversial (Zhang et al., 2012). Al ser el oxígeno singlete potencialmente dañino para la membrana lipídica del cloroplasto, como también para las proteínas y ácidos nucleicos, se esperaría que haya sistemas de protección para aplacar estas especies. Los principales medios de defensa dentro del cloroplasto son los pigmentos carotenoides, de los cuales hay aproximadamente una molécula cada cinco de clorofila. Cuantitativamente, luteína y β -caroteno son los más importantes, y en menor medida violaxantina y α -caroteno (Knok et al., 1985).

La mezcla de pro- y anti- oxidantes presente en plantas, dificulta la interpretación de la fotoactividad de los principios aislados. Nosotros proponemos el uso del extracto crudo de la planta como FS, ya que estos extractos naturales sean probablemente más seguros que los FS artificiales al ser empleados en TFDA, y en el tratamiento de decontaminación de aguas.

Queremos destacar la importancia de que un extracto de flor resultó mucho mejor fotosensibilizante para bacterias que los dos extractos foliáceos que resultaron de mayor efectividad para células. Esto demuestra en primer lugar la selectividad por la célula procariota o eucariota, dependiendo de la entidad química del FS, y en segundo lugar, que queda descartada la acción de la clorofila *a* en la TFDA. Esto último se comprobó además mediante estudios cromatográficos.

La efectividad de la acción fotodinámica sobre células eucariotas o procariotas encontrada en los FS estudiados se puede deber: i) a la naturaleza química del FS y su grado de penetración y/o pegado en las membranas celulares, ii) diferencias en las defensas antioxidantes entre ambos tipos celulares, iii) espectros de absorción de luz diferentes, tales que algunos favorecen la TFD celular y otros la TFDA.

En el presente trabajo, elegimos *S. epidermidis* como modelo de desinfección de aguas empleando TFDA, ya que representa, entre otros estafilococos, un aislamiento común de las aguas en América del Sur (Prado et al., 1994). El potencial empleo del enfoque fotodinámico en la desinfección de aguas ha sido estudiado recientemente por otros autores, demostrando que la TFDA de bacterias de aguas para consumo humano y aguas residuales, es posible bajo la irradiación artificial y solar (Jemli et al., 2002; Magaraggia et al., 2006; Alves et al., 2008; Carvalho et al., 2007; Almeida et al., 2009; Jori et al., 2011). Una ventaja destacable de aplicar TFDA a la desinfección de patógenos en aguas contaminadas es que esta técnica demostró ser independiente de las resistencias a antibióticos (Tavares et al., 2010), por esta razón, podría ser usada para tratar bacterias resistentes, tales como patógenos presentes en el agua de los ríos, océanos y piletas de natación (Tolba et al., 2008).

La estrategia basada en FS naturales activados con luz solar podría ser un medio de control bacteriano que se una a los tratamientos ya existentes. Por otra parte, los

intermediarios citotóxicos fotogenerados (por ej. ROS) típicamente actúan por mecanismos con amplio rango de blancos bioquímicos, generando daños generalizados en diversos constituyentes bacterianos, reduciendo el riesgo de desarrollo de resistencias. Además, la ausencia de efectos mutagénicos inducidos por la fotosensibilización de células microbianas fue comprobada repetidas veces (Jori et al., 2006). Este hecho, permite la repetición de ciclos de TFDA empleando luz solar.

Se realizaron pocos estudios apuntando a llevar a cabo un “screening” en búsqueda de nuevos FS vegetales en microorganismos. Gasparetto et al. (2010) investigaron los efectos de la TFDA empleando extractos de *Alternanthera maritima* en la viabilidad del hongo *Candida dubliniensis* expuesta a un láser de 685 nm. Los extractos de etanol y hexanol también presentaron picos de absorción en la región de los 650 y 700 nm, y se identificaron esteroides, triterpenos y flavonoides como los principales componentes de estos extractos. Sin embargo, no se encontró correlación entre estos metabolitos secundarios y su presunta fotoactividad. Ong et al. (2009) también llevaron a cabo un “screening” en plantas originarias de Malasia, donde 6 extractos presentaron actividad como FS. Estos extractos activos fueron fraccionados y se realizaron ensayos para obtener a partir de ellos cuatro FS en células eucariotas, de los cuales todos están basados en el núcleo estructural de la feoforbida *a* y *b*.

Como ha sido descrito por Jori et al. (2011), la TFDA empleando recursos naturales con bajo impacto en los ecosistemas, puede ser utilizada para afrontar problemas ambientales de gran importancia, tales como la descontaminación de aguas. El balance entre compuestos oxidantes y antioxidantes estaría muy probablemente enmascarando potenciales FS en los extractos, pero pudimos demostrar que empleando extractos crudos de *S. verbascifolium*, el nivel de fototoxicidad fue similar al de FS artificiales luego de la exposición a luz solar. Además, el pico de absorción del extracto dentro de la ventana terapéutica para los tejidos, sugirió su eficiencia en el tratamiento de infecciones superficiales en tejidos expuestos a fuentes de luz artificiales.

II.3 Conclusiones de los resultados en bacterias

Se hallaron extractos pertenecientes a 7 especies vegetales que mostraron actividad antibacteriana sobre las especies Gram positivas con las que se trabajó. Los extractos encontrados en este trabajo, no son compuestos altamente efectivos como antimicrobianos, ya que las CIM de los mismos se hallan en el orden de magnitud de los mg/ml, por encima del límite establecido para ser considerados como tales. Si bien la efectividad de los extractos no fue buena, encontramos actividad en especies que no se habían testeado previamente, y nuestros resultados significan un punto de partida en el estudio de especies locales con dicha actividad. La purificación de los compuestos antimicrobianos a partir de las especies identificadas podría llevar a la identificación de principios activos presentes en bajas concentraciones en estas especies, pero ese trabajo va más allá de los objetivos de esta tesis.

Al realizar el “screening” de fototoxicidad de los extractos, empleando la bacteria Gram positiva *S. epidermidis*, encontramos tres extractos que resultaron fotosensibilizantes. El más fotoactivo fue el de *S. verbascifolium*. Si bien en las determinaciones con fuentes de luz artificiales, su efectividad fue menor a la de FS comerciales como el azul de Toluidina o la Clorina e6, cuando se realizó la TFDA exponiendo las bacterias a la luz solar, el extracto incrementó su efectividad induciendo la erradicación total de *S. epidermidis* luego de 120 minutos de exposición y superando así, los efectos del azul de Toluidina en iguales condiciones. La ventaja de usar luz solar es la explotación del espectro de absorción entero de cada fotosensibilizante, que no puede ser logrado empleando fuentes artificiales con espectros acotados.

Las especies Gram negativas, *E. coli* y *P. aeruginosa* no fueron sensibles a la TFDA con ninguno de los tres extractos empleados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible que el principal compuesto fluorescente (671 nm) en el extracto metanólico de flor de *S. verbascifolium* sea el compuesto fotosensibilizante. Algunos derivados de la clorofila tales como feofitina, clorofilidas y feoforbida, emiten fluorescencia alrededor de 670 nm tal como la observada en nuestros extractos fotosensibilizantes, y suelen también estar presentes en flores jóvenes durante el desarrollo de los pétalos. Sin embargo, vale la pena destacar

que todos los extractos de flores procesados en idénticas condiciones, pero sin embargo no resultaron fotoactivos como los tres extractos estudiados. Esto nos lleva a la hipótesis de la presencia de un FS en particular o bien una mezcla de compuestos oxidantes y antioxidantes que conducen a los resultados obtenidos.

Los extractos de hoja que resultaron altamente fotosensibilizantes en células mamíferas, no fueron eficientes en la TFDA, mientras que el extracto de *S. verbascifolium* no fue eficiente en la TFD de células eucariotas, demostrando selectividad de las especies vegetales por los distintos tipos celulares.

La estrategia basada en el uso de FS naturales activados con luz solar podría ser un medio de control bacteriano que se una a los tratamientos ya existentes, en particular, en el tratamiento de aguas contaminadas. Los intermediarios citotóxicos fotogenerados actúan por mecanismos con amplio rango de blancos bioquímicos, produciendo daños generalizados en diversos constituyentes bacterianos, reduciendo el riesgo de desarrollo de resistencias.

Se estudió la fotodegradación del extracto de *S. verbascifolium* y las vías moleculares implicadas en la fotosensibilización mediada por él. La fotodegradación del mismo fue de menor grado que el de Clorina e6, indicando que el principio fotoactivo de la planta no es especialmente fotolábil. En cuanto al mecanismo molecular, se determinó que la fotosensibilización con el extracto depende principalmente de oxígeno singlete y en menor medida de radical hidroxilo.

II.4 Referencias

Abioye EO, Akinpelu DA, Aiyegoro OA, Adegboye MF, Oni MO, Okoh AI (2013) Preliminary phytochemical screening and antibacterial properties of crude stem bark extracts and fractions of *Parkia biglobosa* (Jacq.). *Molecules*. 18(7):8485-8499.

Almeida A, Cunha A, Gomes NC M, Alves E, Costa L, Faustino MAF (2009) Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Mar Drugs*. 7:268–313.

Alves E, Carvalho CM, Tomé JP, Faustino FA, Neves MG, Tomé AC, Cavaleiro JA, Cunha A, Mendo S, Almeida A (2008) Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 35(11):1447-1454.

Amin A, Khan MA, Shah S, Ahmad M, Zafar M, Hameed A (2013) Inhibitory effects of *Olea ferruginea* crude leaves extract against some bacterial and fungal pathogen. *Pak J Pharm Sci*. 26(2):251-254.

Awouafack MD, McGaw LJ, Gottfried S, Mbouangouere R, Tane P, Spiteller M, Eloff JN (2013) Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). *BMC Complement Altern Med*. 13(1):289.

Binutu OA, Lajubutu BA (1994) Antimicrobial potentials of some plant species of the Bignoniaceae family. *Afr J Med Med Sci*. 23(3):269-273.

Boligon AA, Sagrillo MR, Machado LF, de Souza O, Machado MM, da Cruz IB, Athayde ML (2012a) Protective effects of extracts and flavonoids isolated from *Scutia buxifolia* Reissek against chromosome damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide. *Molecules*. 17(5):5757-5769.

Boligon AA, Janovik V, Frohlich JK, Spader TB, Froeder AL, Alves SH, Athayde ML (2012 b) Antimicrobial and cytotoxic activities of leaves, twigs and stem bark of *Scutia buxifolia* Reissek. *Nat Prod Res.* 26(10):939-944.

Bonnett R, Martinez G (2001) Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron.* 57:9513–9574.

Braga FC, Wagner H, Lombardi JA, Braga de Oliveira A (2000) Screening Brazilian plant species for in Vitro inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomedicine.* 6(6):447-452.

Calin MA, Parasca SV (2009) Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers Med Sci.* 24:453-460.

Caminos DA, Spesia MB, Durantini EN (2006) 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.* 5:56–65.

Carvalho CM, Gomes AT, Fernandes SC, Prata AC, Almeida MA, Cunha MA, Tomé JP, Faustino MA, Neves MG, Tomé AC, Cavaleiro JA, Lin Z, Rainho JP, Rocha J (2007) Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: bacterial β -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. *J Photochem Photobiol B.* 88:112–118.

Cerdeiras MP, Pianzola MJ, Vázquez A (2001) The antibacterial activity of *Commelina erecta* extracts. *Int J Antimicrob Agents.* 17(5):423-424

Chew YL, Chan EW, Tan PL, Lim YY, Stanslas J, Goh JK (2011) Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. *BMC Complement Altern Med.* 10: 11-12.

Coelho RG, Honda NK, Vieira Mdo C, Brum RL, Pavan FR, Leite CQ, Cardoso CA (2010) Chemical composition and antioxidant and antimycobacterial activities of *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). *J Med Food*. 13(5):1277-1280.

Cos P, Maes L, Sindambiwe JB, Vlietinck AJ, Berghe VD (2006) Bioassays for antibacterial and antifungal activities. Biological screening of plant constituents. Training manual. Trieste: UNIDO-ICS (United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology) 19–28.

Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, Hamblin MR, Mylonakis E (2010) Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem Biol*. 5(3):321-332.

Da Silva PF, Paulo L, Barbafiga A, Eisei F, Quina FH, Maçanita AL (2012) Photoprotection and the photophysics of acylated anthocyanins. *Chemistry*.18:3736-3744.

Daozong X, Xiaoqin W, Jiayi S, Qing Y, Ying Z (2011) Phenolic compounds from the edible seeds extract of Chinese Mei (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) and their antimicrobial activity. *Food Science and Technology*. 44:347–349.

de Moraes Lima GR, de Sales IR, Caldas Filho MR, de Jesus NZ, de Sousa Falcão H, Barbosa-Filho JM, Cabral AG, Souto AL, Tavares JF, Batista LM (2012) Bioactivities of the genus *Combretum* (Combretaceae): a review. *Molecules*. 17(8):9142-9206.

Demidova TN, Hamblin MR (2005) Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 49:2329–2335.

Dulger B, Gonuz A (2004) Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants. *Pakistan Journal of Biological Science*. 7 (9):1559-1562.

Freedman B M (2009) Topical polyphenolic antioxidants reduce the adverse effects of intense pulsed light therapy. *J Cosmet Laser Ther*. 11:142-145.

Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F (2012) Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *J Nat Prod.* 75:1030-1036.

Gasparetto A, Lapinski TF, Zamuner SR, Khouri S, Alves LP, Munin E, Salvador MJ (2010) Extracts from *Alternanthera maritima* as natural photosensitizers in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B.* 99:15-20.

Gómez Castellanos JR, Prieto JM, Heinrich M (2009) Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)--a global ethnopharmacological commodity?. *J Ethnopharmacol.* 121(1):1-13.

Hamblin MR, Hasan T (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochem Photobiol Sci.* 3:436-450.

Hsiao-Yin L, Chin-Tin C, Ching-Tsan H (2004) Use of merocyanine 540 for photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cells. *Appl Environ Microbiol.* 70:6453– 6458.

Hsieh PC, Siegel SA, Rogers B, Lewis K (1998) Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. *Proc Natl Acad Sci.* 95:6602–6606.

Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyentayev T, Tanaka M, Hamblin MR (2012) Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med.* 44:490-499.

Jemli M, Alouini Z, Sabbahia S, Gueddari M (2002) Destruction of fecal bacteria in wastewater by three photosensitizers. *J Environ Monitor.* 4:511–516.

Jiang Z, Vasil A I, Hale I, Hancock RE, Vasil ML, Hodges RS (2008) Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 90:369–383.

Johnson-Flanagan AM, Spencer MS (1996) Chlorophyllase and peroxidase activity during degreening of maturing canola (*Brassica napus*) and mustard (*Brassica juncea*) seed. *Physiol Plant*. 97:353–359.

Jori G (2003) Photodynamische therapien in der mikrobiologie. En: Szeimies RM, Jocham D, Landthaler M, editors. *Klinische fluoreszenzdiagnostik und photodynamische therapie*, Berlin: Blackwell verlag, 360–371.

Jori G, Brown SB (2004) Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci*. 3:403–405.

Jori G, Magaraggia M, Fabris C, Soncin M, Camerin M, Tallandini L, Coppellotti O, Guidolin L (2011) Photodynamic inactivation of microbial pathogens: disinfection of water and prevention of water-borne diseases. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 30:261-271.

Kalayou S, Haileselassie M, Gebre-Egziabher G, Tiku'e T, Sahle S, Taddele H, Ghezu M (2012) In-vitro antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2(7):516-522.

Khan DA, Hassan F, Ullah H, Karim S, Baseer A, Abid MA, Ubaidi M, Khan SA, Murtaza G (2013) Antibacterial activity of *Phyllanthus emblica*, *Coriandrum sativum*, *Culinaris medic*, *Lawsonia alba* and *Cucumis sativus*. *Acta Pol Pharm*. 70(5):855-859.

Kim YS, Kim H, Jung E, Kim JH, Hwang W, Kang EJ, Lee S, Ha BJ, Lee J, Park D (2012) A novel antibacterial compound from *Siegesbeckia glabrescens*. *Molecules*. 17(11):12469-12477.

Khurram M, Khan MA, Hameed A, Abbas N, Qayum A, Inayat H (2009) Antibacterial activities of *Dodonaea viscosa* using contact bioautography technique. *Molecules*. 14(3):1332-1341.

Knok J P, Dodge A (1985) Singlet oxygen and plants. *Phytochem*. 24(5): 889-896.

Kuete V (2010) Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Med.* 76:1–13.

Kunz L, MacRobert A J (2002) Intracellular photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) chlorin (Foscan) exhibits a complex dependence on oxygen level and fluence rate. *Photochem Photobiol.* 75(1):28-35.

Kurade NP, Jaitak V, Kaul VK, Sharma OP (2010) Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Lantana camara*, *Ageratum houstonianum* and *Eupatorium adenophorum*. *Pharm Biol.* 48(5):539-544.

Lewis K (2013) Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 12(5):371-387.

Lorenzi V, Muselli A, Bernardini FA (2009) Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram negative species. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:2209–2211.

Ma X, Zheng C, Hu C, Rahman K, Qin L (2011) The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol.* 138(2):314-332.

Magaraggia M, Faccenda F, Gandolfi A, Jori G (2006) Treatment of microbiologically polluted aquaculture waters by a novel photochemical technique of potentially low environmental impact. *J Environ Monitor.* 8:923–931.

Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies R M, Baumler W (2007) The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 104(17):7223–7228.

Martin JP, Logsdon N (1987) The role of oxygen radicals in dyemediated photodynamic effects in *Escherichia coli*. *B J Biol Chem.* 262 (15):7213–7219.

Meira M, Pereira da Silva E, David JM David JP (2012) Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Rev bras farmacogn.* 22(3):682-713.

Miyasaki Y, Rabenstein JD, Rhea J, Crouch ML, Mocek UM, Kittell PE, Morgan MA, Nichols WS, Van Benschoten MM, Hardy WD, Liu GY (2013) Isolation and characterization of antimicrobial compounds in plant extracts against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One.* 8(4):e61594.

Naidoo R, Patel M, Gulube Z, Fenyvesi I (2012) Inhibitory activity of *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* extract against *Streptococcus mutans* and its biofilm. *J Ethnopharmacol.* 144(1):171-174.

Negi P S (2012) Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology.* 156, 7–17.

Ong CY, Ling SK, Ali RM, Chee CF, Samah ZA, Ho AS, Teo SH, Lee HB (2009) Systematic analysis of in vitro photo-cytotoxic activity in extracts from terrestrial plants in Peninsula Malaysia for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol. B.* 96 (3):216-222.

Ordóñez RM, Ordóñez AA, Sayago JE, Nieva Moreno MI, Isla MI (2006) Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. *Peptides.* 27(6):1187-1191.

Pacheco AG, Silva TM, Manfrini RM, Sallum WST, Duarte LP, Piló-Veloso D, Alcântara DF, Knupp VF (2010) Chemical study and antibacterial activity of stem of *Aristolochia esperanzae* Kuntze (Aristolochiaceae). *Quím. Nova.* 33 (8): 1649-1652.

Park BS, Lee HK, Lee SE, Piao XL, Takeoka GR, Wong RY, Ahn YJ, Kim JH (2006) Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol.* 105(1-2):255-262.

Pesewu GA, Cutler RR, Humber DP (2007) Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *J Ethnopharmacol.* 116(1):102-111.

Piddock LJV (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 19:382–402.

Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T (2009) Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci.* 24(2):259-268.

Prado B, Bernal P, Contreras M, Saavedra M, del Moral A, Joyas A (1994) Numerical taxonomy of staphylococci isolated from water and beach sand from Valparaíso and viña del Mar, Chile. *Rev Latinoam Microbiol* 36(2):71-77.

Pykes K, Page M (1998) Plastid Ontogeny during Petal Development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 116:797–803.

Radulovic NS, Blagojevic PD, Stojanovic-Radic ZZ, Stojanovic NM (2013) Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Curr Med Chem.* 20:932-952.

Rios JL, Recio MC (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 100:80–84.

Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo SA, Muñoz JF (2006) Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complement Altern Med.* 17:2-6.

Roy P, Amdekar S, Kumar A, Singh R, Sharma P, Singh V (2012) In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *J Ethnopharmacol.* 140(1):186-192.

Salvat A, Antonnacci L, Fortunato RH, Suarez EY, Godoy HM (2001) Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol.* 32(5):293-297.

Salvat A, Antonacci L, Fortunato RH, Suarez EY, Godoy HM (2004) Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine.* 11(2-3):230-234.

Savoia D (2012) Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol.* 7(8), 979–990.

Schmidt C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luik S, Flores E M, Bittencourt C F, Zanetti G D, Heinzmann B M, Laufer S, Merfort I (2009) Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J Ethnopharmacol.* 122(3):523-532.

Simões M, Bennett RN, Rosa EAS (2009) *Nat Prod Rep.* 26:746–757.

Spesia MB, Rovera M, Durantini EN (2010) Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mitis* by cationic zinc(II) phthalocyanines in media with blood derivatives. *Eur J Med Chem.* 45(6):2198-2205.

Stahl W, Sies H (2012) Photoprotection by dietary carotenoids: concept, mechanisms, evidence and future development. *Mol Nutr Food Res.* 56:287-295

Talas-Oğraş T, Ipekçi Z, Bajrović K, Gözükirmizi N (2005) Antibacterial activity of seed proteins of *Robinia pseudoacacia*. *Fitoterapia.* 76(1):67-72.

Taheri-Araghi S, Ha BY (2007) Physical basis for membrane-charge selectivity of cationic antimicrobial peptides. *Phys Rev Lett.* 98:168101.

Tak-Wah W, Yin-Yi W, Hamm-Ming S, Yin-Ching C (2005) Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:895–902.

Tavares A, Carvalho CMB, Faustino MA, Neves MG, Tomé JP, Tomé AC, Cavaleiro JA, Cunha A, Gomes NCM, Alves E, Almeida A (2010) Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs*. 8:91–105.

Tegos GP, Hamblin MR (2006) Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:196–203.

Tolba O, Loughrey A, Goldsmith C, Millar BC, Rooney PJ, Moore JE (2008) Survival of epidemic strains of healthcare (HA-MRSA) and community-associated (CAMRSA) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in river-, sea- and swimming pool water. *Int J Hyg Environ Health*. 211:398–402.

Torres CA, Zampini IC, Nuñez MB, Isla MI, Castro MP, Gonzalez AM (2013) In vitro antimicrobial activity of 20 selected climber species from the Bignoniaceae family. *Nat Prod Res*. 27(22):2144-8.

Wainwright M (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother*. 42:13–28.

Yamauchi N, Akiyama Y, Kako S, Hashinaga F (1997) Chlorophyll degradation in Wasa satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit with on-tree maturation and ethylene treatment. *Sci Hortic*. 71:35–42.

Yi D, Yi N, Mavi A (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. *Braz J Med Biol Res*. 42(4):346-352.

Zhang SJ, Sun D, Hao JB, Wei YF, Yin LF, Liu X (2012) The effect of dietary soyabean isoflavones on photodynamic therapy in K562 leukemia cells. *J Photochem Photobiol B*. 110:28-33.

Zuo GY, Zhang XJ, Yang CX, Han J, Wang GC, Bian ZQ (2012) Evaluation of traditional Chinese medicinal plants for anti-MRSA activity with reference to the treatment record of infectious diseases. *Molecules*. 17(3):2955-2967.

CAPÍTULO III

=====

III FOTSENSIBILIZACIÓN DE QUERATINOCITOS INFECTADOS CON BACTERIAS

III.1 Puesta a punto de condiciones de infección de queratinocitos PAM212 con *S. aureus* y *S. epidermidis*

III.2 Determinación de fototoxicidad sobre queratinocitos y bacterias empleando *S. verbascifolium* y azul de Toluidina

III.3 Fotosensibilización de *S. epidermidis* y *S. aureus* luego de la internalización en queratinocitos

III.4 Discusión

III.5 Conclusiones

III.6 Referencias

III FOTSENSIBILIZACIÓN DE QUERATINOCITOS INFECTADOS CON BACTERIAS

Como se demostró en los capítulos anteriores, el extracto metanólico de *S. verbascifolium* flor resultó fotosensibilizante en las cepas bacterianas Gram positivas *S. epidermidis* y *S. aureus*. Por otra parte, dicho extracto no fue fotosensibilizante en la línea celular LM2 (sección I.2).

A partir de estos resultados, decidimos emplear el extracto de *S. verbascifolium* en un experimento de fotosensibilización bacteriana en células eucariotas infectadas con *S. aureus* y *S. epidermidis*. Este modelo busca emular el contexto de infección cutánea estafilocócica. Como control, empleamos el FS azul de Toluidina, que es el de elección en los ensayos estándar de TFDA.

Seleccionamos la línea de queratinocitos murinos PAM212 para llevar a cabo las determinaciones, empleándola en experimentos de internalización con *S. epidermidis* y *S. aureus* tal como se describe en la sección 5 de Materiales y Métodos.

Luego de la TFDA con irradiación a diferentes tiempos, se determinó en paralelo la viabilidad de los queratinocitos y de las bacterias internalizadas.

III.1 Puesta a punto de condiciones de infección de queratinocitos PAM212 con *S. aureus* y *S. epidermidis*

Las bacterias extracelulares se eliminaron por tratamiento con la concentración más adecuada de lisostafina. Se emplearon concentraciones empleadas de 3 – 20 µg/ml y se seleccionó la de 20 µg/ml, concentración a la cual se obtuvo la eliminación de las bacterias remanentes luego de la infección.

En cuanto a la MOI, seleccionamos 40 bacterias por queratinocito, ya que a mayores valores, los queratinocitos sufrieron pérdida de viabilidad.

III.2 Determinación de fototoxicidad sobre queratinocitos y bacterias empleando *S. verbascifolium* y azul de Toluidina

Empleando las máximas concentraciones no tóxicas en oscuridad de *S. verbascifolium* y azul de Toluidina, determinamos la fotosensibilización de queratinocitos infectados.

El extracto de *S. verbascifolium* sabemos que no es citotóxico para células eucariotas (sección I.2). En cambio, el FS azul de Toluidina, lo es tanto para bacterias como para células eucariotas (Qin et al., 2008, Kashef et al., 2012,). Por lo tanto, para este último FS escogimos una concentración tal que se obtuviera reducción de viabilidad bacteriana con una fototoxicidad mínima sobre los queratinocitos. Para ello, realizamos la TFDA sobre suspensiones bacterianas de *S. epidermidis* y *S. aureus* empleando concentraciones de azul de Toluidina en el rango 0,04 μM – 15 μM e irradiando 120 min. con el sistema de iluminación para bacterias (Figura III.1). Observamos que a partir de una concentración de 1 μM el azul de Toluidina es capaz de reducir significativamente las UFC/ml luego de la irradiación.

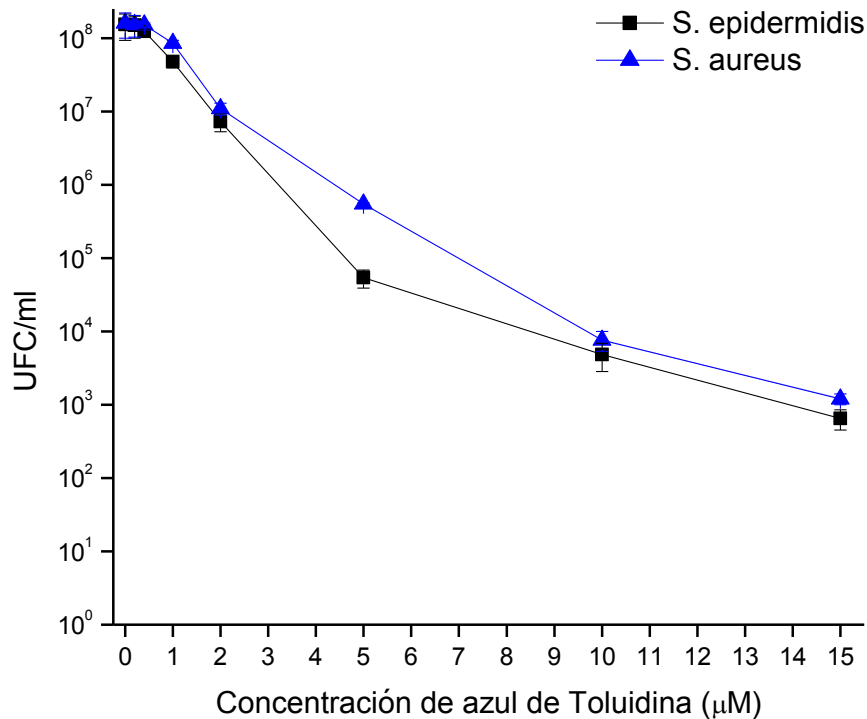


Figura III.1: Fototoxicidad de azul de Toluidina sobre *S. epidermidis* y *S. aureus* en suspensión

Las bacterias en suspensión (1×10^8 UFC/ml) se expusieron 1 h a distintas concentraciones de azul de Toluidina. Seguidamente se irradiaron durante 120 min con el sistema de iluminación para bacterias. Las UFC/ml se determinaron luego de recuento de colonias.

En experimentos paralelos, realizamos una curva de fototoxicidad sobre queratinocitos PAM212 en idénticas condiciones que las arriba descriptas (Figura III.3). En este caso, se observaron efectos fotosensibilizantes en todo el rango de concentraciones empleadas. Por lo tanto, se seleccionó la concentración de azul de Toluidina 1 μM para los experimentos de TFDA en queratinocitos infectados, ya que a pesar de que a esta concentración se registra mortalidad del 75 % de las células PAM212, es la mínima concentración posible a usar para fotosensibilizar a las bacterias, sugiriendo que el azul de Toluidina no sería un FS selectivo por las células procariotas.

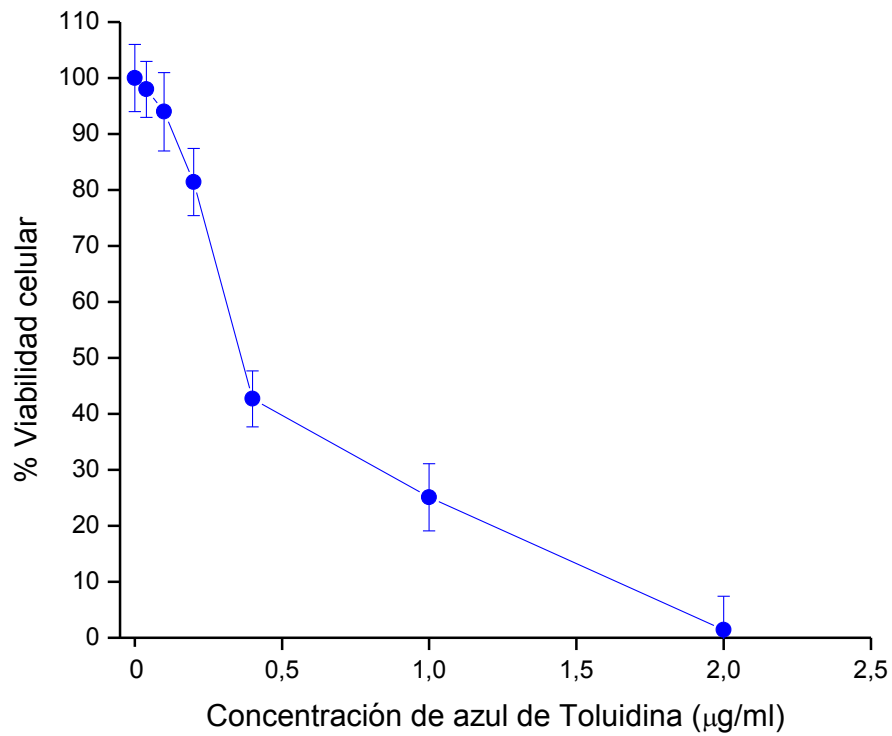


Figura III.3: Fototoxicidad de azul de Toluidina en queratinocitos PAM212

Se incubaron queratinocitos PAM212 durante 1 h con diferentes concentraciones de azul de Toluidina. Seguidamente, se irradiaron 120 min con el sistema de iluminación para bacterias. A las 4 h se llevó a cabo la determinación de viabilidad celular.

III.3 Fotosensibilización de *S. epidermidis* y *S. aureus* luego de la internalización en queratinocitos

El esquema general de infección de queratinocitos y posterior TFDA se muestra en la Figura III.4

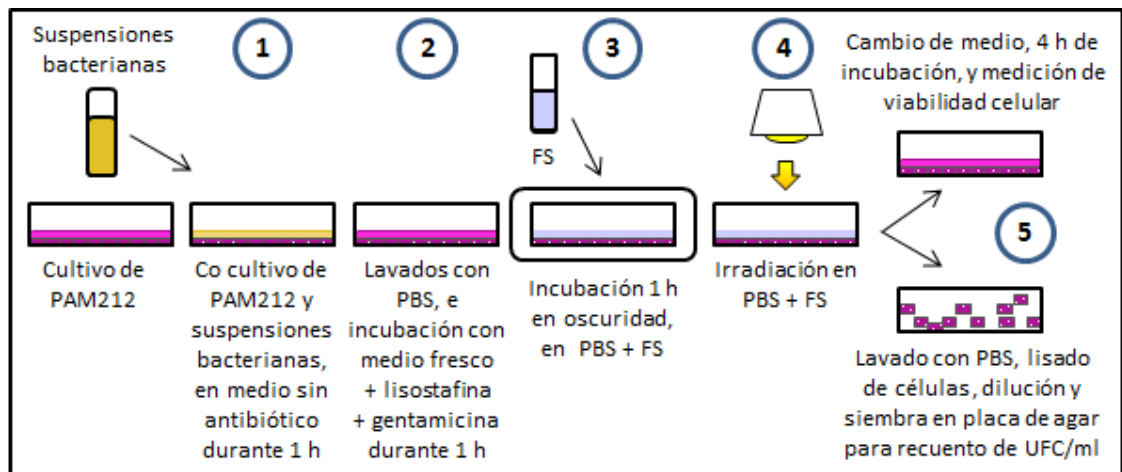


Figura II.3: Esquema experimental de los experimentos de infección y TFDA

1) Los queratinocitos PAM212 se cultivaron (5×10^4) en medio con gentamicina durante 48 h. Luego se retiró el medio y se lavaron las células con PBS, se agregó medio fresco sin antibiótico y se co-cultivaron con suspensiones bacterianas en fase exponencial de crecimiento de *S. epidermidis* o *S. aureus* durante 1 h. **2)** Se retiró el medio y se realizaron lavados con PBS, se agregó medio fresco suplementado con lisostafina 20 $\mu\text{g/ml}$ y gentamicina 100 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó durante 1 h. **3)** Se retiró el medio y se mantuvieron las células en PBS. Se agregaron los FS (extracto de *S. verbascifolium* o azul de Toluidina) y se incubó en oscuridad durante 1 h. **4)** Se realizó la irradiación en la fuente lumínica para bacterias de los cultivos de PAM212 infectados (de 30 a 120 min). **5)** Finalmente se realizaron las determinaciones de viabilidad celular y número de UFC/ml. En el primer caso se cambió el PBS por medio fresco y se incubaron las células durante 4 h en oscuridad y posteriormente se realizó el recuento luego de tinción con azul de Tripán. Para medir las UFC/ml, luego de la irradiación se lisaron las células con Tritón X-100 0,025 % en agua destilada, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de TSA. Luego de 24 h de incubación en estufa se determinó el número de UFC/ml luego de cada tratamiento

Una vez puestas a punto las condiciones de la TFDA y del sistema de infección en queratinocitos, se realizaron los experimentos para fotoinactivar de *S. epidermidis* y *S. aureus* internalizados en PAM212 empleando como FS el extracto de *S. verbascifolium* y azul de Toluidina.

En la Figura III.5.A se observó que la TFDA con *S. verbascifolium* no afectó la viabilidad de los queratinocitos infectados con *S. epidermidis* y *S. aureus*. Sólo se observa una leve citotoxicidad *per se* del extracto que induce alrededor el 15 % de reducción de viabilidad.

En cambio, la mortalidad de los queratinocitos infectados luego de TFDA-azul de Toluidina muestra una dependencia con la dosis lumínica, disminuyendo hasta un 80-85% empleando 120 min de irradiación.

Por otra parte, cuando se analizan las UFC/ml luego de la TFDA de las bacterias internalizadas se observa que *S. verbascifolium* fue capaz de fotosensibilizar tanto a *S. epidermidis* como a *S. aureus* (Figura III.5 B). El extracto fue capaz de inducir reducciones significativas en el número de UFC/ml de alrededor del 80% empleando 60 min de irradiación y mayores al 90% empleando 120 min.

Con el FS azul de Toluidina, el efecto de la TFDA fue menos marcado y no se logró aumentar la eficiencia de fotosensibilización aumentando la dosis de luz. Luego de los primeros 60 min. de irradiación, la disminución del número de colonias bacterianas fue de alrededor del 35 al 40% en ambas especies bacterianas, y no aumenta con el tiempo de iluminación.

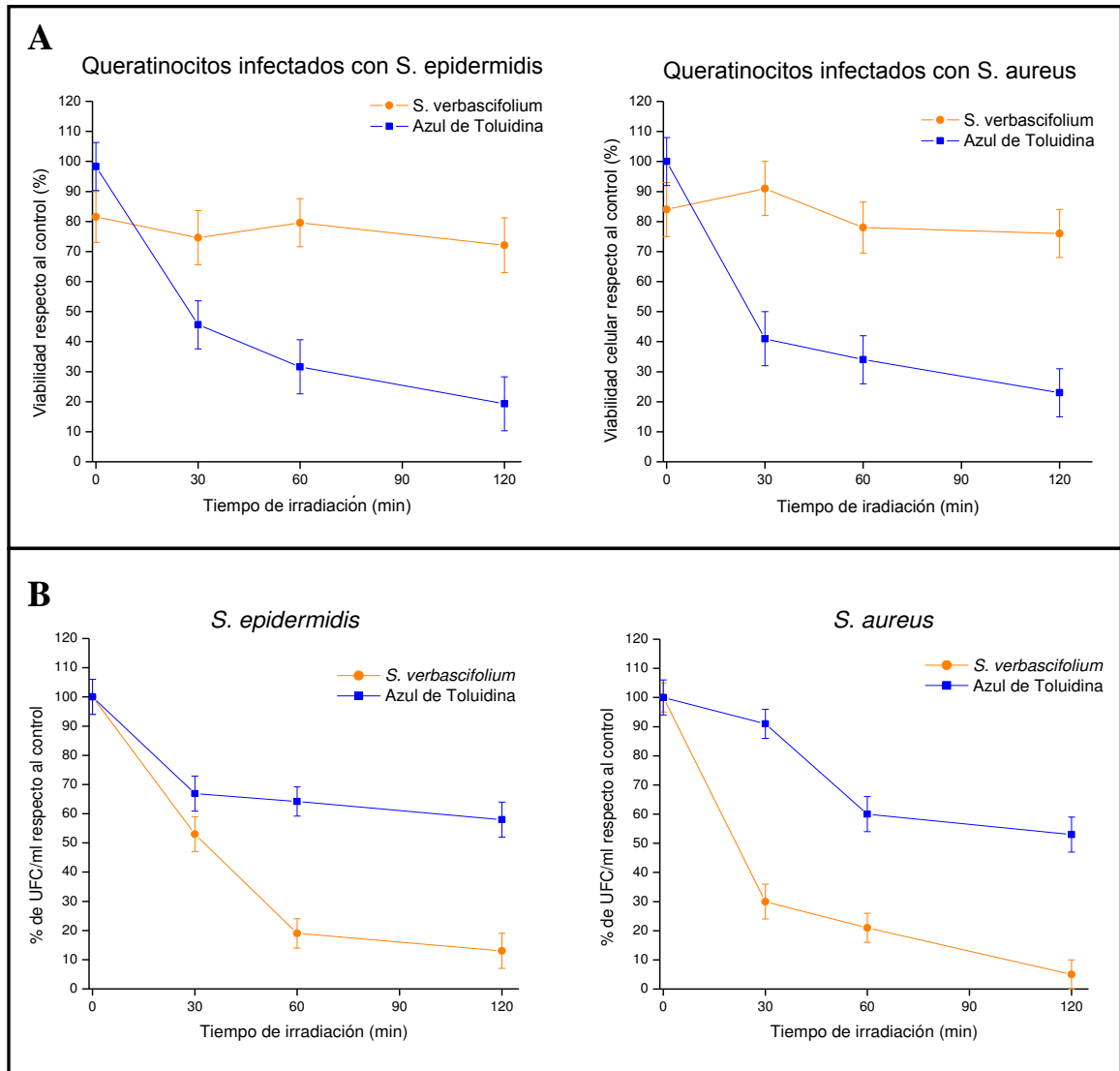


Figura III.4: TFDA de queratinocitos PAM212 infectados con *S. epidermidis* o *S. aureus*

Los queratinocitos se infectaron durante 1 h con *S. epidermidis* o *S. aureus*, empleando MOI=50. Seguidamente, se incubaron 1 h con *S. verbascifolium* 50 $\mu\text{g/ml}$ o azul de Toluidina 1 μM y se irradiaron durante distintos tiempos con el sistema iluminación de bacterias. Luego de 4 h, se determinó la viabilidad de los queratinocitos por azul de Tripán. La viabilidad bacteriana se determinó por recuento de colonias en placas de TSA luego de lisar las células una vez irradiadas. Se representa: A) % de viabilidad de los queratinocitos infectados respecto al control con FS sin luz y B) % de UFC/ml de *S. epidermidis* y *S. aureus* respecto al control con FS sin luz. Se muestra un experimento representativo de 3.

Con el objetivo de determinar la selectividad de la TFD por las células bacterianas, calculamos a partir de los resultados obtenidos, las UFC remanentes luego de la TFDA

relativizadas por queratinocito viable (Figura III.6). La TFDA con *S. verbascifolium* fue efectiva en reducir significativamente esta relación respecto a la inicial de 40 ± 6 en todo el rango de dosis de luz empleado, relación que disminuyó al aumentar la dosis lumínica. Los valores para 120 min de iluminación e infección con *S. aureus* y con *S. epidermidis* fueron de 2 ± 6 y 6 ± 6 respectivamente ($p < 0,001$ respecto al tiempo 0).

Empleando TFDA con azul de Toluidina, en cambio, el número de UFC/queratinocito viable luego de la TFDA se incrementó en forma dependiente de la dosis de luz (Figura III.6). Tanto para *S. aureus* como con *S. epidermidis* la relación fue, luego de 120 min de luz, de 115 ± 6 y 104 ± 6 respectivamente, debido a una mayor selectividad de la TFD mediada por azul de Toluidina por las células eucariotas.

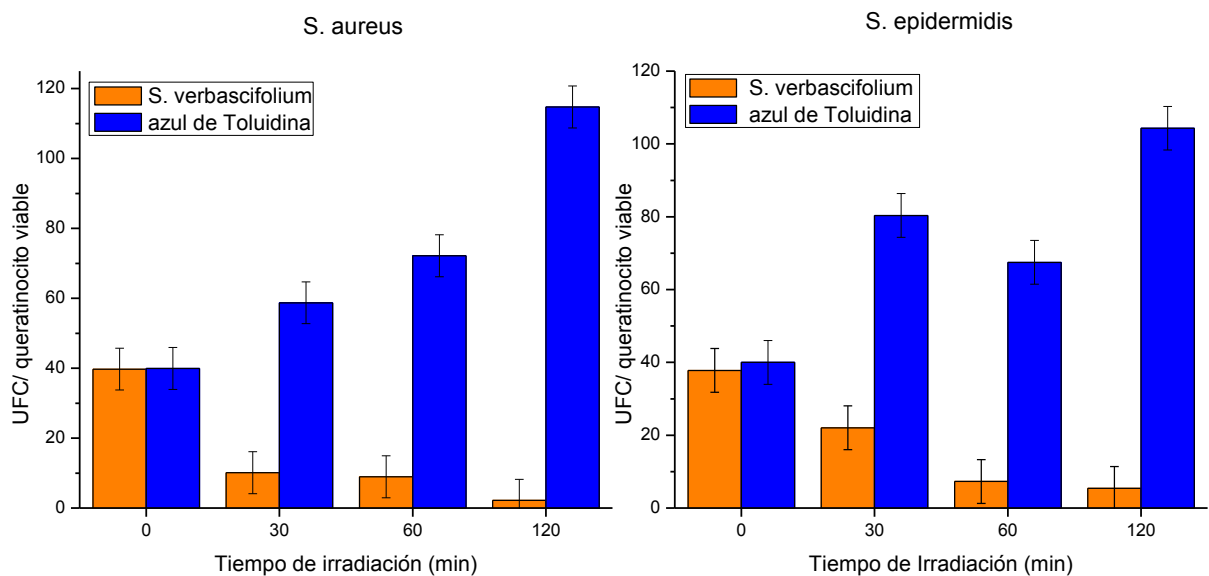


Figura III.5: Relación de UFCs/queratinocito viable luego de TFDA de PAM212 infectados Luego de la infección con *S. epidermidis* o *S. aureus* y TFDA a diferentes tiempos con *S. verbascifolium* o azul de Toluidina se calcularon las UFC/queratinocito viable, teniendo en cuenta los valores de la Figura III.4.

III.4 Discusión

Hemos desarrollado por primera vez según nuestro conocimiento, un modelo de internalización bacteriana y TFDA en queratinocitos, que permitió llevar a cabo experimentos que asemejan más realísticamente el escenario de TFDA en infecciones cutáneas. En este modelo se pretende disminuir lo máximo posible la carga de bacterias intracelulares, así como también aquellas que puedan haber quedado adheridas fuertemente a las membranas de las células eucariotas o estén siendo internalizadas, provocando un daño mínimo sobre las células eucariotas.

A partir del extracto metanólico de flor de *S. verbascifolium* y 120 minutos de irradiación con una fuente de luz blanca, lo cual equivale a una fluencia de 165 J/cm², se alcanzó una reducción significativa del número de bacterias de *S. epidermidis* y de *S. aureus* que habían infectado queratinocitos de la línea PAM212, sin fotosensibilizar dichos queratinocitos. El número de bacterias/queratinocitos viables que inicialmente era de 40 ± 6, se redujo a 5 ± 6 para *S. epidermidis*, y 2 ± 6 para *S. aureus*.

En paralelo a las determinaciones con el extracto de *S. verbascifolium*, realizamos los mismos experimentos empleando el FS azul de Toluidina, por ser el FS sintético más difundido para su uso en TFDA (Qin et al., 2008; Ruhling et al., 2010; Sperandio et al., 2013). Empleando una concentración de 1 μM e igual dosis de luz, este compuesto resultó menos eficaz que el extracto vegetal, en reducir el número de UFC/queratinocito viable. Por el contrario, esta relación se incrementó durante la irradiación, debido a una fotosensibilidad mayor de los queratinocitos, con lo cual consideramos que el extracto analizado en este capítulo posee mayor selectividad por las células bacterianas que el referente estándar empleado hasta el momento.

La fotoactividad sobre los microorganismos internalizados fue menor a la que se alcanzó en cultivos bacterianos en suspensión para ambos FS ensayados. Mientras que en ensayos de infección la reducción de las UFC fue menor de 1 orden de magnitud (90%), en bacterias en suspensión lo fue de 4 órdenes de magnitud. Estos resultados eran esperables, ya que una serie de factores estarían influyendo en la eficiencia de la TFDA en microorganismos intracelulares: i) la concentración neta de FS que alcanza a la bacteria internalizada es mucho menor que cuando se encuentra en suspensión, ii)

mecanismos propios de defensa antioxidante de las células eucariotas podrían estar actuando, iii) la disposición espacial de los patógenos dentro de los compartimientos celulares ya que estos se pueden encontrar dentro de fagosomas, iv) la penetración, acumulación y localización intracelular del FS, modulada por un equilibrio entre el transporte activo dentro y fuera de la célula v) degradación enzimática, afinidad por estructuras celulares, etc.

Se ha reportado que si un microorganismo se localiza en algún compartimento intracelular al que el FS no pueda acceder o donde su rendimiento sea ineficiente por un pH inadecuado, baja disponibilidad de O₂ o presencia de enzimas que lo degradan, la TFDA no podría llevarse a cabo satisfactoriamente (Akilov et al., 2006).

Los reportes sobre TFDA empleada en infecciones intracelulares son escasos, y hasta la actualidad, el presente es el primer trabajo donde se reporta la disminución de la carga bacteriana internalizada en queratinocitos. Existen unos pocos reportes de TFDA en infecciones de células fagocíticas profesionales, la mayoría de los cuales se trata de microorganismos intracelulares eucariotas. Uno de los pocos trabajos existentes reporta el tratamiento fotodinámico de macrófagos infectados con *Leishmania major* empleando como FS una fenotiazina. Aplicando dosis lumínicas de 10 J/cm² los parásitos disminuyen su viabilidad, aunque también los macrófagos lo hacen, y al lisarse estos, se liberan parásitos todavía viables y con la capacidad de infectar macrófagos sanos. Si bien, a primera vista estos resultados *in vitro* no indican un uso prometedor para la TFDA en este tipo de infecciones, los autores informan que cuando aplicaron la TFDA con el mismo FS en modelos *in vivo* de infecciones en ratones, el tratamiento fue eficaz en la recuperación clínica de las infecciones. Esto probablemente se debió a la estimulación de la respuesta inmune (Sah et al., 2002). Resultados similares se han obtenido *in vitro* al tratar macrófagos infectados con *Leishmania amazonensis* y una ftalocianina de aluminio clorada como FS (Dutta et al., 2005).

O’Riordan et (2006) estudiaron los efectos de la TFDA en macrófagos murinos infectados *in vitro* con *Mycobacterium bovis*, y en un modelo de infección cutánea en ratones empleando como FS una benzoporfirina. En el modelo de infección *in vitro*, la mortandad de los macrófagos fue apenas menor a la de los microorganismos empleando una fluencia de 100 J/cm². Sin embargo, los resultados de las determinaciones *in vivo*,

donde se observó la notoria reducción de las lesiones cutáneas, hizo proponer a los autores, a la TFDA como tratamiento prometedor de lesiones micobacterianas localizadas. Estos reportes confirmarían la mayor efectividad de la TFDA en sistemas *in vivo* en comparación con los estudios *in vitro*.

Por su parte, Tanaka et al. (2012) realizaron un estudio preliminar de la actividad de ocho FS sobre una cepa de *S. aureus* meticilino resistente, y neutrófilos obtenidos a partir de sangre de ratones. Las incubaciones e irradiaciones con los FS fueron llevadas a cabo por separado empleando, inclusive, dos sistemas de irradiación diferentes para los neutrófilos y las bacterias. Los FS empleados fueron: eritrosina B, rosa de Bengala, cristal violeta, Photofrin, Laserfirin, nuevo azul de Metileno, azul de Metileno y azul de Toluidina. Con la excepción de los dos últimos, la TFDA con el resto de los FS indujo la reducción de la viabilidad de los neutrófilos en más del 90% con fluencias de 50 J/cm². Azul de metileno y azul de Toluidina indujeron el 50 y 40 % de reducción de la viabilidad de los neutrófilos, bajo las mismas condiciones de fluencia. Las concentraciones de cada FS habían sido puestas a punto previamente en experimentos de TFDA con cultivos en suspensión de *S. aureus* donde obtuvieron reducciones en el número de UFC/ml con todos los FS. La concentración de azul de Toluidina seleccionada por estos autores fue de 20 µM. En este trabajo, los autores proponen condiciones de baja fluencia (20 J/cm²) para llevar a cabo la eliminación selectiva de los microorganismos, ya que bajo estas condiciones la mortandad de los neutrófilos es menor que a dosis lumínicas superiores, y la reducción de la viabilidad de *S. aureus* se mantiene constante.

Las concentraciones de azul de Toluidina empleadas en la literatura para ensayos de TFDA son ciertamente variables, así como también lo es la susceptibilidad de cultivos celulares eucariotas al tratamiento fotodinámico mediado por esta fenotiazina. Tremblay et al. (2002) emplean concentraciones del mismo de 0,6 mM y fluencias de 11 J/cm² y encuentran una toxicidad en linfocitos T Jurkat del 97%, resultado que se acerca más al grado de fototoxicidad encontrado por nosotros en las células PAM212.

Otros autores han aportado resultados de fototoxicidad de diferentes FS sobre líneas celulares y cultivos microbianos pero en ensayos paralelos, sin internalización. Empleando azul de Toluidina 40 µM, Kashef et al. (2012) reportaron que a una fluencia

de 164 J/cm^2 , se reduce la viabilidad de fibroblastos humanos en un 40 %, mientras que las UFC de *S. aureus* metilciclino resistentes y de *E. coli* disminuyen en un 99,91 % y 83,2% respectivamente. Esta “selectividad” también es observada empleando azul de Metileno.

Rodrigues et al. (2013) reportaron la fotosensibilización de *Candida* y fibroblastos murinos, empleando diferentes FS derivados de fenotiazinas (entre ellos azul de Toluidina y azul de Metileno). Con fluencias de 25 J/cm^2 , la susceptibilidad de los microorganismos fue similar a la de los fibroblastos.

Zeina et al. (2002) informaron que bajo las mismas condiciones que consiguen eliminar microorganismos habitualmente presentes en la piel (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes* y *Candida albicans*), la tasa de mortalidad de queratinocitos humanos H103 es en promedio 100 veces menor. El FS empleado en este estudio fue azul de Metileno y las dosis de luz fueron de hasta 452 J/cm^2 .

Cabe destacar que los patógenos que prosperan en el interior de las células, o simplemente se refugian transitoriamente en ellas, están protegidos de muchos de los mecanismos de defensa, humorales y celulares del organismo, lo cual promueve la selección de mutantes resistentes. Estas consideraciones ponen en relieve la importancia de enfoques terapéuticos alternativos, entre los que el potencial de la TFDA se reconoce cada vez más (Akilov et al., 2006).

III.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos en la aplicación de TFDA con extracto de *S. verbasifolium* en la eliminación de *S. epidermidis* y *S. aureus* infectando queratinocitos, nos llevan a pensar que el/los compuesto/s activo/s del extracto poseen potencial en la eliminación selectiva de microorganismos patógenos, con mayor selectividad por los mismos que el FS referente actual, azul de Toluidina. Esto nos alienta a continuar nuestra investigación con miras a el aislamiento del/los componentes fotoactivos de esta planta, y de proyectar la ejecución de experimentos *in vivo*.

III.5 Referencias

Akilov OE, O’Riordan K, Kosaka S, Hasan T (2006) Photodynamic therapy against intracellular pathogens: Problems and potentials. *Medical Laser Application*. 21:251–260.

Dutta S, Ray D, Kolli BK, Chang KP (2005) Photodynamic sensitization of *Leishmaniaamazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(11):4474-4484.

Kashef N, Ravaei Sharif Abadi G, Djavid GE (2012) Photodynamic inactivation of primary human fibroblasts by methylene blue and toluidine blue O. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 9(4):355-358.

O’Riordan K, Sharlin DS, Gross J, Chang S, Errabelli D, Akilov OE, Kosaka S, Nau GJ, Hasan T (2006) Photoinactivation of Mycobacteria in vitro and in a new murine model of localized *Mycobacterium bovis* BCG-induced granulomatous infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 50(5):1828-1834.

Qin Y, Luan X, Bi L, He G, Bai X, Zhou C, Zhang Z (2008) Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med Sci*. 23(1):49-54.

Rodrigues GB, Dias-Baruffi M, Holman N, Wainwright M, Braga GU (2013) In vitro photodynamic inactivation of *Candida* species and mouse fibroblasts with phenothiazinium photosensitisers and red light. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 10(2):141-149.

Rühling A, Fanghänel J, Houshmand M, Kuhr A, Meisel P, Schwahn C, Kocher T (2010) Photodynamic therapy of persistent pockets in maintenance patients—a clinical study. *Clin Oral Investig*. 14(6):637-644.

Sah JF, Ito H, Kolli BK, Peterson DA, Sassa S, Chang KP (2002) Genetic rescue of *Leishmania* deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of

cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. *J Biol Chem.* 277(17):14902-14909.

Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR (2013) Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 8(2):108-120.

Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Hirayama T, Dai T, Huang L, Hamblin MR, Morimoto Y (2012) Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. *Photochem Photobiol.* 88(1):227-232.

Tremblay JF, Dussault S, Viau G, Gad F, Boushira M, Bissonnette R (2002) Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction. *Photochem Photobiol Sci.* 1(11):852-856.

Zeina B, Greenman J, Corry D, Purcell WM (2002) Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol.* 146(4):568-573.

CAPÍTULO IV

IV. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES CON ACTIVIDAD FOSENSIBILIZANTE

IV.1 Detección de extractos potencialmente fotosensibilizantes por la metodología de cuantificación de especies oxidantes totales

IV.2 Detección de oxígeno singlete a partir de extractos vegetales FS irradiados

IV.2.1 Detección de oxígeno singlete por el método de oxidación del triptofano

IV.2.2 Detección de oxígeno singlete por un marcador específico fluorescente

IV.1.3 Disminución de la producción de $^1\text{O}_2$ por el extracto de *C. argentina*

IV.4 Discusión

IV.5 Conclusiones

IV.6 Referencias

IV. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES CON ACTIVIDAD FOSENSIBILIZANTE

En el presente capítulo, se intentó elaborar una metodología para detectar fácilmente la producción de ROS, en especial $^1\text{O}_2$, a partir la irradiación directa de extractos vegetales con luz visible, fuera del contexto celular. Una metodología de este tipo permitiría facilitar el “screening” de los mismos en busca de fotoactividad tanto en células eucariotas como en bacterias. Con este objetivo se testaron 3 posibles métodos *in vitro* de detección de especies reactivas del oxígeno. Uno de ellos consistió en la detección de especies oxidantes totales en un extracto luego de ser irradiado, método que fue adaptado de la literatura para detectar oxidación en soluciones acuosas (Erel et al, 2005).

Los otros dos métodos, se basaron en la detección de $^1\text{O}_2$. En el primero, se adaptó una determinación mediada por la oxidación del triptofano descrita previamente (Cañete et al., 1990), mientras que en el segundo se empleó una sonda específica comercial diseñada para detección fluorométrica de $^1\text{O}_2$ en solución.

IV.1 Detección de extractos potencialmente fotosensibilizantes por la metodología de cuantificación de especies oxidantes totales

Se realizaron determinaciones *in vitro* para determinar la producción de especies oxidantes a partir de la irradiación de los extractos que mostraron fototoxicidad tanto en células como en bacterias. Para ello, se utilizó un ensayo previamente descrito, basado en la oxidación del ión ferroso en medio ácido como método de determinación del estado oxidante total de una solución acuosa (Erel et al., 2005). Los extractos seleccionados fueron *C. fruticosum* hoja, *S. buxifolia* hoja, *S. verbascifolium* flor, *T. Stans* flor y *C. verticillata* raíz. Como control de FS conocidos, se emplearon azul de Toluidina y Clorina e6 y como control negativo, el extracto de flor de *I. bonariensis*, que no presentó fototoxicidad en ningún sistema. Se aplicó la metodología a los extractos antes y después de ser irradiados de manera de tener en cuenta la producción de especies oxidantes en oscuridad de cada especie (Figura IV.1).

Se observó que los diferentes extractos fotoactivos fueron capaces de producir especies oxidantes luego de ser irradiados, y el nivel de estas especies aumentó significativamente respecto del nivel basal en oscuridad en las muestras con fotoactividad. El extracto de *I. bonariensis* y al igual que el control con PBS no mostraron diferencias significativas en los valores obtenidos antes y después de la irradiación. Calculamos la relación $Abs_{Irradiado}/Abs_{Oscuridad}$ para cada caso, con el fin de relativizar los valores al basal de cada FS.

Se observó que los extractos de *S. verbascifolium* y de *C. fruticosum* fueron los más efectivos en la generación de especies oxidantes y *S. buxifolia* el menos efectivo. Sin embargo, los cinco extractos fotoactivos estuvieron dentro del rango de producción de especies oxidantes de los FS Clorina e6 y azul de Toluidina.

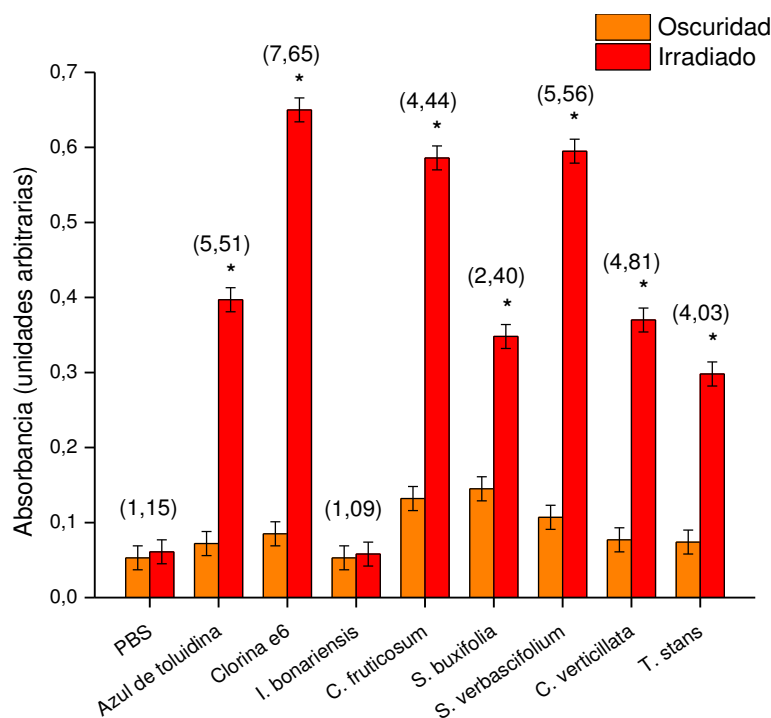


Figura IV.1: Determinación de estado oxidativo total en extractos fotosensibilizantes luego de ser irradiados

Se determinó el estado oxidante antes y después de 40 min de irradiación (en el sistema de iluminación de bacterias descrito en Materiales y Métodos 4.5), de los extractos metanólicos de hoja de *C. fruticosum* 10 µg/ml y *S. buxifolia* 100 µg/ml, los de flor de *S. verbascifolium* 500 µg/ml, *T. stans* 500 µg/ml, *I. bonariensis* 500 µg/ml y de raíz de *C. verticillata* 500 µg/ml. Se utilizaron los FS sintéticos azul de Toluidina (100 µM) y Clorina e6 (10 µM). Entre paréntesis figura la relación entre la absorbancia de la muestra luego y antes de la irradiación. Se grafica la absorbancia a 560 nm. * $p < 0,05$ respecto al extracto en oscuridad.

IV.2 Detección de oxígeno singlete a partir de extractos vegetales FS irradiados

IV.2.1 Detección de oxígeno singlete por el método de oxidación del triptofano

Como ya se mencionó en la Introducción, el oxígeno singlete es una de las principales especies reactivas implicadas tanto en el tratamiento fotodinámico de células y bacterias mediante el mecanismo fotoquímico de tipo II. Es por ello que realizamos determinaciones de producción de $^1\text{O}_2$ *in vitro* a partir de los extractos fotoactivos irradiados.

Se probó un método basado en la oxidación del triptofano por $^1\text{O}_2$ (Cañete et al., 1990), y su consecuente degradación. Se siguió la reacción a través de la emisión de fluorescencia del triptofano. Pudimos detectar un decaimiento de fluorescencia emitida por el triptofano luego de la irradiación de los FS azul de Toluidina y Clorina e6 (2 y 10% de la fluorescencia inicial, respectivamente). Sin embargo, no se logró detectar oxidación del triptofano luego de la irradiación de los extractos vegetales empleados (Figura IV.2).

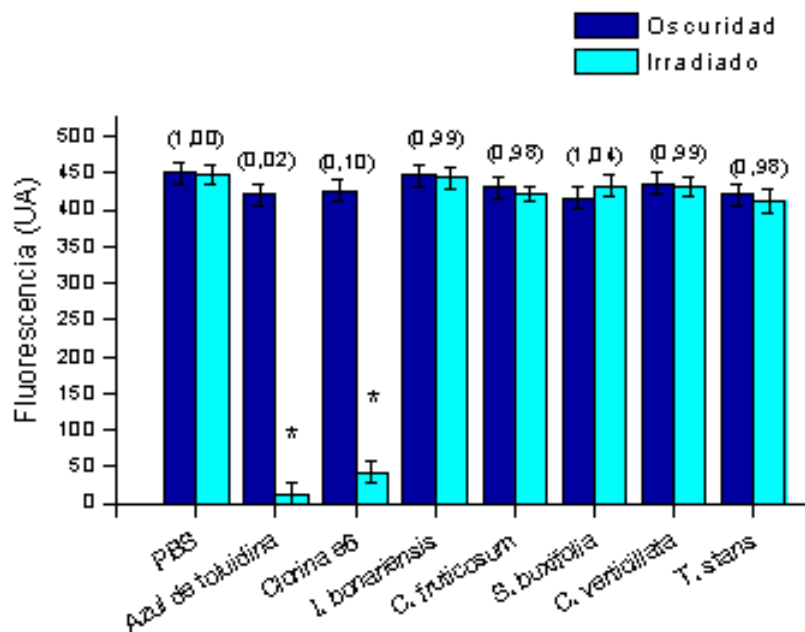


Figura IV.2: Decaimiento de fluorescencia del triptofano luego de la irradiación de los extractos fotosensibilizantes

Se determinó la producción de $^1\text{O}_2$ antes y después de 40 min de irradiación (en el sistema de iluminación de bacterias descrito en Materiales y Métodos 4.5) de los extractos metanólicos de hoja de *C. fruticosum* 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y *S. buxifolia* 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, los de flor de *S. verbascifolium* 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *T. stans* 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *I. bonariensis* 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y de raíz de *C. verticillata* 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se utilizaron los FS sintéticos azul de Toluidina (100 μM) y Clorina e6 (10 μM). Entre paréntesis figura la relación entre la fluorescencia de la muestra luego y antes de la irradiación. Se grafica fluorescencia como unidades arbitrarias (UA). * $p < 0,05$ respecto al control en oscuridad.

IV.2.2 Detección de oxígeno singlete por un marcador específico fluorescente

Mediante la técnica descrita anteriormente, no logramos detectar la producción de $^1\text{O}_2$ a partir de los extractos, probablemente debido a la baja sensibilidad del método, por lo que decidimos adaptar un método de mayor sensibilidad, empleando una sonda fluorescente comercial que fue diseñada para la detección de $^1\text{O}_2$ extracelular.

Se utilizó la sonda molecular fluorescente específica “Singlet Oxygen Sensor Green” de Invitrogen (Eugene, Oregon, USA). Mediante este método se corroboró la producción de $^1\text{O}_2$ a partir de azul de Toluidina y Clorina e6, y se pudo detectar además, la producción de la misma especie reactiva de oxígeno a partir de los extractos de *S.*

verbascifolium, *C. verticillata* y *C. fruticosum*. No se registró producción de $^1\text{O}_2$ a partir de los extractos de *T. stans* ni de *S. buxifolia* ni tampoco del control negativo *I. bonariensis* (Figura IV.3).

La producción de $^1\text{O}_2$ en el caso de los FS puros es mucho mayor en términos absolutos que la de los extractos. Además, las cinéticas de producción de $^1\text{O}_2$ son diferentes. En el caso de azul de Toluidina y Clorina e6 se detecta una rápida producción de $^1\text{O}_2$ durante los primeros veinte minutos de irradiación (siendo significativamente superior al control en oscuridad desde los primeros 2 minutos de irradiación), seguida de un plateau en los últimos minutos. Empleando extractos vegetales, por el contrario, la producción de $^1\text{O}_2$ durante los primeros minutos de irradiación es lineal y luego comienza a incrementarse exponencialmente hacia el final de la irradiación, siendo significativamente superior al control en oscuridad, recién a los 30 minutos de irradiación.

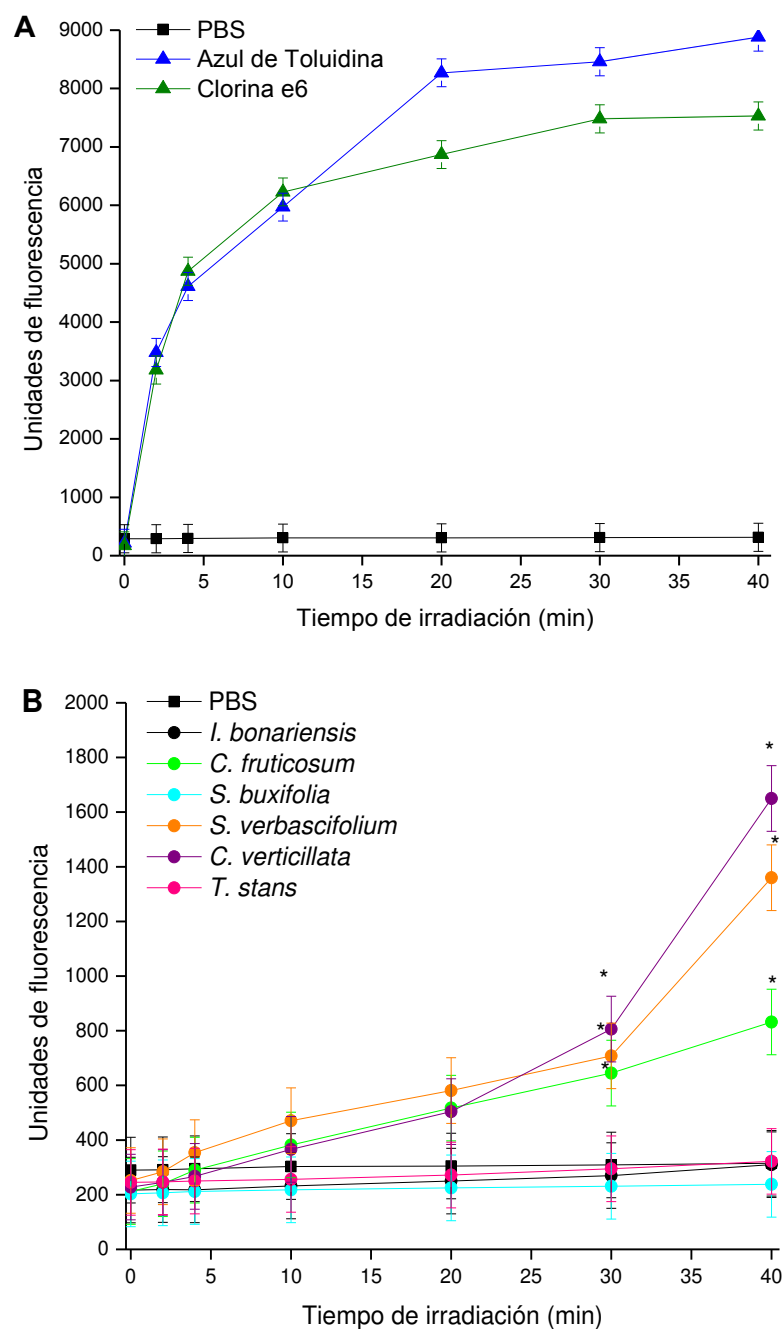


Figura IV.3: Producción de $^1\text{O}_2$ a partir de FS irradiados empleando un marcador fluorescente específico

Se determinó el aumento de la fluorescencia del marcador de $^1\text{O}_2$ luego de diferentes tiempos de irradiación (en el sistema de iluminación de bacterias descrito en Materiales y Métodos 4.5) de soluciones de los extractos metanólicos de hoja de *C. fruticosum* 10 $\mu\text{g/ml}$ y *S. buxifolia* 100 $\mu\text{g/ml}$, los de flor de *S. verbascifolium* 500 $\mu\text{g/ml}$, *T. stans* 500 $\mu\text{g/ml}$, *I. bonariensis* 500 $\mu\text{g/ml}$ y de raíz *C. verticillata* 500 $\mu\text{g/ml}$. Se utilizaron los FS sintéticos azul de Toluidina (100 μM) y Clorina e6 (10 μM). * $p < 0,05$ respecto al tiempo 0 de irradiación.

IV.1.3 Disminución de la producción de $^1\text{O}_2$ por el extracto de *C. argentina*

Complementamos las determinaciones de $^1\text{O}_2$ con mediciones donde se incubó junto con el extracto fotoactivo o el FS control, el extracto metanólico de hoja de *C. argentina* que mostró propiedades fotoprotectoras en el Capítulo I.3. Los extractos elegidos para el ensayo fueron aquéllos a partir de los cuales detectamos producción de $^1\text{O}_2$ por el método del marcador fluorescente específico: *S. verbascifolium*, *C. verticillata* y *C. fruticosum*, además de los FS azul de Toluidina y Clorina e6 (Figura IV.4).

Durante los primeros minutos de irradiación en presencia de azul de Toluidina y Clorina e6, no se detectaron cambios por el agregado de *C. argentina*. Sin embargo entre los 5 y 10 minutos de irradiación se detectó una disminución significativa en la producción de $^1\text{O}_2$. Si bien se produjo $^1\text{O}_2$ durante todo el tiempo de irradiación, el *plateau* alcanzado es más bajo en presencia de *C. argentina*, tanto para azul de Toluidina como Clorina e6.

De manera similar, al agregar *C. argentina* a las soluciones con los extractos de *S. verbascifolium* y *C. verticillata* se observó una disminución en los niveles de producción de $^1\text{O}_2$. Este patrón no se observó con el extracto de *C. fruticosum*, donde el agregado de *C. argentina* produce un descenso leve en la producción de la especie, pero las diferencias no son significativas.

En los controles donde el secuestrante de $^1\text{O}_2$, NaN_3 , estuvo presente durante la irradiación de los FS, no se detectó producción de $^1\text{O}_2$, induciendo una inhibición total (resultados no graficados).

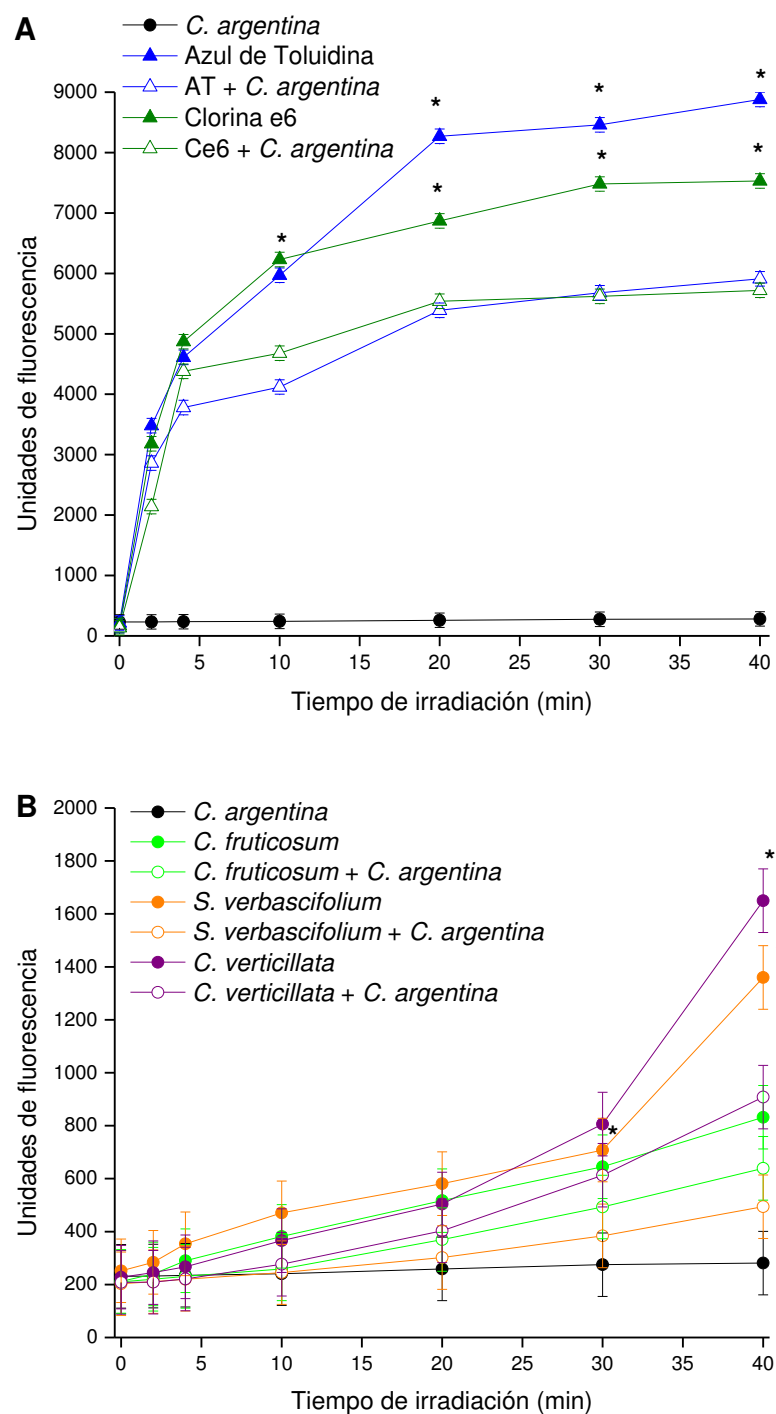


Figura IV.4: Inhibición de la producción de $^1\text{O}_2$ por *C. argentina*

La producción de $^1\text{O}_2$ se determinó por el método de sonda fluorescente. La irradiación de los FS (A) y extractos (B) en las concentraciones empleadas en la Figura IV.3 se irradiaron distintos tiempos (en el sistema de iluminación de bacterias descrito en Materiales y Métodos 4.5) en presencia de del extracto metanólico de hoja de *C. argentina* (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ce6: Clorina e6. * $p < 0,05$ respecto al FS sin irradiar.

IV.4 Discusión

Los 5 extractos que mostraron actividad fotosensibilizante, ya sea en células o en bacterias, indujeron el aumento de las especies oxidantes totales luego de ser irradiados. De igual forma ocurrió con los FS azul de Toluidina y Clorina e6, siendo estos dos últimos compuestos, los más fotoactivos.

Dentro de los FS naturales, los extractos de *S. verbascifolium* y de *C. fruticosum* fueron los que más especies oxidantes generaron, y es de destacar que estos fueron los FS más efectivos para el tratamiento fotodinámico de bacterias y células respectivamente.

El extracto de *S. buxifolia* hoja tuvo menor eficiencia en la producción de dichas especies, pues si bien las especies oxidantes totales generadas fueron similares a las de los extractos de *C. verticillata* hoja y *T. stans* flor, el nivel basal en oscuridad para este extracto fue mayor en ellos. Es de importancia señalar que dicho nivel basal en oscuridad de producción de especies oxidantes, fue similar al del extracto de *C. fruticosum*, extracto FS también proveniente de hoja, remarcando los altos niveles oxidantes inducidos *per se* en las hojas de las plantas.

Por otra parte, el método de determinación de $^1\text{O}_2$ por oxidación del triptofano no resultó lo suficientemente sensible para detectar la especie reactiva producida por los extractos, pero sí por los dos FS sintéticos. En cambio, el método de detección por sonda fluorescente específica para $^1\text{O}_2$ resultó muy sensible y adecuado para la determinación de esta especie a partir de muestras vegetales.

Mediante este último método, la producción de $^1\text{O}_2$ a partir de los extractos de *C. verticillata*, *S. verbascifolium* y *C. fruticosum* comenzó a detectarse significativamente a partir de los veinte minutos de irradiación. En cambio, los extractos de *S. buxifolia* y *T. stans*, no mostraron producción de $^1\text{O}_2$ bajo las mismas condiciones. Esto indicaría o bien una menor producción indetectable de oxígeno singlete, o bien la contribución de otras especies oxidantes diferentes al $^1\text{O}_2$, como responsables del aumento de especies oxidantes luego de la irradiación en estos dos extractos.

Los FS sintéticos azul de Toluidina y Clorina e6 produjeron niveles de $^1\text{O}_2$ mucho mayores a los producidos por los extractos en ambas metodologías desarrolladas.

Por otra parte, el extracto de *C. argentina* resultó efectivo en la disminución de la producción de $^1\text{O}_2$ durante la irradiación de azul de Toluidina, Clorina e6, *C. verticillata* y *S. verbascifolium*. Estos resultados, estarían indicando que su modo de acción en la fotoprotección durante la TFD sería mediante la disminución de los niveles de $^1\text{O}_2$ producidos durante la irradiación.

El $^1\text{O}_2$, puede ser determinado por varios métodos directos o indirectos, ya sea mediante el uso de sondas -moléculas reporteras o “quenchers”-, por cuantificación de la luminiscencia emitida, o por resonancia de espín electrónico (Bäumler et al., 2012).

El método directo más empleado es la determinación de la luminiscencia (emisión a 1270 nm) del $^1\text{O}_2$, cuya principal desventaja consiste en el bajo rendimiento cuántico con la consecuente baja sensibilidad. Este método además, presenta dificultades para la medición de $^1\text{O}_2$ en cultivos celulares o en sistemas *in vivo*, comparado con medición en soluciones, el tiempo de vida corto del $^1\text{O}_2$ y la difusión del oxígeno.

Los métodos de detección indirectos aprovechan la alta reactividad del $^1\text{O}_2$ e implican la detección de productos generados o degradados a partir de reacciones con esta especie, mediante ensayos de quimioluminiscencia o blanqueo. Estos métodos son de utilidad en sistemas *in vitro*, donde la desventaja de estas técnicas radica en la limitada penetración de estas moléculas a la concentración necesaria dentro de células o tejidos, o su potencial toxicidad (Bäumler et al., 2012).

La luminiscencia del $^1\text{O}_2$ es extremadamente débil y puede haber interferencias en su medición debido a autofluorescencia, y en el particular durante la medición de $^1\text{O}_2$ en TFD, por la luz incidente de la terapia. El equipamiento para sobrellevar estas dificultades es complejo y costoso. Sin embargo al emplear sondas capaces de reaccionar con el $^1\text{O}_2$ y con tiempos de vida media de fluorescencia más largos, la medición de esta especie reactiva se facilita y vuelve accesible para el estudio durante la TFD. Adaptando aparatos de medición de fluorescencia, algunos autores han

conseguido seguir la producción de $^1\text{O}_2$ *in vivo* en piel de ratones sometidos a TFD con Protoporfirina IX como FS (Wei et al., 2008).

Una de las moléculas tradicionalmente más utilizadas para la detección de ROS es la dicloro-dihidrofluoresceína. Este compuesto reacciona con un amplio rango de ROS y no es completamente fotoestable, por lo que su empleo en TFD se ve dificultado. Se han reportado nuevos compuestos que reaccionan de forma más específica con las diferentes ROS, uno de los cuales es el reportado en nuestro trabajo, y mediante el cual pudimos seguir la específicamente la producción de $^1\text{O}_2$ en soluciones irradiadas.

Esta sonda empleada en la detección del $^1\text{O}_2$ en soluciones de nuestros extractos, ha sido empleada por otros autores en la detección de $^1\text{O}_2$ en sistemas de liposomas, diatomeas y hasta en hojas de *Arabidopsis*, para estudiar la producción de $^1\text{O}_2$ a lo largo del tiempo, durante diferentes tratamientos donde se indujo diferentes tipos de estrés sobre las mismas (Flors et al., 2006).

Otros autores, en cambio han estudiado sistemas de FS en solución similares al nuestro. Empleando azul de Toluidina y otras fenotiazinas, la detección del $^1\text{O}_2$ gracias a técnicas basadas en sondas fluorescentes, les permitió caracterizar fotoquímicamente estos compuestos (Ronzani et al., 2013).

También hay autores que han empleado este tipo de sondas en el estudio de un extracto vegetal FS, el extracto de *Alternanthera brasiliana*, empleado en TFDA de diferentes especies de estafilococos y en *Candida dubliniensis*. Utilizando una sonda fluorescente que se fotodegrada luego de reaccionar con el $^1\text{O}_2$ generado por el extracto, consiguieron seguir la actividad del extracto en solución y caracterizar la respuesta del mismo mientras era irradiado (Andreazza et al., 2013).

IV.5 Conclusiones

Los resultados desarrollados al trabajar con diferentes métodos para detectar *in vitro* la producción de especies oxidantes totales y oxígeno singlete a partir de la irradiación de los diferentes fotosensibilizantes empleados, indican que se produce de oxígeno singlete al irradiar los extractos de *C. verticillata*, *S. verbascifolium* y *C. fruticosum*, aunque en

menor medida que en los FS controles azul de Toluidina y Clorina e6. La irradiación de los extractos de *S. buxifolia* y *T. stans*, probablemente implicaría la generación de especies oxidativas alternativas al oxígeno singlete para ejercer el efecto fotodinámico observado en células y bacterias, respectivamente.

Nuestros resultados sugieren que por ser aquél que permite detectar un mayor número de especies reactivas de oxígeno, el método de determinación de oxidantes totales sería el más adecuado para un “screening” de FS a partir de extractos vegetales, aunque cuenta con la desventaja de partir de diferentes estados de oxidación propios de cada planta. Por otro lado, si en el “screening” apuntamos a un mayor rendimiento de oxígeno singlete, que es la especie que se considera más importante en el proceso de fotosensibilización, el método de sonda fluorescente específica sería el más adecuado.

IV.6 Referencias

Andreazza NL, de Lourenco CC, Siqueira CA, Sawaya AC, Lapinski TF, Gasparetto A, Khouri S, Zamuner SR, Munin E, Salvador MJ (2013) Photodynamic inactivation of yeast and bacteria by extracts of *alternantherabrasiliana*. *Curr Drug Targets*. 14(9):1015-1022.

Bäumler W, Regensburger J, Knak A, Felgenträger A, Maisch T (2012) UVA and endogenous photosensitizers--the detection of singlet oxygen by its luminescence. *PhotochemPhotobiol Sci*. 11(1):107-117.

Cañete M, Villanueva A (1990) Photodynamic properties of toluidine blue characterized by fluorescence and absorption spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* Vol. 46A, No. 8, pp. 1265-1267.

Erel O (2005) A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 38(12):1103-1111.

Flors C, Fryer MJ, Waring J, Reeder B, Bechtold U, Mullineaux PM, Nonell S, Wilson MT, Baker NR (2006) Imaging the production of singlet oxygen *in vivo* using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green. *J Exp Bot*. 57(8):1725-1734.

Ronzani F, Trivella A, Arzoumanian E, Blanc S, Sarakha M, Richard C, Oliveros E, Lacombe S (2013) Comparison of the photophysical properties of three phenothiazine derivatives: transient detection and singlet oxygen production. *Photochem Photobiol Sci*. 12(12):2160-2169.

Wei Y, Xing D, Luo S, Xu W, Chen Q (2008) Monitoring singlet oxygen in situ with delayed chemiluminescence to deduce the effect of photodynamic therapy. *J Biomed Opt*. 13(2):024023.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

Se generó una colección de 113 extractos metanólicos y acuosos de 64 especies vegetales de nuestro país, con los que se realizaron estudios sistemáticos empleando la línea celular tumoral murina, LM2, y una especie bacteriana Gram positiva, *S. epidermidis*, con el fin de encontrar compuestos con actividad citotóxica, bactericida y/o fototóxica sobre células o microorganismos. Posteriormente se estudiaron en profundidad aquellos extractos que mostraron alguna de las actividades mencionadas.

Trece de las especies estudiadas mostraron actividad citotóxica en oscuridad sobre líneas tumorales y no tumorales. Si bien en general, no se observó selectividad *in vitro* por las líneas tumorales, uno de los extractos, *I. cairica*, mostró cierta toxicidad diferencial en las líneas tumorales.

Las bajas concentraciones citotóxicas y los efectos de los extractos sobre el citoesqueleto, ciclo celular y capacidad migratoria de las células LM2, sugieren que el/los principio/s activo/s presentes en estas especies, resultan interesantes puntos de partida en el estudio de nuevos compuestos con actividad antitumoral.

Todos los extractos metanólicos foliáceos presentaron actividad fotosensibilizante en células, sin embargo dos de ellos, *C. fruticosum* y *S. buxifolia*, tuvieron actividad marcadamente superior al resto. Se destaca además la selectividad por las líneas tumorales de estos extractos. Analizando su composición, resulta probable que los compuestos fotosensibilizantes sean compuestos tetrapirrólicos vinculados al metabolismo de la clorofila. Por otra parte, se encontraron dos extractos de flor, de *C. argentina* y *M. unguis-cati*, que también resultaron fotosensibilizantes sobre células. Estos compuestos sin embargo, fueron significativamente menos fototóxicos que los de hoja, debido probablemente a una baja concentración del compuesto fotoactivo.

También se encontró que un extracto metanólico de hoja, perteneciente a la especie *C. argentina*, resultó protector frente al fotodaño inducido por la TFD. Se pudo corroborar que este extracto redujo los niveles de oxígeno singlete generado por diferentes fotosensibilizantes durante la irradiación.

En cuanto a la actividad antimicrobiana en oscuridad de los extractos, encontramos siete de ellos con capacidad bactericida leve frente a las bacterias Gram positivas con las que trabajamos, mientras que las Gram negativas fueron resistentes a estos efectos.

Encontramos que tres extractos de flor: *S. verbascifolium*, *T. stans* y *C. verticillata*, son buenos fotosensibilizantes sobre especies bacterianas Gram positivas creciendo en suspensión, pero no sobre Gram negativas.

Se comprobó la rápida unión del extracto de *S. verbascifolium* a las bacterias *S. epidermidis*, y la generación de oxígeno singlete a partir de su iluminación. Empleando este extracto pudimos eliminar bacterias creciendo en medio sólido. Cabe señalar que se probó la actividad de *S. verbascifolium* como fotosensibilizante en TFDA empleando luz solar y en estas condiciones nuestro extracto fue más efectivo en la eliminación de *S. epidermidis*, que el fotosensibilizante sintético de referencia azul de Toluidina. Los extractos de hoja de *C. fruticosum* y *S. buxifolia*, de alta fototoxicidad en células, mostraron leve fototoxicidad bajo la iluminación solar cuando se los comparó con el extracto floral de *S. verbascifolium*.

Los extractos capaces de fotosensibilizar bacterias no resultaron activos sobre células, lo cual permitió el empleo de *S. verbascifolium* flor, en la eliminación fotodinámica selectiva de bacterias Gram positivas infectando queratinocitos PAM212. Mientras que con este extracto se consiguió reducir el número de UFC/ml luego de la irradiación, la viabilidad de los queratinocitos prácticamente no sufrió modificaciones.

La selectividad por las células procariotas probablemente sea el punto fundamental en la TFDA. La absorción de la luz de determinado rango de longitud de onda por los tejidos, y los distintos picos de absorción de los fotosensibilizantes, permitirían encontrar condiciones en las cuales la luz active selectivamente las moléculas presentes en microorganismos, siendo éste uno de los mayores desafíos en el área.

También se adaptaron métodos para la detección *in vitro* de extractos productores de especies oxidantes, en particular oxígeno singlete, luego de la irradiación. A partir de estas técnicas es posible investigar rápida y fácilmente, el potencial como fotosensibilizantes de nuevos extractos o compuestos.

Se hallaron especies y extractos vegetales, con múltiples propiedades y diferentes blancos. Es probable que esta diversidad de actividades se deba a la presencia de múltiples compuestos en los extractos que den cuenta de los diferentes efectos. Se presenta un resumen de las especies y extractos activos en la siguiente tabla:

Especie	Parte	Citotóx. en células	TFD en células	Bactericida	TFDA en bacterias
<i>Cissus verticillata</i>	Raíz				
<i>Clematis hilarii</i>	Hoja				
<i>Collaea argentina*</i>	Flor				
	Hoja				
<i>Combretum fruticosum</i>	Hoja				
<i>Iochroma australe</i>	Hoja				
<i>Ipomoea bonariensis</i>	Flor				
<i>Ipomoea cairica</i>	Hoja				
<i>Jacaranda mimosifolia</i>	Flor				
<i>Macfadyena unguis-cati</i>	Flor				
<i>Prunus cerasifera</i>	Hoja				
<i>Prunus subcoriacea</i>	Hoja				
<i>Scutia buxifolia</i>	Hoja				
<i>Sesbania punicea</i>	Flor				
<i>Solanum amygdalyfolium</i>	Flor				
<i>Solanum chacoense</i>	Hoja				
<i>Solanum sisymbriifolium</i>	Flor				
<i>Solanum verbascifolium</i>	Flor				
<i>Tecoma stans</i>	Flor				
<i>Xanthium cavanillesii</i>	Hoja				

En verde se indica la actividad que mostraron los diferentes extractos metanólicos.

Se han realizado pocos estudios apuntando a llevar a cabo un “screening” en búsqueda de nuevos fotosensibilizantes vegetales. Nuestras investigaciones constituirían una primera etapa en el análisis de la potencial función fototóxica de los extractos de especies vegetales autóctonas argentinas estudiadas. Asimismo, el estudio de extractos naturales genera nuevas líneas de investigación, tales como la obtención de compuestos

antitumorales, antimicrobianos o inclusive fotoprotectores en Terapia Fotodinámica. Es necesario realizar la identificación y el aislamiento de los compuestos activos presentes en los extractos que mostraron actividad, para continuar con las determinaciones de toxicidad, fototoxicidad y fotoprotección *in vivo*.

