



**INAOE**

**Efecto de la inactivación fotodinámica en la  
inhibición de biopelículas  
formadas por *Candida spp***

por

**Diana Antonieta Sen Salinas**

Tesis sometida como requisito parcial para la  
obtención de grado de

**Maestra en Ciencias y Tecnologías  
Biomédicas**

en el

**Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y  
Electrónica**

Marzo 2021

Tonantzintla, Puebla

Supervisada por:

**Dra. Teresita Spezzia Mazzocco**

INAOE

**M.C. Alejandra Paula Espinosa Taxis**

CICM-ICUAP, BUAP

©INAOE 2021

Derechos Reservados

El autor otorga al INAOE el permiso de  
reproducir y distribuir copias de esta tesis en su  
totalidad o en partes mencionando la fuente.





---

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero agradecer especialmente a mis papás, por siempre impulsarme desde pequeña a ir por mis sueños, por su amor infinito y su apoyo en todas y cada una de mis decisiones. Mi Lolita, que sé que me cuidas desde el cielo, y mi Betito, que siempre estás incondicionalmente para mí.

A mi asesora, la Dra. Teresita Spezzia Mazzocco, por apoyarme durante la realización de este trabajo de investigación, al escuchar mis inquietudes sobre la parte experimental, incluso los detalles mínimos, además de sus asesorías y las numerosas revisiones de la tesis. A mi coasesora, la M.C. Alejandra Paula Espinosa Taxis, por recibirme en el Laboratorio de Micología de la BUAP, por sus enseñanzas, paciencia y ayuda brindadas. Al Dr. Jorge Castro Ramos, Dra. Haydee Peregrina Barreto y M. en T.A. Marisol Sánchez Esgua por sus observaciones y comentarios en la revisión de mi tesis. Al Dr. Rubén Ramos García por sus comentarios y apoyo en la búsqueda de soluciones.

A Miguel Osorio, por acompañarme durante este trayecto, apoyarme en todo momento y motivarme para continuar, por su amor incondicional y paciencia, incluso en los días más difíciles. A mi familia, gracias por sus palabras de aliento y su comprensión, especialmente a mi hermano Carlos por siempre animarme a seguir adelante, a Lis y Memo, por su tiempo y consejos. A Laura y Caroleny por su apoyo, las risas y las noches de desvelo estudiando. A mis amistades que, en la distancia, estuvieron pendientes de mí, mandando sus buenos deseos.

Al INAOE y el CONACyT, por los distintos apoyos otorgados que facilitaron mi estancia en el instituto y sin los cuales, me hubiese resultado complicado realizar este posgrado.

A los doctores que nos prepararon durante el primer año en la maestría, al grupo de Biofotónica por la retroalimentación en cada seminario. A Juan Pablo por su contribución en el programa de conteo de células y a Mayra Salazar por la ayuda en el laboratorio de Terapia Fotodinámica. A la comunidad de INAOE, compañeros de clase y de otros posgrados, al personal administrativo por todas las facilidades y apoyos brindados durante mi estancia en el instituto. A las Galaxy's por todos los partidos jugados, ganamos, perdimos y también nos divertimos.

A todos quienes directa o indirectamente me apoyaron en la realización de este trabajo.

*“Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla”.*

---

## RESUMEN

---

La inactivación fotodinámica (IFD) es una técnica basada en la combinación de tres componentes principales, un fotosensibilizador (FS), irradiación de luz en el rango espectral apropiado para la excitación de este, y oxígeno molecular, para producir daño o muerte celular. Es una técnica ampliamente estudiada que ha mostrado buenos resultados en la inactivación de bacterias y hongos en su forma planctónica y en algunas biopelículas, además de tener la ventaja de reducir el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos.

La candidiasis es una micosis oportunista ocasionada por levaduras del género *Candida*, y que, en su forma invasiva o crónica, representa la cuarta causa de infección sanguínea en hospitales. Estas infecciones están asociadas a la formación de biopelículas, en mucosas, así como en dispositivos médicos como catéteres y prótesis implantables. El problema principal de las biopelículas radica en la alta resistencia que presentan a los antifúngicos, y aunque se han desarrollado nuevos enfoques de tratamiento, aún no se ha encontrado una solución definitiva para erradicarlas.

En esta tesis se propuso utilizar la IFD en biopelículas formadas por *Candida* spp para evaluar su efecto con fotosensibilizadores de diferentes familias químicas. La primera parte del estudio consistió en caracterizar las cepas tipo y aislados clínicos, esto mediante la identificación presuntiva por CHROMagar con lo que se identificaron especies de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*; además de su evaluación de sensibilidad antifúngica en donde todas las cepas resultaron ser resistentes a fluconazol y ketoconazol. La segunda parte abordó la optimización del protocolo de crecimiento de biopelículas y la estandarización del método de evaluación de la IFD utilizando únicamente las cepas tipo de *C. albicans* y *C. tropicalis*. Se aplicó la IFD con azul de metileno (AM), rosa de bengala (RB) y curcumina (CUR) evaluando cuatro grupos diferentes: control, toxicidad, luz y tratamiento. El análisis estadístico utilizado para evaluar el efecto de IFD fue ANOVA de 1 vía y, la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

Los resultados de la optimización del protocolo de biopelícula lograron concluir que la concentración y medio ideales para crecer las biopelículas fueron  $1 \times 10^7$  cel/ml con YPD. El ensayo de viabilidad con azul tripán fue elegido de la estandarización del método de evaluación de IFD. Los resultados de IFD mostraron que todos los FS presentaron diferencias significativas entre controles y tratamientos. La IFD con CUR como FS presentó el mejor desempeño inhibitorio a  $40 \mu\text{M}$  y luz azul a  $20 \text{ J/cm}^2$  para ambas cepas evaluadas. Para las biopelículas de *C. albicans* tipo, la IFD con RB a una concentración de  $10 \mu\text{M}$  y luz verde a  $10 \text{ J/cm}^2$  tuvo mejor desempeño que con AM a  $40 \mu\text{M}$  y luz roja a  $60 \text{ J/cm}^2$  a diferencia de las biopelículas de *C. tropicalis* en donde la IFD con AM tuvo un mejor desempeño sobre la IFD con RB.

Nuestros resultados demostraron que es posible inhibir parcialmente las biopelículas de *C. albicans* tipo y *C. tropicalis* tipo con AM, RB y CUR, además se realizó una contribución al conocimiento de las biopelículas y el efecto de la IFD en ambas cepas *C. albicans* tipo y *C. tropicalis* tipo, especies de interés clínico al ser la primera y segunda especie más aislada en nuestro país. Además de que, para las biopelículas con *C. tropicalis* aún no hay estudios comparativos de estos FSs con IFD.

---

## ABSTRACT

---

Antimicrobial photodynamic inactivation (PDI) is a technique based on the combination of three main components, a photosensitizer (PS), light irradiation with the appropriate spectral range for its excitation, and molecular oxygen, in order to produce cell damage or death. It is a widely studied technique that has shown good results in the inactivation of bacteria and fungi both in their planktonic form and in some biofilms. This technique has also the advantage of reducing the development of resistance by microorganisms.

Candidiasis is an opportunistic mycosis caused by yeasts of the genus *Candida*, in its invasive or chronic form represents the fourth cause of blood infection in hospitals. This mycosis is associated with the formation of biofilms in mucosa and medical devices such as catheters and implantable prostheses. These biofilms are a significant medical problem due to their high resistance to antifungals. Despite new treatment approaches have been developed, a definitive solution to eradicate biofilms has not yet been found.

In this thesis it was proposed to use PDI on *Candida* spp biofilms to evaluate its effect with PSs of different chemical families. The first part of the study consisted in characterizing the type strains and clinical isolates, using presumptive identification by CHROMagar. *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata* were identified. Antifungal susceptibility test was performed on the strains where all of them were resistant to fluconazole and ketoconazole. The second part dealt with the biofilm growth protocol optimization and the standardization of the PDI evaluation method on type strains of *C. albicans* and *C. tropicalis*. PDI was applied using methylene blue (MB), rose bengal (RB) and curcumin (CUR), evaluating four different experimental groups: control, toxicity, light, and treatment. The statistical analysis used to evaluate the effect of IFD was 1-way ANOVA and Tukey's test for multiple comparisons.

Results of biofilm protocol optimization enabled us to conclude that  $1 \times 10^7$  cel/ml with YPD is the ideal concentration and medium to grow biofilms. The cell viability assay by trypan blue was chosen from the standardization of the PDI evaluation method. The PDI results showed that all PSs had significant differences between controls and PDI treatments. The PDI with CUR - 40  $\mu$ M and blue light at 20 J/cm<sup>2</sup> showed the best inhibitory performance for both strains evaluated. For *C. albicans* type biofilms, PDI with RB - 10  $\mu$ M, and green light at 10 J/cm<sup>2</sup> showed better inhibitory effect than AM - 40  $\mu$ M and red light at 60 J/cm<sup>2</sup>. In contrast, IFD on *C. tropicalis* type biofilms with AM had a better performance over the IFD with RB. Our results showed that it is possible to partially inhibit *C. albicans* type and *C. tropicalis* type biofilms with AM, RB, and CUR. In addition, a contribution was made to the knowledge of biofilms and the effect of IFD on *C. albicans* and *C. tropicalis* which are species of clinical interest in our country as

both are the first and the second most isolated species, moreover for *C. tropicalis* biofilms there are still no comparative studies of these PSs in PDI.



---

## CONTENIDO

---

LISTA DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE TABLAS .....	XIV
INTRODUCCIÓN .....	1
Antecedentes .....	1
1.1 Planteamiento del problema .....	2
1.2 Justificación .....	3
1.3 Preguntas de investigación .....	3
1.4 Hipótesis .....	4
1.5 Objetivos .....	4
1.5.1 Objetivo general .....	4
1.5.2 Objetivos específicos .....	4
1.6 Guía del documento .....	5
MARCO TEÓRICO .....	6
2.1 Candidiasis .....	6
2.1.1 Epidemiología .....	6
2.1.2 Antifúngicos en las infecciones por <i>Candida</i> .....	8
2.2 <i>Candida</i> .....	8
2.2.1 Crecimiento y nutrición .....	9
2.2.2 <i>C. albicans</i> .....	9
2.2.3 <i>C. tropicalis</i> .....	10
2.3 Biopelículas .....	11
2.3.1 Biopelículas de <i>Candida</i> spp .....	12
2.4 Inactivación Fotodinámica .....	14
2.4.1 Mecanismo de la IFD .....	15
2.4.2 Fuentes de luz .....	16
2.4.3 Fotosensibilizadores .....	16
2.5 Trabajo relacionado de IFD en <i>Candida</i> spp .....	18
2.6 Conclusión .....	20
MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
3.1 Materiales .....	21
3.1.1 Material biológico .....	21
3.1.2 Medios de cultivo .....	22

3.1.3 Fuentes de luz .....	22
3.1.4 Fotosensibilizadores .....	23
3.2 Métodos .....	24
3.2.1 Mantenimiento y condiciones de cultivo .....	24
3.2.2 Identificación en CHROMagar <i>Candida</i> .....	24
3.2.3 Prueba de sensibilidad antifúngica .....	25
3.2.4 Formación de biopelículas .....	26
3.2.5 Preparación de fotosensibilizadores .....	26
3.2.6 Proceso de aplicación de la IFD .....	26
3.2.7 Determinación del número de células viables por unidades formadoras de colonias .....	27
3.2.8 Ensayo de viabilidad con azul tripán .....	28
3.2.9 Ensayo de viabilidad con azul tripán en pozo .....	28
3.2.10 Cuantificación de células .....	29
3.2.11 Pruebas de análisis estadístico .....	30
3.3 Conclusión .....	30
RESULTADOS .....	32
4.1 Identificación presuntiva de especies por el método de CHROMagar <i>Candida</i> .....	32
4.2 Prueba de sensibilidad antifúngica .....	33
4.3 Optimización del protocolo de formación de biopelículas .....	35
4.4 Estandarización del protocolo para la evaluación de la viabilidad en biopelículas de <i>Candida</i> ..	36
4.4.1 Conteo de UFC .....	37
4.4.2 Resultados del EVAT pozo .....	38
4.4.3 Resultados del EVAT .....	39
4.5 Resultados de IFD en <i>C. albicans</i> tipo .....	40
4.5.1 Resultados de IFD en <i>C. albicans</i> con AM .....	40
4.5.2 Resultados IFD en <i>C. albicans</i> con rosa de bengala .....	41
4.5.3 Resultados IFD en <i>C. albicans</i> con CUR .....	43
4.6. Resultados de IFD en <i>C. tropicalis</i> tipo .....	45
4.6.1 Resultados de IFD en <i>C. tropicalis</i> con AM .....	45
4.6.2 Resultados IFD en <i>C. tropicalis</i> con rosa de bengala .....	46
4.6.3 Resultados de la IFD en <i>C. tropicalis</i> con CUR .....	47
4. 7 Conclusión .....	48
DISCUSIONES .....	49

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>6.1 Trabajo a futuro.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>57</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Distribución frecuencial de <i>Candida</i> spp en México en el periodo 2005-2015.....	7
Figura 2. Morfologías de <i>C. albicans</i> . .....	10
Figura 3. Morfologías de <i>C. tropicalis</i> . .....	11
Figura 4. Proceso de formación de biopelículas en <i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i> . .....	13
Figura 5. Diagrama de Jablonski.....	15
Figura 6. Dispositivos de fuente de luz LED utilizados.....	22
Figura 7. Espectro de emisión de los dispositivos LED rojo, verde y azul.....	23
Figura 8. Proceso de cuantificación de células. ....	29
Figura 9. Diagrama de resumen de metodología. ....	31
Figura 10. Cultivo de identificación en agar cromogénico CHROMagar.....	32
Figura 11. Pruebas antifúngicas en cepas de <i>C. albicans</i> . ....	34
Figura 12. Pruebas antifúngicas en cepas de <i>C. tropicalis</i> .....	34
Figura 13. Pruebas antifúngicas en cepas de <i>C. glabrata</i> . ....	34
Figura 14. Biopelículas de <i>C. albicans</i> tipo en fase intermedia crecidas en pozo a 24 h.....	35
Figura 15. Biopelículas de <i>C. tropicalis</i> tipo en fase intermedia crecidas en pozo a 24 h.....	36
Figura 16. Resultados de UFC después de la IFD con AM a 20 $\mu$ M y 60 J/cm <sup>2</sup> .....	37
Figura 17. Resultados cualitativos de los métodos de conteo UFC, EVAT-Pozo y EVAT para la optimización del protocolo de evaluación de IFD. ....	39
Figura 18. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de <i>C. albicans</i> tipo con AM al 20 $\mu$ M e irradiación de 60 J/cm <sup>2</sup> . ....	40
Figura 19. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de <i>C. albicans</i> tipo con AM al 40 $\mu$ M e irradiación de 60J/cm <sup>2</sup> . ....	41
Figura 20. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de <i>C. albicans</i> tipo con RB al 5 $\mu$ M e irradiación de 10 J/cm <sup>2</sup> .....	42
Figura 21. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de <i>C. albicans</i> tipo con RB al 10 $\mu$ M e irradiación de 10 J/cm <sup>2</sup> .....	43
Figura 22. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de <i>C. albicans</i> tipo con CUR al 20 $\mu$ M e irradiación de 20 J/cm <sup>2</sup> .....	44
Figura 23. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de <i>C. albicans</i> tipo con AM al 40 $\mu$ M e irradiación de 20 J/cm <sup>2</sup> . ....	45

Figura 24. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de <i>C. tropicalis</i> tipo con AM al 40 $\mu\text{M}$ e irradiación de 60 $\text{J}/\text{cm}^2$ . .....	46
Figura 25. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de <i>C. tropicalis</i> tipo con RB al 10 $\mu\text{M}$ e irradiación de 10 $\text{J}/\text{cm}^2$ . .....	47
Figura 26. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de <i>C. tropicalis</i> tipo con CUR al 40 $\mu\text{M}$ e irradiación de 20 $\text{J}/\text{cm}^2$ .....	48

---

## LISTA DE TABLAS

---

Tabla 1. Tipos de fotosensibilizadores.....	17
Tabla 2. Trabajos relacionados de IFD en <i>Candida</i> spp. ....	19
Tabla 3. Especies de <i>Candida</i> utilizadas en este trabajo.....	21
Tabla 4. Interpretación de las medidas del halo de inhibición. ....	25
Tabla 5. Resultados de identificación por CHROMagar <i>Candida</i> . ....	33
Tabla 6. Resultados de sensibilidad antifúngica. ....	33
Tabla 7. Comparación en parejas por el método de Tukey con una confianza de 95% para experimentos de IFD evaluadas por conteo de UFC. ....	38
Tabla 8. Comparativa de trabajos de IFD en <i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i> . ....	53

---

## INTRODUCCIÓN

---

### Antecedentes

La terapia fotodinámica (TFD) es un método terapéutico no invasivo que ha tenido gran crecimiento en las últimas décadas. Esta terapia se basa en la combinación de tres componentes, una molécula no tóxica llamada fotosensibilizador (FS), irradiación de luz en el rango espectral apropiado para la excitación del FS, y oxígeno molecular, cuando la técnica es aplicada a microorganismos *in vitro*, se le conoce como inactivación fotodinámica antimicrobiana (IFD) (Cieplik et al., 2018).

La TFD tiene su origen en la fototerapia, la aplicación de la luz en el tratamiento de enfermedades, misma que se remonta a la edad antigua, los primeros registros de esta aplicación datan del año 3000 a.C. en Egipto e India, en donde se usaron extractos vegetales en combinación con la luz solar para tratar enfermedades de la piel (Plaetzer et al., 2009). Durante el siglo II a. C. el médico griego Hipócrates, nombró "helioterapia" a la fototerapia y esta práctica fue adoptada posteriormente por los Romanos en sus baños públicos y los chinos, como parte de sus rituales hasta el siglo I a.C. La fototerapia desapareció por muchos siglos hasta que en el siglo XX se consideró como un área redescubierta y de amplio interés clínico.

En 1900, Oscar Raab realizó un estudio a detalle demostrando la fotooxidación biológica a causa de un FS en presencia de luz y oxígeno. En 1902 se demostró que el oxígeno molecular era el tercer componente necesario para que el FS pudiese activarse. Por otra parte, en 1904 y 1907 Tappeiner y Jesionek, realizaron los primeros estudios de TFD con eosina como FS en pacientes con cáncer de piel y lesiones sifilíticas. Gracias a sus contribuciones, Tappeiner es considerado uno de los pioneros de la fotobiología, además de que introdujo el término "Acción fotodinámica" en 1904 (Abdel-Kader, 2014). El primer FS aprobado para uso clínico fue el Photofrin en Canadá en 1993 y desde entonces también se ha usado en algunas quimioterapias. Como consecuencia positiva de la práctica clínica de la TFD en una modalidad quimioterapéutica, se están buscando evaluar sus alcances como un enfoque alternativo para combatir enfermedades infecciosas y de alto interés clínico (Baltazar et al., 2015).

En los últimos años las infecciones bacterianas y fúngicas se han agravado porque los microorganismos han ido incrementando la resistencia a antifúngicos y antibióticos. Las biopelículas microbianas constituyen hasta un 80% de todas las formas de infecciones bacterianas y fúngicas en el ser humano, incluyendo a las infecciones crónicas.

Las levaduras del género *Candida* son hongos patógenos que causan infecciones superficiales y sistémicas en el ser humano, además poseen la habilidad de crear biopelículas que las protegen de factores externos como las defensas del sistema inmunitario del huésped y medicamentos antimicóticos, lo que resulta en una alta resistencia a tratamientos antimicrobianos. A lo largo de las últimas dos décadas, la aparición de infecciones por especies de *Candida* ha ido en aumento y cada vez es más difícil de tratar debido al crecimiento de enfermedades inmunogénicas, el uso desproporcionado de fármacos inmunosupresores, desnutrición, trastornos endocrinos, el uso generalizado de dispositivos médicos implantados, antibióticos de amplio espectro y envejecimiento (S. Silva et al., 2017). Una de las formas de resistencia microbiana más importantes y difíciles de tratar se basa en la capacidad de algunos microorganismos de formar biopelículas y es por esto por lo que en este trabajo se propone utilizar la IFD para inhibir el crecimiento *in vitro* de las biopelículas de *Candida* spp de manera que podamos contribuir en el desarrollo de procesos alternativos para el tratamiento de infecciones microbianas resistentes.

## **1.1 Planteamiento del problema**

Las candidemias son infecciones fúngicas causadas por especies oportunistas del género *Candida*, y que componen la cuarta causa de infección sanguínea en hospitales (Del Pozo & Cantón, 2016), en su forma invasiva tiene una tasa de mortalidad de hasta el 40% incluso después de haber recibido un tratamiento antimicótico (Pappas et al., 2018).

El tratamiento recomendado por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (ASID) para las infecciones por *Candida* incluye en primera instancia el uso de equinocandinas, anfotericina B, seguido de las terapias orales con azoles (Pappas et al., 2015). Sin embargo, amplios estudios han hecho evidente la alta resistencia a tales antifúngicos, especialmente por parte de las biopelículas asociadas a estas infecciones, así como otros factores del huésped, el uso indiscriminado de las terapias antifúngicas, la profilaxis y la terapia repetida que resulta en la aparición de resistencia farmacológica (S. Silva et al., 2017).

Las candidiasis están asociadas al desarrollo de biopelículas, estructuras organizadas que presentan una alta resistencia a antifúngicos y que además representan un gran problema al crecer fácilmente en superficies de dispositivos médicos implantables y originar infecciones diseminadas en el torrente sanguíneo (Kojic & Darouiche, 2004; Ramage et al., 2006; Nett, 2016).

En las guías clínicas de la ASID, la manera de tratar infecciones por catéter o por dispositivos implantables asociados a candidiasis, es retirándolos cuando hay sospecha de infección, no obstante, no



todos los dispositivos pueden ser retirados cuando su uso compromete la vida del paciente , de manera que el aumento de la resistencia clínica a los medicamentos antifúngicos dificulta la lucha contra estas infecciones.(Lee et al., 2019; Pappas et al., 2015) .

## 1.2 Justificación

El aumento de la resistencia a tratamientos antifúngicos en infecciones por *Candida* así como otras infecciones fúngicas, hace importante y conveniente buscar alternativas que permitan mejorar la terapia antifúngica (S. Silva et al., 2017)

La IFD es una técnica ampliamente estudiada y utilizada en enfermedades cancerígenas, y que cada vez está demostrando mejores resultados en los ensayos de inactivación *in vitro* de microorganismos como bacterias y hongos (Agostinis et al., 2011; Sperandio & Hamblin, 2013; Liang et al., 2016; Sebrão et al., 2017). Este tipo de terapia presenta grandes ventajas al ser mínimamente invasiva e indolora, puede ser repetitiva, no necesita ser aplicada como un tratamiento sistémico ya que puede ser localizada y así, evitar efectos secundarios (Abdel-Kader, 2014). Además, la TFD tiene un mecanismo de acción diferente al de los antibióticos y antimicóticos tópicos, orales y sistémicos, por lo que también puede reducir el desarrollo de resistencia hacia los mismos (Gomer, 2010).

La mayor parte de los estudios de IFD relacionados a biopelículas de *Candida* se centran en *C. albicans* y empleando unos cuantos FS, poco se ha investigado sobre los efectos que la IFD y otros FS puede tener en biopelículas de especies de *Candida* no albicans. En México la especie más aislada después de *C. albicans* es *C. tropicalis*. Es importante conocer el potencial de esta terapia en especies no albicans, para poder llevar a cabo ensayos que puedan sustentar el uso de la terapia y ayudar al tratamiento de infecciones fúngicas como lo son las candidiasis. El trabajo de investigación que se presenta surge de la motivación de aportar conocimiento en busca de alternativas de tratamiento para infecciones asociadas a biopelículas de *Candida*, para lo cual se pretende inhibir el crecimiento de estas en ensayos *in vitro* por medio de la IFD haciendo uso de FS de diferentes familias químicas.

## 1.3 Preguntas de investigación

- ¿Es posible reducir significativamente la viabilidad de biopelículas de especies de *Candida* empleando IFD utilizando AM, CUR, y/o RB como fotosensibilizadores?

- Partiendo de la investigación previa de IFD en *Candida* en donde AM, RB y CUR han mostrado inhibición completa en células planctónicas ¿la aplicación de IFD podría tener el mismo efecto inhibitorio que en células planctónicas?

## 1.4 Hipótesis

La aplicación de la terapia fotodinámica utilizando azul de metileno, rosa de bengala y/o curcumina como fotosensibilizadores puede reducir la viabilidad en biopelículas de especies de *Candida*.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 Objetivo general

Evaluar y comparar el efecto de la terapia fotodinámica antimicrobiana en biopelículas formadas por especies del género *Candida* tipo de laboratorio empleando fotosensibilizadores de diferentes familias químicas.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- Optimizar un protocolo para la formación de biopelículas de *Candida* y para la evaluación de la IFD *in vitro*.
- Realizar prueba de sensibilidad antifúngica con ketoconazol y fluconazol de las especies en estudio.
- Evaluar el efecto de la IFD con diferentes fotosensibilizadores tales como: AM, RB y CUR en biopelículas formadas por *C. albicans* y *C. tropicalis*.
- Analizar los resultados y comparar la eficiencia de cada FS en la IFD de las biopelículas de *C. albicans* y *C. tropicalis*.

## 1.6 Guía del documento

Los capítulos de este documento están organizados de la siguiente manera:

- Capítulo 2. Presenta un panorama referencial respecto a los trabajos relacionados, así como los conceptos teóricos básicos usados a lo largo de la tesis.
- Capítulo 3. Describe los materiales y métodos empleados para los experimentos que sustentan el trabajo de la tesis.
- Capítulo 4. Muestra los resultados de los experimentos que se llevaron a cabo.
- Capítulo 5. Presenta la discusión de los resultados y se muestran las conclusiones obtenidas de esta tesis, así como la presentación de propuestas de trabajo a futuro.

---

## MARCO TEÓRICO

---

En este capítulo se describen los temas importantes para esta investigación, como son la candidiasis, los tratamientos antifúngicos para tratarla, el género *Candida*, así como las características principales de las especies *albicans* y *tropicalis*, abarcando desde su morfología, crecimiento hasta el desarrollo de biopelículas. Adicionalmente se presenta el concepto y funcionamiento de la IFD, los elementos necesarios para que esta se lleve a cabo y su mecanismo de acción, se incluye el concepto de FS, así como los tipos de fuentes de luz que se han utilizado en los últimos años en la aplicación de la IFD. Como última parte se presenta de manera sintetizada una revisión de los trabajos relacionados a la aplicación de IFD en biopelículas formadas por levaduras del género *Candida*.

### 2.1 Candidiasis

La candidiasis es una infección fúngica causada por especies oportunistas del género *Candida*. La infección puede ser aguda o crónica, superficial o profunda, limitada a un órgano o multisistémica y con un amplio espectro de manifestaciones clínicas (candidiasis cutánea, ungueal, de las membranas mucosas, mucocutánea y sistémica o invasora (Arteaga, 2003).

La candidiasis invasiva es especialmente graves en pacientes infectados por el VIH, pacientes oncológicos, pacientes trasplantados, pacientes posquirúrgicos, neonatos, además de que puede afectar a personas sanas con dispositivos médicos implantados (Del Pozo & Cantón, 2016).

#### 2.1.1 Epidemiología

De todas las especies de *Candida*, quince han resultado ser patogénicas para el ser humano, y especialmente han sido cinco las que representan el 90% de las candidiasis invasivas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, y *C. tropicalis*, mientras que especies como *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. kefyr*, *C. famata* y *C. rugosa* representan un grupo de especies aisladas ocasionalmente. *C. albicans* es la especie más estudiada en términos de

patogenicidad y es el principal agente causal de las candidiasis superficiales y sistémica (Pappas et al., 2018; S. Silva et al., 2017; Yapar, 2014)

La candidiasis invasiva es la infección fúngica de mayor incidencia entre los pacientes hospitalizados, la tasa de mortalidad de esta llega a ser del 40% incluso después de haber suministrado un tratamiento antimicótico. La candidemia ha sido asociada a una mortalidad de hasta el 47% (Pappas et al., 2018).

Diversos estudios han demostrado que existe una variación temporal y geográfica en la distribución de las especies de *Candida* en los aislados clínicos. En Estados Unidos y el noroeste de Europa, la segunda especie más común es generalmente *C. glabrata* y esta a su vez es más común entre los individuos mayores a 60 años y entre los receptores de trasplante de órganos. En América Latina, el sur de Europa, India y Pakistán, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* se encuentran con mucha más frecuencia que *C. glabrata*. *C. krusei* es la menos común de las cinco especies (Pappas et al., 2018).

Una revisión de estudios en México que reflejó la situación de candidiasis en los estados más grandes del país mostró que la etiología de la candidiasis en el país es similar a la reportada en otros países, en donde *C. albicans* sigue siendo la especie más aislada, tanto en infecciones superficiales como invasivas, y que también otras especies del género son cada vez más frecuentes como se puede observar en la Figura 1, siendo *C. tropicalis* la segunda especie más aislada en el país (Reyes-Montes et al., 2017).

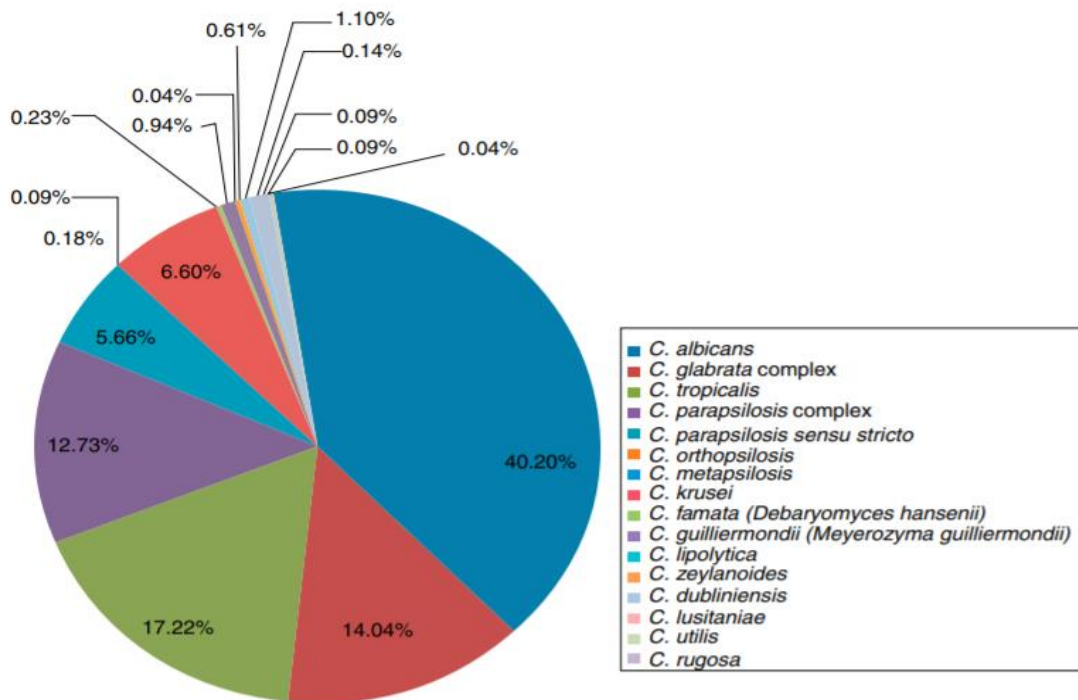


Figura 1. Distribución frecuencial de *Candida* spp en México en el periodo 2005-2015. (Reyes-Montes et al., 2017).

### 2.1.2 Antifúngicos en las infecciones por *Candida*

El tratamiento recomendado por la ASID para las infecciones por *Candida* incluye en primera instancia el uso de equinocandinas, anfotericina B, seguido de las terapias orales con azoles (Pappas et al., 2015), así también, los polienos son otro tipo de antifúngicos que se han empleado en este tipo de tratamiento (S. Silva et al., 2017; McCarty & Pappas, 2016; Pappas et al., 2015).

- Azoles (fluconazol, posaconazol, voriconazol). Bloquean la síntesis del ergosterol, inhibiendo la enzima 14 $\alpha$ -lanosterol demetilasa, encargada de la síntesis del ergosterol en la membrana celular, inhibiendo así el crecimiento y la replicación fúngica (Odds, 2003).
- Polienos (anfotericina B y nistatina). Se intercalan en membranas que contienen ergosterol, creando poros que destruyen el gradiente de protones, lo que resulta en la salida del citoplasma y otros contenidos celulares.
- Equinocandinas (casposfungina, micafungina y anidulafungina). Interrumpen la síntesis de la enzima  $\beta$ 1,3-D-glucano-sintetasa, componente de la pared celular de las especies de *Candida*. (Petrikos & Skiada, 2007).
- Anfotericina B. Se une al ergosterol de la membrana fúngica creando poros que permiten que los iones se difundan a través de la membrana. Debido a su hidrofobicidad y pobre absorción gastrointestinal, se administra de forma intravenosa (Odds, 2003). Su nefrotoxicidad se ha minimizado en los últimos años con las formulaciones lipídicas que presentan mejor solubilidad (Schlottfeldt et al., 2015).

Si bien hay diferentes tratamientos, aún no se ha encontrado una solución definitiva, por lo que se han desarrollado y probado otras alternativas, como el uso combinado de las equinocandinas y la forma liposomal de la anfotericina B, misma que sigue en estudios y está relacionada a la producción de nefrotoxicidad (Adler-Moore et al., 2019; Kuse et al., 2007; Queiroz-Telles et al., 2008). Otro enfoque de tratamiento orientado a los catéteres venosos es la terapia de bloqueo, sin embargo, aún no está aprobado para infecciones fúngicas.

## 2.2 *Candida*

El género *Candida* está compuesto por aproximadamente 200 especies, las cuáles se encuentran distribuidas en plantas, en la flora gastrointestinal de mamíferos, en la piel, así como en la flora normal de

mucosas superficiales en humanos (genitales, el tracto gastrointestinal y la boca). La causa más frecuente de infecciones fúngicas invasivas pertenece a este género, hasta el momento se conocen 15 especies que están asociadas a patologías (Murray et al., 2017).

Este género representa un grupo de levaduras comensales del ser humano, tienen una morfología oval o redondeada de 3 a 7  $\mu\text{m}$  de diámetro, su reproducción es asexual por blastoconidios y forman pseudomicelios. Son capaces de asimilar y fermentar carbohidratos, no producen pigmentos carotenoides y carecen de cápsula. Estos microorganismos crecen rápidamente formando colonias redondas con olor característico (McCullough et al., 1996). La mayoría de las especies, con excepción de *C. glabrata*, forman pseudohifas, e hifas en tejidos.

La especie con mayor prevalencia en el tracto gastrointestinal y en la mayoría de las formas de candidiasis en los seres humanos, es *C. albicans*, aunque en los últimos años se ha incrementado la incidencia de especies no albicans en los aislados clínicos, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, entre otras (Pappas et al., 2018).

### **2.2.1 Crecimiento y nutrición**

Las levaduras de *Candida* crecen generalmente en temperaturas de 20 a 40 °C, y en un rango de pH de 2 a 8 (Calderone & Fonzi, 2001), en medios definidos, que contienen sales, una fuente de carbono (glucosa), una fuente de nitrógeno y fosfato; y a veces biotina. Macroscópicamente, en agar dextrosa Sabouraud la mayoría de las especies de este género, tienen características morfológicas muy similares en temperaturas entre 28 y 32°C de 24 a 48 horas. Las colonias son blancas, cremosas, planas o sobresalientes, lisas o plegadas y tales características pueden variar con respecto a las condiciones del medio. Microscópicamente se presentan en formas de levadura y de micelio. La forma levaduriforme es denominada blastoconidio (oval, alargada, cilíndrica y esférica), estos pueden elongarse formando cadenas cortas de levaduras con constricciones, llamadas pseudohifas e incluso formar micelio verdadero (Thompson et al., 2011).

### **2.2.2 *C. albicans***

Es una levadura redonda u ovalada de 3-8 por 2-7 micras. Las diversas formas morfológicas de *C. albicans* se han asociado con el cambio de estados comensales o patógenos, puede formar blastoconidios, pseudohifas e hifas verdaderas dependiendo de la temperatura, el pH y nutrientes (Stokes et al., 2007). Se cree que el cambio de levadura a hifas ayuda a la adhesión celular y facilita la infección de tejidos, la evasión de macrófagos y el desarrollo de biopelículas (Verma-Gaur & Traven, 2016). El genoma de *C. albicans* está constituido por ocho pares de cromosomas homólogos cuyo tamaño en total es de 16 Mb

(McManus & Coleman, 2014). *C. albicans* fermenta glucosa, galactosa y maltosa con formación de ácidos y dióxido de carbono. *C. albicans* se encuentra con frecuencia como parte de la flora microbiana normal de los humanos: boca, tubo digestivo, aparato genitourinario, lo que facilita su encuentro con la mayoría de los biomateriales implantados y las superficies del huésped (Luo & Mitchell, 2002).

Macroscópicamente, en el medio agar dextrosa Sabouraud (SDA) las colonias de *C. albicans* tienen un crecimiento rápido y un aspecto liso, blanco y redondo como se aprecia en la Figura 2, poseen una consistencia cremosa, pastosa o blanda, de bordes precisos y un centro ligeramente prominente (Whiteway & Bachewich, 2007). Asimismo, cuando crecen en un medio cromogénico como CHROMagar *Candida*, el color que adquieren las colonias de *C. albicans* es un verde claro (Horvath et al., 2003).

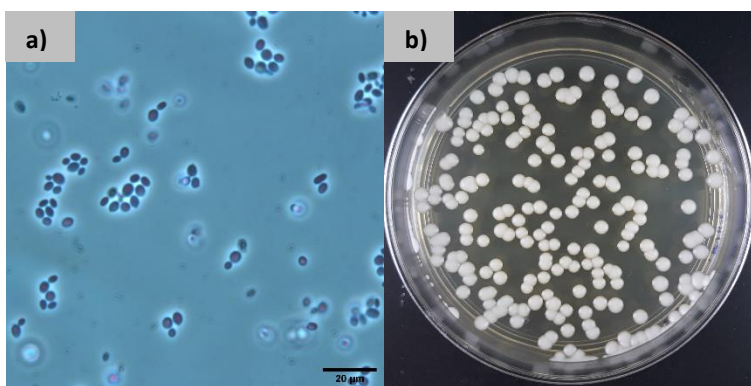


Figura 2. Morfologías de *C. albicans*. a) Morfología microscópica observada a 40X. b) Morfología macroscópica creciendo sobre medio de cultivo SDA.

### 2.2.3 *C. tropicalis*

Es una levadura diploide susceptible a los azoles aunque menos susceptible que *C. albicans*. *C. tropicalis* se ha convertido en una de las especies de *Candida* más importante al ser considerada como la segunda especie más virulenta de tal género. Afecta con frecuencia a los pacientes leucémicos y neutropénicos, tiene gran capacidad invasiva y se estima que de un 50% a un 60% de los casos, desarrollan candidiasis diseminada a diferencia de *C. albicans* que lo hacen en un 2 a 15% de los casos (Nucci & Marr, 2005).

Estudios han demostrado que la producción de sus biopelículas es mayor que en *C. albicans*. Puede producir factores de virulencia tales como la adhesión a células bucales epiteliales, así como células endoteliales (Galán-Ladero et al., 2013; Tronchin et al., 2008), secreción de enzimas líticas como proteinasas, fosfolipasas y hemolisinas, morfogénesis (transición de brotes a hifas) y el switching fenotípico (estado blanco a opaco) (Seervai et al., 2013).



La morfología de las colonias de *C. tropicalis* en SDA es de color blanco a crema como se ve en la Figura 3, con una textura cremosa y un aspecto liso y pueden tener bordes ligeramente arrugados (Zuza-Alves et al., 2017). Asimismo, cuando crecen en un medio cromogénico como CHROMagar Candida, el color que adquieren las colonias de *C. tropicalis* es azul (Horvath et al., 2003).

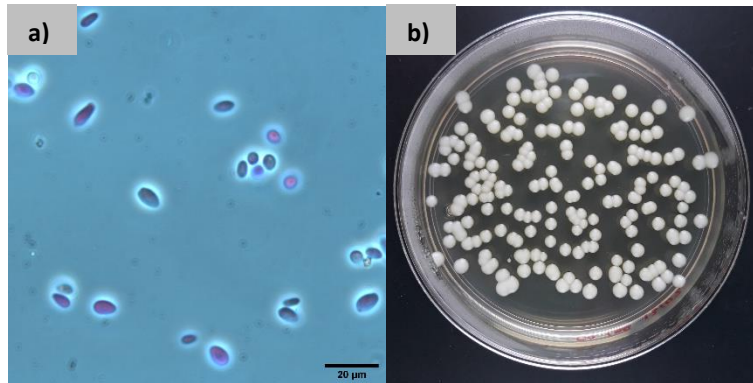


Figura 3. Morfologías de *C. tropicalis*. a) Morfología microscópica observada a 40X. b) Morfología macroscópica creciendo sobre medio de cultivo SDA.

## 2.3 Biopelículas

Antoni van Leeuwenhoek escribió por primera vez sobre biopelículas en 1683 para la Royal Society of London y desde entonces, la definición de biopelículas ha evolucionado a como se conoce en la actualidad (Gulati & Nobile, 2016). Una biopelícula consiste en una comunidad de microorganismos (bacterias u hongos) que se unen de manera irreversible a una superficie estática, material inerte o tejido vivo y que producen sustancias poliméricas extracelulares formando una matriz estructural, (Nobile & Johnson, 2015; Kolter & Greenberg, 2006; Lewis, 2001). Los microorganismos en este tipo de comunidad muestran tasas de crecimiento más bajas y mayor resistencia al tratamiento antimicrobiano, comportándose de manera muy diferente a las células planctónicas (Donlan, 2001). El Instituto Nacional de Salud (NIH) en EUA ha señalado que las biopelículas patogénicas son responsables directa o indirectamente del 80% de todas las infecciones microbianas (bacterianas y fúngicas) en el ser humano (Jamal et al., 2018), y estas varían desde infecciones de mucosas superficiales, dermatológicas hasta infecciones diseminadas con un alto índice de mortalidad, llegando a 47% en varios casos (Nobile & Johnson, 2015; S. Silva et al., 2017).

### 2.3.1 Biopelículas de *Candida* spp

La habilidad que poseen las especies de *Candida* para formar biopelículas, les permite adherirse no solo a superficies bióticas ya que estas pueden adherirse de igual forma a superficies inertes como catéteres u otros dispositivos biomédicos implantables y causar infecciones relacionadas a los mismos.

Las adhesinas son proteínas responsables de la adhesión específica antes de la formación de la biopelícula. Las adhesinas de secuencia similar a la aglutinina (Als) son una familia de glucoproteínas ubicadas en la superficie de la pared celular de las levaduras, que se sabe que están asociadas con la patogenicidad; están presentes en *C. albicans* y en especies de *Candida* no albicans como *C. tropicalis* (Chandra & Mukherjee, 2015).

Los estudios relacionados a biopelículas de *Candida* spp han sido realizados en su mayoría sobre *C. albicans*, por lo que aún se desconoce en gran medida el proceso de formación de estas estructuras en otras especies, en la Figura 4 se muestra el proceso de formación de biopelículas para *C. albicans* y *C. tropicalis*. La formación de biopelículas para *C. albicans* es un proceso multifacético (Gulati & Nobile, 2016):

1. Fase temprana o de adherencia. Comienza con la adhesión de levaduras a una superficie determinada, seguida de la formación de una colonia discreta, formando una capa basal de levaduras.
2. Fase intermedia. Consiste en la proliferación celular y la filamentación de las células adheridas, además las células se organizan y comienzan a producir y secretar sustancias poliméricas extracelulares (EPS).
3. Fase de maduración. Como resultado de la proliferación celular, se forma una red compleja de hifas (cadenas de células cilíndricas), pseudohifas (células elipsoidales unidas de extremo a extremo) y levaduras, encerradas en una matriz extracelular. Esto le da a la biopelícula una apariencia gruesa y estructurada, además de protección contra lesiones químicas y físicas.
4. Fase de dispersión. Después de la maduración de la biopelícula, existe la posibilidad de diseminación de las levaduras al desprenderse y migrar a otros sitios para formar nuevas biopelículas (Cavalheiro & Teixeira, 2018).

De forma *in vitro*, la fase temprana de la formación de *C. albicans* tiene una duración aproximada de 11 horas en la que se forman microcolonias, mientras que la fase intermedia puede durar de 12 a 30 horas, se caracteriza por la producción de EPS y la formación de una bicapa de levaduras, tubos germinales e hifas. La fase de maduración se consigue de 38 a 72 horas, que es cuando se desarrolla una capa gruesa de EPS y una red densa de hifas y levaduras. En cambio, en la biopelícula de *C. tropicalis* la red se compone de levaduras, pseudohifas e hifas con un brote intenso de hifas (Cavalheiro & Teixeira, 2018). La fase de dispersión es la menos estudiada del desarrollo de biopelículas.

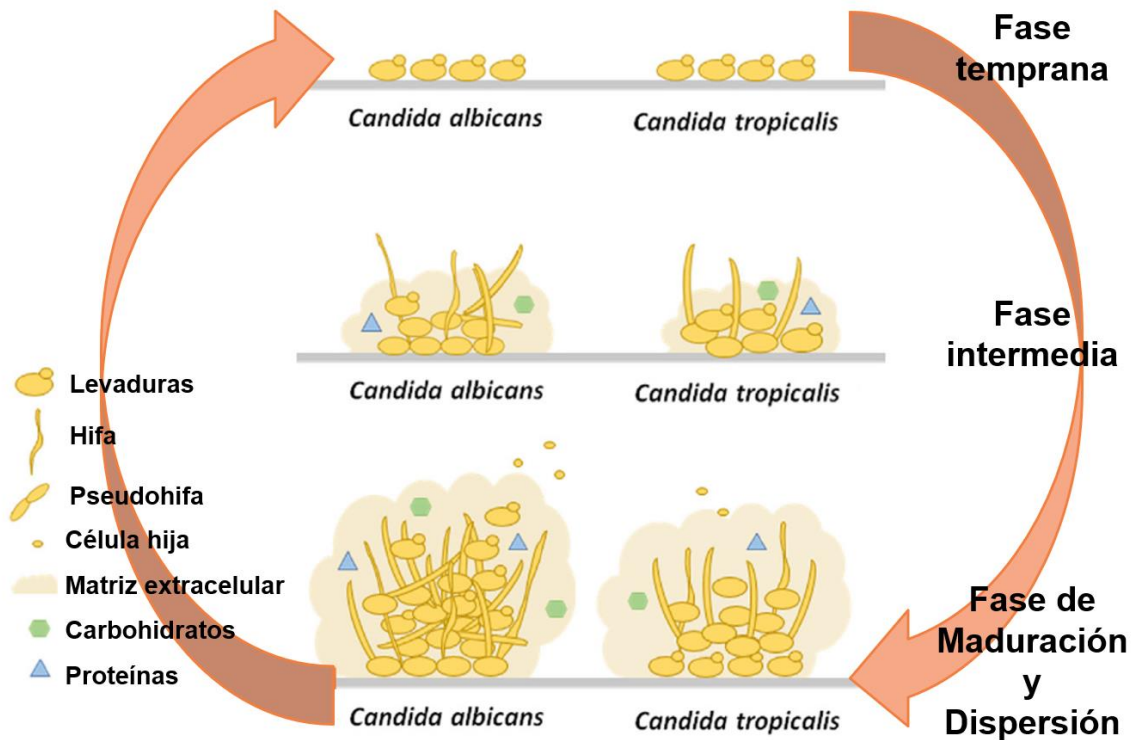


Figura 4. Proceso de formación de biopelículas en *C. albicans* y *C. tropicalis*. Basado en Cavalheiro & Teixeira, (2018).

Las biopelículas de *C. tropicalis* tienen una matriz extracelular gruesa que puede afectar la difusión de nutrientes y oxígeno, lo que conduce a una menor actividad metabólica en las células (Marcos-Zambrano et al., 2014). A pesar de que la matriz de *C. tropicalis* contiene carbohidratos, proteínas, hexosamina, fósforo y ácido urónico, tiene menores cantidades de carbohidratos y proteínas que la de *C. albicans*. El componente principal de la matriz de sus biopelículas es hexosamina (Galán-Ladero et al., 2019; S. Silva et al., 2011). Las biopelículas de *C. tropicalis* también presentan una alta resistencia a terapia antimicótica así como la capacidad de las células dentro de las biopelículas para resistir las defensas inmunes del huésped, se ha reportado que la infección por *C. tropicalis* está fuertemente relacionada con la presencia de biopelículas en las sondas urinarias (Kothavade et al., 2010).

### **2.3.1.1 Biopelículas de *Candida* en tejidos**

Las biopelículas de *Candida* pueden formarse en el tejido de las mucosas del huésped, donde reside como parte de la microflora comensal, siendo la cavidad oral el objetivo principal. La candidiasis pseudomembranosa es la infección oportunista oral más común en personas VIH+ y otras personas inmunocomprometidas. Se presenta como lesiones de color blanco cremoso en el paladar, la mucosa bucal y la lengua, aunque también puede extenderse a la faringe (candidiasis orofaríngea) (Tsui et al., 2016).

Las infecciones superficiales asociadas a biopelículas de *Candida* son menos graves, la gingivoestomatitis y la periimplantitis son dos de las manifestaciones más frecuentes. En este tipo de infecciones las biopelículas suelen ser polimicrobianas, y la participación de microorganismos del género *Streptococcus* es frecuente (Del Pozo & Cantón, 2016).

La endocarditis por *Candida* puede resultar de la formación de biopelículas en el endotelio vascular dañado de las válvulas cardíacas en pacientes con enfermedad cardíaca preexistente (S. Silva et al., 2017).

### **2.3.1.2 Biopelículas de *Candida* en dispositivos biomédicos**

Las biopelículas de *Candida* se adhieren generalmente a dispositivos biomédicos, y son capaces de resistir concentraciones altas de antifúngicos (Nett et al., 2015). El dispositivo médico de mayor infección por estas biopelículas es el catéter venoso central comúnmente usado para la administración de líquidos, nutrientes y fármacos. La contaminación del fluido, así como la del núcleo del catéter tiene su origen en la piel del paciente o las manos del personal de enfermería al realizar la inserción del mismo, permitiendo que los organismos pueden migrar a través de la herida hecha por el catéter (S. Silva et al., 2017).

## **2.4 Inactivación Fotodinámica**

La IFD antimicrobiana, es una técnica basada en la activación de un cromóforo no tóxico llamado FS, que puede ser activado por luz a cierta longitud de onda. Esta exposición induce la producción de radicales dañinos, como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y oxígeno singulete, que son capaces de activar procesos de daño celular, como la muerte (Cieplik et al., 2018).

La IFD es aplicada a microorganismos como las bacterias u hongos. Los FSs utilizados en estudios de IFD han incluido colorantes de diversas familias químicas y extractos naturales (Tabla I).

## 2.4.1 Mecanismo de la IFD

Cuando se hace incidir luz en el FS, este al absorber un fotón, pasa a un estado triplete y luego por la presencia de oxígeno molecular, es capaz de producir oxígeno singlete y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) que, a su vez, pueden dañar casi todo tipo de moléculas, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y, en consecuencia, inducir muerte celular (Broekgaarden et al., 2015). Existen dos mecanismos de producción de especies reactivas de oxígeno cuando el FS se encuentra en estado triplete (Kashef et al., 2017), como se observa en la Figura 5, estos pueden ser:

- **Reacción tipo I**

Involucra reacciones de transferencia de electrones para formar radicales libres e iones radicales, como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo.

- **Reacción tipo II**

Resulta de la transferencia de energía del FS al oxígeno molecular en estado triplete ( $^3\text{O}_2$ ), llevando así a la producción de oxígeno singlete altamente tóxico ( $^1\text{O}_2$ ).

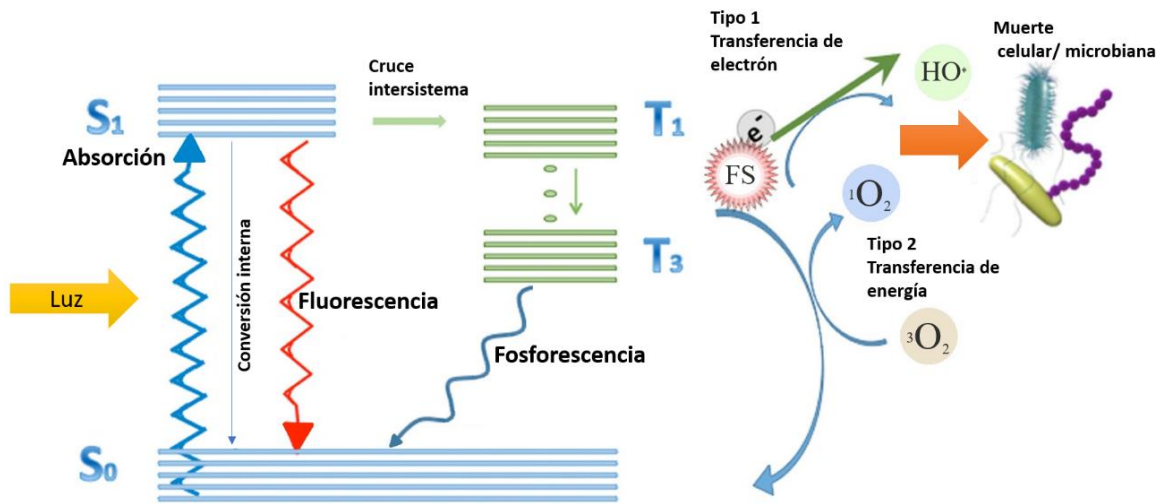


Figura 5. Diagrama de Jablonski. El FS del estado fundamental absorbe luz y pasa al estado singlete, que (además de perder energía por fluorescencia o conversión a calor) sufre un cruce entre sistemas para formar el primer estado triplete excitado de larga duración. En el estado triplete puede haber una reacción tipo I de transferencia de electrones para formar un superóxido y un radical hidroxilo; o una reacción tipo II de transferencia de energía para formar oxígeno singlete. Basado en Kashef et al. (2017).

## 2.4.2 Fuentes de luz

Se han utilizado tres tipos de fuentes de luz para la IFD, fuentes de luz coherentes como los láseres, y no coherentes como los diodos emisores de luz y las lámparas de descarga de gas (Calin & Parasca, 2009; Nyman & Hynninen, 2004). Los láseres permiten suministrar luz con alta monocromaticidad y pueden ser usados junto con fibra óptica, sin embargo, tienen inconvenientes como su alto costo y difícil transporte. En cambio, los LEDs son menos costosos, pueden ser fácilmente transportados y tienen un espectro de emisión más amplio (Wilson & Patterson, 2008). Las lámparas de halógeno pueden ser filtradas espectralmente para que coincida con cualquier FS, pero no pueden ser acopladas tan fácilmente a una fibra óptica, además de que pueden causar un mayor calentamiento al tejido o muestra, en comparación con los láseres o LEDs.

En el caso de lámparas de luz blanca o fluorescente, es necesario disminuir la irradiación de luz ultravioleta e infrarroja para evitar mutagénesis y el calentamiento de tejidos respectivamente, por lo que, para reducir el daño en tejido normal, las dosis de luz aplicadas deben ser menores a  $200 \text{ mW/cm}^2$  (Donnelly et al., 2008; Nyman & Hynninen, 2004).

## 2.4.3 Fotosensibilizadores

Un FS ideal se caracteriza por su solubilidad en agua, mínima toxicidad en oscuridad, bajo potencial mutagénico, y una alta estabilidad química, además debe tener la capacidad de acumularse preferentemente en el objetivo específico (tejido o célula) y eliminarse rápidamente después de la administración para evitar fotosensibilización prolongada (Cieplik et al., 2018).

La estructura ideal del FS es diferente de acuerdo con la aplicación. Los FSs anticancerígenos tienden a ser lipofílicos con poca o ninguna carga general (ya sea positiva o negativa), mientras que los FSs antimicrobianos, deberían tener cargas catiónicas pronunciadas y, en muchos casos, cuantas más cargas, mejor, especialmente para atacar a las bacterias Gram negativas.

Los FSs anticancerígenos tienen bandas de absorción de longitud de onda larga (rojo lejano / infrarrojo cercano) entre 650 y 800 nm para una buena penetración de la luz en el tejido, mientras que para los FSs antimicrobianos, esta propiedad es mucho menos importante dado que las infecciones que suelen ser tratadas tienden a ser de naturaleza superficial (Abrahamse & Hamblin, 2016).

En los últimos 20 años, varios trabajos se han hecho para optimizar las propiedades fotodinámicas de los FSs, al modificar su estructura química o desarrollando nuevas clases de FS (Wainwright et al., 2017).

Los FSs más utilizados en aplicaciones anticancerígenas son los que poseen estructuras tetrapirrólicas como las porfirinas, clorinas, bacterioclорinas y ftalocianinas. Por otra parte, se han sintetizado FSs derivados de las fenotiazinas que también se han usado más en aplicaciones antimicrobianas, como el azul de toluidina (AT) o el AM, cuya absorción se encuentra en el rango de 600 a 660 nm y de los que se ha demostrado que pueden causar daño a la membrana de hongos (Abrahamse & Hamblin, 2016). Otros FSs sintetizados incluyen las fenalenolas, escuarinas y el RB. Otro enfoque en el desarrollo de FSs ha sido el uso de productos naturales, mismos que siguen en investigación, algunos de ellos son la hipericina, hipocrellina, riboflavina y la CUR. En la Tabla I se pueden observar algunos ejemplos de FSs derivados de diferentes clases químicas.

**Tabla 1**

*Tipos de fotosensibilizadores*

Tipo	Clase	Nombre	Espectro de la luz (nm)	Aplicaciones	Referencia
Tetrapirrólicos	Porfirinas	TMPyP	400–650	Cáncer	Garcia-Sampedro et al., 2019
		Protoporfirina-IX	400-630	Cancer <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	
	Clorinas	Clorina e6 Photodithazine	650-670	Antimicrobiano	Dovigo et al., 2013
	Ftalocianinas	Ftalocianinas de cloroaluminio	630-720	Antimicrobiano	Carmello et al., 2016
Sintetizados	Fenotiazinas	AT	630	Antimicrobiano,	Tseng et al., 2017; Graciano et al., 2015
	Fenotiazinas	AM	660	Anticancerígeno,	
	Xantenos	RB		Anticancerígeno, unión de tejidos, antimicrobiano,	
Naturales	Perilenequinona	Hipericina	600	Anticancerígeno, antimicrobiano	(Zheng et al., 2014)
	Curcuminoide	CUR	400-434	Antimicrobiano	Manoil et al., 2014
	Flavinas	Riboflavinas	360-365	Antimicrobiano	(Makdoui & Bäckman, 2016)

## 2.5 Trabajo relacionado de IFD en *Candida* spp

La IFD para tratar hongos ha sido previamente estudiada en algunas especies del género *Candida*, siendo *C. albicans* la más estudiada. Los trabajos incluyen estudios *in vitro* con células planctónicas y otros en biopelículas. Los trabajos de IFD sobre biopelículas de especies de *Candida* no *albicans* son escasos.

En México, Spezzia-Mazzocco et al., (2016) reportaron que la IFD *in vitro* sobre las especies del género *Microsporum* (*M. canis* y *M. gypseum*) tienen una mejor respuesta de inhibición con el tratamiento que los géneros *Trichophyton* (*T. mentagrophytes*, *T. tonsuras*), utilizando AM (20 y 40  $\mu\text{M}$ ) y luz láser HeNe a dosis de 20, 40 y 60  $\text{J}/\text{cm}^2$  además de que demostraron que la administración de la luz de forma fraccionada y repetida en los procesos de IFD puede lograr mejores resultados que una exposición única a mayor potencia.

Davies et al. (2016) examinaron la actividad fotodinámica de un FS basado en porfirina, denominado TMP-1363 en combinación con miconazol para combatir biopelículas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. El tratamiento incluía una incubación de las biopelículas con 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de miconazol para posteriormente aplicar la IFD por 30 minutos con una irradiancia en el espectro visible de 32.5  $\text{mW}/\text{cm}^2$  usando un bulbo como fuente de luz. Los resultados demostraron que *C. glabrata* y *C. albicans* no fueron sensibles a la IFD solo con TMP-1363, mientras que para *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, el tratamiento combinado con miconazol y IFD tuvo un mejor efecto citotóxico hasta del 40%, y para *C. albicans*, este si fue efectivo.

La IFD de biopelículas de *C. albicans* en discos de resina acrílica, utilizando AM y protoporfirina IX (PpIX) como FS fue investigado por Sousa et al. (2016), en donde usaron 50  $\mu\text{M}$  de AM y 10  $\mu\text{M}$  de protoporfirina, y una irradiación de aproximadamente 800  $\text{mW}$  en un rango de 2 a 10 minutos con LEDs cuyas longitudes de onda fueron de 660 nm y 630 nm. Para la evaluación utilizaron como método el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), con lo que demostraron que la IFD con MB disminuyó las UFC aproximadamente dos órdenes de magnitud sin erradicar las biopelículas tras 10 minutos de tratamiento y que la protoporfirina no fue efectiva en los experimentos.

Se ha evaluado el azul de toluidina (TBO), y a pesar de no reducir totalmente la biopelícula, se han conseguido reducciones de 3 órdenes de magnitud y una remoción parcial de sustancias poliméricas extracelulares en biopelículas de *C. albicans* (Huang et al., 2018).



Silva et al. (2016), evaluaron la IFD con RB al 12.5  $\mu$ M reduciendo en un 33.92% las UFC con respecto a los grupos de control para todas las pruebas de biopelículas *C. albicans*, concluyendo que no es suficiente para causar una reducción significativa de las biopelículas de tales organismos.

La búsqueda de artículos sobre IFD en biopelículas de *C. tropicalis* específicamente utilizando AM y RB no arrojó resultados hasta el momento, sin embargo, hay estudios de IFD en células planctónicas de esta especie, aún es necesario evaluar el efecto de tales FSs en biopelículas de *C. tropicalis*, siendo esta una de las especies más aisladas en Latinoamérica y la segunda especie más aislada en México.

**Tabla 2**

*Trabajos relacionados de IFD en Candida spp*

Referencia	Microorganismo	FS	Longitud de onda /Dosis	Fluencia	Resultado
Torres-Hurtado et al. (2019)	<i>C. albicans</i>	MB	600 – 650 nm	10 - 60 J/cm <sup>2</sup>	99% inhibición células planctónicas.
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	RB	490 – 540 nm		
Huang et al. (2018)	<i>C. albicans</i>	AT	630 nm	50 J/cm <sup>2</sup>	AT- IFD remoción parcial. IFD + caspofungina remoción total
Hsieh et al. (2018)	<i>C. albicans</i>	CUR	430 nm	9 J/cm <sup>2</sup>	Miconazol con IFD erradicó efectivamente las biopelículas.
Davies et al. 2016	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i>	TMP-1363	350 – 800 nm	58.5 J/cm <sup>2</sup>	<i>C. glabrata</i> no es sensible a IFD. Miconazol con IFD en <i>C. albicans</i> funciona. <i>C. tropicalis</i> y <i>C. parapsilosis</i> sin efecto citotóxico total.
Sousa et al. (2016)	<i>C. albicans</i>	AM PpIX	660 nm y 630 nm	NR	AM decrece hasta 2 órdenes de magnitud las UFC PpIX sin efecto significativo
Trigo Gutiérrez et al (2018)	<i>C. albicans</i>	CIAIPc	Luz roja	39.3 J/cm <sup>2</sup>	Reducción significativa de UFC.

Nota: NR= No reportado.

## 2.6 Conclusión

En este capítulo se ha presentado una descripción sobre las candidiasis, su epidemiología, las características del género *Candida*, así como las diferencias entre las especies de *C. albicans* y *C. tropicalis*, además de introducir el proceso de formación de biopelículas.

Adicionalmente se describieron los aspectos teóricos del proceso de IFD y se presentó una revisión del trabajo relacionado a este estudio. La información presentada permite entender el panorama en el que se desarrolla esta investigación de aplicación de IFD con diferentes FSs a biopelículas de *Candida*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se presenta la información correspondiente a los materiales utilizados en esta investigación, así como la descripción de los métodos que se llevaron a cabo. Los métodos incluyen el cultivo y mantenimiento de las cepas, la identificación presuntiva de cepas por CHROMagar la estandarización del protocolo para la creación de biopelículas, la prueba de sensibilidad antifúngica, el procedimiento para realizar la IFD, y los métodos para evaluar los efectos de la IFD como el conteo de las UFC, y los ensayos de viabilidad utilizando el colorante azul tripano.

### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Material biológico

Se utilizaron 9 cepas de *Candida*, correspondientes a 3 especies de este género: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, mismas que fueron donadas por el Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas (CICM) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las cepas tipo provienen de la American Type Culture Collection (ATCC), mientras que las cepas de aislados clínicos provienen del Hospital Universitario de la BUAP. En la Tabla 3 se muestran las cepas utilizadas en este estudio.

**Tabla 3**

*Especies de Candida utilizadas en este trabajo*

Especie	Cepas de referencia	Aislados clínicos
<i>C. albicans</i>	Tipo ATCC CAF2	19ci, 19cd
<i>C. tropicalis</i>	Tipo ATCC MYA3404	002, 004
<i>C. glabrata</i>	Tipo ATCC 2001	2664,129 (2)

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micología del Instituto de Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y en la Laboratorio de Terapia Fotodinámica del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica.

### 3.1.2 Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un líquido o agar diseñado para apoyar el crecimiento de microorganismos. Para las levaduras del género *Candida* de este estudio se utilizaron los siguientes medios:

- Agar dextrosa Sabouraud (SDA) para el cultivo de hongos y levaduras (MCD Laboratorios).
- Agar cromogénico (Difco TM CHROMagar TM *Candida*).
- Caldo dextrosa Sabouraud (SDB) (BD Bioxon).
- Caldo extracto de levadura, peptona y glucosa (YPD) preparado con 2% glucosa (Laboratorios Meyer), 1% extracto de levadura (MCD laboratorios) y 1% peptona de caseína (MCD laboratorios).
- Solución buffer fosfato salino (PBS) compuesto por Sodio Fosfato dibásico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Gran), Sodio Cloruro  $\text{NaCl}$  (Omnichem Cristal), Potasio Fosfato monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Omnichen Cristal) y Potasio Cloruro  $\text{KCl}$  (Gran).

### 3.1.3 Fuentes de luz

Se utilizaron tres dispositivos LED rojo, azul y verde como fuente de luz para los experimentos de IFD, mismos que se observan en la Figura 6. Cada dispositivo cuenta con una matriz de 12 LEDs ultrabrillantes de 3W de potencia (Vollong Electronics). Los dispositivos fueron diseñados y manufacturados en el INAOE.

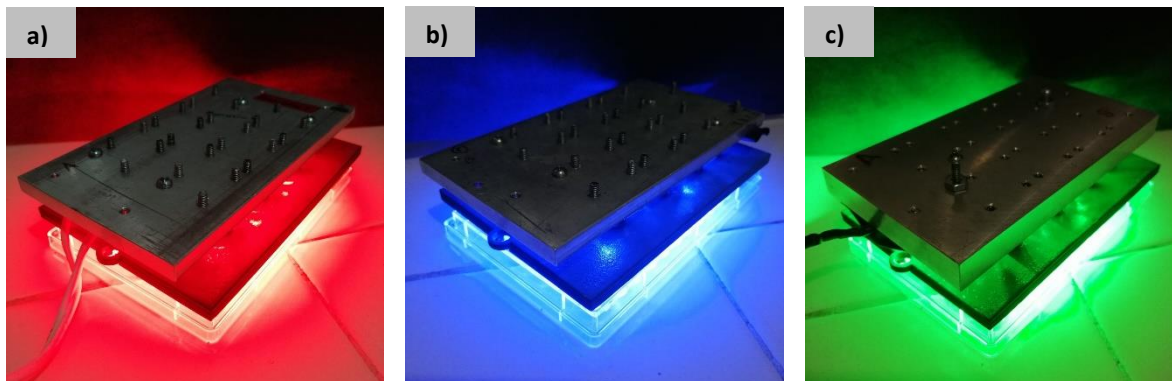


Figura 6. Dispositivos de fuente de luz LED utilizados. a) Rojo, b) azul y c) verde.

En la Figura 7 se muestran los espectros de emisión de los dispositivos que se tomaron con un espectrofotómetro HR4C2564 Ocean Optics., en donde el espectro de luz roja está centrado en  $\lambda = 630$  nm, el del dispositivo verde en  $\lambda = 520$  nm , y el espectro de emisión del dispositivo azul en  $\lambda = 460$  nm.

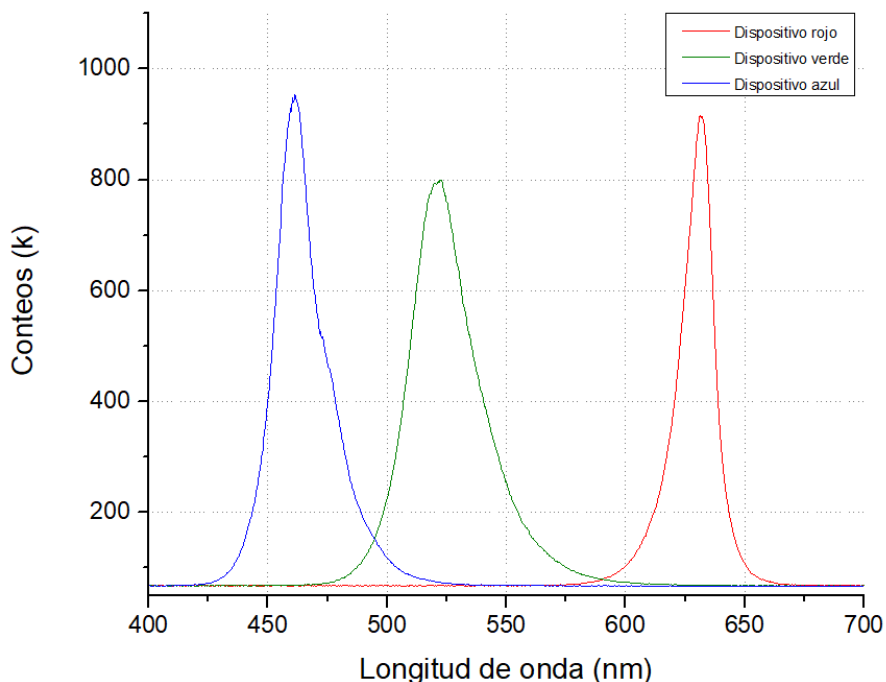


Figura 7. Espectro de emisión de los dispositivos LED rojo, verde y azul.

### 3.1.4 Fotosensibilizadores

Se utilizaron tres FSs de diferentes familias químicas: azul de metileno (AM) perteneciente a las fenotiazinas, rosa de bengala (RB) derivado de los xantenos y, curcumina (CUR), colorante natural derivado de la raíz de cúrcuma.

- a) AM. (I.C. 52015, Reactivos y Químicos Meyer, México). La banda de absorción de este colorante se encuentra en el rango de los 550 a 700 nm. El AM utilizado en los experimentos alcanza su máxima absorción a una longitud de onda  $\lambda=660$  nm y tiene un peso molecular de 373.90 g/mol.
- b) RB (I.C. 45440, Reactivos y Químicos Meyer, México). con una máxima absorción a una longitud de onda  $\lambda=545$  nm, además tiene un peso molecular de 1017.65 g/mol. El RB es un derivado

halógeno de fluoresceína, utilizado en la práctica clínica para el diagnóstico de enfermedades oftalmológicas. Su mecanismo fotodinámico consiste en la formación de 80% de oxígeno singulete y 20% de anión superóxido. Se caracteriza por tener una banda de absorción entre 450– 600 nm.

- c) CUR. (C1386, Sigma Aldrich, Estados Unidos). Usada tradicionalmente como colorante y especia. Se han demostrado sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antifécciosos. Su absorción está en la banda del azul, por lo que se le considera como una opción en TFD para enfermedades superficiales (Buzzá, et al., 2019) La CUR utilizada alcanza su mayor absorción en  $\lambda = 430$  nm y tiene un peso molecular de 368.38 g/mol.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Mantenimiento y condiciones de cultivo

Para el mantenimiento de las 9 cepas en criopreservación a  $-80$  °C, se hicieron cultivos en PBS con glicerol. Estas reservas se realizaron una vez identificadas las levaduras en estudio.

Para el crecimiento rutinario de todas las cepas, se sembró por estría masiva en placas con medio SDA durante un periodo de incubación de 24 a 48 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ , al comenzar cada experimento de crecimiento de levadura se reactivan las cepas descongelando las de reserva y sembrándolas por estría masiva en placas de SDA a una incubación de 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ . Se realizan resiembras como máximo durante dos semanas para trabajar con cultivos jóvenes.

La incubación de *C. albicans* y *C. tropicalis* para los experimentos de biopelículas se mantuvo en  $37^{\circ}\text{C}$ . Los medios de crecimiento utilizados fueron caldo SDB y YPD.

### 3.2.2 Identificación en CHROMagar *Candida*

CHROMagar *Candida*, es un medio de cultivo comercial formado por una mezcla de sustratos cromógenos, mismos que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas específicas, de manera que es posible diferenciar determinadas especies de *Candida* de acuerdo al color que las colonias de estas adquieran.

Cada cepa se sembró en placas de agar SDA por estría cruzada y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Se tomó una colonia aislada de este cultivo y se sembró nuevamente en placas con CHROMagar *Candida*, siguiendo un periodo de incubación de 24 a 48 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se realizó la identificación presuntiva, de

acuerdo con las características colorimétricas que indica el fabricante para cada especie. Las colonias de *C. albicans* presentan un color verde, las colonias de *C. tropicalis*, de azul verdoso a azul metálico, mientras que *C. krusei*. y *C. glabrata* pueden presentar una coloración rosado claro a rosa.

### 3.2.3 Prueba de sensibilidad antifúngica

Para realizar la prueba de sensibilidad antifúngica, se hizo una adaptación del método de difusión en disco de Kirby y Bauer (CLSI, M44-A2), se mide el diámetro del halo de inhibición generado a partir de un disco para antifungigrama, de 24 a 48 horas después de haber sembrado las levaduras en agar SDA. Los antifúngicos evaluados fueron fluconazol (25 µg) y ketoconazol (50 µg) en 9 cepas de *Candida*, como grupo control se utilizaron discos de papel filtro impregnados con agua destilada estéril.

Para realizar la prueba de sensibilidad contra antifúngicos se cultivaron las cepas en SDA durante 24 horas, posteriormente se tomó una asada de 2 colonias y se colocó dentro de un tubo con PBS, se realiza conteo en cámara de Neubauer y se ajusta la densidad hasta conseguir una concentración de  $2.5 \times 10^6$  cel/ml en un volumen de 4 mL, se empleó un hisopo estéril impregnado con la muestra de cada cepa en dicha concentración para posteriormente sembrar con estriado masivo en placas con agar SDA adicionadas con cloranfenicol (50 mg/L). Se procede a impregnar los discos estériles de la solución de cada antifúngico y estos se colocan junto con el control en cada placa cultivada. Se incubaron las placas de forma invertida por 48 horas y finalmente se midieron los halos de inhibición interpretando los resultados de acuerdo con la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Interpretación de las medidas del halo de inhibición*

Antifúngicos	Diámetro de inhibición	Interpretación
	$\geq 20$ mm	Sensible
Azoles	$> 10$ mm y $< 20$ mm	Intermedio
	$\leq 10$ mm	Resistente

### 3.2.4 Formación de biopelículas

Se seleccionaron 2 cepas tipo para los estudios de biopelículas, *C. albicans* (CAF2) y *C. tropicalis* (MYA3404) provenientes de la ATCC. Se reactivan los cultivos de reserva con estriado masivo en SDA a una incubación de 30°C durante 24 horas. Posteriormente se toma una asada de una colonia y se cultiva en caldo YPD. Se incuba durante 12 horas a 30°C para crecer levaduras, se realiza conteo de levaduras en cámara Neubauer la concentración de levaduras fue calculada con un hemocitómetro (Neubauer improved 0.1 mm depth; Marienfeld, Germany) para calcular una suspensión de  $1 \times 10^7$  cel/ml. De esta concentración se colocan 200  $\mu$ L por pozo en una placa de microtitulación y se incuba a 37°C en agitación a 150 rpm por 1.5 horas. Después de la agitación, las muestras se lavan dos veces con 200  $\mu$ L de PBS y se agrega 200  $\mu$ L de caldo fresco YPD. Se incuba a 37°C con agitación de 120 rpm, durante 24 h. Finalmente cada muestra es lavada dos veces con 200  $\mu$ L de PBS para remover las células no adherentes.

### 3.2.5 Preparación de fotosensibilizadores

Para los tres FSs se realizó un stock primario a una concentración de 200  $\mu$ M. La fórmula empleada para el cálculo fue  $m = CMV$  en donde  $m$  es la masa,  $C$  la concentración,  $M$  el peso molecular y  $V$  el volumen. Los polvos de las tinciones RB y AM se disolvieron en PBS estéril con un pH = 7.4 (medidor de pH Milwaukee MI-150) a temperatura ambiente. Posteriormente las soluciones finales se esterilizaron por filtros de jeringa (acetato de celulosa; poro 0.20  $\mu$ m; diámetro de 25 mm de GVS Life Sciences, USA). Se preserva en refrigeración a 4°C. Cuando se utiliza en IFD se realizan las diluciones correspondientes para las condiciones de los experimentos con PBS estéril. El stock de FS solo se conserva y utiliza durante 30 días. En el caso de la preparación de Curcumina se reemplaza el PBS por DMSO al 10% ya que la CUR es menos soluble en PBS. Durante la preparación y almacenamiento de los FS se evita en todo momento su interacción con la luz para evitar fotoblanqueamiento.

### 3.2.6 Proceso de aplicación de la IFD

Los experimentos de IFD se llevaron a cabo con AM, RB y CUR, la concentración y dosis fue diferente para cada FS:

- IFD con AM a 20  $\mu$ M e irradiación de 60 J/cm<sup>2</sup> .
- IFD con AM a 40  $\mu$ M e irradiación de 60 J/cm<sup>2</sup> .
- IFD con RB a 5  $\mu$ M e irradiación de 10 J/cm<sup>2</sup> .



- IFD con RB a 10  $\mu\text{M}$  e irradiación de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  .
- IFD con CUR a 20  $\mu\text{M}$  e irradiación de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  .
- IFD con CUR a 40  $\mu\text{M}$  e irradiación de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  .

Se realizaron 3 repeticiones de cada experimento por triplicado (9 en total para cada tratamiento o control). Para activar el AM se utilizó el dispositivo rojo (emisión en  $\lambda = 630 \text{ nm}$  ) durante 16 minutos y 40 segundos, para el CUR el dispositivo azul (emisión en  $\lambda = 460 \text{ nm}$ ) por 3 minutos y 55 segundos, y para RB, el dispositivo verde (emisión en  $\lambda = 520 \text{ nm}$  ) por 3 minutos y 25 segundos. La cepa a la que se le aplicó IFD con ambas concentraciones de cada FS y dosis de luz fue *C. albicans* CAF2, mientras que la cepa *C. tropicalis* MYA3404 se aplicó la concentración más efectiva resultante de los experimentos con CAF2.

Para la evaluación y análisis de la IFD se propusieron 4 grupos experimentales:

- Control: Grupo sin FS y en ausencia de luz (L-FS-).
- Toxicidad: Grupo con FS y sin luz (L-FS+).
- Luz: Grupo con exposición a luz y sin FS (L+FS-).
- Tratamiento: Grupo de inactivación fotodinámica con FS y exposición de luz (L+FS+).

### **3.2.7 Determinación del número de células viables por unidades formadoras de colonias**

El conteo por unidades formadoras de colonias (UFC) es un método estándar de cuantificación, también llamado conteo aeróbico en placa, usado para determinar el número de células viables (Goldman & Green, 2008; Pettit et al., 2005). El método de UFC se realizó en biopelículas de CAF2, llevando a cabo 3 experimentos por triplicado para el caso de AM, mientras que para RB y CUR se corrieron 2 experimentos por triplicado. Para llevar a cabo este método se raspó cada biopelícula cuidadosamente con la punta de una micropipeta, se realizaron 3 resuspensiones para homogenizar la muestra y se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del pozo de la placa de microtitulación. Posteriormente se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del pozo y se realizaron 6 diluciones seriadas, de la última dilución se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se sembraron por estriado masivo en una placa con SDA. Se incubó durante 24 horas a 30°C y posterior a ello se realizó el conteo directo desde la placa.

### 3.2.8 Ensayo de viabilidad con azul tripán

El ensayo de viabilidad con azul tripán (EVAT) se usó para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular, basándose en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen ciertos colorantes, mientras que las células muertas no. De manera que se realizó un conteo de células viables y no viables de la muestra y a partir de ello se obtuvo un porcentaje de viabilidad mismo que fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Células viables (\%)} = \left( \frac{\text{Número total de células viables}}{\text{Número total de células}} \right) * 100$$

Para evaluar las biopelículas con este ensayo se adaptó el protocolo de Gulati et al. (2018) para enumeración de células con microscopía. Para fines de esta investigación se utilizó un microscopio invertido (Leica DM300B) y se utilizaron 3 pozos por grupo o condición y para la tinción, el colorante azul tripán. Después de aplicar la terapia, se raspó vigorosamente la biopelícula con ayuda de una punta amarilla y micropipeta, así como los bordes del pozo en donde esta se encontraba, seguido de 3 resuspensiones para homogenizar la muestra. Posterior a ello se transfirió la muestra de la biopelícula alterada a un tubo Eppendorf de 2 ml para lavarla por centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos, y se descartó el sobrenadante, después se agregaron 200 µl de PBS para resuspender el pellet, y adicionalmente el azul tripán en la misma proporción. Finalmente, se observó al microscopio en portaobjetos, tomando 3 micrografías por cada pozo por triplicado y por condición, de manera que se obtuvieron un total de 36 imágenes por experimento para el posterior conteo de células.

### 3.2.9 Ensayo de viabilidad con azul tripán en pozo

Se propuso hacer algunas modificaciones al ensayo de viabilidad por azul tripán y así adaptarlo para obtener las micrografías directamente de los pozos que tuvieran biopelículas sin necesidad de rasparlas para resuspender las células y así, minimizar la manipulación de las biopelículas. Denominamos a la propuesta del método como EVAT-Pozo. El procedimiento consistió en hacer un lavado de la biopelícula con 100 µl de PBS después de aplicar la terapia, enseguida, se aplicó 100 µl de azul tripán en cada pozo para luego incubarlo en oscuridad a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se aspiró cuidadosamente la tinción y se tomaron imágenes por duplicado por pozo.

Se utilizó el programa Fiji para poder identificar los bordes de las levaduras de las micrografías obtenidas por este método, haciendo cambios en el umbral de la escala de grises de las imágenes originales, y binarizaron para el conteo.

### 3.2.10 Cuantificación de células

Una vez obtenida las micrografías, la cuantificación de células se llevó a cabo en dos pasos principales: semi automatizado y verificación manual, el proceso se muestra en la Figura 8. Para el primer paso, se realizó un programa en Matlab que contó los centros de las estructuras de la imagen, después de quitar ruido de fondo, obtener el histograma y binarizar la imagen para finalmente guardar una nueva imagen con la identificación de cada estructura. Después de este paso, se procedió a la verificación manual del conteo utilizando Fiji. Fiji es una distribución del software de acceso libre ImageJ, un programa de procesamiento de imágenes, diseñado para imágenes biológicas, desarrollado en el National Institute of Health (NIH) (Schindelin et al., 2012). En Fiji se hace uso del plugin Cell Counter y se cuentan manualmente tanto hifas como levaduras que no fueron contadas en la imagen procesada de Matlab, las células muertas se tiñen con azul tripán y es por ello que es posible identificarlas y contarlas.

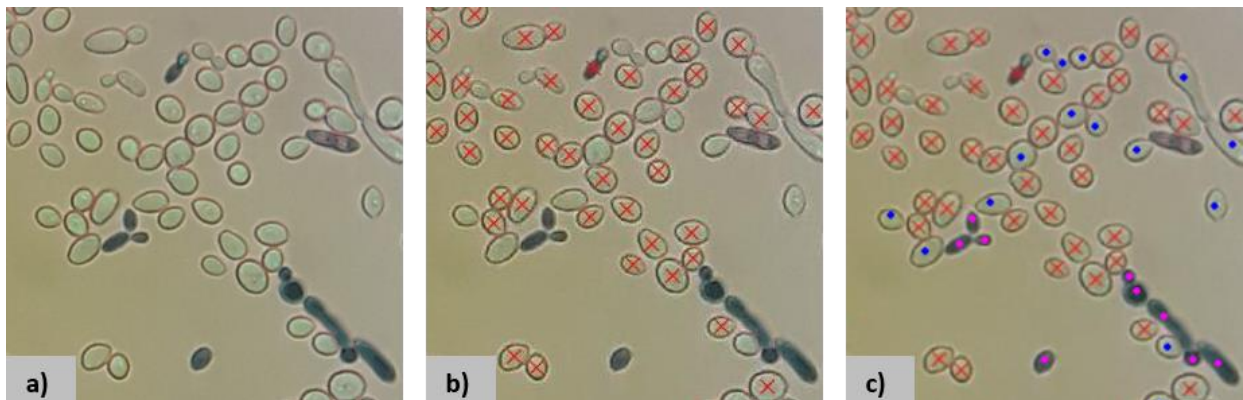


Figura 8. Proceso de cuantificación de células. a) Toma de micrografía de la muestra en el microscopio invertido a 40X, b) procesamiento de imagen en Matlab, c) verificación manual en Fiji.

Una vez escogido el método para evaluar los experimentos a realizar y obtenido las micrografías, se sacaron las medias de los conteos de 3 experimentos por triplicado para cada FS evaluado en cada cepa. Los resultados de los experimentos se expresaron como porcentajes de viabilidad de acuerdo con la fórmula de viabilidad celular.

### 3.2.11 Pruebas de análisis estadístico

Se obtuvieron las medias estadísticas, así como la desviación estándar para cada grupo control experimental y grupo de tratamiento. La comparación estadística entre grupos se realizó mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la prueba de Tukey. Las diferencias entre medias se consideraron como estadísticamente significativo en  $P < 0.05$  (\*), medianamente significativo en  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*)).

### 3.3 Conclusión

Este capítulo presentó de manera específica los métodos que se emplearon en este trabajo experimental, al trabajar con un microorganismo como *Candida*, es necesario saber el correcto manejo y almacenamiento de esta, así como sus condiciones y características de crecimiento. La identificación de cepas se realizó por el método de CHROMagar y las pruebas antifúngicas incluyeron la evaluación de fluconazol y ketoconazol, de manera que se caracterizaran a las cepas tipo y de aislados clínicos. Para la optimización de protocolo se utilizaron las cepas tipo con tres diferentes concentraciones iniciales, mientras que para estandarización de la evaluación del efecto de la IFD se propusieron 3 posibles métodos con el objetivo de seleccionar el más conveniente: el conteo de UFC, la evaluación de la viabilidad celular mediante tinción con azul tripán directo en el pozo de crecimiento y la evaluación de la viabilidad celular mediante tinción con azul tripán resuspendiendo y lavando las células. Este último se seleccionó para las pruebas de IFD, complementado con el conteo celular en Matlab y Fiji. Además, se explicó el método para aplicar la IFD con AM, RB y CUR. El análisis estadístico utilizado para evaluar el efecto de IFD fue ANOVA de 1 factor y como prueba post hoc, la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. El diagrama de la Figura 9 ilustra de forma general, la metodología de este trabajo.

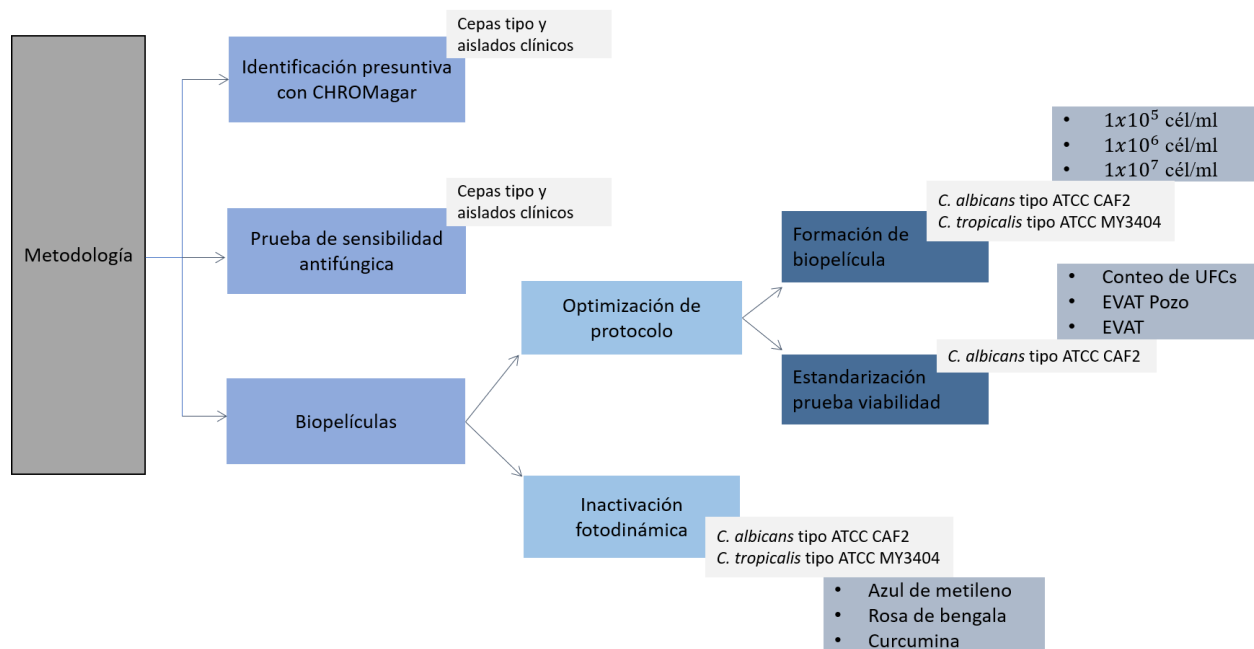


Figura 9. Diagrama de resumen de metodología.

## RESULTADOS

Este capítulo muestra los resultados obtenidos para cada método evaluado y que fue previamente descrito en el capítulo anterior, tanto para la etapa en donde se caracterizan las cepas por su identificación y las pruebas de sensibilidad antifúngica, así como la optimización de protocolos, para crear biopelículas y encontrar el método de evaluación de viabilidad adecuado. Se presentan, además, las gráficas del análisis de resultados de los tratamientos de IFD con sus respectivos controles para cada FSS evaluado, así como las comparaciones entre tratamientos en las biopelículas de *C. albicans* y *C. tropicalis*.

### 4.1 Identificación presuntiva de especies por el método de CHROMagar *Candida*

Se identificaron 9 cepas por CHROMagar *Candida* de acuerdo con las características colorimétricas que indica el fabricante para cada especie. Como se muestra en la imagen de la Figura 10 y la Tabla 5, las cepas CAF2, 19ci y 19D que presentaron una coloración verde se identificaron como *C. albicans*, las cepas MYA3404, 002 y 004 que presentaron coloración azul verdoso a azul metálico se identificaron como *C. tropicalis* y finalmente, las cepas ATCC 2001, 2664 y 129(2) de coloración rosa a lila fueron identificadas como *C. glabrata*.

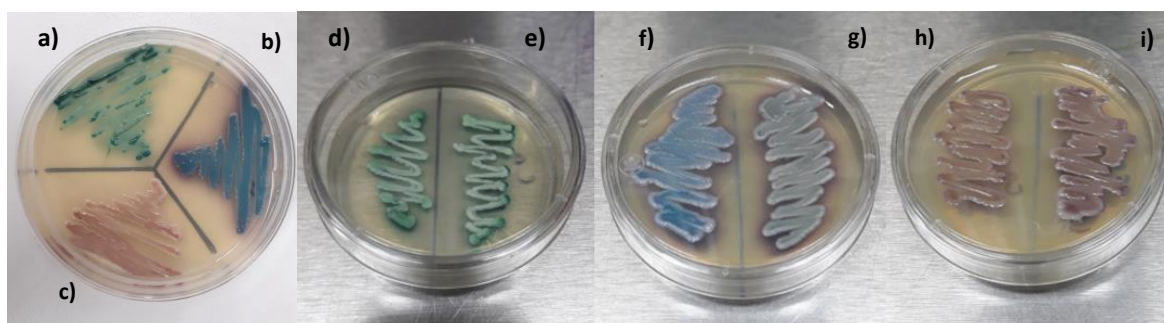


Figura 10. Cultivo de identificación en agar cromogénico CHROMagar. Cepas: a) ATCC CAF2, b) ATCC MYA3404, c) ATCC 2001, d) 19ci, e) 19d, f) 002, g) 004, h) 2664 e i) 129(2).

**Tabla 5***Resultados de identificación por CHROMagar Candida.*

Cepas	Coloración CHROMagar	Identificación
Tipo ATCC MYA3404	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>
002	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>
004	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>
Tipo ATCC CAF2	Verde	<i>C. albicans</i>
19ci	Verde	<i>C. albicans</i>
19cd	Verde	<i>C. albicans</i>
Tipo ATCC 2001	Rosa claro	<i>C. glabrata</i>
2664	Rosa claro	<i>C. glabrata</i>
129 (2)	Rosa claro	<i>C. glabrata</i>

## 4.2 Prueba de sensibilidad antifúngica

Las pruebas de sensibilidad antifúngica en las 9 cepas de *Candida*, arrojaron como resultado que todas las cepas fueron resistentes a ketoconazol y fluconazol. En la Tabla 6 se resumen los resultados, y en las Figuras 11, 12 y 13, se puede observar la ausencia de halo de inhibición en cada cepa lo que evidencia la resistencia a los fármacos mencionados.

**Tabla 6***Resultados de sensibilidad antifúngica*

Cepas \ Antifúngico	<i>C. albicans</i>			<i>C. tropicalis</i>			<i>C. glabrata</i>		
	CAF2	19ci	19D	MYA3404	002	004	ATCC 2001	219(2)	2664
Fluconazol	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ketoconazol	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Notas: S = Sensible; I=Intermedia/Resistente; R=Resistente

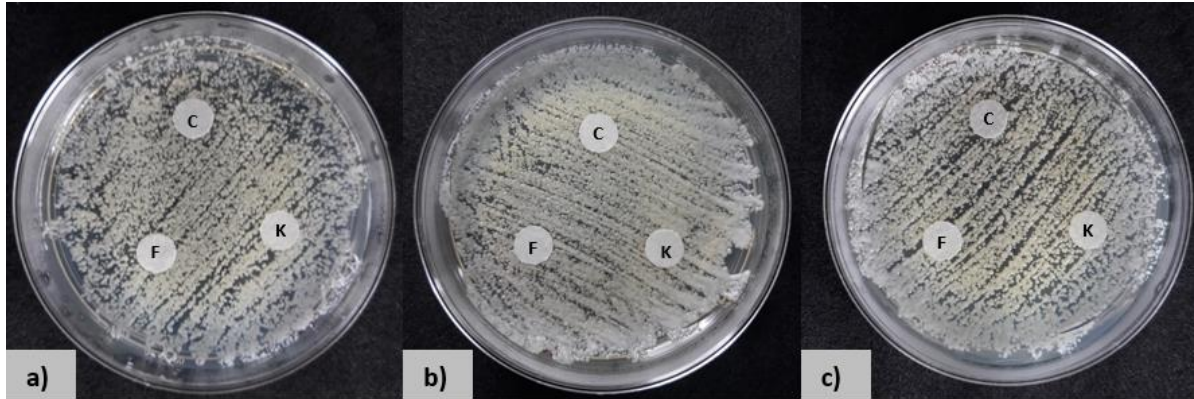


Figura 11. Pruebas antifúngicas en cepas de *C. albicans*. Los discos corresponden a fluconazol (F), ketoconazol (K), y agua estéril como control (C) en las cepas a) ATCC CAF2, b) 19ci y c) 19D.

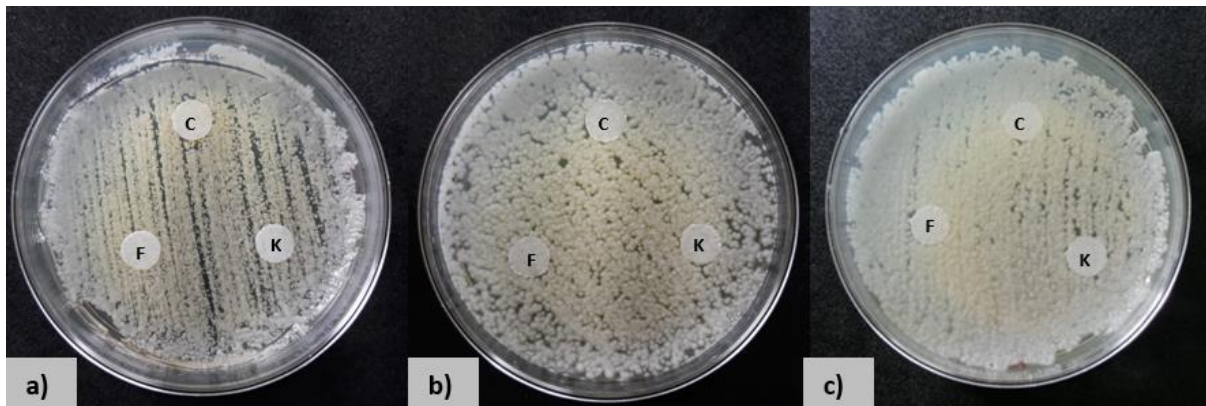


Figura 12. Pruebas antifúngicas en cepas de *C. tropicalis*. Los discos corresponden a fluconazol (F), ketoconazol (K), y agua estéril como control (C) en las cepas a) ATCC MYA3404, b) 002 y c) 004.

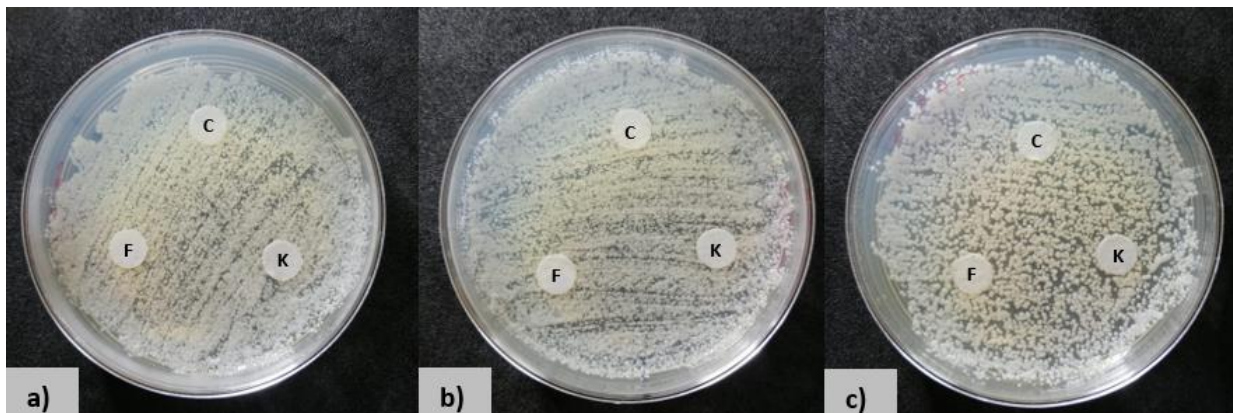


Figura 13. Pruebas antifúngicas en cepas de *C. glabrata*. Los discos corresponden a fluconazol (F), ketoconazol (K), y agua estéril como control (C) en las cepas a) ATCC 2001, b) 129(2) y c) 2664.



### 4.3 Optimización del protocolo de formación de biopelículas

En la optimización del protocolo de formación de biopelículas, se probaron tres diferentes concentraciones de células,  $1 \times 10^5$  cel/ml,  $1 \times 10^6$  cel/ml y  $1 \times 10^7$  cel/ml y dos medios SDB y YPD. Las Figuras 14 y 15 muestran los resultados cualitativos representativos de las micrografías de *C. albicans* tipo y *C. tropicalis* tipo respectivamente, con ambos medios. Se trabajó con la etapa de formación intermedia de las biopelículas a las 24 horas porque en esta etapa la doble capa de levaduras adheridas al sustrato es visible en las micrografías. En el caso de *C. albicans* tipo, se observaron diferencias cualitativas entre las biopelículas formadas por SDB (Figura 14 a, b y c) y YPD (Figura 14 d, e y f). La concentración de  $1 \times 10^5$  cel/ml no logró formar una biopelícula uniforme que cubriera el área del pozo independientemente del medio utilizado. La concentración de  $1 \times 10^6$  cel/ml permitió visualizar una biopelícula un poco más homogénea en YPD que en SDB (Figura 14 b y e). La concentración de  $1 \times 10^7$  cel/ml en SDB formó una biopelícula que recubrió una mayor área a diferencia de las concentraciones anteriores, aunque, fue más heterogénea que la formada por YPD en la misma concentración.

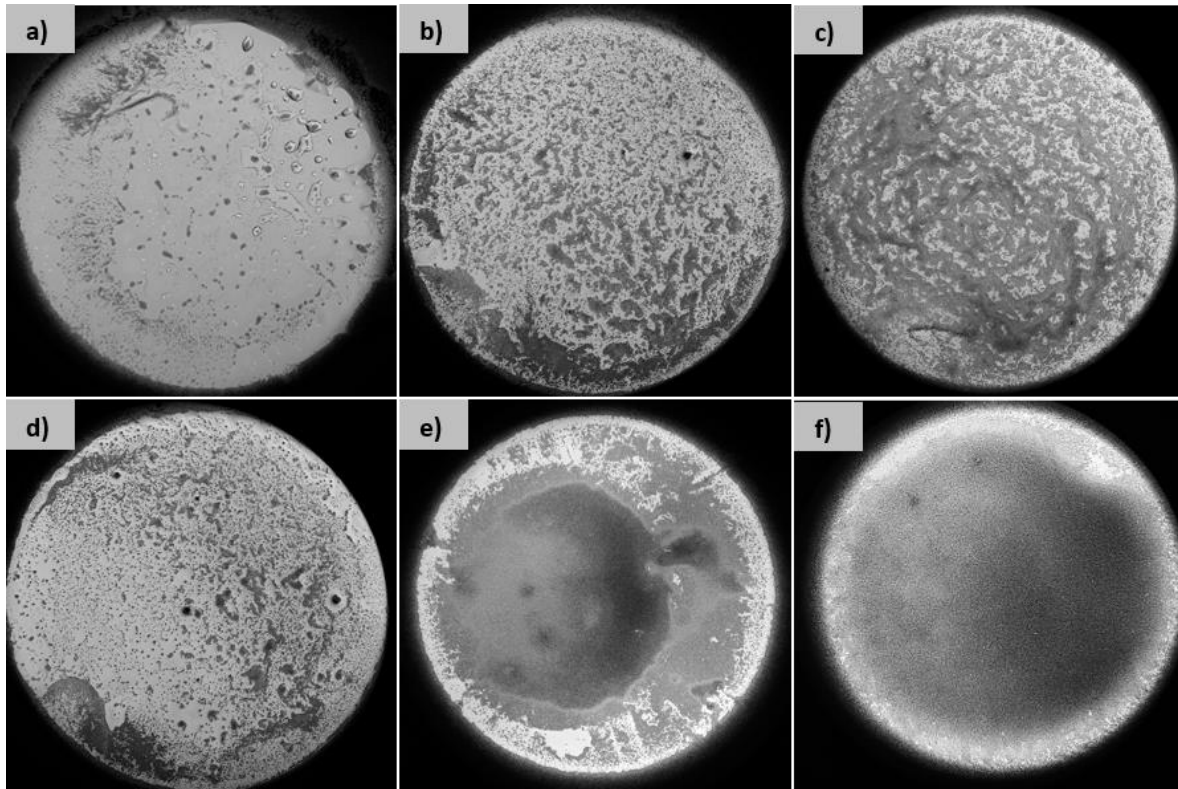


Figura 14. Biopelículas de *C. albicans* tipo en fase intermedia crecidas en pozo a 24 h. Concentración inicial de células a)  $1 \times 10^5$ , b)  $1 \times 10^6$  y c)  $1 \times 10^7$  crecidas en SDB y d)  $1 \times 10^5$ , e)  $1 \times 10^6$  y f)  $1 \times 10^7$  en YPD.

En *C. tropicalis* tipo, se observó que las biopelículas formadas por YPD fueron también más homogéneas que en SDB. Las biopelículas formadas con la concentración de  $1 \times 10^5$  cel/ml (Figura 15 a y d) colonizaron una mayor área del pozo a diferencia de *C. albicans* tipo a la misma concentración. Las biopelículas con la concentración de  $1 \times 10^6$  cel/ml formaron una biopelícula visiblemente más uniforme, aunque se visualizaron áreas del pozo no cubiertas (Figura 15 b y e). La concentración de  $1 \times 10^7$  cel/ml en YPD formó una biopelícula más uniforme y menos heterogénea que en SDB.

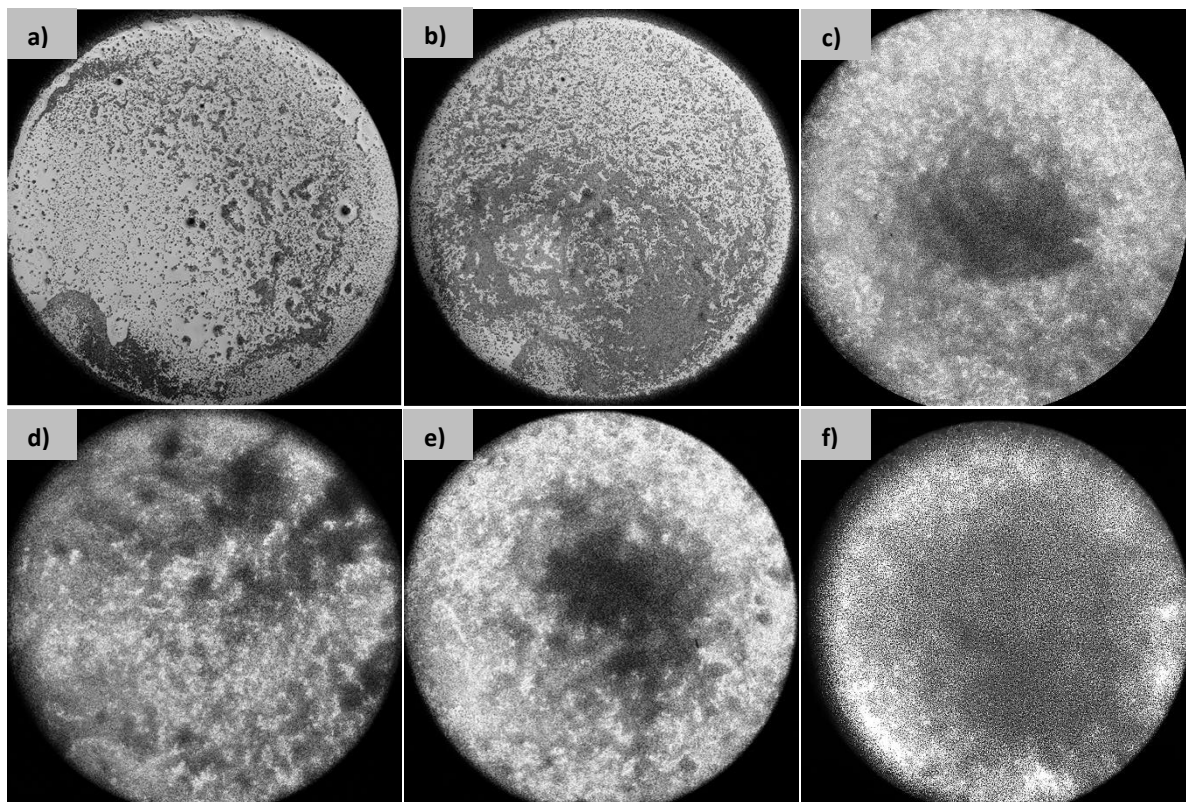


Figura 15. Biopelículas de *C. tropicalis* tipo en fase intermedia crecidas en pozo a 24 h. Concentración inicial cel/ml a)  $1 \times 10^5$ , b)  $1 \times 10^6$  y c)  $1 \times 10^7$  crecidas en SDB y d)  $1 \times 10^5$ , e)  $1 \times 10^6$  y f)  $1 \times 10^7$  en YPD.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se eligió la concentración de  $1 \times 10^7$  cel/ml y el medio YPD para formar las biopelículas de los experimentos de IFD.

#### 4.4 Estandarización del protocolo para la evaluación de la viabilidad en biopelículas de *Candida*

En la estandarización de un protocolo para evaluar la viabilidad de biopelículas de *Candida*, se obtuvieron los siguientes resultados para los tres métodos de evaluación analizados: conteo de UFC, EVAT-Pozo y EVAT.

#### 4.4.1 Conteo de UFC

En la Figura 16 se aprecia el crecimiento de colonias de *Candida* en placa Petri empleadas para el conteo de UFC después de aplicada la IFD a biopelículas de *C. albicans* con AM al 20  $\mu\text{M}$  y una fluencia de 60  $\text{J} / \text{cm}^2$ . En donde se puede observar que casi no hubo diferencia en el número de UFC promedio presentadas entre controles y tratamientos, debido a grandes variaciones entre las repeticiones de un mismo experimento.

Los resultados de los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas de las medias de las UFC incluso dentro de los triplicados de los experimentos de control para cada fotosensibilizador, con una desviación estándar muy grande dentro de los mismos grupos de controles. De los experimentos evaluados, como se muestra en la Tabla 7, los realizados con AM tuvieron más diferencias significativas, que los de CUR. Sin embargo, estos datos no son confiables debido a que los resultados obtenidos aún en los controles fueron muy variables. Por tales motivos, se descartó el método de conteo de UFC para evaluar la IFD en las cepas en estudio.

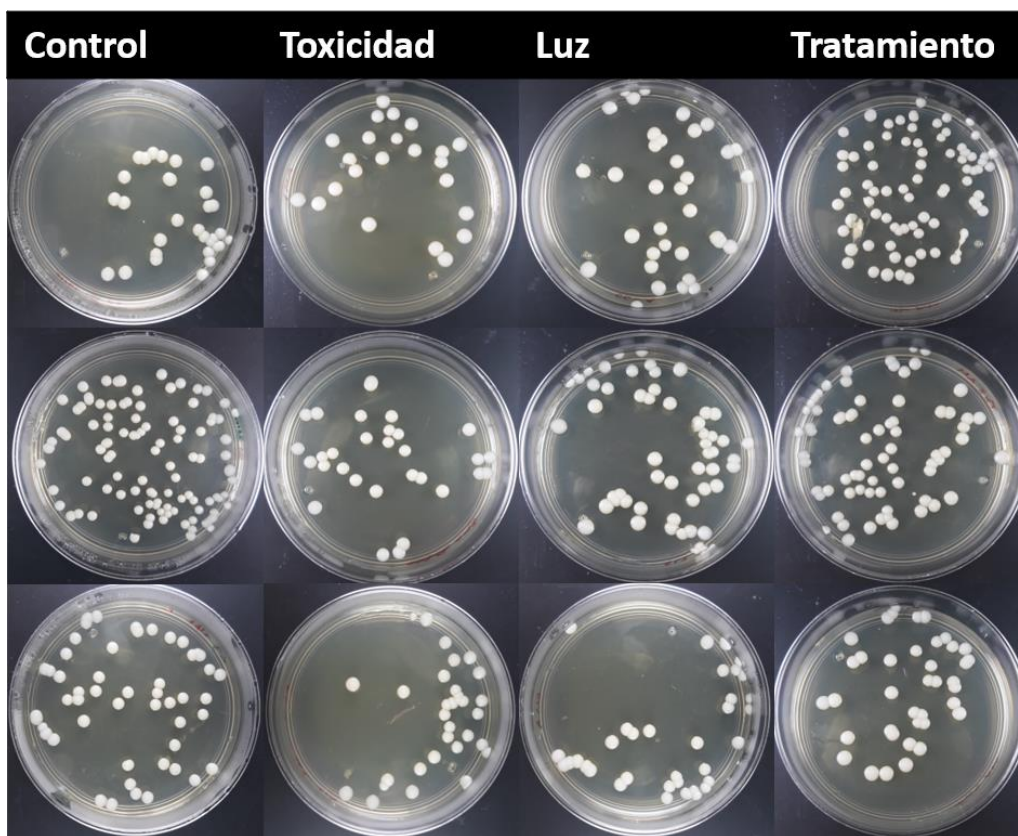


Figura 16. Resultados de UFC después de la IFD con AM a 20  $\mu\text{M}$  y 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

En el ensayo de conteo de UFC se tomó como hipótesis nula que todas las medias fuesen iguales, y un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . En la Tabla 7 se muestran los resultados de las comparaciones en parejas de Tukey para cada tipo de terapia. El número que antecede al grupo en las columnas de factor corresponde al número de experimento.

**Tabla 7**

*Comparación de parejas de Tukey con una confianza del 95% para experimentos de IFD por conteo de UFC*

Experimentos evaluados por UFC	Comparaciones en parejas de Tukey											
	Factor	N	Media	Agrupación	Factor	N	Media	Agrupación	Factor	N	Media	Agrupación
IFD Azul de metileno (3 experimentos por triplicado)	3-FS	3	138.66	A	3-CL	3	118.5	A	3-TX	3	114.71	A
	1-FS	3	84.67	B	1-CL	3	69.71	B	1-TX	3	91.15	A B
	2-FS	3	33.20	C	2-CL	3	46.48	B	2-TX	3	69.5	B
IFD Rosa de bengala (2 experimentos por triplicado)	1-FS	3	99.15	A	1-CL	3	99.32	A	1-TX	3	82.99	A
	2-FS	3	28.9	B	2-CL	3	77.3	A	2-TX	3	23.05	B
IFD Curcumina (2 experimentos por triplicado)	2-FS	3	118.93	A	2-CL	3	128.1	A	2-TX	3	101.79	A
	1-FS	3	93.6	A	1-CL	3	94.9	A	1-TX	3	46.40	B

#### 4.4.2 Resultados del EVAT pozo

El análisis de las biopelículas tratadas con IFD empleando el programa de Fiji no fue exitoso a pesar de los ajustes (cambios en los umbrales de la escala de grises, binarización, aplicación de filtros) que se realizaron para poder identificar los bordes de las levaduras y realizar su conteo directamente sobre la biopelícula. El grosor de la biopelícula más la tinción del azul tripán no hicieron posible la distinción entre células. En la Figura 17 (segunda fila) se muestra una comparación cualitativa de imágenes representativas de uno de los experimentos de IFD con AM al 20  $\mu$ M con sus respectivos controles.

### 4.4.3 Resultados del EVAT

Dado que los resultados del EVAT-Pozo no permitieron hacer el conteo de células, se optó por realizar el EVAT convencional para teñir las células después de ser raspadas y resuspendidas de las biopelículas, con lo cual se obtuvieron concentraciones menores de células y se lograron micrografías que permitieron distinguir las células para su conteo como se observa en la figura 17 (tercera fila), además, la tinción con azul tripán permitió identificar con facilidad cuántas células estaban vivas y cuantas estaban muertas, por lo que este método fue la elección final para evaluar todos los experimentos siguientes de IFD en *C. albicans* y *C. tropicalis*.

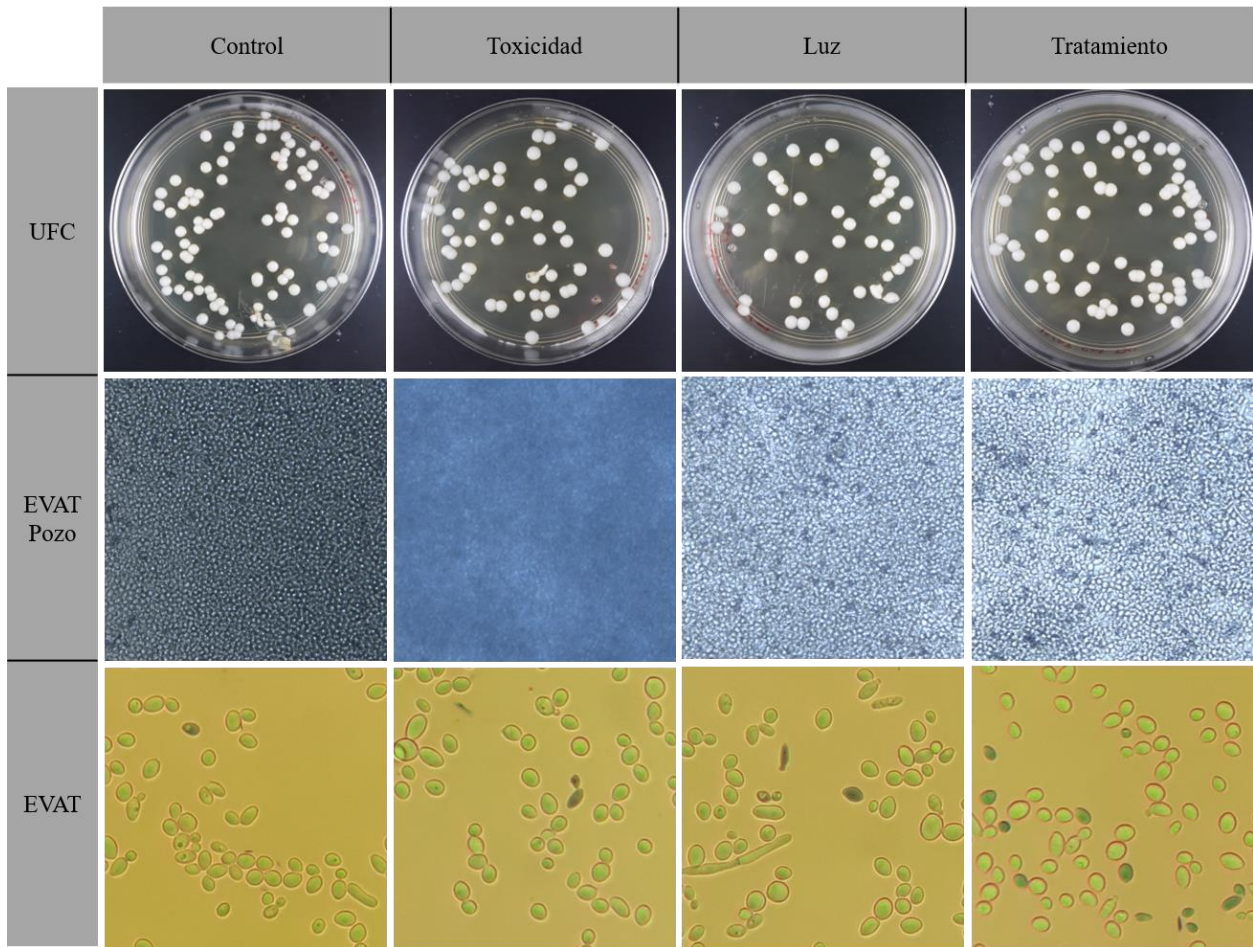


Figura 17. Resultados cualitativos de los métodos de conteo UFC, EVAT-Pozo y EVAT para la optimización del protocolo de evaluación de IFD. Las imágenes ilustran un experimento de IFD con AM al 20  $\mu\text{M}$  e irradiación de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$  aplicado a biopelículas de *C. albicans*.

## 4.5 Resultados de IFD en *C. albicans* tipo

### 4.5.1 Resultados de IFD en *C. albicans* con AM

Los resultados de la IFD *in vitro* con AM a 20  $\mu\text{M}$  y una dosis de luz de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$  en CAF2 tras la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones de Tukey, presentaron diferencias significativas entre el tratamiento de IFD y la toxicidad ( $P < 0.012$ ), así como de luz ( $P < 0.017$ ), mientras que el tratamiento comparado con el control presentó una diferencia medianamente significativa ( $P < 0.008$ ) como se aprecia en la Figura 18.

En contraste, las comparaciones de parejas entre los grupos de control, toxicidad y luz no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ). Por lo que el crecimiento de las biopelículas de CAF2 no se ve afectado por la presencia única de luz, o la ausencia de esta en presencia de AM.

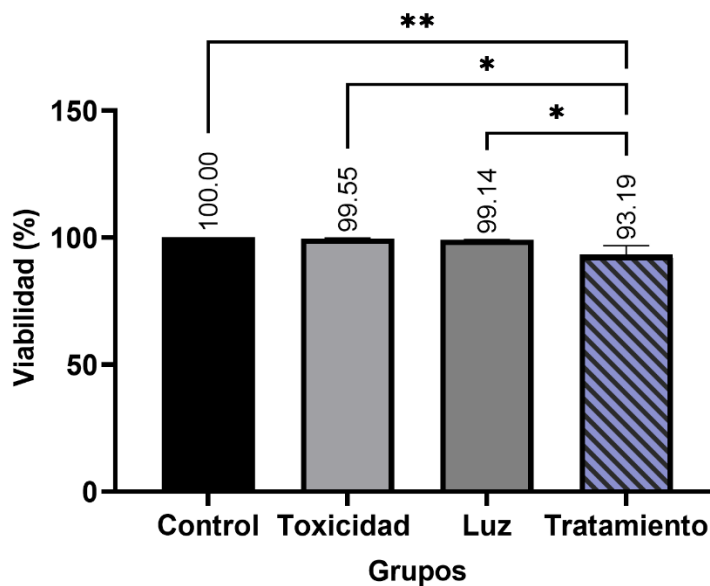


Figura 18. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de *C. albicans* tipo con AM al 20  $\mu\text{M}$  e irradiación de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Se muestran las medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental control, toxicidad, luz y tratamiento. Se muestran diferencias significativas en comparaciones del grupo de tratamiento a toxicidad y luz, y medianamente significativa de tratamiento a control. De acuerdo con ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, se considera estadísticamente significativo a  $P < 0.05$  (\*), medianamente significativo  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo a  $P < 0.001$  (\*\*\*)

Los resultados con AM a 40  $\mu\text{M}$  que se muestran en la Figura 19, utilizando la misma dosis de luz de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ , después de la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones de Tukey, mostraron

diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre el tratamiento de IFD y el control, así como con toxicidad, y luz. La reducción en la viabilidad de las biopelículas después del tratamiento de IFD con AM a  $40 \mu\text{M}$  es mayor que la obtenida con AM a  $20 \mu\text{M}$ . El comportamiento de los grupos de toxicidad y luz fue parecido al grupo control, ya que no se ve afectada la viabilidad de la biopelícula al no mostrar diferencias estadísticamente significativas entre sus comparaciones de parejas.

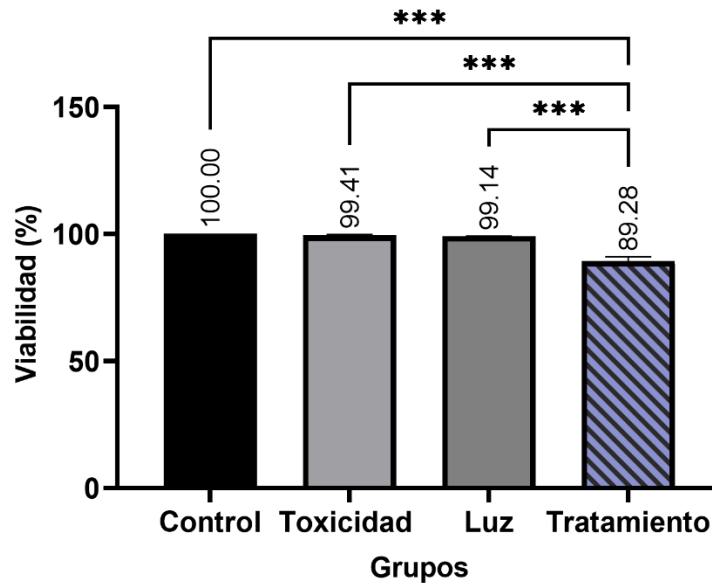


Figura 19. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de *C. albicans* tipo con AM al  $40 \mu\text{M}$  e irradiación de  $60 \text{ J/cm}^2$ . Se presentan las medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental control, toxicidad, luz y tratamiento. Se muestran diferencias altamente significativas en comparaciones del grupo de tratamiento hacia control, toxicidad y luz. De acuerdo con ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, se considera estadísticamente significativo a  $P < 0.05$  (\*), medianamente significativo  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo a  $P < 0.001$  (\*\*\*)

#### 4.5.2 Resultados IFD en *C. albicans* con rosa de bengala

Los resultados de ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones de Tukey en la IFD con RB a  $5 \mu\text{M}$  y una dosis de luz verde de  $10 \text{ J/cm}^2$  que se observan en la Figura 20, mostraron diferencias medianamente significativas entre el tratamiento y el grupo control ( $P < 0.012$ ) aunque no presentaron un alto efecto inhibitorio en el crecimiento de la biopelícula, asimismo se observaron diferencias de significancia estadística del tratamiento con los grupos de toxicidad ( $P < 0.003$ ) y de luz ( $P < 0.017$ ). Al contrario de esto, las comparaciones de parejas entre los grupos de control, toxicidad y luz no mostraron diferencias

estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ), de manera que por estos últimos no se afecta el crecimiento de las biopelículas de la cepa en estudio.

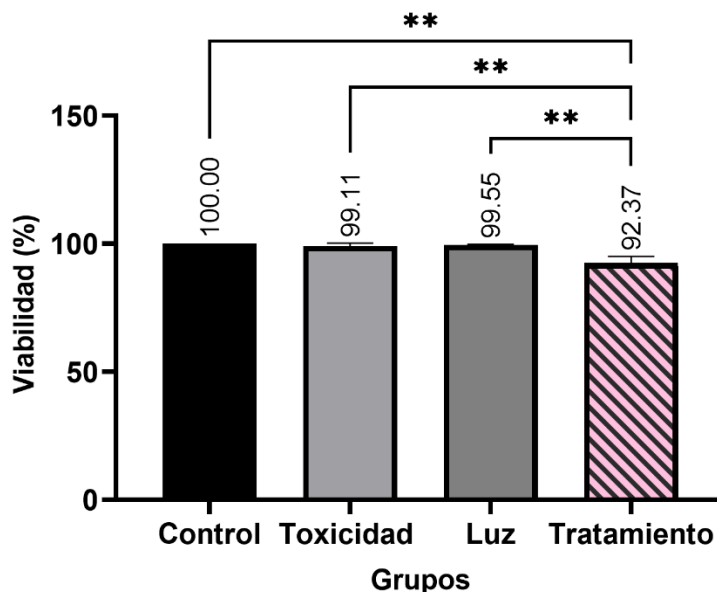


Figura 20. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de *C. albicans* tipo con RB al 5  $\mu\text{M}$  e irradiación de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Se presentan las medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental: control, toxicidad, luz y tratamiento. Se muestran diferencias medianamente significativas en comparaciones del grupo de tratamiento hacia control, toxicidad y luz. De acuerdo con ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, se considera estadísticamente significativo a  $P < 0.05$  (\*), medianamente significativo  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo a  $P < 0.001$  (\*\*\*)

Para la evaluación de la IFD con RB a 10  $\mu\text{M}$ , y luz de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$  se obtuvieron diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) en las parejas de comparación de tratamiento hacia los grupos de control, toxicidad y luz. El porcentaje de viabilidad del tratamiento fue de 83.17%, a diferencia del 92.37% que se logró con la mitad de la concentración de RB. En la Figura 21, se observa también el comportamiento de los grupos de toxicidad y luz que fue similar al grupo control, ya que no hubo una reducción significativa en la viabilidad. No se mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las comparaciones de Tukey de estos últimos grupos.



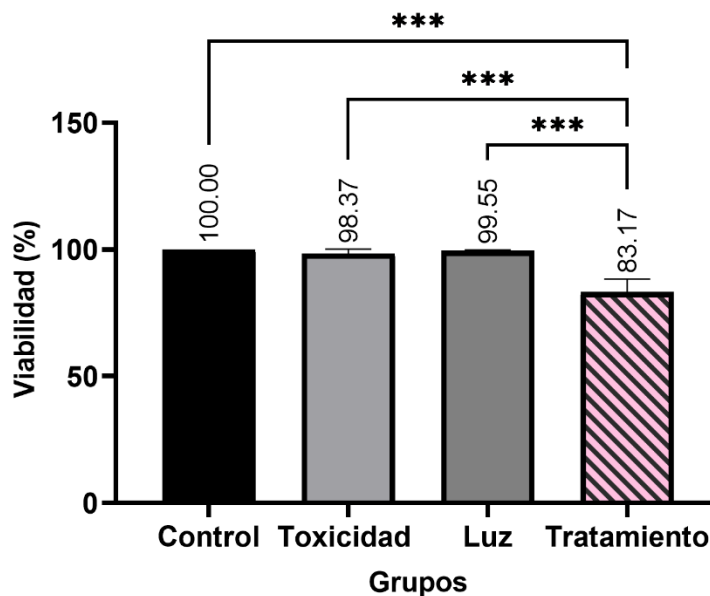


Figura 21. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de *C. albicans* tipo con RB al 10  $\mu\text{M}$  e irradiación de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Se presentan las medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental: control, toxicidad, luz y tratamiento. Se muestran diferencias altamente significativas en comparaciones del grupo de tratamiento hacia control, toxicidad y luz. De acuerdo con ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, se considera estadísticamente significativo a  $P < 0.05$  (\*), medianamente significativo  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo a  $P < 0.001$  (\*\*\*)

#### 4.5.3 Resultados IFD en *C. albicans* con CUR

En la Figura 22 se muestra el resultado de la IFD en el grupo de tratamiento de *C. albicans* tipo con CUR al 20  $\mu\text{M}$  y una dosis de luz azul de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  en donde se muestran las diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.029$ ), con respecto a los grupos controles. El grupo tratamiento en sus demás comparaciones de parejas de Tukey con toxicidad ( $P < 0.048$ ) y luz ( $P < 0.043$ ), también mostró diferencias significativas. El porcentaje de viabilidad del tratamiento fue de 91.90%.

Se observó que, similar a los experimentos anteriores, los grupos tanto de toxicidad del FS y el de luz no afectaron de forma significativa el crecimiento de la cepa ( $P > 0.05$ ).

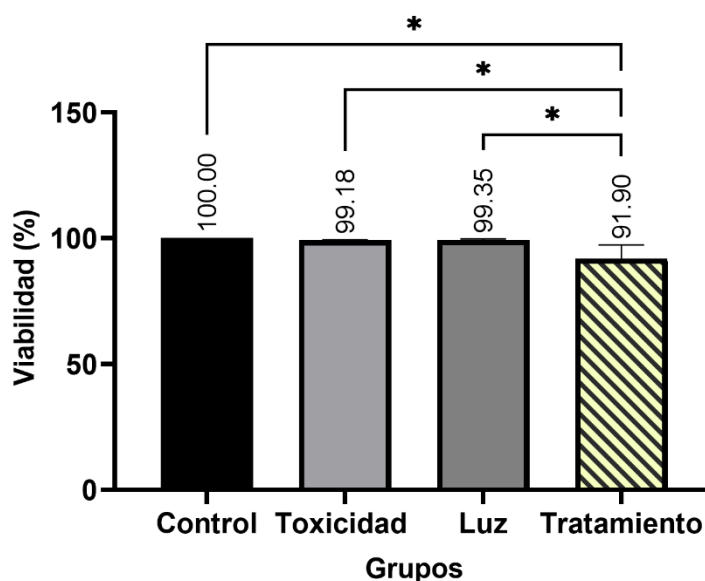


Figura 22. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de *C. albicans* tipo con CUR al 20  $\mu\text{M}$  e irradiación de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Se presentan las medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental: control, toxicidad, luz y tratamiento. Se muestran diferencias significativas en comparaciones del grupo de tratamiento hacia control, toxicidad y luz. De acuerdo con ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, se considera estadísticamente significativo a  $P < 0.05$  (\*), medianamente significativo  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo a  $P < 0.001$  (\*\*\*)

Los resultados con CUR a 40  $\mu\text{M}$ , con dosis de luz de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  mostraron diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre el tratamiento y el grupo control, y medianamente significativas entre tratamiento y luz ( $P < 0.005$ ), y tratamiento y toxicidad ( $P < 0.002$ ) como se muestra en la Figura 23. Las comparaciones de parejas entre los grupos de toxicidad y luz, así como el de control, no mostraron diferencias significativas por lo que no presentan un efecto inhibitorio a las biopelículas ( $P > 0.05$ ).

Como se puede observar, la viabilidad de las biopelículas con CUR 40  $\mu\text{M}$  se ve más afectada con esta concentración que con 20  $\mu\text{M}$ , pues se logró una inhibición del 24.12%.

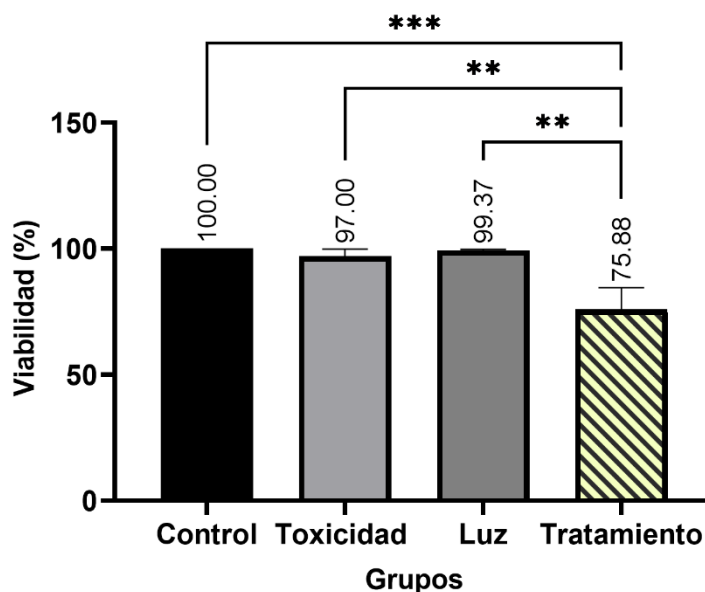


Figura 23. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de *C. albicans* tipo con AM al 40  $\mu\text{M}$  e irradiación de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Se presentan las medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental: control, toxicidad, luz y tratamiento. Se muestran diferencias altamente significativas en comparaciones del grupo de tratamiento hacia control, y medianamente significativas del tratamiento a toxicidad y a luz. De acuerdo con ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, se considera estadísticamente significativo a  $P < 0.05$  (\*), medianamente significativo  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo a  $P < 0.001$  (\*\*\*)

## 4.6. Resultados de IFD en *C. tropicalis* tipo

### 4.6.1 Resultados de IFD en *C. tropicalis* con AM

Los resultados de la IFD *in vitro* con AM a 40  $\mu\text{M}$  y una dosis de luz de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$  que se muestran en la Figura 24, presentaron una diferencia altamente significativa ( $P < 0.001$ ) respecto al control en *C. tropicalis* tipo, y de igual forma lo hicieron para las parejas de tratamiento con toxicidad y tratamiento con luz. El análisis estadístico de ANOVA de una vía y la prueba de Tukey, mostraron además que no hay diferencias significativas en la viabilidad entre los grupos de control tanto de toxicidad y el grupo de solo luz, por lo que no afecta la viabilidad de la cepa. El grupo de tratamiento utilizado permitió un porcentaje de viabilidad del 79.43%, y, por ende, una inhibición de 20.57% de las biopelículas. Las comparaciones de parejas entre los grupos de control, toxicidad y luz no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ).

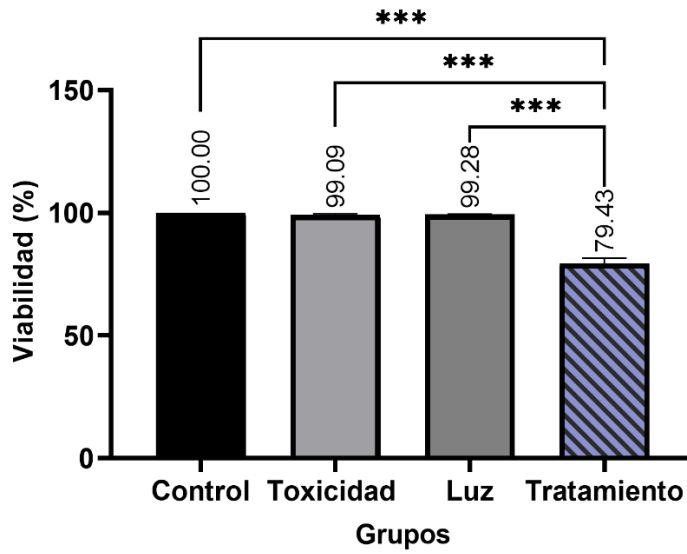


Figura 24. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de *C. tropicalis* tipo con AM al 40  $\mu\text{M}$  e irradiación de 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Se presentan las medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental: control, toxicidad, luz y tratamiento. Se muestran diferencias altamente significativas en todas las comparaciones del grupo de tratamiento hacia control, toxicidad y luz. De acuerdo con ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, se considera estadísticamente significativo a  $P < 0.05$  (\*), medianamente significativo  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo a  $P < 0.001$  (\*\*\*)

#### 4.6.2 Resultados IFD en *C. tropicalis* con rosa de bengala

Los resultados de la IFD con rosa de bengala a 10  $\mu\text{M}$  y una dosis de luz de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  presentaron un porcentaje de viabilidad para las biopelículas de *C. tropicalis* tipo en el grupo de tratamiento de 86.79%, los resultados de ANOVA y Tukey arrojaron que la diferencia entre el tratamiento y el control es altamente significativa ( $P < 0.001$ ). La diferencia fue altamente significativa también entre el tratamiento y los grupos de toxicidad y luz. Como se observa en la Figura 25, no hubo diferencias significativas para las parejas de control y toxicidad, así como de control con luz, por lo que la biopelícula no se vio afectada por estos grupos.

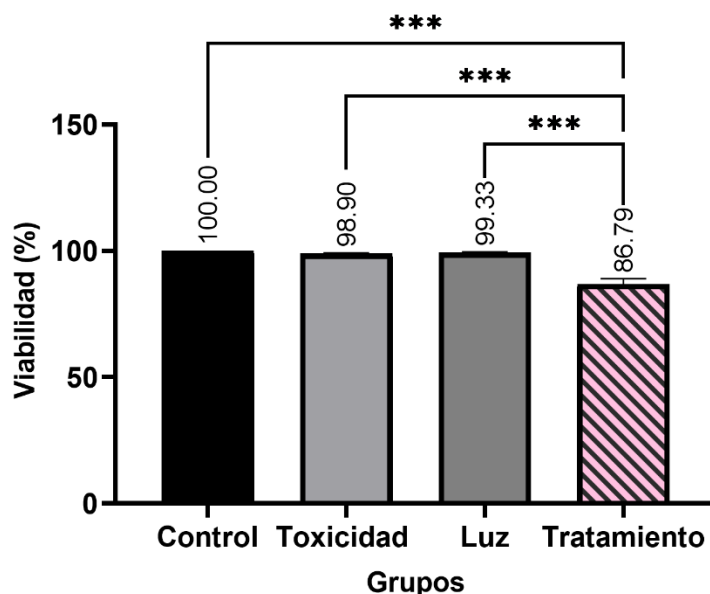


Figura 25. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de *C. tropicalis* tipo con RB al 10  $\mu\text{M}$  e irradiación de 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Se presentan las medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental: control, toxicidad, luz y tratamiento. Se muestran diferencias altamente significativas en todas las comparaciones del grupo de tratamiento hacia control, toxicidad y luz. De acuerdo con ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, se considera estadísticamente significativo a  $P < 0.05$  (\*), medianamente significativo  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo a  $P < 0.001$  (\*\*\*)

#### 4.6.3 Resultados de la IFD en *C. tropicalis* con CUR

Los resultados del análisis estadístico en los experimentos con CUR a 40  $\mu\text{M}$ , con dosis de luz azul a 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  mostraron diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre el tratamiento y el grupo control, así como entre tratamiento y luz ( $P < 0.001$ ), y tratamiento y toxicidad ( $P < 0.001$ ) como se observa en la Figura 26. Las comparaciones de parejas en comportamiento de los grupos de toxicidad y luz, así como el de control, no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Se puede observar que la viabilidad de las biopelículas con IFD empleando CUR 40  $\mu\text{M}$  como FS se ve afectada, inhibiéndola en un 43.43%. Este resultado es el mejor que se obtuvo entre todos los experimentos incluso comparando con *C. albicans*, en donde el porcentaje de inhibición fue de 20.57%.

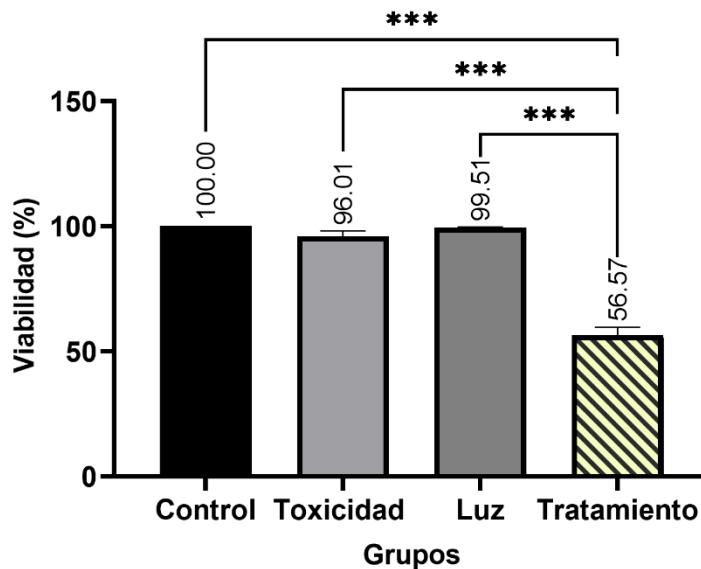


Figura 26. Porcentaje de viabilidad de los grupos evaluados sobre biopelículas de *C. tropicalis* tipo con CUR al 40  $\mu\text{M}$  e irradiación de 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Se presentan las medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental: control, toxicidad, luz y tratamiento. Se muestran diferencias altamente significativas entre el grupo de tratamiento y los grupos de control, toxicidad y luz. De acuerdo con ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, se considera estadísticamente significativo a  $P < 0.05$  (\*), medianamente significativo  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo a  $P < 0.001$  (\*\*\*)

## 4.7 Conclusión

En este capítulo se mostraron los resultados de la serie de experimentos realizados en este trabajo. Se caracterizaron todas las cepas de estudio en cuanto a su identificación y sensibilidad antifúngica. Los resultados de la optimización del protocolo de biopelícula lograron concluir que la concentración ideal y medio para crecer las biopelículas fue  $1 \times 10^7$  cel/ml con YPD. El EVAT fue elegido de tres ensayos analizados para la estandarización del método de evaluación de IFD. Los resultados de la evaluación de los tres FSs fueron presentados, en donde la IFD con *C. albicans* tipo y *C. tropicalis* tipo tuvo un efecto inhibitorio con los FSs: AM, RB y CUR. En el siguiente capítulo se discuten los resultados obtenidos.

---

## DISCUSIONES

---

Las especies del género *Candida* son responsables de la mayoría de las infecciones fúngicas superficiales y diseminadas en los seres humanos, como la candidiasis invasiva que llega a tener una tasa de mortalidad del 40% incluso después de haber suministrado un tratamiento antimicótico (Pappas et al., 2016). Un aspecto importante para aplicar tratamientos en estas infecciones es en primera instancia, la identificación de cepas de *Candida*. En este estudio, se lograron identificar 9 cepas, mediante el método cromogénico de identificación presuntiva CHROMAgar *Candida*, encontrando especies *albicans*, *tropicalis* y *glabrata* en un periodo menor a 48 horas. Si bien existen otros métodos de identificación, el medio cromogénico ofrece ventajas como el reducir tiempos para la identificación, aislamiento y detección de cultivos mixtos además de ser simple y de bajo costo (Ghelardi et al., 2008).

Además de la identificación de especies, en este trabajo, se realizó la prueba de sensibilidad antifúngica con fluconazol y ketoconazol, con lo que se confirmó que las especies tipo de laboratorio y los aislados clínicos utilizados fueron resistentes a ambos antifúngicos. Considerando los resultados de sensibilidad a antifúngicos en las cepas de nuestro estudio podrían esperarse biopelículas aún más resistentes en comparación con biopelículas formadas por cepas que demuestren ser sensibles a azoles.

En nuestra optimización de protocolo, observamos que las biopelículas con aspecto más homogéneo a las 24 h de crecimiento para las cepas tipo CAF2 (*C. albicans*) y MYA3404 (*C. tropicalis*) fueron aquellas formadas con una concentración inicial de  $1 \times 10^7 \text{ cel/ml}$ . Aunque las biopelículas se formaron bajo las mismas condiciones en cuanto al tipo de superficie de crecimiento, temperatura, incubación, y procedimiento de lavado, fue posible observar diferencias cualitativas entre las biopelículas crecidas en SDB y YPD, de manera que YPD pareció favorecer la formación de biopelícula en casi toda el área del pozo con un aspecto menos heterogéneo, sin huecos o espacios como los que se observaron con SDB. Es posible considerar estos resultados normales, pues apoyan la idea de Daniels et al. (2013) de que *C. albicans* puede formar biopelículas con arquitecturas y características funcionales evidentemente diferentes de acuerdo al medio utilizado y su composición, observación también realizada por Kucharíková et al. (2011). Por otro lado, incluso en condiciones de crecimiento similares utilizando el mismo medio, fue posible observar diferencias en el crecimiento de acuerdo con la concentración celular inicial, las micrografías que se obtuvieron mostraron que, a mayor concentración, se obtiene una biopelícula que se adhiere uniformemente cubriendo la mayor área del pozo en el que se crece. Algunos autores han evaluado otros medios de cultivo para el crecimiento de biopelículas, y han reportado que en RPMI (nombre adquirido por Roswell Park Memorial Institute), o YNB (base de nitrógeno de levadura) el crecimiento puede ser

uniformemente mayor que en SDB, asimismo, han demostrado que las biopelículas de *C. albicans* se forman preferentemente en medio YPD con 2% de glucosa que en YNB (Serrano-Fujarte et al., 2015; Gulati et al., 2018). Los resultados de esta investigación proporcionan apoyo a la premisa de Weerasekera et al., (2016) de la necesidad de estandarizar el crecimiento de biopelículas de especies de *Candida* de acuerdo con los medios de cultivo, para así poder facilitar las comparaciones entre laboratorios.

Las diferencias en el crecimiento de biopelículas han hecho importante elegir un método adecuado que permita evaluarlas después del tratamiento. En la búsqueda de un método para evaluar la viabilidad de las biopelículas en este estudio, se probó inicialmente el conteo de UFC, método que ya había sido reportado por otros autores al evaluar IFD en biopelículas (Hsieh et al., 2018; Cernáková et al., 2017; Sousa et al., 2016). Los resultados obtenidos para cada fotosensibilizador mostraron altas variaciones entre los datos en los triplicados de un mismo control, una dificultad similar fue descrita anteriormente por Denega et al. (2019) en donde las altas variaciones de UFC hicieron imposible hacer algún análisis o comparación, adicional a ello, Djais et al. (2020) han señalado que al usar el conteo de UFC, la fracción de células vivas desprendidas puede no ser representativa de la población de una biopelícula inicial y una subpoblación de células de biopelícula puede ser viable pero no cultivable, además de que se incrementa el error al hacer diluciones seriadas para poder realizar el cultivo de UFC. Adicionalmente, es probable que uno de los factores que pueden afectar el recuento de UFC, sean los errores en la manipulación de la biopelícula, como la técnica y cantidad de lavados empleados y el número de diluciones para cultivar la muestra en placa. Debido a las altas diferencias obtenidas dentro de los mismos controles, se descartó el conteo de UFC para evaluar viabilidad en este estudio.

El método tradicional para evaluar viabilidad con azul tripano ha sido ampliamente utilizado y ha demostrado ser efectivo en la tinción de células muertas. La propuesta del ensayo de EVAT-Pozo se hizo con la finalidad de evitar la necesidad de alterar las biopelículas al desprenderlas, no fue algo que tuviera precedente en la literatura revisada, sin embargo, una similitud en la técnica fue reportada por Djais et al., (2020) en donde se utilizó cristal violeta como tinción y OpenCFU para el procesamiento de imágenes. En nuestro estudio para las condiciones de crecimiento utilizadas, los resultados obtenidos no hicieron posible diferenciar entre las células viables y muertas haciendo que el método no fuera apto para contabilizar las levaduras e hifas de las biopelículas ya que su estructura no unidimensional dificultó enfocarla adecuadamente. Se optó por resuspender las células de las biopelículas y utilizar el EVAT estándar, lo que permitió obtener una mayor información sobre como la IFD afectó a la biopelícula.

La mayoría de los estudios de IFD en biopelículas de *Candida* están orientados a la especie *albicans*, siendo necesario el estudio en especies de *Candida* no *albicans*. Nuestro trabajo contribuyó en este aspecto al evaluar el efecto de la IFD en *C. tropicalis*, especie con alta importancia clínica en México. Además, es



la primera vez que se compara el efecto de la IFD con tres FSs, como AM, RB y CUR en biopelículas de una misma cepa de *C. albicans* tipo, y *C. tropicalis* tipo.

Para evaluar el efecto de la IFD en las biopelículas de CAF2 y MYA3404, este trabajo continuó la previa investigación realizada por Torres-Hurtado et al. (2019), Spezzia- Mazzoco et al. (2016) con células planctónicas, en donde se demostró que la IFD con AM y RB redujo significativamente el número de UFC en comparación al control, consiguiendo obtener una inhibición del 99% en el crecimiento de las levaduras de *C. albicans* con AM a 20  $\mu\text{M}$  y 60  $\text{J}/\text{cm}^2$ , así como con RB al 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ . En el caso de CUR se tomó como base la concentración que ha demostrado ser efectiva con células planctónicas en los trabajos del Laboratorio de Terapia Fotodinámica del INAOE. A partir de sus resultados, dichas condiciones de concentración de fotosensibilizadores, así como de dosis de irradiación efectivas en células planctónicas, fueron aplicadas en nuestros experimentos, además de evaluar también una doble concentración del FS.

De acuerdo con la hipótesis planteada para este estudio y al análisis estadístico aplicado, se concluye que la aplicación de IFD con AM, RB y CUR como FSs, puede tener un efecto inhibitorio en las biopelículas de *C. albicans* tipo CAF2 y *C. tropicalis* tipo MY3404, debido a que los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la reducción de la viabilidad por debajo de los grupos controles. En este sentido para ambas cepas evaluadas, el FS con mejor desempeño inhibitorio en la IFD fue CUR con una concentración de 40  $\mu\text{M}$ . Las concentraciones mayores de FS utilizadas en este estudio mostraron un mejor resultado que la concentración menor de los mismos. En el caso particular de *C. albicans* tipo, RB - 10  $\mu\text{M}$  fue mejor que AM- 40  $\mu\text{M}$ , contrario a *C. tropicalis* tipo en donde el AM tuvo mejor desempeño que RB con las concentraciones mencionadas. Si bien la IFD con CUR – 40  $\mu\text{M}$  fue el tratamiento con mejor desempeño para ambas cepas, se evidenció que *C. tropicalis* tipo fue más susceptible que *C. albicans* tipo con reducciones de viabilidad de 43.43% y 24.12% respectivamente. En cuanto a los controles de todas las evaluaciones para ambas cepas, las biopelículas no fueron afectadas individualmente solo por la luz, o por la toxicidad del FS, resultado que también es similar a lo reportado por Ozturk et al. (2020), Cernáková et al. (2017) y Rossoni et al. (2014).

Hasta el momento, solo un trabajo ha realizado la evaluación de AM, RB y CUR en células planctónicas en una misma cepa de *C. albicans*, en donde Soria-Lozano et al. (2015) reportaron que la IFD con AM y RB lograron inhibir *C. albicans*, pero con CUR esta no fue efectiva. Si bien nuestros resultados no inhiben por completo, es evidente que el FS con mayor porcentaje de inhibición en la IFD fue CUR, en comparación a AM y RB. Esto puede ser explicado porque los experimentos de este estudio contemplaron la activación de CUR con una fuente de luz azul, a diferencia de los de Soria-Lozano et al. (2015), en el que utilizaron luz blanca en un rango de 420 nm a 700 nm para abarcar el espectro de absorción de los tres FS, además, para las irradiaciones aplicaron 37  $\text{J}/\text{cm}^2$ , mientras que en nuestro estudio, para la luz roja fue de 60

J/cm<sup>2</sup>, luz verde 10 J/cm<sup>2</sup> y luz azul 20 J/cm<sup>2</sup>. No obstante, nuestros resultados no pueden ser completamente comparables con su estudio en células planctónicas debido a que utilizamos biopelículas. A diferencia de las células planctónicas, las biopelículas tienen una matriz que además de proporcionar soporte estructural y bioquímico a la misma, le confiere protección a antimicrobianos, lo que estaría limitando la penetración de los FSs a través de la matriz extracelular, de manera que estos no alcanzan a las células internas de la biopelícula, tal como ha sido señalado previamente por Sousa et al. (2016). La limitada penetración de FSs explicaría el por qué la IFD en nuestro estudio redujo solo parcialmente la viabilidad de las biopelículas con AM, RB y CUR, independientemente del incremento en la concentración de estos FSs.

Es probable que la CUR haya sido más eficiente en la inhibición de la viabilidad en comparación de AM o RB, porque se ha demostrado que este colorante de origen natural tiene efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antifécciosos (Buzzá et al., 2019), cabe destacar, que en nuestros resultados la toxicidad de CUR no mostró una reducción significativa en la viabilidad por si sola, su efecto inhibitorio fue observable hasta ser utilizada como FS en la IFD. La viabilidad obtenida después de la IFD con CUR en biopelículas de *C. albicans* fue similar a lo reportado por Hsieh et al. (2018) específicamente al utilizar una concentración de 40 µM con una sola irradiación de luz azul, siendo aproximadamente del 70% al 75%, además, para *C. tropicalis* obtuvimos una reducción mayor en la viabilidad ya que esta resultó ser de 56.57%, a diferencia de la obtenida por Hsieh et al. (2018) con CUR a 40 µM o concentraciones menores y exposiciones intermitentes a la luz, y muy similar a su estudio con concentración de 80 µM. Por otro lado, Hsieh et al., demostraron obtener mejores resultados, al aplicar 6 exposiciones intermitentes a la IFD durante 30 min, a diferencia de una sola exposición de 30 min (9 J/cm<sup>2</sup>), mientras que, en nuestro estudio, se aplicó una única dosis de 20 J/cm<sup>2</sup>.

Los resultados observados en este y otros estudios son similares en el aspecto concluyente de que la sola aplicación de IFD en biopelículas, permite una reducción parcial de las mismas. Algunos autores han conseguido disminuir las UFC en biopelículas de *C. albicans* con IFD y AM, Sousa et al. (2016) reportaron una disminución aproximada de dos órdenes de magnitud con AM - 50 µM, mientras que Rossoni et al., (2014), con AM a 300 µM las redujeron en 0,49 log y 2,34 log. Por su parte, Cernáková et al. (2017) con una mayor concentración de AM a 1 mM lograron una inhibición de hasta un 78%, a diferencia de nuestros resultados en *C. albicans* que alcanzaron una inhibición baja del 11% aproximadamente. Silva et al. (2016), reportaron un 33.92% de reducción de UFC con RB a 12.5 µM mientras que Freire et al. (2014) al usar una concentración más alta de 200 µM obtuvieron una reducción de 0.22 log. A diferencia de los trabajos mencionados, los resultados de reducción de viabilidad de nuestro estudio para AM son menores a 20% y para RB, menores a 17% en *C. albicans*, mientras que en *C. tropicalis* fueron aproximadamente del 19% y 13% respectivamente. En la Tabla 8 se muestran estudios realizados con IFD.

**Tabla 8**

*Comparativa de trabajos de IFD en C. albicans y C. tropicalis*

Ref.	Especie	FS	$\lambda$	Dosis	Sustrato	Método evaluación	Resultado
Estudio actual	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>	AM	630 nm	60 J/cm <sup>2</sup>	Placa de poliestireno	EVAT	<i>C. albicans</i> AM 10.72% RB 16.83%
		RB	520 nm	10 J/cm <sup>2</sup>			CUR 24.12%
		CUR	460 nm	20 J/cm <sup>2</sup>			<i>C. tropicalis</i> AM ~75% RB 13.21%
				++			CUR 43.43%
Cernáková et al. (2017)	<i>C. albicans</i>	AM	660 nm	15 a 57 J/cm <sup>2</sup> +	Placa de poliestireno	UFC CSLM	~75-78% de reducción en <i>C. albicans</i> tipo
Hsieh, et al. (2018)	<i>C. albicans</i>	CUR	430 nm	9 J/cm <sup>2</sup> ++	Placa de poliestireno	WST-1 UFC	IFD parcial 100% de inhibición con IFD + miconazol
Davies, et al. (2016)	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i>	TMP - 1363	350 – 800 nm	58.5 J/ cm <sup>2</sup> +++	Discos de polimetilmetacrilato	XTT	Reducción parcial hasta un 64%
Sousa et al. (2016)	<i>C. albicans</i>	AM	660 nm y 630 nm	SN ++	Resina acrílica	UFC	Reducción de dos órdenes de magnitud de UFC
Silva et al. (2016)	<i>C. albicans</i>	RB	532 nm	16.2 J/cm <sup>2</sup> ++	Placa de poliestireno	UFC	Reducción de 33.92% de UFC

Nota: Láser (+), LED (++) o bulbo (+++). XTT y WST-1: Ensayos de viabilidad por reducción de las sales de tetrazolio. XTT (2,3-bis [2-Metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carboxanilida). WST-1 (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]- 1,3-disulfonato de benceno).

La comparación entre investigaciones resulta ser complicada, ya que diferentes factores podrían influir en los resultados obtenidos. Por una parte, la tasa y tiempo de crecimiento que está relacionada a la densidad de células utilizadas para formar la biopelícula, la maduración de la biopelícula, el medio de cultivo, así como las diferencias en la expresión génica (Freire et al., 2014; Nobile & Johnson, 2015; Serrano-Fujarte et al., 2015). Otro factor relacionado puede ser el tipo de material del sustrato en donde se adhiere la biopelícula, ya que se ha reportado que las que se forman en placas de poliestireno son más resistentes a la IFD que las biopelículas formadas en resinas acrílicas (García et al., 2020).

Evidentemente, aún es incierta la dosis correcta de FS y/o luz para erradicar las biopelículas con IFD, como podemos observar en la Tabla 8, todos los trabajos tienen variaciones en la cantidad de irradiación aplicada, así como el tipo de fuente de luz utilizada para la aplicación de IFD.

Hasta el momento ningún estudio ha logrado reportar que la sola aplicación de IFD permita erradicar por completo las biopelículas por *C. albicans* o *C. tropicalis* sin embargo, hay autores que han combinado la IFD con terapias antifúngicas obteniendo la eliminación completa en biopelículas de *C. albicans* (Hsieh et al., 2018; Huang et al., 2018).

Parece posible que la IFD logre tener un papel en el tratamiento de las infecciones por *Candida*, tal vez no como un tratamiento único sino como un tratamiento en sinergia con antifúngicos. Existe todavía una amplia gama de experimentos que realizar, futuras investigaciones podrían centrarse en evaluar el efecto de IFD en biopelículas con diferentes etapas de crecimiento, así como la adherencia a otros tipos de superficies, y en combinación con antifúngicos, además de establecer protocolos universales para las concentraciones de FSs y dosis de luz.

---

## CONCLUSIONES

---

Se identificaron de manera presuntiva las 9 cepas de *Candida* del estudio que correspondieron a 3 cepas por especie, *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* mediante el uso de CHROMagar Candida.

Todas las cepas de *Candida* evaluadas en este estudio presentaron resistencia a ketoconazol (50 µg/ml) y fluconazol (25 µg/ml).

Las condiciones óptimas para crecer biopelículas cualitativamente uniformes fueron: emplear una concentración de  $1 \times 10^7$  cel/ml, cultivar en caldo YPD, incubar durante 24 h utilizando dos periodos de agitación; 120 rpm en la etapa de adhesión y 150 rpm en la etapa intermedia de desarrollo.

El método seleccionado para la evaluación de viabilidad en biopelículas fue EVAT debido a que permitió diferenciar y contabilizar células muertas y vivas.

Todos los tratamientos de IFD presentaron diferencias estadísticamente significativas en comparación a los grupos de control, toxicidad y luz.

La IFD en biopelículas de *C. albicans* con AM y RB con las dosis y concentraciones evaluadas, presentaron una inhibición parcial muy similar entre ellas, después de la primera hora de tratamiento, en donde la viabilidad disminuyó hasta un rango del 83% - 93%, sin embargo, la IFD con CUR disminuyó hasta un 75.88%.

A partir de los resultados de IFD en *C. albicans*, las dosis seleccionadas para *C. tropicalis* fueron AM 40 µM (60 J/cm<sup>2</sup>), RB 10 µM (10 J/cm<sup>2</sup>) y CUR 40 µM (20 J/cm<sup>2</sup>).

Los resultados de la IFD en biopelículas de *C. tropicalis* mostraron que la IFD con CUR tuvo un mejor efecto de reducción de la viabilidad a 56.57% en comparación con AM de 79.43% y RB de 86.79% en la primera hora después del tratamiento.

La IFD con AM a 40 µM tuvo un efecto inhibitorio parcial ligeramente mayor en *C. tropicalis* (79%) que en *C. albicans* (89%), mientras que en el caso de IFD con RB a 10 µM, el efecto inhibitorio parcial fue muy similar en ambas cepas (*C. albicans* 83% y *C. tropicalis* 86%).

El FS con mejor desempeño en la IFD para reducir la viabilidad tanto en *C. albicans* como en *C. tropicalis* fue CUR a una concentración de 40 µM y dosis de luz azul de 20 J/cm<sup>2</sup>, reduciendo la viabilidad de sus biopelículas a un 75.88% y 56.57% respectivamente.

## 6.1 Trabajo a futuro

Para completar los estudios de sensibilidad antifúngica, se sugiere realizar pruebas con otros antifúngicos como las equinocandinas y anfotericinas que también han sido recomendados en los tratamientos para candidiasis.

Analizar el efecto de la IFD en biopelículas formadas por cepas de aislados clínicos resistentes a antifúngicos en diferentes materiales asociados a la composición de dispositivos médicos como catéteres y prótesis.

Evaluar la IFD en conjunto con antifúngicos como un tratamiento complementario.

Estudiar la aplicación de la IFD en otras etapas de formación de biopelículas.

Evaluar la IFD *in vivo* utilizando modelos animales para el tratamiento de candidiasis.

---

## REFERENCIAS

---

- Abdel-Kader, M. H. (2014). History of Photodynamic Therapy. En M. H. Abdel-Kader (Ed.), *Photodynamic Therapy: From Theory to Application* (pp. 3-22). Springer.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-39629-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39629-8_1)
- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347-364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>
- Adler-Moore, J., Lewis, R. E., Brüggemann, R. J. M., Rijnders, B. J. A., Groll, A. H., & Walsh, T. J. (2019). Preclinical Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Antifungal Activity of Liposomal Amphotericin B. *Clinical Infectious Diseases*, 68(Supplement\_4), S244-S259. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz064>
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250-281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>
- Arteaga, M. A. (2003). *Micosis Humanas. Procedimientos diagnósticos. Exámenes directos*. Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Baltazar, L. M., Ray, A., Santos, D. A., Cisalpino, P. S., Friedman, A. J., & Nosanchuk, J. D. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00202>
- Broekgaarden, M., Weijer, R., van Gulik, T. M., Hamblin, M. R., & Heger, M. (2015). Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: A molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer Metastasis Reviews*, 34(4), 643-690.  
<https://doi.org/10.1007/s10555-015-9588-7>
- Buzzá, H. H., Fialho de Freitas, L. C., Moriyama, L. T., Teixeira Rosa, R. G., Bagnato, V. S., & Kurachi, C. (2019). Vascular Effects of Photodynamic Therapy with Curcumin in a Chorioallantoic Membrane Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1084.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20051084>
- Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327-335. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7)
- Calin, M. A., & Parasca, S. V. (2009). Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers in Medical Science*, 24(3), 453-460. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0588-5>
- Carmello, J. C., Alves, F., Ribeiro, A. P. D., Basso, F. G., Costa, C. de S., Tedesco, A. C., Primo, F. L., Mima, E. G., & Pavarina, A. C. (2016). In vivo photodynamic inactivation of *Candida albicans* using chloro-aluminum phthalocyanine. *Oral Diseases*, 22(5), 415-422.  
<https://doi.org/10.1111/odi.12466>

- Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Frontiers in Medicine*, 5, 28. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>
- Cernáková, L., Dižová, S., & Bujdáková, H. (2017). Employment of methylene blue irradiated with laser light source in photodynamic inactivation of biofilm formed by *Candida albicans* strain resistant to fluconazole. *Medical Mycology*, 55(7), 748-753. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw137>
- Chandra, J., & Mukherjee, P. K. (2015). Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. *Microbiology Spectrum*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015>
- Cieplik, F., Deng, D., Crielgaard, W., Buchalla, W., Hellwig, E., Al-Ahmad, A., & Maisch, T. (2018). Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(5), 571-589. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>
- Costa, A. C. B. P., Rasteiro, V. M. C., Pereira, C. A., Rossoni, R. D., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2012). The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*: Photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses*, 55(1), 56-63. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02042.x>
- Daniels, K. J., Park, Y.-N., Srikantha, T., Pujol, C., & Soll, D. R. (2013). Impact of Environmental Conditions on the Form and Function of *Candida albicans* Biofilms. *Eukaryotic Cell*, 12(10), 1389-1402. <https://doi.org/10.1128/EC.00127-13>
- Davies, A., Gebremedhin, S., Yee, M., Padilla, R. J., Duzgunes, N., Konopka, K., & Dorocka-Bobkowska, B. (2016). Cationic porphyrin-mediated photodynamic inactivation of *Candida* biofilms and the effect of miconazole. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 67, 777-783.
- Del Pozo, J. L., & Cantón, E. (2016). Candidiasis asociada a biopelículas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(3), 176-183. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2015.06.004>
- Denega, I., d'Enfert, C., & Bachellier-Bassi, S. (2019). *Candida albicans* Biofilms Are Generally Devoid of Persister Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.01979-18>
- Djais, A. A., Jemmy, Putri, N., Rahmania Putri, A., & Angky Soekanto, S. (2020). Description of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, and *Candida albicans* biofilms after exposure to propolis dentifrice by using OpenCFU method. *The Saudi Dental Journal*, 32(3), 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2019.08.003>
- Donlan, R. M. (2001). Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387-1392. <https://doi.org/10.1086/322972>
- Donnelly, R. F., McCarron, P. A., & Tunney, M. M. (2008). Antifungal photodynamic therapy. *Microbiological Research*, 163(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.08.001>
- dos Santos, A. F., Terra, L. F., Wailemann, R. A. M., Oliveira, T. C., Gomes, V. de M., Mineiro, M. F., Meotti, F. C., Bruni-Cardoso, A., Baptista, M. S., & Labriola, L. (2017). Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 17(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3179-7>



- Dovigo, L. N., Carmello, J. C., de Souza Costa, C. A., Vergani, C. E., Brunetti, I. L., Bagnato, V. S., & Pavarina, A. C. (2013). Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Medical Mycology*, *51*(3), 243-251. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.714081>
- Freire, F., Costa, A. C. B. P., Pereira, C. A., Beltrame Junior, M., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2014). Comparison of the effect of rose bengal- and eosin Y-mediated photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. *Lasers in Medical Science*, *29*(3), 949-955. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1435-x>
- Galán-Ladero, M. Á., Blanco-Blanco, M. T., Fernández-Calderón, M. C., Lucio, L., Gutiérrez-Martín, Y., Blanco, M. T., & Pérez-Giraldo, C. (2019). *Candida tropicalis* biofilm formation and expression levels of the CTRG ALS-like genes in sessile cells. *Yeast*, *36*(2), 107-115. <https://doi.org/10.1002/yea.3370>
- Galán-Ladero, M. A., Blanco-Blanco, M. T., Hurtado, C., Pérez-Giraldo, C., Blanco, M. T., & Gómez-García, A. C. (2013). Determination of biofilm production by *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients and its relation to cellular surface hydrophobicity, plastic adherence and filamentation ability. *Yeast*, *30*(9), 331-339. <https://doi.org/10.1002/yea.2965>
- Garcia, B. A., Panariello, B. H. D., de Freitas Pontes, K. M., & Duarte, S. (2020). Regimen and different surfaces interfere with photodynamic therapy on *Candida albicans* biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, *178*, 106080. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106080>
- García-Sampedro, A., Tabero, A., Mahamed, I., & Acedo, P. (2019). Multimodal use of the porphyrin TMPyP: From cancer therapy to antimicrobial applications. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, *23*(01n02), 11-27. <https://doi.org/10.1142/S1088424619500111>
- Ghelardi, E., Pichierri, G., Castagna, B., Barnini, S., Tavanti, A., & Campa, M. (2008). Efficacy of Chromogenic *Candida* Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(2), 141-147. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01872.x>
- Goldman, E., & Green, L. H. (2008). *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press.
- Gomer, C. J. (Ed.). (2010). *Photodynamic therapy: Methods and protocols*. Humana Press.
- Graciano, T. B., Coutinho, T. S., Cressoni, C. B., Freitas, C. de P., Pierre, M. B. R., de Lima Pereira, S. A., Shimano, M. M., Cristina da Cunha Frange, R., & Garcia, M. T. J. (2015). Using chitosan gels as a toluidine blue O delivery system for photodynamic therapy of buccal cancer: In vitro and in vivo studies. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *12*(1), 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.11.003>
- Gulati, M., Lohse, M. B., Ennis, C. L., Gonzalez, R. E., Perry, A. M., Bapat, P., Arevalo, A. V., Rodriguez, D. L., & Nobile, C. J. (2018). In Vitro Culturing and Screening of *Candida albicans* Biofilms. *Current protocols in microbiology*, *50*(1), e60. <https://doi.org/10.1002/cpmc.60>

- Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: Development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, *18*(5), 310-321.  
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
- Harris, F., & Pierpoint, L. (2012). Photodynamic therapy based on 5-aminolevulinic acid and its use as an antimicrobial Agent. *Medicinal Research Reviews*, *32*(6), 1292-1327.  
<https://doi.org/10.1002/med.20251>
- Horvath, L. L., Hospenthal, D. R., Murray, C. K., & Dooley, D. P. (2003). Direct Isolation of *Candida* spp. From Blood Cultures on the Chromogenic Medium CHROMagar *Candida*. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(6), 2629. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2629-2632.2003>
- Hsieh, Y.-H., Zhang, J.-H., Chuang, W.-C., Yu, K.-H., Huang, X.-B., Lee, Y.-C., & Lee, C.-I. (2018). An in Vitro Study on the Effect of Combined Treatment with Photodynamic and Chemical Therapies on *Candida albicans*. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2), 337.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19020337>
- Huang, M.-C., Shen, M., Huang, Y.-J., Lin, H.-C., & Chen, C.-T. (2018). Photodynamic Inactivation Potentiates the Susceptibility of Antifungal Agents against the Planktonic and Biofilm Cells of *Candida albicans*. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2), 434.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19020434>
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMA*, *81*(1), 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Kashef, N., Huang, Y.-Y., & Hamblin, M. R. (2017). Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. *Nanophotonics*, *6*(5), 853-879. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0189>
- Kojic, E. M., & Darouiche, R. O. (2004). *Candida* Infections of Medical Devices. *Clinical Microbiology Reviews*, *17*(2), 255-267. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.255-267.2004>
- Kolter, R., & Greenberg, E. P. (2006). The superficial life of microbes. *Nature*, *441*(7091), 300-302.  
<https://doi.org/10.1038/441300a>
- Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G., & Panthaki, M. H. (2010). *Candida tropicalis*: Its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, *59*(8), 873-880. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.013227-0>
- Kucharíková, S., Tourneu, H., Lagrou, K., Van Dijck, P., & Bujdáková, H. (2011). Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *Journal of Medical Microbiology*, *60*(9), 1261-1269. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.032037-0>
- Kuse, E.-R., Chetchotisakd, P., da Cunha, C. A., Ruhnke, M., Barrios, C., Raghunadharao, D., Sekhon, J. S., Freire, A., Ramasubramanian, V., Demeyer, I., Nucci, M., Leelarasamee, A., Jacobs, F., Decruyenaere, J., Pittet, D., Ullmann, A. J., Ostrosky-Zeichner, L., Lortholary, O., Koblinger, S.,

- ... Micafungin Invasive Candidiasis Working Group. (2007). Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: A phase III randomised double-blind trial. *Lancet (London, England)*, 369(9572), 1519-1527. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60605-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60605-9)
- Lee, Y.-M., Kim, D. Y., Kim, Y. J., Park, K.-H., & Lee, M. S. (2019). Clinical impacts of delayed central venous catheter removal according to the severity of comorbidities in patients with candidaemia. *Journal of Hospital Infection*, 103(4), 420-427. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.08.018>
- Lewis, K. (2001). Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999-1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>
- Liang, Y., Lu, L.-M., Chen, Y., & Lin, Y.-K. (2016). Photodynamic therapy as an antifungal treatment (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(1), 23-27. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3336>
- Luo, G., & Mitchell, T. G. (2002). Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2860-2865. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2860-2865.2002>
- Makdoui, K., & Bäckman, A. (2016). Photodynamic UVA-riboflavin bacterial elimination in antibiotic-resistant bacteria. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 44(7), 582-586. <https://doi.org/10.1111/ceo.12723>
- Manoil, D., Filieri, A., Gameiro, C., Lange, N., Schrenzel, J., Wataha, J. C., & Bouillaguet, S. (2014). Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 11(3), 372-379. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.06.003>
- Marcos-Zambrano, L. J., Escribano, P., Bouza, E., & Guinea, J. (2014). Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 304(8), 1192-1198. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.012>
- McCarty, T. P., & Pappas, P. G. (2016). Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 103-124. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.013>
- McCullough, M. J., Ross, B. C., & Reade, P. C. (1996). *Candida albicans*: A review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 25(2), 136-144. [https://doi.org/10.1016/S0901-5027\(96\)80060-9](https://doi.org/10.1016/S0901-5027(96)80060-9)
- McManus, B. A., & Coleman, D. C. (2014). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 166-178. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.008>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2017). *Microbiología médica*. Elsevier Health Sciences.

- Nett, J. E. (2016). The Host's Reply to Candida Biofilm. *Pathogens*, 5(1), 33. <https://doi.org/10.3390/pathogens5010033>
- Nett, J. E., Zarnowski, R., Cabezas-Olcoz, J., Brooks, E. G., Bernhardt, J., Marchillo, K., Mosher, D. F., & Andes, D. R. (2015). Host Contributions to Construction of Three Device-Associated *Candida albicans* Biofilms. *Infection and Immunity*, 83(12), 4630-4638. <https://doi.org/10.1128/IAI.00931-15>
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual review of microbiology*, 69, 71-92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
- Nucci, M., & Marr, K. A. (2005). Emerging Fungal Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 41(4), 521-526. <https://doi.org/10.1086/432060>
- Nyman, E. S., & Hynninen, P. H. (2004). Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 73(1), 1-28. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002>
- Odds, F. C. (2003). Antifungal agents: Their diversity and increasing sophistication. *Mycologist*, 17(2), 51-55. [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(03\)00206-4](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(03)00206-4)
- Ozturk, I., Tunçel, A., Yurt, F., Biyiklioglu, Z., Ince, M., & Ocakoglu, K. (2020). Antifungal photodynamic activities of phthalocyanine derivatives on *Candida albicans*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 30, 101715. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101715>
- Panzarini, E., Inguscio, V., Fimia, G. M., & Dini, L. (2014). Rose Bengal Acetate PhotoDynamic Therapy (RBAC-PDT) Induces Exposure and Release of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human HeLa Cells. *PLOS ONE*, 9(8), e105778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105778>
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D. (2015). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, civ933. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
- Petrikos, G., & Skiada, A. (2007). Recent advances in antifungal chemotherapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 108-117. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.03.009>
- Pettit, R. K., Weber, C. A., Kean, M. J., Hoffmann, H., Pettit, G. R., Tan, R., Franks, K. S., & Horton, M. L. (2005). Microplate Alamar Blue Assay for *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Susceptibility Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2612-2617. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2612-2617.2005>

- Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., & Kiesslich, T. (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*, 24(2), 259-268. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>
- Queiroz-Telles, F., Berezin, E., Leverger, G., Freire, A., Vyver, A. van der, Chotpitayasunondh, T., Konja, J., Diekmann-Berndt, H., Koblinger, S., Groll, A., & Arrieta, A. (2008). Micafungin Versus Liposomal Amphotericin B for Pediatric Patients With Invasive Candidiasis: Substudy of a Randomized Double-Blind Trial. *The Pediatric infectious disease journal*. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31817275e6>
- Ramage, G., Martínez, J. P., & López-Ribot, J. L. (2006). Candida biofilms on implanted biomaterials: A clinically significant problem. *FEMS Yeast Research*, 6(7), 979-986. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00117.x>
- Reyes-Montes, M. del R., Duarte-Escalante, E., Martínez-Herrera, E., Acosta-Altamirano, G., & Frías-De León, M. G. (2017). Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(4), 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.05.001>
- Rossoni, R. D., Barbosa, J. O., de Oliveira, F. E., de Oliveira, L. D., Jorge, A. O. C., & Junqueira, J. C. (2014). Biofilms of *Candida albicans* serotypes A and B differ in their sensitivity to photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science*, 29(5), 1679-1684. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1570-z>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schlottfeldt, F. dos S., Fernandes, S. M., Martins, D. M., Cordeiro, P., Fonseca, C. D. da, Watanabe, M., Vattimo, M. de F. F., Schlottfeldt, F. dos S., Fernandes, S. M., Martins, D. M., Cordeiro, P., Fonseca, C. D. da, Watanabe, M., & Vattimo, M. de F. F. (2015). Prevenção da nefrotoxicidade da anfotericina B por meio do uso de fitomedicamentos. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 49(SPE), 74-79. <https://doi.org/10.1590/S0080-623420150000700011>
- Sebrão, C. C. N., Bezerra, A. G., de França, P. H. C., Ferreira, L. E., & Westphalen, V. P. D. (2017). Comparison of the Efficiency of Rose Bengal and Methylene Blue as Photosensitizers in Photodynamic Therapy Techniques for *Enterococcus faecalis* Inactivation. *Photomedicine and Laser Surgery*, 35(1), 18-23. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.3995>
- Seervai, R. N. H., Jones, S. K., Hirakawa, M. P., Porman, A. M., & Bennett, R. J. (2013). Parasexuality and Ploidy Change in *Candida tropicalis*. *Eukaryotic Cell*, 12(12), 1629-1640. <https://doi.org/10.1128/EC.00128-13>
- Serrano-Fujarte, I., López-Romero, E., Reyna-López, G. E., Martínez-Gámez, M. A., Vega-González, A., & Cuéllar-Cruz, M. (2015). Influence of Culture Media on Biofilm Formation by *Candida* Species and Response of Sessile Cells to Antifungals and Oxidative Stress [Research Article]. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/783639>

- Silva, M. P., dos Santos, T. A., de Barros, P. P., de Camargo Ribeiro, F., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2016). Action of antimicrobial photodynamic therapy on heterotypic biofilm: *Candida albicans* and *Bacillus atrophaeus*. *Lasers in Medical Science*, *31*(4), 605-610. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1876-0>
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2011). Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology*, *19*(5), 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.02.003>
- Silva, S., Rodrigues, C. F., Araújo, D., Rodrigues, M. E., & Henriques, M. (2017). *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, *3*(1). <https://doi.org/10.3390/jof3010008>
- Soria-Lozano, P., Gilaberte, Y., Paz-Cristobal, M. P., Pérez-Artiaga, L., Lampaya-Pérez, V., Aporta, J., Pérez-Laguna, V., García-Luque, I., Revillo, M. J., & Rezusta, A. (2015). In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiology*, *15*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0524-3>
- Sousa, A. S., Prates, R. A., de Santi, M. E. S. O., Lopes, R. G., Bussadori, S. K., Ferreira, L. R., & Deana, A. M. (2016). Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: Influence of the radiant energy and photosensitizer charge. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *14*, 111-114. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.03.004>
- Sperandio, F. F., & Hamblin, Y.-Y. H. and M. R. (2013, julio 31). *Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria*. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery. <https://www.eurekaselect.com/113687/article>
- Spezzia-Mazzocco, T., Torres-Hurtado, S. A., Ramírez-San-Juan, J. C., & Ramos-García, R. (2016). In-vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy with methylene blue in two different genera of dermatophyte fungi. *Photonics & Lasers in Medicine*, *5*(3), 203-210. <https://doi.org/10.1515/plm-2016-0021>
- Stokes, C., Moran, G. P., Spiering, M. J., Cole, G. T., Coleman, D. C., & Sullivan, D. J. (2007). Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, *44*(9), 920-931. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.11.014>
- Thompson, D. S., Carlisle, P. L., & Kadosh, D. (2011). Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. *Eukaryotic Cell*, *10*(9), 1173-1182. <https://doi.org/10.1128/EC.05085-11>
- Torres-Hurtado, S. A., Ramírez-Ramírez, J., Larios-Morales, A. C., Ramírez-San-Juan, J. C., Ramos-García, R., Espinosa-Taxis, A. P., & Spezzia-Mazzocco, T. (2019). Efficient in vitro photodynamic inactivation using repetitive light energy density on *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *26*, 203-209. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.03.015>
- Tronchin, G., Pihet, M., Lopes-Bezerra, L. M., & Bouchara, J.-P. (2008, diciembre). Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Jean-Philippe*, *46*(8), 749-772.

- Tseng, S.-P., Hung, W.-C., Chen, H.-J., Lin, Y.-T., Jiang, H.-S., Chiu, H.-C., Hsueh, P.-R., Teng, L.-J., & Tsai, J.-C. (2017). Effects of toluidine blue O (TBO)-photodynamic inactivation on community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *50*(1), 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.12.007>
- Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, *74*(ftw018). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
- Verma-Gaur, J., & Traven, A. (2016). Post-transcriptional gene regulation in the biology and virulence of *Candida albicans*. *Cellular Microbiology*, *18*(6), 800-806. <https://doi.org/10.1111/cmi.12593>
- Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2017). Photoantimicrobials-are we afraid of the light? *The Lancet. Infectious Diseases*, *17*(2), e49-e55. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30268-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30268-7)
- Weerasekera, M. M., Wijesinghe, G. K., Jayarathna, T. A., Gunasekara, C. P., Fernando, N., Kottegoda, N., & Samaranyake, L. P. (2016). Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(11), 697-702. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160294>
- Whiteway, M., & Bachewich, C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology*, *61*(1), 529-553. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093341>
- Wilson, B. C., & Patterson, M. S. (2008). The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology*, *53*(9), R61-R109. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/9/R01>
- Xu, N., Yao, M., Farinelli, W., Hajjarian, Z., Wang, Y., Redmond, R. W., & Kochevar, I. E. (2015). Light-activated sealing of skin wounds. *Lasers in Surgery and Medicine*, *47*(1), 17-29. <https://doi.org/10.1002/lsm.22308>
- Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, *10*, 95-105. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S40160>
- Zheng, Y., Yin, G., Le, V., Zhang, A., Lu, Y., Yang, M., Fei, Z., & Liu, J. (2014). WITHDRAWN: Hypericin-based Photodynamic Therapy Induces a Tumor-Specific Immune Response and an Effective DC-based cancer Immunotherapy. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.036>
- Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P., & Chaves, G. M. (2017). An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01927>