



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Instituto en ciencias
Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas



**“Efecto de la terapia fotodinámica sobre levaduras del
género *Candida*”**

tesis para obtener el grado de:

**Maestría en Ciencias (Microbiología) con opción en
Microbiología Médica**

presenta:

Débora Vázquez Domínguez

bajo el asesoramiento de:

M. en C. Alejandra P. Espinosa Taxis

D. en C. Teresita Spezzia Mazzocco

Puebla de Zaragoza

Diciembre, 2019

“Esta tesis fue realizada con el apoyo de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de agosto 2017 a julio 2019.”



“La conclusión de esta tesis fue posible gracias a una beca proporcionada por el Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electricidad y por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado”



AGRADECIMIENTOS

Gracias, a Dios primeramente porque me ha permitido la vida, las oportunidades y ayudarme a culminar esta etapa en mi vida profesional.

A mis padres bellos, que han sido mi fuerza y siguen siendo pilares en mi vida, por su apoyo incondicional, sus consejos que son muy valiosos para mí, porque siempre me han incentivado a cumplir mis metas como persona y profesionista. Sé que ellos siempre estarán para mí.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP, por darme la oportunidad de realizar la maestría en Ciencias Microbiológicas, por su apoyo al realizar una estancia en España en el Laboratorio de Genética Molecular de *Candida albicans* y en cada detalle a lo largo de la maestría, muchas gracias.

A mi asesora la Mtra. en C. Alejandra Paula Espinosa Taxis, por su tiempo dedicado a la elaboración de este proyecto y porque siempre estuvo pendiente de todo el material y reactivos que hicieran falta, por su soporte, sus consejos y la oportunidad que me dio a través de sus relaciones académicas de hacer una estancia en Valencia, España; que sin duda fue una de las mejores experiencias en mi vida y mi formación académica.

A mi coasesora la Dra. en C. Teresita Spezzia Mazzocco por permitirme ser parte de su proyecto, su valioso tiempo para resolver todas mis dudas, su apoyo, sus consejos y recomendaciones. La confianza para realizar este proyecto en su laboratorio, las facilidades de reactivos y el equipo para trabajar.

Al Dr. en C. Eulogio Valentín Gómez por abrirnos las puertas de su laboratorio en la Universidad de Valencia, España y permitirnos trabajar parte de este proyecto, me quedo sin palabras, muchas gracias por sus consejos y su valioso tiempo.

A quienes además conformaron parte de mi comité tutorial y revisor, la Dra. en C. Fabiola Avelino Flores, la Dra. en C. Claudia F. Martínez de la Peña, la Dra. en C. Lucía Soto Urzúa y la Dra. en C. Ma. Lilia Cedillo Ramírez; por sus consejos, recomendaciones y el tiempo dedicado para la revisión y mejora de este trabajo, así mismo al Dr. en C. Julio Cesar Ramírez San Juan por dedicarnos parte de su valioso tiempo para ayudarnos con la estadística, sus consejos, el tiempo dedicado para la revisión y recomendaciones. Gracias

A varios profesores y compañeros por su apoyo en la estadística, sus consejos, a todos por haber compartido sus conocimientos, su amistad y cariño.

Gracias.



Efecto de la terapia fotodinámica sobre levaduras del género *Candida*



2019

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS MICROBIÓLOGICAS

RESUMEN

El agente etiológico más importante a nivel mundial de micosis oportunistas es *Cándida* spp, que puede llegar a producir infecciones importantes en el huésped incluyendo la muerte en algunos casos. Actualmente se ha observado un aumento en el aislamiento de cepas resistentes a antifúngicos, lo que se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. En varios informes realizados se encuentran con mayor frecuencia aislados de *Candida albicans*, pero en las últimas décadas se ha observado un incremento en especies *C. no albicans*, como *C. tropicalis* y *C. glabrata* con patrones variables de resistencia. Debido a esto, surge la terapia fotodinámica (TFD) como un tratamiento alternativo que combina tres elementos principales, un fotosensibilizador, que es activado a una longitud de onda específica y oxígeno, que al reaccionar conducen a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que inducen la muerte del agente infeccioso. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la TFD en especies del género *Candida* resistentes a antifúngicos utilizando azul de metileno (AM) como fotosensibilizador (FS).

Se identificaron y confirmaron levaduras *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* resistentes a antifúngicos por la técnica de PCR especie - específico y MALDITOF en vinculación con la Universidad de Valencia, España y la TFD se realizó en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electricidad en Puebla, México. Las cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* identificadas se cultivaron en placas Dextrosa Sabouraud (SB) y se resembraron en medio líquido SB. La TFD *in vitro* se realizó en microplacas de 96 pocillos inoculadas con *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* respectivamente y AM, posteriormente se incubaron a 37 °C en oscuridad. Para la TFD se utilizó un dispositivo LED rojo, irradiando a 55 J / cm². Posteriormente, se recuperaron las levaduras y se resembraron en placas SB y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC), para ser analizados por métodos estadísticos (ANOVA) y la prueba de Tukey (P <0.05). La TFD resultó ser efectiva contra el crecimiento de las levaduras en estudio, permitiendo una diferencia significativa para *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* con respecto al control, en promedio se obtuvo una inhibición del 99.55, 98.32 y 83.75 % de UFC respectivamente. Cabe mencionar que en 2 cepas *C. glabrata* incluyendo la cepa de referencia se realizó la TFD con irradiaciones repetidas que mejoraron los resultados. Por lo tanto, la TFD no discrimina los resultados en cepas resistentes a antifúngicos.

Por medio de este trabajo se muestra además que la TFD con AM es un buen candidato para usarse como una alternativa en el tratamiento contra infecciones por especies del género *Candida*, principalmente en pacientes en los que la administración de antifúngicos es contraindicada o quienes presentan infecciones con resistencias antifúngicas.

ÍNDICE

	PÁGINAS
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 INFECCIONES NOSOCOMIALES	1
1.2. CANDIDOSIS	1
1.2.1 CANDIDOSIS SUPERFICIAL	2
1.2.2 CANDIDOSIS INVASIVA O DISEMINADA	2
1.3 <i>Candida</i> spp.	3
1.4 EPIDEMIOLOGÍA	4
1.4.1 <i>Candida auris</i> , UNA LEVADURA EMERGENTE	5
1.5 PATOGÉNESIS	6
1.5.1 ADHESIÓN	6
1.5.2 INVASIÓN	8
1.5.3 DAÑO	8
1.6 DIAGNÓSTICO	9
1.6.1 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONALES	9
1.6.2 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULARES	10
1.7	11
	ANTIFÚNGICOS

1.7.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE ANTIFÚNGICOS	11
1.7.2 FACTORES RELACIONADOS EN LA FALLA TERAPÉUTICA	12
1.7.3 RESISTENCIA CONTRA ANTIFÚNGICOS	12
1.8 TERAPIA FOTODINÁMICA	14
1.8.1 MECANISMO DE LA TFD	15
1.8.2 MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD MEDIADA POR TFD	16
1.8.3 FOTOSENSIBILIZADOR IDEAL	18
1.8.4 FUENTES DE LUZ	19
2. ANTECEDENTES	20
2.1 ANTECEDENTES DIRECTOS	21

PÁGINAS

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 OBJETIVO GENERAL	24
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
6. DIAGRAMA DE TRABAJO	25
7. MATERIALES Y METODOLOGÍA	26

7.1 MICROORGANISMOS	26
7.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS, BUFFER Y FUENTE DE LUZ	26
7.3 IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE ESPECIES POR EL MÉTODO CONVENCIONAL CHROMagar® <i>Candida</i>	28
7.4 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO DE KIRBY Y BAUER	28
7.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DE COLONIA	30
7.5.1 METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO <i>Candida</i> POR PCR A PARTIR DE GENES PARA PROTEÍNAS 5.8S ARNr	30
7.5.2 METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN POR PCR A PARTIR DEL GEN INTRÓN <i>RPS0</i> PARA LEVADURAS <i>C. glabrata</i>	30
7.5.3 METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN POR PCR A PARTIR DE LAS REGIONES ITS (ITS 1 E ITS 2) PARA <i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	31
7.6 ANÁLISIS DE ELECTROFORESIS	31
7.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE EL SISTEMA MALDITOF VTK MS	32
7.8 BLAST DE OLIGONUCLEÓTIDOS	33
7.9 CRIOPRESERVACIÓN	33

7.10 PROTOCOLO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA <i>IN VITRO</i>	33
7.10.1 CRECIMIENTO DE LEVADURAS	33
7.10.2 CONTEO DE LEVADURAS EN CÁMARA DE NEUBAUER	33
7.10.3 TERAPIA FOTODINÁMICA	33
7.11 ANÁLISIS DE DATOS	34
8. RESULTADOS	35
8.1 IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE ESPECIES POR EL MÉTODO CONVENCIONAL CHROMagar® <i>Candida</i>	35
8.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	36
8.2.1 IDENTIFICACIÓN POR PCR A PARTIR DE GENES QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS 5.8S ARNr	36
8.2.2 IDENTIFICACIÓN POR PCR DE COLONIA A PARTIR DEL GEN INTRÓN <i>RPS0</i>	37
8.2.3 IDENTIFICACIÓN POR PCR A PARTIR DE LAS REGIONES ITS (ITS 1 E ITS 2)	38
8.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE EL SISTEMA MALDITOF VITEK MS IVD	38
8.4 BLAST DE OLIGONUCLEÓTIDOS	40
8.5 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO DE KIRBY Y BAUER	41
8.6 TERAPIA FOTODINÁMICA <i>IN VITRO</i>	42
9. DISCUSIÓN	54

10. CONCLUSIÓN	58
11. PERSPECTIVAS DE TRABAJO	59
12. BIBLIOGRAFÍAS	60
13.- ANEXOS	69

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INFECCIONES NOSOCOMIALES

Las infecciones nosocomiales (IN) o infecciones asociadas a la atención médica (IAAS), son un problema de salud a nivel mundial debido al aumento de la morbilidad y mortalidad. Las IN se definen como infecciones adquiridas durante la estancia en un hospital, que no estaban presentes ni en período de incubación, ni en el momento del ingreso del paciente, que puede ser localizada o sistémica. Usualmente, se considera que una infección corresponde a una IN si se manifiesta al menos 48 horas después de la admisión. Las principales IN son: infección de tracto urinario asociada al uso de catéter, neumonía asociada al uso de ventilador, infección de sitio quirúrgico y la infección del torrente sanguíneo asociada al uso de catéter. De forma general, estas infecciones se encuentran relacionadas a procedimientos asistenciales que ocasionan la disrupción de las defensas propias del huésped por un dispositivo o una incisión, permitiendo la invasión del microorganismo en donde el papel del huésped es muy relevante (Pujol, M. & Limón, E. 2013; Khan, H. A., *et al.* 2017). Existen múltiples condiciones del huésped que predisponen la adquisición de infecciones nosocomiales; por ejemplo, la edad, la gravedad de la enfermedad de base, el estado inmunológico, el estado nutricional, entre otros, que suponen un riesgo elevado de infección durante el ingreso hospitalario (Arango Díaz, A., *et al.* 2018). Según las estimaciones de la OMS, aproximadamente el 15% de todos los pacientes hospitalizados sufren IN, (Khan, H. A., *et al.* 2017) incrementado la probabilidad de morir, lo que implica un aumento en los gastos hospitalarios (Rodríguez Salgado M. 2018), para los pacientes incluidos sus familiares y costos adicionales para los sistemas de salud, (WHO, 2013) por conceptos de estadía prolongada, tratamientos costosos, que además eliminan la microbiota normal del huésped y facilitan la generación selectiva de microorganismos multidrogorresistentes (Arias Flores, R., *et al.* 2016), reintervenciones quirúrgicas, sin contar con los costos sociales dados por pérdidas de salarios y producción (Arango Díaz, A., *et al.* 2018), que a su vez ocasionan efectos incalculables en sus vidas, y un impacto enorme en la economía del país.

Durante la hospitalización el paciente se expone a una gran variedad de microorganismos como bacterias, virus, hongos y parásitos que ocasionan infecciones. Mismas que son contraídas de otra persona (infección cruzada), de la propia microbiota del paciente (infección endógena), transmitida por un objeto inanimado o por sustancias recién contaminadas provenientes de otro foco humano de infección (infección ambiental) (OMS, 2003). Uno de los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales de origen micótico se refiere a hongos del género *Candida* (Arias Flores, R., *et al.* 2016).

1.2 CANDIDOSIS

La candidosis o candidiasis son micosis causadas por diversas especies de levaduras del género *Candida*, hongo de tipo oportunista que vive habitualmente en el ser humano como parte de la microbiota en la piel y las mucosas, la infección generalmente se asocia a diversos factores de riesgo (Vega Sánchez, D. C. 2015). Las formas clínicas pueden presentarse como infecciones cutáneas y mucosas sin sintomatología, que pueden ocurrir a cualquier edad y surgen cuando se rompe la barrera ecológica o la función inmunitaria está

dañada, entonces puede volverse una infección sistémica y comprometer estructuras profundas internas con evolución aguda o crónica que son generalmente severas (Arendrup, M. C. 2013; Vega Sánchez, D. C. 2015).

1.2.1 CANDIDOSIS SUPERFICIAL

Las infecciones fúngicas de la piel y las uñas son el grupo más común y extendido de todas las micosis. Generalmente afectan a más del 20 - 25% de la población mundial, particularmente en países tropicales debido al calor y la humedad. La candidosis cutánea superficial puede manifestarse como intertrigo, dermatitis del pañal, paroniquia *Candida*, onicomicosis e infecciones mucocutáneas. A menudo, la enfermedad se desarrolla en la piel húmeda de los pliegues y la región perigenital, extendiéndose hacia el área interna del muslo. En casos severos, la infección puede producir pápulas, erosiones y raramente úlceras. Los pacientes con frecuencia son diabéticos, confinados a la cama, bebés, ancianos y pacientes adiposos (Taha, M., & Zaghloul, A. B. 2018).

Las infecciones mucocutáneas por candidosis más comunes son las infecciones orales e infecciones genitales. *Candida* es un agente comensal en la cavidad oral del 45 - 65 % de las personas sanas (Patil, S., *et al.* 2015). La candidosis oral puede ser aguda o crónica con descamación de células epiteliales, típicamente los pacientes suelen ser asintomáticos y/o presentar síntomas variados como sensaciones dolorosas, malestar local y dificultad para tragar (Gacon, I., *et al.* 2019; Millsop, J. W., & Fazel, N. 2016) hasta placas blancas removibles dolorosas. La candidosis genital por otro lado, ocurre en al menos el 20% de la población femenina, aunque esta estadística se eleva un 30% al final del embarazo y en pacientes inmunodeprimidos (Sobel, J. D. 2014; Ruhnke, M. 2018).

1.2.2. CANDIDOSIS INVASIVA O DISEMINADA

Candida es un comensal inofensivo en el tracto gastrointestinal (GI), pero cuando su crecimiento avanza sin control puede causar una infección, ingresando al torrente sanguíneo y causar candidosis invasiva o diseminada con una alta morbilidad y mortalidad. La candidosis invasiva comprende tanto la candidemia como la candidosis de tejido profundo y abarca una serie de infecciones. La mayoría de las infecciones sistémicas por *Candida* spp. se origina en el tracto gastrointestinal o urológico, aunque también se relacionan con el uso de catéter. La mortalidad entre los pacientes con candidosis invasiva es de hasta el 40 %, incluso en los pacientes que reciben tratamiento (Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. 2015) y puede afectar órganos internos como los riñones (Kauffman, C. A. 2005), el hígado, el bazo, los pulmones (Canals, M., *et al.* 2014), el cerebro (Tsakiri, S., *et al.* 2018) y las válvulas cardíacas (Kara, A. 2018).

Se describe que el uso de profilaxis antifúngica es capaz de disminuir la incidencia de infecciones invasivas, pero también se ha demostrado que el uso de medicamentos antifúngicos a su vez conduce a la aparición de hongos resistentes y se vuelven una amenaza grave para el paciente (Gunsalus, K. T. W., *et al.* 2015). El riesgo de muerte es muy alto, incluso mortal particularmente entre los pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (Ruhnke, M. 2018; Keighley, C., *et al.* 2019).

1.3 *Candida* spp.

Actualmente, hay más de 150 especies conocidas de *Candida*, sin embargo, solo 15 de estas especies se consideran patógenas, entre las que se encuentran: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *C. norvegensis* y *C. auris* (Pappas, P. G., et al. 2018). Todas las especies de *Candida* asimilan y fermentan glucosa, y no asimilan nitritos, pero su capacidad para usar diferentes fuentes adicionales de carbono y nitrógeno varía considerablemente, por ejemplo, a medida que atraviesa diferentes nichos del huésped, *Candida* spp. puede adaptarse y usar simultáneamente fuentes alternativas de carbono, para su supervivencia y su virulencia (Böhringer, M., et al. 2016). En humanos, generalmente coloniza algunas regiones, como la piel, la orofaringe, el tracto respiratorio inferior, el tracto gastrointestinal y el sistema genitourinario donde su proliferación está controlada por el sistema inmunitario del huésped (Pappas, P. G., et al. 2018).

Candida spp. se identifica como levaduras alargadas o ligeramente redondas 2 - 6 x 3 - 9 μm . En general son levaduras que crecen en un pH entre 2.5 a 7.5, a temperatura que va desde 20 a 38 °C (Castañón Olivares, L. R. 2016). Generalmente se aíslan en medio agar dextrosa sabouraud (SB), que es un medio enriquecido que contiene glucosa, peptona y agar, y mediante la adición de cloranfenicol puede evitarse el crecimiento de bacterias (figura 1).

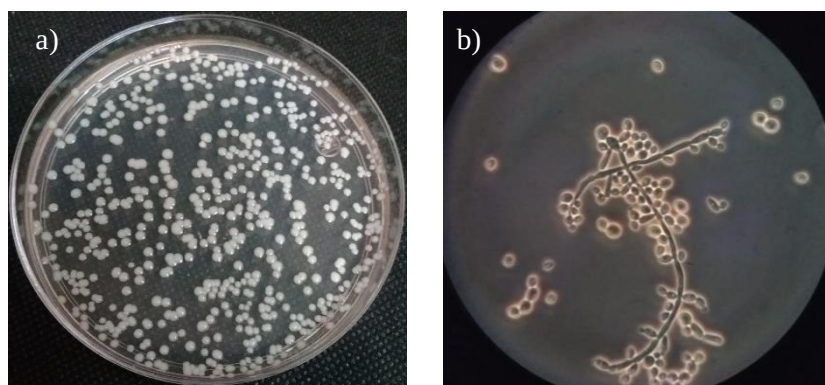


Figura 1. a) Colonias típicas de levaduras *C. albicans* en placas de agar SB, b) Microscopía en contraste de fases; levaduras *C. albicans* observadas a 40X.

Levaduras *Candida* spp. se reproducen por gemación y la división nuclear ocurre en la unión entre la célula madre y la célula hija. Cuando la célula hija se desprende completamente de la célula madre las levaduras se consideran unicelulares, se consideran hifas si permanecen firmemente unidas de extremo a extremo después de la citocinesis en

forma de tubo delgado, de modo que producen estructuras filamentosas multicelulares llamadas micelios, por otro lado, las células pseudohifales presentan forma de elipsoide y tienen características tanto de levaduras como de hifas, figura 2. Otra estructura formada por cepas *C. albicans* son las llamadas clamidosporas, aunque su papel parece indefinido. Las clamidosporas son células grandes, esféricas, de paredes gruesas que se observan *in vitro* bajo ciertas condiciones adversas, como el hambre y la hipoxia (Noble, S. M., *et al.* 2016).

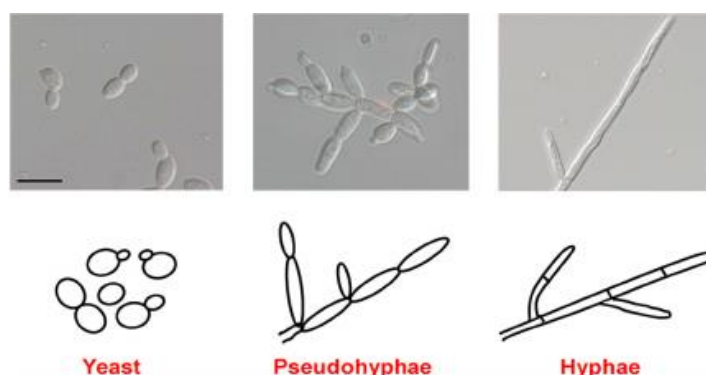


Figura 2. Principales morfologías celulares de *C. albicans*: levadura, pseudohifas e hifas en microscopia de contraste de interferencia diferencial y representación esquemática de cada morfología, (arriba y abajo respectivamente).

Una propiedad de *Candida* que ha generado gran interés y se encuentra relacionado a su capacidad virulenta es la de presentar varias formas de colonias. Esta capacidad se encuentra relacionada a su morfología fenotípica de colonias blancas lisas y colonias opacas rugosas descritas por primera vez en un aislado clínico particular de *C. albicans in vitro*, las primeras son colonias, blancas cremosas, brillantes y convexas en medios sólidos (figura 1), sin embargo en medios que contienen glucosa, y a temperatura ambiente, las colonias blancas ocasionalmente producen sectores de células opacas, de crecimiento lento con colonias de aspecto más oscuros, mate, aplanados y rugosas. Las células opacas son alargadas en comparación con las células blancas, son aproximadamente tres veces más grandes (en volumen) y tienen vacuolas más pronunciadas. A esta propiedad de cambiar de colonias lisas a opacas se le denomina “switching” fenotipo (véase en el tema patogénesis) (Noble, S.M. *et al.* 2016).

1.4 EPIDEMIOLOGÍA

Mientras que *C. albicans* ha sido el patógeno aislado con mayor frecuencia, esta especie representa actualmente solo la mitad de los aislamientos detectados, porque en las últimas décadas especies *C. no albicans* han aumentado (Pappas, P. G., *et al.* 2018), donde *C. glabrata* es la especie más común, seguido de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Sadeghi, G., *et al.* 2018) causando infecciones más graves debido a que presentan patrones de variabilidad de resistencia a antifúngicos tradicionales como el fluconazol,

incrementando así, la duración de la estadía en el hospital, el costo de la atención médica, inclusive la mortalidad en el paciente (Quindós, G. 2014).

La prevalencia de *C. no albicans* en la mayoría de las regiones se determina por factores como los patrones de uso de antifúngicos de fondo en la región, factores de riesgo de pacientes individuales y brotes clonales, es decir, brotes que involucran una *Candida* spp. que es única en un entorno de atención médica (Vázquez Tsuji, O., *et al.* 2014), p. ej., *C. parapsilosis* se encuentra asociada a infecciones en neonatos, adultos jóvenes y generalmente en pacientes relacionados al uso de catéter venoso central e hiperalimentación, debido a su propensión de colonizar la piel humana y la capacidad de adherirse a dispositivos médicos. *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, por otro lado, causan infecciones en pacientes mayores en asociación con cirugía abdominal, tumores sólidos, trasplantes y / o tratamientos prolongados con corticoides. Otras especies que aparecen con menos frecuencia en entornos clínicos, como *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr* y *C. guilliermondii*, están asociadas con patrones de susceptibilidad específicos o con hospedadores específicos, p. ej., *C. dubliniensis* ha sido particularmente común en pacientes infectados por VIH (Pappas, P. G., *et al.* 2018; Quindós, G. 2014).

Además, hay algunas diferencias geográficas importantes en la distribución de especies que causan candidosis invasiva. *C. parapsilosis* es la primera o segunda etiología de candidemia en Australia, América Latina y los países mediterráneos de África, Asia y Europa. Por el contrario, *C. glabrata* tiene un importante papel etiológico en EE. UU., Europa Central y del Norte, que a su vez pueden presentarse con resistencias al fluconazol y otros triazoles, equinocandinas y / o anfotericina B (Quindós, G. 2014).

1.4.1 *Candida auris*, LEVADURA EMERGENTE

Candida auris se describió por primera vez como un aislado del canal auditivo de un paciente en Japón en 2009, posteriormente se aisló de varios sitios corporales de pacientes en múltiples países en los cinco continentes (figura 3). Las tasas de mortalidad varían significativamente entre las regiones geográficas desde el 32,5 % al 72 % (Jeffery Smith, A., *et al.* 2017).

C. auris puede identificarse erróneamente en los laboratorios de diagnóstico convencionales con otras especies del mismo género por su similitud. El escenario es preocupante ya que esta especie exhibe una disminución *in vitro* de susceptibilidad contra antifúngicos. Los datos de susceptibilidad antifúngica demuestran que es altamente resistente al fluconazol y que un tercio de los aislamientos exhiben una concentración mínima inhibitoria elevada al voriconazol y anfotericina B (Chowdhary, A. 2016).

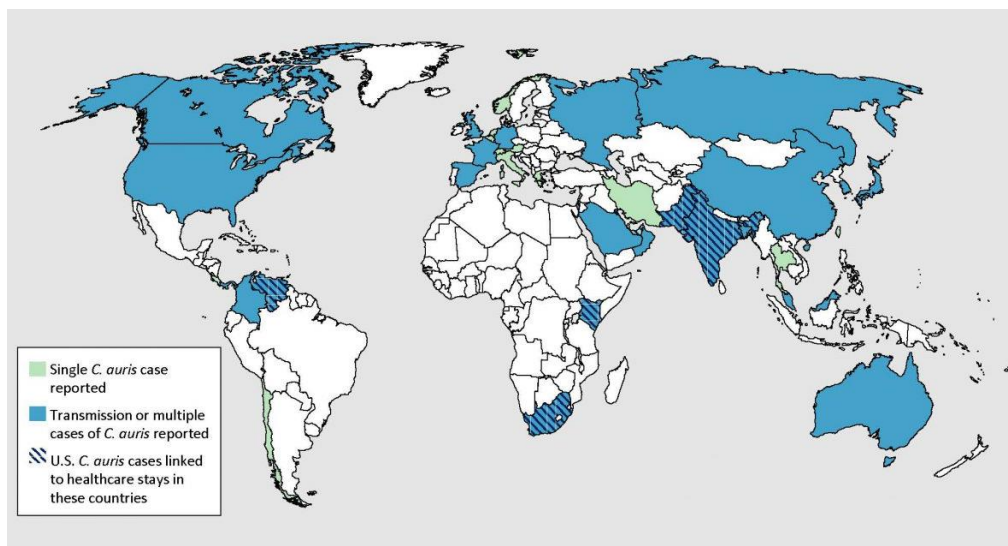


Figura 3. Mapa de los países desde los cuales se han notificado casos únicos y múltiples de *C. auris*, al 30 de septiembre de 2019. Otros países no destacados en este mapa también pueden tener casos de *C. auris* no detectados o no notificados. Imagen extraída de <https://www.cdc.gov>

1.5 PATOGÉNESIS

Candida spp. es un agente comensal que habita formando parte de la microbiota humana en piel y mucosas. La transición de un estado comensal a un estado patológico se debe generalmente a un cambio en el estado inmunológico o alteraciones primarias del paciente más que del hongo, por otro lado, para desarrollar una infección *Candida* depende de su virulencia, patogenicidad y dosis infecciosa. Otro punto importante es la propiedad de transición morfológica (levadura, pseudohifas, hifas) de *Candida* spp., pues dictan las fases de colonización, crecimiento, diseminación y evasión del sistema inmune (Jabra Rizk, M. A. 2016).

1.5.1 ADHESIÓN

Tanto comensal como patológica, las levaduras *Candida* spp. se unen a células hospedadas, y debido a múltiples estímulos como el contacto con la célula epitelial y la temperatura corporal, desencadena la morfogénesis hifal que responde con la producción de factores de virulencia tempranos, (Jabra Rizk, M. A., 2016) por ej., Hwp1 (proteína 1 de la pared de la hifa), Als3 (proteína similar a la aglutinina 3), entre otras que se expresan de forma dependiente de hifas. Además, de las adhesinas y receptores de las células epiteliales, *Candida* spp. también puede reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) a través de receptores tipo Toll o receptores de reconocimiento de patrones de tipo lectina C (PRR). La detección de componentes de la pared celular fúngica puede activar las vías de señalización MAPK y NF κ B aguas abajo (Böhringer, M., *et al.* 2016). Las hifas invasoras y pseudohifas desencadenan varias vías de señalización proinflamatorias en el huésped asociadas con la enfermedad activa, mientras que las levaduras, que simplemente colonizan la superficie del tejido sin causar daño, desencadenan una respuesta inflamatoria

más silenciada asociada al estímulo de MAPK. Es decir que, la transición de levadura a hifa es necesaria para la virulencia en las infecciones diseminadas, también son necesarios para la formación de biopelículas (Noble, S. M., *et al.* 2016). A excepción de *C. glabrata* que no tiene la capacidad para formar hifas o pseudohifas como *C. albicans* o *C. tropicalis*, pero al igual que los anteriores es altamente oportunista y responsable de infecciones graves, su prevalencia está relacionada con muchos otros factores como su capacidad de expresar adhesinas como Epa (adhesina epitelial) asociadas a su pared celular, cambio morfológico de colonias, su capacidad para formar biopelículas, entre otras. Aunque, se sabe muy poco acerca de su patogénesis, también se ha relacionado a su capacidad de resistencia contra antifúngicos (Muñoz del Valle, G. M. 2015; Richardson, J. P., *et al.* 2018).

Dependiendo de los sitios de la colonización del hospedero *Candida* spp. tienen la capacidad de realizar un “switching” fenotipo, lo que implica un cambio dramático en el fenotipo celular y diferencias en la capacidad de colonizar la piel, y realizar un cambio de células blancas a una células opacas con fenotipo intermedio alargado, donde estas últimas colonizan más fácilmente la piel, causando cavidades en la superficie de la piel, pero quizás, lo más intrigante de las células opacas es que pierden la capacidad de liberar un potente quimioatrayente para los polimorfonucleares (figura 4). Este atrayente es liberado solo por las células blancas. En términos prácticos, la falta de quimioatrayente podría hacer que las células opacas, pero no las células blancas, sean invisibles para los células del sistema inmune (Soll, D. R. 2014).

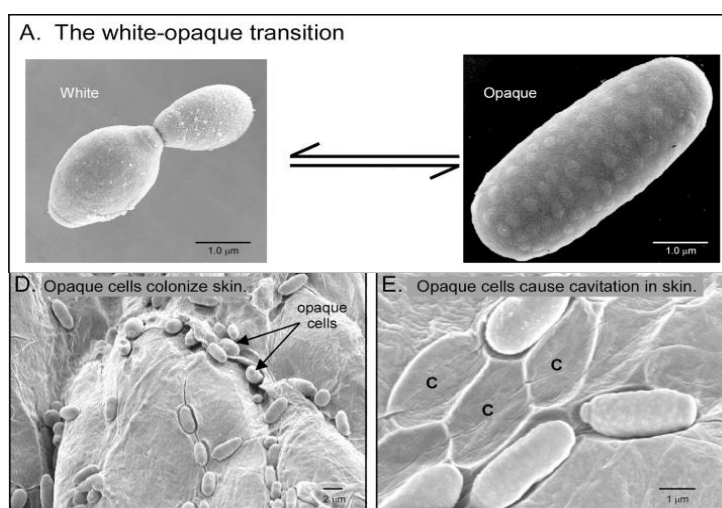


Figura 4. Micrografías electrónicas A) transición entre células de levadura “blanco” y una única célula oblonga, espinosa, “opaca”, D) las células opacas, pero no las células blancas, colonizan fácilmente la piel de un ratón recién nacido, hundiéndose en una cavidad inducida, E) la eliminación de células opacas de la piel revela cavidades. Imagen extraída de Soll, D. R. 2014.

La mayoría de las infecciones por *Candida* spp. están asociadas con su capacidad de formar biopelículas en el tejido del huésped o en superficies abióticas. Las biopelículas son comunidades estructuradas de poblaciones microbianas que se encuentran asociadas a una superficie, incrustadas en una matriz de polisacáridos extracelulares propuestos para proporcionar protección a las células incrustadas en las biopelículas, además de brindarles estabilidad, así como, la protección contra el sistema inmunitario del huésped y la capacidad de tolerar concentraciones extremadamente altas de antimicrobianos provocando una gran impacto en la salud pública, ya que las células liberadas de las biopelículas formadas en biomateriales implantados, pueden potenciar las infecciones sistémicas (Jabra Rizk, M. A. 2016).

1.5.2 INVASIÓN

Dos mecanismos complementarios están involucrados en la invasión de *C. albicans* a través de las células epiteliales: la endocitosis inducida y la penetración activa (figura 5). La endocitosis inducida por hongos contribuye a las primeras etapas de la invasión (Da Silva Dantas, A., *et al.* 2016), pseudópodos producidos por el huésped rodean al hongo para atraerlo hacia la célula huésped, este proceso depende de atributos fúngicos que incluyen la presión física y la penetración por la punta de hifas que avanza y la producción / secreción de factores de hifas que ayudan al proceso de invasión. Sin embargo, la formación de hifas no es suficiente para causar daño celular y es casi seguro que no sea el único factor que contribuye a la destrucción del tejido (Naglik, J. R., *et al.* 2011). Por el contrario, la penetración activa ocurre en momentos posteriores cuando las hifas invaden entre o, a través de las células epiteliales (Da Silva Dantas, A., *et al.* 2016). Durante la penetración activa, *C. albicans* secreta factores como proteasas, fosfolipasas, lipasas y esterases, que afectan las uniones de las células epiteliales y facilita, además, la degradación de los componentes de la membrana celular junto con otros ligandos que facilitan la adhesión fúngica. La superóxido dismutasa localizada en la superficie celular fúngica desintoxica las especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas cuando el tejido está dañado y también se expresa en la superficie de hifas ayudando en la adquisición de nutrientes, la invasión y la evasión de la defensa inmune del huésped (Jabra Rizk, M. A., 2016; Da Silva Dantas, A., *et al.* 2016).

1.5.3 DAÑO

El daño tisular es inherente en el proceso de invasión por la secreción de factores como las enzimas. En células fagocíticas, después de la internalización del hongo, la maduración del fagosoma en fagolisosoma es fundamental para la eliminación de los hongos. Por su parte, *C. albicans* ha desarrollado estrategias que le permiten sobrevivir en un ambiente como el fagolisosoma, esto mediante la manipulación y el escape de las células fagocíticas (Da Silva Dantas, A., *et al.* 2016).

Cuando está dentro del fagolisosoma *Candida* induce una batería de enzimas y proteínas protectoras que incluyen catalasa, superóxido dismutasa, tiorredoxina, entre otras que degradan o eliminan ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN). Además, promueve la neutralización del fagolisosoma, permitiendo la morfogénesis de hifas de *Candida*, lo que facilita su escape y activa vías que forman quitina de refuerzo en la pared celular del hongo,

provocando así una lisis en el fagocito. Recientemente, se ha descrito un agente de lisis de células huésped secretoras de *C. albicans*, llamado “candidalisina”, que puede inducir daño a las membranas epiteliales (Da Silva Dantas, A., *et al.* 2016).

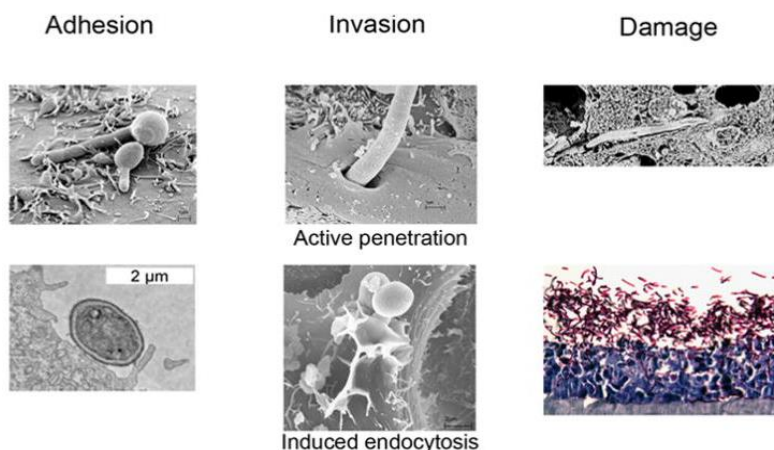


Figura 5. Progresión de la infección por *C. albicans* en células epiteliales orales, caracterizada por tres etapas distintas: adhesión, invasión (a través de dos rutas diferentes: penetración activa y endocitosis inducida) y daño tisular. Micrografías electrónicas de barrido y transmisión e histología del tejido epitelial. Imagen extraída de Naglik J.R. *et al.* 2011.

1.6 DIAGNÓSTICO

Candida spp. es un hongo dimórfico; unicelular, en forma de levaduras y multicelular, formando hifas o pseudohifas. Especies como *C. albicans* y *C. dubliniensis* tienden a formar, además, esporas de pared gruesa denominadas clamidosporas, así mismo, de producir tubos germinales. La forma del hongo depende generalmente del medio y las condiciones en la que se encuentre, mismas que se utilizan para su identificación. La identificación rápida y precisa es importante para la aplicación de tratamiento efectivo, la disminución de cepas resistentes, así como también para la implementación de medidas efectivas de control de infecciones especialmente en pacientes que padecen candidosis potencialmente mortal (OPATHY Consortium, Gabaldón T., 2019).

1.6.1 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO CONVENCIONALES

Los métodos de identificación de levadura más utilizados se basan en fenotipos, como la prueba del tubo germinal (Mothibe, J. V., & Patel, M. 2017), uso de agar cromogénico (Hernández Botero, J. S., & Pérez Cárdenas, J. E. 2015), pruebas bioquímicas, sistemas automatizados bioquímicos (Delmonte, M. L., *et al.* 2017), o inmunológicos (Ruhnke, M. 2018). Todos estos métodos requieren aislamiento y cultivo del agente infeccioso a partir de muestras clínicas en agar SB (medio enriquecido que contiene peptonas y una elevada concentración de glucosa que favorece el crecimiento de los hongos, adicionando cloranfenicol u otro antibiótico se convierte en un medio selectivo para hongos) incubado

bajo condiciones de aerobiosis por 24 - 48 h a 37 °C (OPATHY Consortium, Gabaldón T., 2019).

A continuación, se presenta una lista de métodos tradicionales para la identificación de la especie *Candida*, descritos por Ruhnke, M. (2018):

- Tinciones: Con la tinción de Gram las levaduras suelen comportarse como Gram positivas. Mediante estas tinciones también se puede observar la morfología como levaduras, hifas, pseudohifas o clamidosporas.
- Prueba de tubo germinal o prueba de filamentación en suero: Se toma una pequeña porción de la colonia sembrada previamente en medio SB, con un asa estéril y se siembra en 0,5 ml de suero humano, se incuba a 37° C por 2 h, posteriormente, se observa al microscopio la formación de un tubo germinal sin constricción en su punto de origen y con forma característica de “espejo de mano”.
- Formación de clamidosporas: Hongos presuntivos se siembran en medio bilis agar o agar harina de maíz con un asa estéril, se incuban a 28° C por 48 a 72 horas en condiciones de aerobiosis, posteriormente, se observa al microscopio la formación de esporas asexuales, de paredes gruesas y refringentes, llamadas clamidosporas, que pueden estar intercaladas o en posición terminal de las hifas.
- Agar cromogénico o diferenciales: Hongos presuntivos se siembran en medio agar cromogénico, y se incuban a 37° C y por 48 a 72 h, luego, se observa el crecimiento de las colonias de color características según las enzimas que diferencian a cada especie. Según sus fabricantes, la especificidad en el reconocimiento de especies como *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* es cercana al 99%.
- Hemocultivos: Los hemocultivos siguen siendo el método de elección para el diagnóstico de candidemia. Para aumentar el rendimiento de los hemocultivos por encima del 95%, se deben obtener hasta cuatro pares de hemocultivos. Sin embargo, no siempre se sigue esta regla.
- Pruebas serológicas: Se pueden usar como pruebas de diagnóstico complementarias. Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad varían ampliamente entre los diferentes estudios. Se pueden lograr mejoras adicionales en la sensibilidad mediante la combinación del ELISA sándwich de *Candida* con detección de anticuerpos.

1.6.2 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULARES

La gran mayoría de los laboratorios asistenciales de nuestro país cuenta con métodos convencionales para la investigación de levaduras de importancia clínica, y en algunos casos no se identifican aislados de *C. no albicans* a nivel de especie, o se identifican erróneamente especies como *C. haemulonii*, *C. guillermindii*, *C. parapsilosis* o *C. auris*, entre otras especies poco comunes. Otros inconvenientes que pueden presentarse son, el tiempo de identificación prolongada (aproximadamente 72 h.) e incapacidad para identificar especies crípticas de los complejos *C. parapsilosis* (Kordalewska, M., *et al.* 2017; Aguilar G., *et al.* 2017). Además, la identificación por métodos convencionales requiere de experiencia previa.

Por lo tanto, la confirmación utilizando herramientas moleculares como, por ejemplo: PCR y espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) son herramientas útiles, disminuyendo el tiempo de identificación y aumentando la sensibilidad y especificidad para identificar microorganismos a nivel de especie (Zhao, Y., *et al.* 2015; Tian Ao, X., *et al.* 2019; Kordalewska, M., 2017; Bal, A. M. & Gill, M. Mc. 2018).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica que permite amplificar regiones específicas de un segmento de ADN, generando millones de copias mediante el uso de oligonucleótidos específicos, obteniendo resultados de la identificación del microorganismo en pocas horas. Con esta técnica, se logra un diagnóstico más rápido, con mayor sensibilidad y especificidad que los procedimientos convencionales. El gen de ARN ribosómico (ARNr), está altamente conservado y se encuentra presente en múltiples copias, esto lo hace particularmente adecuado para su uso en la identificación de cepas. Los genes ribosomales que codifican las subunidades 5.8S están dispuestos en tándem formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma de las levaduras (Vásquez, C. J. A., *et al.* 2016), y particularmente se utilizan para la identificación del género *Candida* (Ruiz Gaytan, A. C., *et al.* 2018), por otro lado, el estándar de oro internacional para la identificación de especies fúngicas es la amplificación y secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS) del locus de ADNr (OPATHY Consortium, Gabaldón T., 2019; Luo, G. & Mitchell, G. T. 2002). Otras herramientas empleadas en la PCR para la identificación de especies del género *Candida* son la amplificación de genes *GPI* que codifican para glicosilfosfatidilinositol, amplificación de genes del intrón *RPS0* que es un componente de la maquinaria de traducción y está extremadamente conservada entre las especies (García Martínez, J. M. *et al.* 2010), entre otros.

MALDITOF: La ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz), acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo), el fundamento consiste en hacer incidir un rayo láser sobre un microorganismo embebido en una matriz, que provoca la ionización de una serie de proteínas y tras ser sometidos a un campo electrónico estas migran por un tubo con vacío hasta un detector donde se calcula la masa de cada proteína, por el tiempo de vuelo. El sistema lee una serie de espectros que son comparados con una base de datos que contiene el espectro esperado de cada microorganismo analizado, permitiendo así, la identificación de cepas clínicas entre género y especie. Los sistemas comerciales más empleados en la actualidad que usan la tecnología MALDI-TOF para identificación de microorganismos son el sistema VITEK®MS (bioMérieux, Durham, NC) y el sistema MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA). Las bases de datos de los espectros de referencia se comercializan como parte de un sistema patentado y son construidas y mantenidas por los fabricantes. En la identificación, estos sistemas asignan un valor de puntuación (MALDI Biotyper®) o nivel de confianza (VITEK®MS) a cada coincidencia, con base en las similitudes del microorganismo con los espectros de referencia. El sistema VITEK®MS posee dos configuraciones: VITEK®MS IVD y VITEK®MS Research Use Only (RUO). El sistema VITEK®MS RUO está avalado para uso en investigación, el sistema VITEK®MS IVD, compara el espectro obtenido con el espectro esperado de cada organismo o grupo de organismos contenido en la base de datos, obteniendo una identificación con un nivel de confianza que se calcula con base al porcentaje de probabilidad y el número de opciones de microorganismos posibles (Maldonado, N., *et al.* 2018).

1.7 ANTIFÚNGICOS

Las clases de antifúngicos incluyen: polienos, azoles, alilaminas, flucitosina y equinocandinas (Cowen, L. E., *et al.* 2014). Para comprender los mecanismos de resistencia es necesario conocer el mecanismo de acción de cada antifúngico, que a continuación se describen.

1.7.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE ANTIFÚNGICOS

Los azoles (p. ej., fluconazol, voriconazol y posaconazol) inhiben la enzima 14 α - lanosterol desmetilasa dependiente del citocromo P450 codificada por el gen *ERG11* que convierte el lanosterol en ergosterol en la membrana celular, por otro lado, las alilaminas (p. ej., terbinafina) inhiben la actividad de la enzima escualeno epoxidasa que cataliza la conversión de escualeno en epóxido de 2, 3 - escualeno en la síntesis del ergosterol; el ergosterol es un componente principal de la membrana celular fúngica y contribuye a una variedad de funciones celulares, como la fluidez, integridad de la membrana y la función adecuada de las enzimas unidas a la membrana. Los polienos (p. ej., anfotericina B) se unen al ergosterol en la membrana plasmática, donde forman poros grandes que alteran la función celular. La flucitosina (5-fluorocitosina) inhibe el metabolismo de la pirimidina y la síntesis de ADN. Finalmente, las equinocandinas (p. ej., caspofungina, anidulafungina y micafungina) son agentes activos que se dirigen a la glucano sintasa, una enzima involucrada en la biosíntesis de la β - 1, 3 - D glucano; componente estructural principal de la pared celular fúngica (Cowen, L. E., *et al.* 2014; Campoy, S., *et al.* 2017).

1.7.2 FACTORES RELACIONADOS EN LA FALLA TERAPÉUTICA

Diversos factores del huésped, antifúngicos y los hongos contribuyen a las fallas terapéuticas, p. ej., los pacientes con un sistema inmunitario comprometido tienen más probabilidades de no responder a la terapia porque el tratamiento no cuenta con la ayuda de una respuesta inmune robusta en la lucha contra la infección, por otro lado, los catéteres permanentes, las válvulas cardíacas artificiales y otros dispositivos implantados contribuyen a las infecciones refractarias porque a menudo están colonizadas con biopelículas (Perlin, D. S., *et al.* 2017). Además, se presume que el uso generalizado de agentes antifúngicos (Cowen, L. E., *et al.* 2014), la profilaxis, terapia repetida y a largo plazo (Perlin, D. S., 2017) resultan en la selección de cepas menos susceptibles o de la aparición de resistencia farmacológica adquirida durante la terapia en cepas susceptibles (Perlin, D. S., *et al.* 2015).

En los últimos años se han detallado diversos mecanismos de resistencia antifúngica, que generalmente implican una reducción en la absorción del fármaco, la modificación del objetivo del fármaco y / o una reducción en el nivel celular del fármaco debido a la regulación ascendente de los transportadores de flujo de salida del fármaco (bombas) y las biopelículas, (Perlin, D. S., *et al.* 2015). A su vez, la resistencia de los hongos contra los antifúngicos pueden ser primaria (intrínseca) o secundaria (adquirida). La resistencia primaria a los medicamentos se encuentra naturalmente entre algunos hongos sin exposición previa, la resistencia secundaria es la consecutiva a una quimioterapia incorrecta provocada por un esquema terapéutico inicial erróneo, una indicación inadecuada del tratamiento, o un incumplimiento del tratamiento (Perlin, D. S., *et al.* 2017).

1.7.3 RESISTENCIA CONTRA ANTIFÚNGICOS

En general, la formación de biopelículas es un mecanismo importante de resistencia contra los antifúngicos (Perlin, D. S., *et al.* 2017). Las moléculas de antifúngicos son atrapadas en una matriz de polímeros rico en glucanos, sus mecanismos incluyen el secuestro de drogas y la expresión de transportadores de eflujo de drogas. La biosíntesis de β - 1, 3 - glucano por glucano sintasa y la producción de matriz de biopelículas es crítica para las propiedades de resistencia de la biopelícula (Perlin, D. S., *et al.* 2015).

Los azoles son los antifúngicos más utilizados en el tratamiento y profilaxis debido a su actividad de amplio espectro. Su resistencia ha surgido a través del desarrollo de resistencia adquirida y un cambio epidemiológico hacia especies menos susceptibles. *C. glabrata* e intrínsecamente *C. krusei* presentan altas tasas de resistencia a los azoles. Además de las biopelículas, adaptación fúngica y la tolerancia a los azoles, la aparición de alteraciones genéticas estables confiere resistencia a los antifúngicos. La resistencia por alteraciones genéticas en *Candida* spp. incluyen una regulación positiva de los transportadores de fármacos, la sobreexpresión o la alteración del objetivo del fármaco como mutaciones puntuales en el gen *ERG11* y cambios celulares. La inducción de bombas de eflujo, que disminuyen la concentración de drogas dentro de la célula, es el mecanismo más común de resistencia a estos antifúngicos, codificadas por genes casetes de unión a ATP (ABC) o la superfamilia de facilitadores principales (MFS), ver figura 6 (Campoy, S., *et al.* 2017; Perlin, D. S., *et al.* 2017; Perlin, D. S., *et al.* 2015).

Aunque la resistencia a anfotericina B es rara en *Candida* spp. pero, se han registrado algunos casos de resistencia en estudios previos en especies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Jiménez Guerra, G., *et al.* 2018), también se han encontrado informes de fracaso del tratamiento asociado con una concentración mínima inhibitoria alta a la anfotericina B en *C. auris*. El mecanismo de resistencia a la anfotericina B implica una reducción en el contenido de ergosterol en la membrana celular, ver figura 6 (Perlin, D. S., *et al.* 2017).

Las equinocandinas son altamente activas contra la mayoría de las especies de *Candida*, pero son menos activas contra algunas cepas de *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, y *C. glabrata*, donde se ha observado una tendencia alarmante de aumento de la resistencia. En general, la resistencia a la equinocandina en especies susceptibles de *Candida* surge después de una exposición repetida o prolongada, e implica la adquisición genética de mutaciones en los genes *FKS*, que codifican las subunidades catalíticas de la glucano sintasa, y generalmente se asocian con sustituciones de aminoácidos. La importancia clínica de la susceptibilidad intrínseca y reducida a los medicamentos no está clara porque las infecciones por hongos a menudo se tratan con éxito; sin embargo, el valor de esta característica puede variar con la población de pacientes, particularmente en los casos en

que las cepas son intermedias susceptibles o resistentes, ver figura 6 (Perlin, D. S., *et al.* 2015; Perlin, D. S., *et al.* 2017; Muñoz del Valle, G. M., 2015).

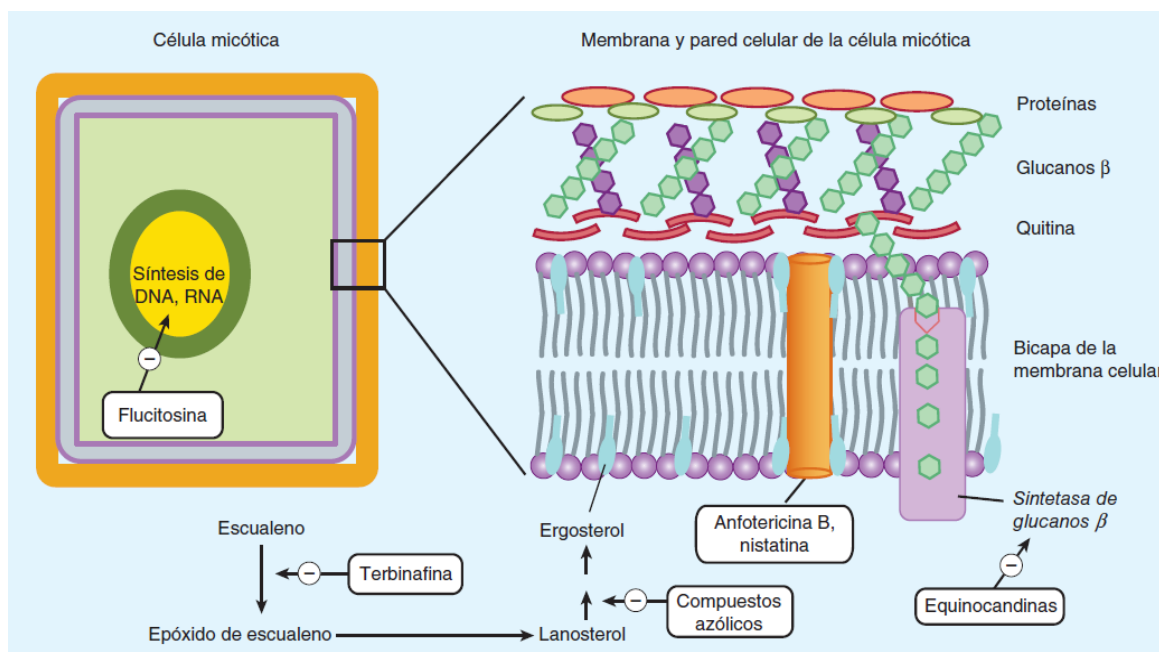


Figura 6. Resumen del mecanismo de resistencia de *Candida* spp. contra antimicóticos. Imagen extraída de Katzung, B. G. (2013).

1.8 TERAPIA FOTODINÁMICA

La terapia fotodinámica (TFD) tiene un método no invasivo y selectivo para la destrucción de células y tejidos no deseados, se ha utilizado con éxito para el tratamiento de infecciones virales, bacterianas y fúngicas resistentes a antimicrobianos, para la inactivación de patógenos en productos sanguíneos, para la esterilización del agua, para la desinfección y saneamiento de superficies (Benov, L. 2015). El renovado interés y los avances en la TFD antimicrobiana son bastante recientes, y acelerados por el advenimiento de la resistencia a los antimicrobianos (Abdel Kader, M. H. 2014) que en los últimos años se ha visto exacerbado por su uso inadecuado y excesivo. Estos microorganismos y genes resistentes no reconocen fronteras geográficas o ecológicas, por lo que es un problema a nivel mundial (FAO, 2016).

La TFD es una técnica basada en tres componentes: un fotosensibilizador (FS), oxígeno molecular y luz visible, ninguno de los cuales es tóxico o daña las células / tejidos por sí mismo. La eficiencia de la TFD depende del tipo de FS, su localización intracelular, el tiempo de incubación, los parámetros de irradiación (fluencia, densidad de potencia y longitud de onda), la disponibilidad de oxígeno y la susceptibilidad del objetivo, incluidos los mecanismos de defensa antioxidante. La TFD se ha utilizado durante muchos años, pero solo ahora está siendo ampliamente aceptada y utilizada, a pesar de que tiene muchas ventajas sobre otros tipos de tratamientos. Es una técnica que no discrimina entre cepas susceptibles o resistentes a antimicrobianos, de manera que pueden ser eliminadas de

manera efectiva. Además, hasta ahora no hay evidencia de resistencia microbiana a la TFD, incluso después de la aplicación repetida (Abdel Kader, M. H. 2014), es selectiva, en tanto que el agente FS se acumule selectivamente en el sitio de interés y se preserven los tejidos normales circundantes, por lo tanto, la TFD trata enfermedades localizadas. Se puede usar cuando la cirugía no es posible. La TFD es un procedimiento de bajo costo, además es una terapia repetible, a diferencia de la radioterapia. Por lo tanto, ofrece un medio de manejo a largo plazo.

1.8.1 FUNDAMENTO DE LA TFD

La TFD implica la activación de un FS por luz visible esto después, de un período de incubación con las células específicas, posteriormente se aplica luz a una longitud de onda específica que activa el FS promoviendo la reacción fotodinámica que resulta en la producción de especies reactivas de oxígeno dentro de las células objetivo, provocando la muerte de la célula (Morton, C., *et al.* 2015). La reacción fotoquímica puede explicarse por medio del diagrama de Jablonski, que representa el mecanismo de la TFD, figura 7.

Los FS, en el estado fundamental (singlete) tienen pares de electrones con espines opuestos en orbitales moleculares de baja energía (S_0). La absorción de un fotón (A) de luz con una longitud de onda específica eleva un electrón a un orbital de alta energía sin cambiar su espín, por lo tanto, el FS se transfiere desde su estado fundamental (S_0) a un estado singlete excitado (S_n). El estado S_n es de corta duración (nanosegundos) y puede perder su energía y volver al estado fundamental emitiendo fluorescencia (F) o conversión interna en forma de calor (H) volviendo así a S_0 . Alternativamente, el estado S_n puede experimentar un proceso conocido como cruce entre sistemas (ISC), para formar un estado triplete excitado (T_1) más estable donde se invierte el espín del electrón excitado. Esta inversión del espín electrónico es la razón de la vida relativamente larga (microsegundos) del estado T_1 , en comparación con solo nanosegundos del estado S_n . La molécula de FS desde el estado T_1 , puede perder energía y volver a su estado fundamental (S_0) ya sea por emisión de fosforescencia (P), pero este proceso está prohibida por las reglas de selección cuántica porque requiere un cambio del espín electrónico, que es un proceso lento, también puede perder energía a través de la conversión interna o transiciones sin radiación durante las colisiones con otras moléculas formando especies químicamente reactivas por medio de la transferencia de electrones o energía (Benov, L. 2015; Abrahamse, H. & Hamblin, M. R. 2016; Cieplik, F., *et al.* 2018).

El FS en estado T_1 puede estar involucrado en dos tipos mecanismos. En el mecanismo tipo I, el FS en un estado T_1 transfiere un electrón a sustratos circundantes que conducen a la formación de radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$) que pueden reaccionar y producirse peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o en radicales hidroxilo libres altamente reactivos ($HO\cdot$), que se forman a través de reacciones de tipo Fenton. Por el contrario, en el mecanismo tipo II, el estado T_1 del FS transfiere su energía directamente al oxígeno molecular en estado fundamental (3O_2), lo que conduce a la aparición de oxígeno singlete (1O_2), que no es más que oxígeno molecular energizado (Cieplik, F., *et al.* 2018). La transferencia de energía para producir 1O_2 (tipo II) compite con la transferencia de electrones (tipo I), y se cree que la mayoría de los FS generan tanto 1O_2 como radicales. Porque la transferencia de energía a O_2 ocurre a una velocidad mayor que la transferencia de electrones, y 1O_2 es

más reactivo que $O_2^{\cdot -}$; el oxígeno singlete se considera la principal especie dañina en TFD. Además, los sistemas biológicos están protegidos enzimáticamente contra el superóxido, pero las enzimas antioxidantes que eliminan 1O_2 no han evolucionado, presumiblemente debido a su corta vida útil (Benov, L. 2015; Cieplik, F., *et al.* 2018).

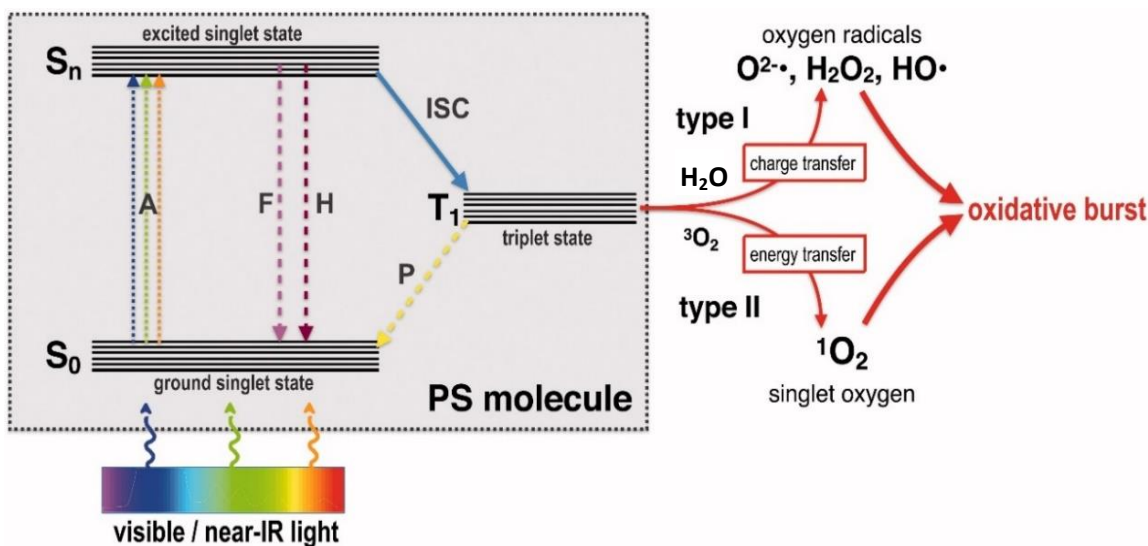


Figura 7. Diagrama de Jablonski que muestra los mecanismos fotoquímicos y fotofísicos de la TFD. Imagen extraída y modificado de Cieplik, F., *et al.* 2018.

PS molecule: FS, S_0 : estado singlete del FS en su estado fundamental; S_n : estado singlete excitado del FS; T_1 : estado triplete excitado del FS; A: absorción de luz; F: emisión de fluorescencia; H: calor (conversión interna); ISC: cruce entre sistemas; P: emisión de fosforescencia; 3O_2 : oxígeno en estado fundamental; 1O_2 : oxígeno singlete; $O_2^{\cdot -}$: anión superóxido; $HO^{\cdot}$: radical hidroxilo; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno.

1.8.2 MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD MEDIADA POR TFD

Las células contienen una variedad de biomoléculas que son sustratos potenciales para la oxidación por 1O_2 y otras especies reactivas generadas por TFD. En principio, la probabilidad de que tales especies reaccionen con un objetivo potencial depende de la distancia entre el FS y el objetivo, la abundancia del objetivo y la velocidad de reacción, figura 8. Los FS raramente participan solo en procesos de tipo I o tipo II; por lo tanto, la activación fotodinámica generalmente genera una mezcla especies generadas por reacciones de tipo I y tipo II ($O_2^{\cdot -}$, $HO^{\cdot}$ y 1O_2) (Benov, L. 2015).

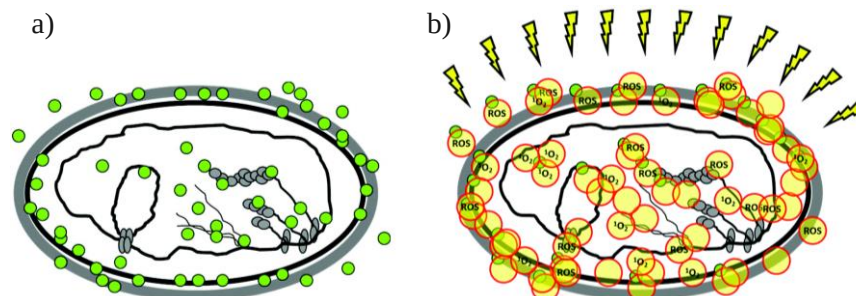


Figura 8. La explosión oxidativa en la célula ocurre aproximadamente en el sitio de la localización del fotosensibilizador. Las ERO reaccionan contra el microorganismo con procesos de oxidación de tal manera que la supervivencia no le es posible. (A) Localización inespecífica de un FS dado antes de la iluminación. (B) Generación de ERO, especialmente oxígeno singlete (1O_2), después de la activación ligera del FS por luz a una longitud de onda específica. Imagen extraída de Maisch, T. 2015.

El 1O_2 reacciona rápidamente produciendo peróxidos como productos iniciales, y la descomposición de los peróxidos a su vez genera radicales que pueden iniciar una variedad de reacciones químicas, generando productos como radicales oxidantes hidroxilo ($HO \bullet$). La vida útil de 1O_2 es muy corta ($\sim 10 - 320$ ns) y limita su difusión aproximadamente de 10 a 55 nm en las células haciendo que la localización del FS sea un factor clave para determinar qué estructuras celulares se dañarán (Benov, L. 2015).

El radical hidroxilo, reacciona con la mayoría de los aminoácidos, como consecuencia de las modificaciones fotoinducidas, las proteínas pierden sus funciones catalíticas, de señalización celular y otras funciones esenciales. Por otro lado, el FS localizado en un entorno lipídico tiene una mayor probabilidad que el agua de encontrar O_2 y producir 1O_2 tanto como radicales derivados de oxígeno, generando peróxidos lipídicos. La oxidación leve de la membrana inducida por TFD puede provocar la pérdida de la función de barrera de membrana, la inactivación de los complejos proteicos unidos a la membrana, modificaciones de los receptores celulares e interrupción de las cascadas de señalización celular, que en última instancia puede conducir a la muerte celular. Además, se informa que las FS que se localizan en mitocondrias son más eficientes para matar células que las que se localizan en otros sitios celulares. El daño fotodinámico en mitocondrias da como resultado la interrupción de la cadena de transporte de electrones, la disipación del potencial de membrana mitocondrial, la hinchazón mitocondrial y puede inducir una respuesta apoptótica rápida. Los radicales hidroxilo reaccionan, además, con todos los constituyentes del ADN. La principal forma en que $HO \bullet$ provoca modificaciones en la base es mediante la adición de dobles enlaces. Por otro lado, el oxígeno singlete es un modificador de ADN altamente selectivo. Su objetivo principal es la guanina, que a través de una serie de reacciones se convierte en 8- oxo-7, 8- dihidro- 2'- desoxiguanosina (Benov, L. 2015). Una vez que la oxidación de proteínas, lípidos, ADN y sus consecuencias no pueden prevenirse ni repararse, el desarrollo del daño continúa hasta que se alcanza un punto final irreversible (Abdel Kader, M. H. 2014).

De manera que la TFD puede matar células a través de tres principales mecanismos: muerte celular apoptótica, necrótica y autofagia. Se cree que la localización subcelular de la FS en diferentes orgánulos (mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico, membrana plasmática, etc.) desempeña un papel importante en el tipo de mecanismo de muerte celular que domina, pero otro factor como la dosis total de TFD (Concentración FS $\times$ fluencia de luz) también juegan un papel importante, figura 9. En general, se acepta que la apoptosis es la principal modalidad de muerte celular cuando las células se tratan con TFD *in vitro* (Abrahamse, H. & Hamblin, M. R. 2016).

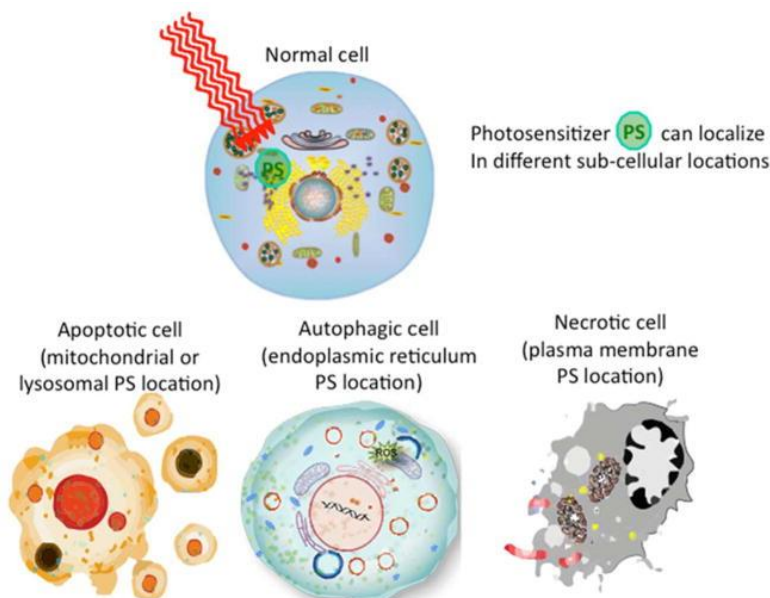


Figura 9. La localización subcelular del FS en diferentes orgánulos de la célula (como: mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico, membrana plasmática, etc.) juega un papel importante en el tipo de mecanismo de muerte celular que domina, otros factores como la dosis total de TFD (concentración de FS $\times$ fluencia de luz) también juegan un papel importante. Imagen extraída de Abrahamse, H. & Hamblin, M. R. 2016.

1.8.3 FOTSENSIBILIZADOR IDEAL

Idealmente, un FS debe tener un pico de absorción fuerte en la región espectral del rojo al infrarrojo cercano (entre 650 y 800 nm) porque la absorción de fotones individuales con longitudes de onda superiores a 800 nm no proporciona suficiente energía para excitar el oxígeno a su estado singlete. Los FS deben poseer un rendimiento cuántico triplete sustancial que conduzca a una buena producción de ERO tras la irradiación. No debe tener una toxicidad en oscuridad y fotoblanqueamiento rápido de los tejidos normales, minimizando así los efectos secundarios de la fototoxicidad (Abrahamse, H. & Hamblin, M. R. 2016).

La mayoría de los FS actualmente en uso para TFD son estructuras cíclicas tetrapirrólicos: porfirinas y sus análogos, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, etc. Dentro de los FS sintéticos se encuentran las ftalocianinas que se activan con luz roja lejana en el rango de 670 nm. Dentro de las fenotiazinas, los más populares son el azul de metileno (AM) y azul de toluidina (AT) que han sido ampliamente estudiados para aplicaciones antimicrobianas y con menos frecuencia para células cancerosas, muestran una fuerte absorción en el espectro rojo ($\approx 600\text{--}680$ nm). Así también el rosa bengala (RB), xanteno que ha sido explorado para aplicaciones antimicrobianas, unión de tejidos y aplicaciones anticancerígenas (Abrahamse, H. & Hamblin, M. R. 2016).

1.8.4 FUENTES DE LUZ

En el campo de la TFD se han descrito tres fuentes de luz principales en la literatura para la activación de la luz de un FS hasta ahora, estos son: láseres, diodos emisores de luz (LED) y lámparas de descarga de gas (Cieplik, *et al.* 2018).

Los láseres se aplican principalmente debido a su monocromaticidad más que a otras propiedades (es decir, coherencia, propagación de haz paralelo, intensidad espacial estrecha). Por lo tanto, puede acoplarse fácilmente en una sola fibra óptica y montarse en diferentes dispositivos de suministro de luz. En comparación con los láseres, los LED ofrecen un espectro de emisión ligeramente más amplio y sus costos son más bajos. A diferencia de los láseres y los LED, las lámparas halógenas tienen la ventaja de que pueden filtrarse espectralmente para adaptarse a cualquier FS; sin embargo, no pueden acoplarse de manera eficiente en paquetes de fibra óptica o guías de luz líquida, y causan más calentamiento en comparación con los láseres y los LED. En general, para la irradiación de un FS determinado, la emisión espectral y la intensidad de la fuente de luz respectiva, así como el modo de suministro de luz (a través de fibra óptica o directamente) son más importantes que el tipo de fuente de luz en sí, por ejemplo, láser, LED o lámpara de descarga de gas (Cieplik, *et al.* 2018).

2. ANTECEDENTES

La TFD pertenece al grupo de fototerapias que se han utilizado desde la antigüedad, pero desapareció durante muchos siglos y no fue hasta finales de 1800 y principios de 1900 que floreció nuevamente. Un gran contribuyente a la fundación de la fototerapia moderna fue el médico danés Niels Ryberg Finsen (1860-1904) quien planteó la hipótesis de que el tinte de acridina convierte la luz en una energía química activa, hallazgo que formó la base de TFD Oscar Raab, alumno de Niels, descubrió accidentalmente que los microorganismos como la paramecia que habían sido incubados con ciertos tintes podían ser destruidos cuando se exponían a la luz, pero no cuando se mantenían en la oscuridad. Posteriormente el profesor H. Tappeiner, introdujo el término "Acción fotodinámica" en 1904, más tarde él y su grupo de investigación realizaron varios estudios sobre TFD y descubrieron que el mecanismo subyacente de TFD involucraba ERO, lo que implicaba que se requería oxígeno para este tipo de terapia. La era moderna de la TFD comenzó en la década de 1970 en los EE. UU., cuando el Dr. Thomas Dougherty y su equipo de trabajo introdujeron el primer FS que se denominó "derivado de hematoporfirina" (HpD), y una preparación más purificada que más tarde se conoció como Photofrin, aunque con una pobre penetración en el tejido. Desde entonces, se ha trabajado por encontrar FS mejorados y útiles para mediar la TFD y combatir el cáncer, las infecciones y muchas otras enfermedades (Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. 2016; Abdel Kader, M. H. 2014).

Actualmente la TFD se ha utilizado para tratar una serie de afecciones como el cáncer (Juarranz, Á., *et al.* 2008; Ucar, E., *et al.* 2019; Mahmoudi, K., *et al.* 2019) además de varias infecciones patógenas fúngicas y otros microorganismos como parásitos (Silva, M. L. F., *et al.* 2019) bacterias (Aspiroz, C., *et al.* 2017) y virus (Maldonado Alvarado, E., *et al.* 2017).

Las infecciones por hongos son un problema de salud importante en todo el mundo, que afectan tanto a personas inmunocompetentes como inmunocomprometidas. En los últimos años las infecciones fúngicas causadas por las especies de *Candida* han aumentado dramáticamente a nivel mundial (Pappas Peter G., *et al.* 2018). Aunque *C. albicans* sigue siendo el agente causal más importante, también se ha observado el aumento de especies del grupo *C. no albicans* que son aisladas con más frecuencia (Sadeghi, G., *et al.* 2018) y que además presentan diversos patrones de resistencias contra antifúngicos tradicionales como azoles, polienos e incluso equinocandinas (Perlin, D. S., *et al.* 2017), de tal manera que la infección por estos microorganismos se vuelve crónica y / o recurrente, que además puede ser capaz de terminar con la vida del paciente.

Por otro lado, el efecto de TFD contra células fúngicas ha demostrado ser exitosa utilizando diferentes procedimientos para el tratamiento contra estas infecciones tanto *in vitro* como *in vivo* (Baltazar, L. M., *et al.* (2015).

Algunas investigaciones han demostrado que la TFD ha sido exitosa al utilizar fotosensibilizadores como azul de metileno *in vitro*. Dovigo, L. N., *et al.* (2011) probaron el efecto fungicida de la TFD - AM contra *C. albicans* y *C. glabrata* resistentes a fluconazol,

ellos utilizaron Photogem un derivado de hematoporfirina (HpD) como FS excitándolo con luz LED (longitud de onda: 455 nm) probando diferentes fluencias, observaron que para *C. albicans* en células planctónicas requiere de menor dosis (18 y 25 J / cm²) para ser eliminada con respecto a las células planctónicas *C. glabrata* (25.5 y 37.5 J / cm²). De forma general la asociación de 25 mg / mL de Photogem y dosis de 37.5 J / cm² resultó en la inactivación completa de todos los microorganismos independientemente de la especie y la cepa evaluada. Por otro lado, Sousa, J. N. L. *et al.* (2015) realizaron fotoinactivación sobre levaduras de *C. albicans* usando azul de metileno (150 µg / mL) como FS, y luz laser de baja potencia (longitud de onda: 660 nm, y dosis: 426 J / cm²), el resultado fue un efecto antifúngico significativo contra *Candida*, sin reducción de unidades formadoras de colonia (UFC) en el control de toxicidad en oscuridad.

In vivo la TFD también se ha utilizado en la onicomicosis, para esto Figueiredo Souza, L. W., *et al.* (2014) demostraron que la TFD con diodos de emisión de luz y azul de aetileno al 2% (dosis: de luz: 18 J / cm²) para tratar la onicomicosis de las uñas de los pies, es un tratamiento seguro, efectivo y bien tolerado, en comparación con los pacientes con un tratamiento tradicional de antifúngicos como el fluconazol.

2.1 ANTECEDENTES DIRECTOS

Spezzia-Mazzocco, T., *et al.* (2016) realizaron TFD *in vitro* sobre 2 géneros de hongos dermatofitos (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsuras*, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum*) utilizando azul de metileno (20 y 40 µM) y luz laser HeNe (dosis: 20, 40 y 60 J / cm²). Se demostró que las especies del género *Microsporum* tienen una mejor respuesta al tratamiento con TFD que los géneros *Trichophyton*. De forma general, la TFD demostró ser efectiva para inhibir el crecimiento de hongos y se descubrió que la TFD a exposición repetida con luz de baja potencia puede lograr mejores resultados que una exposición única a mayor potencia.

Torres-Hurtado, S. A., *et al.* (2019) realizaron TFD *in vitro* de *C. albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*, comparando el azul de metileno y el rosa de bengala. Ellos utilizaron azul de metileno en *C. albicans* y *T. mentagrophytes* o y el rosa de bengala en *C. albicans*. Los resultados fueron una reducción significativa en UFC / ml en las cepas utilizadas. Y se demostró que el rosa de bengala fue más efectivo que el azul de metileno para la inactivación de *C. albicans*. Además, es posible reducir significativamente la cantidad de FS y la densidad de energía lumínica mediante el uso de irradiaciones repetitivas en ambos géneros probados.

En los ejemplos experimentales mencionados se demuestra una reducción significativa en la eliminación del microorganismo utilizado, concordando en la idea de que la técnica de TFD pueda utilizarse como un nuevo tratamiento o un complemento del tratamiento convencional.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones nosocomiales son causantes de una elevada tasa de morbi-mortalidad. Uno de los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales de origen micótico es *Candida*, que además forma parte de la microbiota de piel y las mucosas, lo que aumenta la posibilidad de diseminación e infección en pacientes con factores de riesgo.

C. albicans ha sido aislado con mayor frecuencia, pero actualmente especies *C. no albicans* representan la mitad de los aislamientos clínicos detectados, causando infecciones más graves debido a que presentan patrones variables de resistencia contra antifúngicos, limitando el uso de terapias tradicionales como el fluconazol en los pacientes, extendiendo la duración de la estadía y el costo total de la atención médica, incrementando además la mortalidad en el paciente.

Diversos factores del huésped, antifúngicos y los hongos contribuyen a las fallas terapéuticas, entre ellas el uso indiscriminado de las terapias antifúngicas, la profilaxis, la terapia repetida y a largo plazo resultan en la selección de cepas menos susceptibles o aparición de resistencia farmacológica adquirida durante la terapia en cepas susceptibles, por lo cual es conveniente buscar alternativas que permitan mejorar la terapia antifúngica.

Los estudios en México sobre la terapia fotodinámica y su mecanismo de acción en las células son escasos, por lo tanto, es de suma importancia estandarizar la técnica y conocer los efectos de la TFD que esta produce en levaduras del género *Candida* resistentes a diferentes antifúngicos.

4. JUSTIFICACIÓN

La TFD, no es tratamiento recientemente propuesto, sino que ha sido retomada hace pocos años debido a las ventajas que esta ofrece dentro de los cuales esta su capacidad de erradicar microorganismos, tiene cierta selectividad en el tejido acumulando el fotosensibilizador en el tejido diana, no presenta toxicidad acumulada lo que permite repetir múltiples tratamientos y no presenta efectos secundarios, permitiendo así su uso en pacientes con enfermedades asociadas, contra enfermedades infecciosas y no infecciosas. Su uso ha sido aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de Estados Unidos para su uso en cáncer de piel, vejiga, mamas, lesiones en cavidad bucal, entre otros, además se usa para el tratamiento de la piel como las queratosis actínicas, el acné y fotorrejuvenecimiento; así mismo, en varias investigaciones *in vivo* e *in vitro* se demuestra su eficacia reduciendo significativamente la viabilidad de microorganismos como ejemplo: bacterias (como *P. aeruginosa*), virus (como el virus de papiloma humano) y algunos parásitos (protozoos como *Leishmania*). En algunos países además ya se utiliza como una terapia de apoyo para aumentar la efectividad del tratamiento base. Por otro lado, el azul de metileno es una fenotiazina fotoactivable, adecuada para producir citotoxicidad sobre la membrana de microorganismos gracias a su naturaleza catiónica; es barato y su tiempo de incubación es relativamente corto, lo cual facilita su uso en la TFD.

Los estudios sobre TFD *in vitro* e *in vivo* con cepas tipo y de origen clínicas, por lo tanto, son necesarios para ampliar el conocimiento y ayudar en el tratamiento contra infecciones como la candidosis.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la terapia fotodinámica en cepas *Cándida albicans*, *Cándida tropicalis* y *Cándida glabrata*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Confirmar la identidad de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* por PCR especie - específico y MALDITOF

1.1 Determinar el perfil a antifúngicos de las cepas *C. glabrata*

1.2 Seleccionar cepas *C. albicans* y *C. tropicalis* resistentes a antifúngicos

2. Estandarizar la metodología de la TFD sobre levaduras *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*

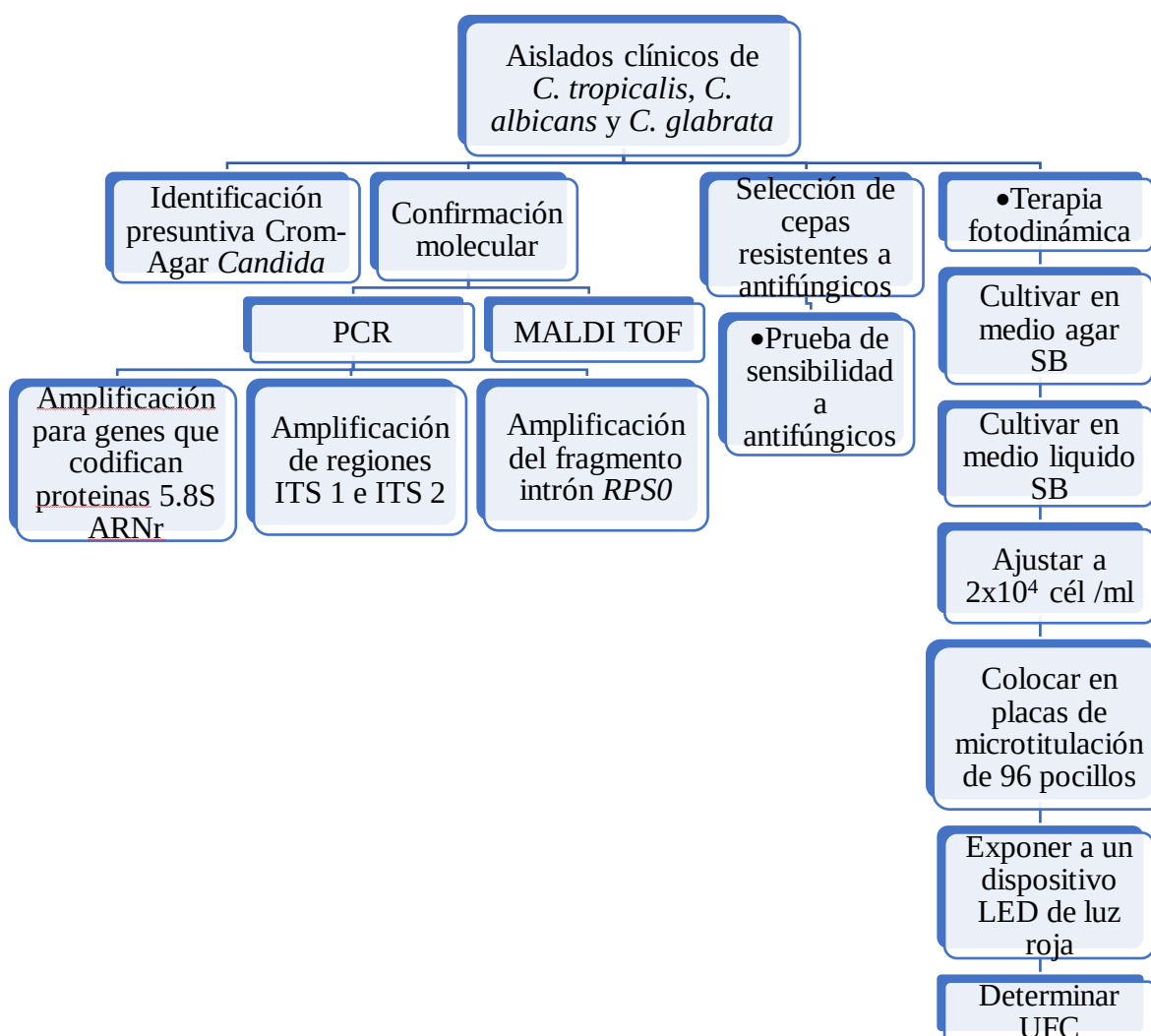
2.1 Determinar el efecto de la TFD / AM sobre la cepa *C. albicans* CAF2 y las cepas silvestres *C. albicans* resistentes a antifúngicos.

2.2 Determinar el efecto de la TFD / AM sobre la cepa *C. tropicalis* MYA3404 y las cepas silvestres *C. tropicalis* resistentes a antifúngicos.

2.3 Determinar el efecto de la TFD / AM sobre la cepa *C. glabrata* ATCC 2001 y las cepas silvestres *C. glabrata* resistentes a antifúngicos.

3. Determinar estadísticamente las diferencias por medio de ANOVA

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. MATERIALES Y METODOLOGÍA

7.1 MICROORGANISMOS

En la tabla 1 se muestran las cepas que se utilizaron para realizar este trabajo (cepas de referencia y el número de aislados clínicos por especie utilizadas) recuperados del cepario del laboratorio de Micología del ICUAP de Microbiología BUAP.

Tabla 1. Cepas *Candida* spp. resistentes aisladas de pacientes utilizadas en este trabajo.

Cepas de referencia:	Aislados clínicos:
<i>C. tropicalis</i> MYA3404	<i>C. tropicalis</i> (5 cepas resistentes)
<i>C. albicans</i> CAF2	<i>C. albicans</i> (5 cepas resistentes)
<i>C. glabrata</i> ATCC2001	<i>C. glabrata</i> (2 resistentes y 3 susceptibles)

7.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS, BUFFER Y FUENTE DE LUZ:

Extracto de Levadura Peptona Dextrosa (YPD): Se disolvió 20 g / L de D - glucosa, 20 g / L de peptona de caseína MCD LAB, 10 g / L de extracto de levadura MCD LAB y agar BD Bioxon al 2 % en agua destilada, se dejó hervir por 1 minuto y se esterilizó a 121° C por 15 minutos. Se enfrió a una temperatura entre 45 a 50° C, y se distribuyó en placas, se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se incubó a 37° C por 24 h para confirmar esterilidad.

Difco TM CHROMagar TM *Candida*: Se esterilizó material (agua, abatelengua, aluminio, etc.) y se pesó en oscuridad 47.7 g / L de medio Difco TM CHROMagar TM *Candida* y se disolvió en agua estéril tibia con mecheros y agua tibia, se dejó hervir por 1 minuto, por último, se vertió el medio en placas petri en la campana de flujo laminar y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se incubó a 37° C por 24 h envueltas en papel, para confirmar esterilidad.

TAE 50X: Se disolvió 242 g de tris base, 18.61 g EDTA en 50 mL de agua destilada, posteriormente se añadió 57.1 g ácido acético glacial y se aforó a 1 L con agua destilada, rotulado correctamente [50X] / fecha de preparación. Finalmente se diluyó a [1X] y se guardó en refrigeración para posterior uso.

Gel de agarosa Molecular Grade BIOLINE al 1.5%: Se disolvió 1.5 g de gel de agarosa molecular grade BIOLINE en 100 mL de TAE preparado al [1X] y se calentó hasta disolverse completamente.

Bromuro de etidio: Se preparó 1 µg de bromuro de etidio / mL en agua destilada utilizando guantes y cubrebocas respectivamente. Manteniendo precaución al preparar y manipular la preparación.

Medio de cultivo agar Dextrosa Sabouraud (SB) MCD LAB, S.A. DE C.V.: Se disolvió 65 g / L de medio de cultivo agar dextrosa sabouraud MCD LAB, S.A. de C.V. en agua destilada, se dejó hervir por 1 minuto y se esterilizó a 121° C por 15 minutos. Se dejó enfriar a una temperatura ambiente, y se distribuyó en placas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se incubó a 37° C por 24 h para confirmar esterilidad.

Caldo agar Dextrosa Sabouraud BD Bioxon: Se disolvió 20 g / L de medio caldo agar dextrosa sabouraud BD Bioxon, se esterilizó a 121°C por 15 minutos en autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Agar Mueller Hinton BD Bioxon: Se disolvió 37 g / L de medio agar Mueller Hinton BD Bioxon en agua destilada y se dejó hervir por 1 minuto, luego se esterilizó a 121°C por 15 minutos en autoclave. Se dejó enfriar a una temperatura ambiente y se distribuyó en placas. Posteriormente se incubó a 37° C por 24 h para realizar prueba de esterilidad.

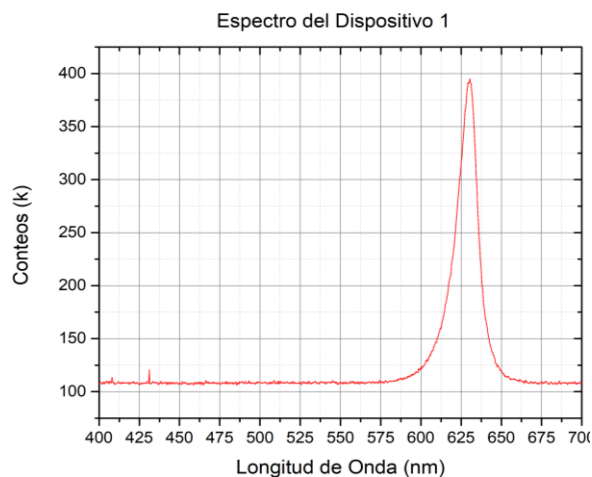
Buffer PBS: Se disolvió 287.5 mg de sodio fosfato dibásico (heptahidratado) (Gran.) Omnicem, 55 mg potasio cloruro (Gran.) Omnicem, 2,015 mg sodio cloruro (Crist.) Omnicem y 50 mg potasio fosfato monobásico Omnicem (Crist.) en agua destilada. Se ajustó a un pH de 7.4 y se esterilizó en autoclave. Para ajustar pH se utilizó: NaOH 1 M y HCl 1 M

Fuente de luz: La terapia fotodinámica se realizó con un dispositivo rojo fabricado en el departamento de óptica del INAOE (figura 10), con un espectro de emisión máximo de 630 nm (gráfica 1). El LED se enfocó de tal manera que cubría uno de los pocillos de la microplaca (microplacas estériles de poliestireno de fondo plano) y se irradió con 20 mW, 60 mW / cm², a 55 J / cm².

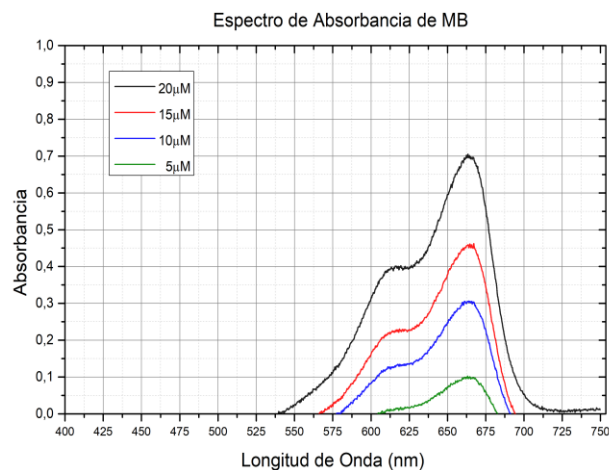
Fotosensibilizador (FS): El azul de metileno MEYER (AM) se utilizó como fotosensibilizador químico para la inactivación fotodinámica. Se preparó una solución stock de azul de metileno con buffer PBS pH 7.4 a una concentración de 200 µM, utilizando la formula $g = (PM) (Vol) (M)$, se esterilizó con una filtro de jeringa estéril (CA: 0.22 µm – 33 mm) posteriormente se diluyó a 20 µM hasta su uso. El peso molecular del AM es de 373.90 g / mol y su espectro de absorción máximo en PBS es de 630 nm, gráfica 2.



Figura 10. Dispositivo para TFD fabricado en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE).



Gráfica 1. Espectro de emisión del dispositivo rojo máximo en 630 nm.



Gráfica 2. Espectro de absorción de la solución azul de metileno en PBS.

7.3 IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE ESPECIES POR EL MÉTODO CONVENCIONAL

CHROMagar® *Candida*

Cada muestra se sembró en placas de agar YPD por estría cruzada y se incubó a 37°C durante 24 horas. Se tomó una colonia aislada y se resembró en placas de CHROMagar® *Candida* y se incubó en un lapso de 48 a 72 horas a 37°C. Posteriormente se analizaron 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*, azul verdoso a azul metálico y las colonias *C. glabrata*, color rosa. Posteriormente se resembró en placas de agar YPD para pruebas posteriores.

7.4 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO DE KIRBY Y BAUER

Para realizar la prueba de sensibilidad contra antifúngicos se tomaron cepas *C. glabrata*, se cultivaron en medio YPD, de la cual se tomó una pequeña porción y se llevó a un tubo con solución fisiológica estéril hasta conseguir una concentración de 1×10^6 Lev / ml utilizando el tubo #5 de Mc Farland, con la ayuda de un hisopo impregnado de la solución anterior se colocó en placas de agar Mueller Hinton, y se realizó un estriado masivo, se esperó aprox. 5 a 10 minutos hasta secarse, y se colocaron sensidiscos de fluconazol (FCA) BIO RAD 50 µg, ketoconazol (KET) BIO RAD 50 µg, anfotericina B (AB) BIO RAD 100 µg con pinzas esterilizadas previamente con alcohol (figura 11), se colocó además un control con papel filtro más solución fisiológica, finalmente se presionaron los discos ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto y se incubaron las placas de forma invertida por 48 a 72 h hasta su lectura para observar halos definido según el inserto, tabla 2.

Tabla 2. La lectura se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante:

Antifúngicos	Diámetro de la zona de inhibición	Interpretación
Anfotericina B	> 10 mm	Sensible
	≤ 10 mm	Intermedia / Resistente
Azoles	= 20 mm	Sensible
	20 – 10 mm	Intermedio
	10	Resistente

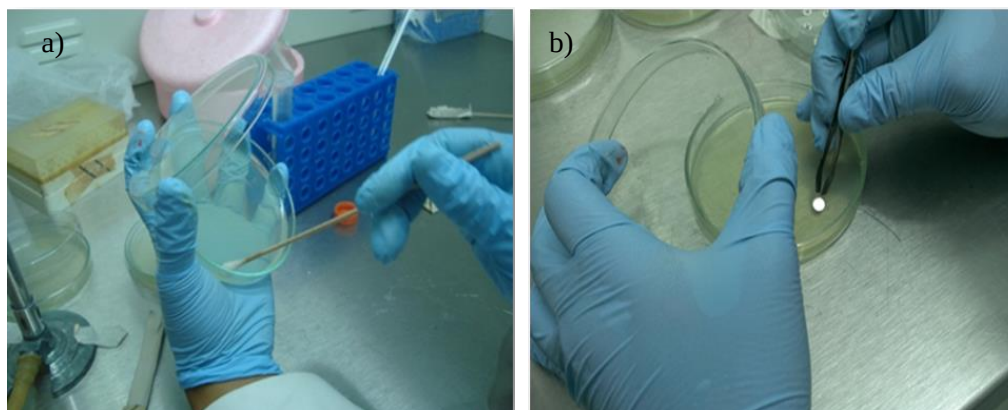


Figura 11. Prueba de sensibilidad para las cepas *C. glabrata* contra antifúngicos por el método de difusión en disco de Kiby y Bauer. a) Estriado masivo con un hiposo impregnado del cultivo en solución fisiológica aproximadamente 1×10^6 Lev / ml. b) Después de secarse las muestras se colocaron los sensidiscos con antifúngicos de Fluconazol (FCA) BIO RAD 50 µg, Ketoconazol (KET) BIO RAD 50 µg, Anfotericina B (AB) BIO RAD 100 µg.

7.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DE COLONIA

7.5.1 METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *Candida* POR PCR A PARTIR DE GENES PARA PROTEÍNAS 5.8S ARNr

Las levaduras se cultivaron en medio solido YPD / Cloranfenicol a 37° C por 24 h, se tomó una porción muy pequeña de una sola colonia con la ayuda de una pipeta estéril y se llevaron a una solución de 3 µL de NaOH 0.02 M estéril. Se calentó a 94 – 95 °C por 10 a 12 min en el termociclador. Posteriormente se prepara el mix de la PCR. Cada reacción de PCR se preparó con un volumen total de 25 µL, que corresponde a 5 µL sol buffer, 0.5 µL de cada oligonucleótidos Foward y Reverse, 0.5 de Taq Plomerasa, 1 µL de DMSO, 14.5 µL de agua libre de nucleasas más 3 µL del templado o muestra de ADN previamente preparado. Este trabajo se realizó en el laboratorio de GMCA en la Universidad de Valencia, España.

En el ensayo para la PCR se incluyeron los controles positivos *C. albicans* CAF2, *C. glabrata* ATCC2001 y *C. tropicalis* MYA3404. Para la identificación se utilizó la metodología y condiciones propuestas en el trabajo realizado por Ruiz Gaitán, A. C., *et al.* (2018). Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos para la identificación molecular de especies del género *Candida*. secuencia 5'-3'

Levadura	Region	Oligonucleótidos 5.8S ADN _r	Pb
<i>Candida</i>	RDN58_F	GGATCTCTTGGTTCTCGC	134
	RDN58_R	CGCTCAAACAGGCATGC	

7.5.2 METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN POR PCR A PARTIR DEL

GEN INTRÓN *RPS0* PARA LEVADURAS *C. glabrata*

Para las condiciones de amplificación del gen intrón *RPS0* se utilizó la metodología propuesta en el trabajo realizado por García Martínez M. *et al*, (2010), y también se utilizaron los oligonucleótidos que ellos diseñaron, en el ensayo se incluyó un control positivo, *C. glabrata* ATCC2001. Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación en la tabla 4. Este trabajo se realizó en el laboratorio de GMCA en la Universidad de Valencia, España.

Tabla 4. Oligonucleótidos especie - específico para la identificación molecular de las especies del género *Candida*. secuencia 5'-3'

Levadura	Oligonucleótidos del gen intrón <i>RPS0</i>		Pb
<i>C. glabrata</i>	CGf	ACATATGTTTGCTGAAAAGGC	406
	CGr	ACTTTTCTTAGTGTTTCAGGACTTC	

7.5.3 METODOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN POR PCR A PARTIR DE LAS REGIONES ITS (ITS1 E ITS2) PARA *C. albicans* y *C. tropicalis*

La caracterización molecular se realizó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos especie – específicos basados en la detección de regiones conservadas del ARNr, diseñados a partir de las regiones ITS 1 e ITS 2 cuya técnica fue descrita en el trabajo de Luo & Mitchel, (2002). Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación en la tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos especie - específico para la identificación molecular de las especies del género *Candida*.

Levadura	Region	Oligonucleótidos; secuencia 5'-3'		Pb
<i>C. albicans</i>	ITS1	F	TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A	273
	ITS2	R	ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG	
<i>C. tropicalis</i>	ITS1	F	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T	357
	ITS2	R	TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T	

Cada reacción de PCR se preparó con un volumen total de 12.5 µL, que consisten en, 1 µL de cada oligonucleótido Foward y Reverse, 6.25 µL de DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), y 3,25 de agua libre de nucleasas, más 1µL de suspensión de ADN previamente preparado. En cada ensayo se incluyó un control positivo *C. albicans* CAF2 y *C. tropicalis* MYA3404 para cada identificación respectivamente. Las condiciones de la amplificación en la programación del termociclador por PCR consistieron en una fase inicial de desnaturalización a 96 ° C por 5 min, seguida por 40 ciclos, iniciando con una temperatura de 94°C por 30 s, posteriormente la fase de alineación a 58°C por 30 s y la fase de elongación a 72° por 30 s. Finalmente la fase de elongación final a 72° durante 10 min.

7.6 ANÁLISIS DE ELECTROFORESIS

A los amplificadores obtenidos de la PCR, se les realizó un análisis electroforético en un gel de agarosa al 1.5%. En cada pozo del gel de agarosa se depositaron 5 μ L del producto de PCR, y un solo pozo fue cargado con 1 μ L del marcador de peso molecular 1 kb (Thermo scientific). A la cámara electroforética se le aplicó un voltaje de 75 V. Posteriormente el gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio 1 μ g / mL y se visualizó a través de la exposición a la luz ultravioleta (Benchtop 2UV™).

Los productos de PCR se analizaron evaluando el tamaño en pares de bases de cada una de las bandas obtenidas, tomando como control positivo las cepas de referencia. Aquellas que presentaban el tamaño esperado para cada especie se tomaron como positivas.

7.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE EL SISTEMA MALDITOF VTK



Figura 12. Equipo MALDITOF VITEK MS IVD utilizado en la identificación molecular por proteínas.

Se utilizó el programa MALDITOF VITEK MS IVD (figura 12), utilizado para la identificación de cepas de importancia médica. Las cepas se sembraron en medio YPD, y se colocó una muestra pequeña con la ayuda de un palillo estéril, sobre una placa metálica conductora, cada placa contenía espacio para 16 muestras (figura 13), y se adiciona una gota de ácido fórmico para romper la pared celular, posteriormente se le adiciona una matriz orgánica para lograr una cocrystalización muestra - matriz, que ayuda a identificar las proteínas. Para cada placa se coloca una muestra control que en este caso se usa *E. coli* ATCC. Las placas se reciben en el equipo y se procesan, los resultados se obtienen en menos de una hora según el número de muestras, y mediante la comparación de espectros en una base de datos se permite la discriminación y confirmación a nivel de género y

especie. Trabajo de identificación realizado en el laboratorio de microbiología del hospital Universitari i Politècnic La Fe (Valencia, España).

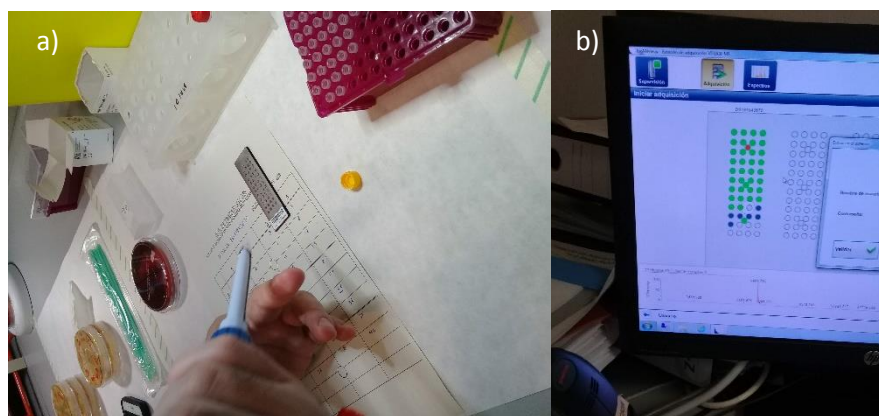


Figura 13. Se muestra a) la placa metálica donde se coloca la muestra más ácido fórmico y b) el posterior análisis en el sistema.

7.8 BLAST DE OLIGONUCLEÓTIDOS

El análisis por BLAST encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas y compara secuencias de nucleótidos con las bases de datos de secuencias y calcula la significación estadística. Posteriormente todos los oligonucleótidos utilizados fueron analizados en la base de datos de NCBI.

7.9 CRIOPRESERVACIÓN

Después de ser identificadas todas las cepas fueron criopreservadas a -70°C en medio caldo YPD y glicerol al 50%.

7.10 PROTOCOLO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA *IN VITRO*

7.10.1 CRECIMIENTO DE LEVADURAS

Todo el proceso debe realizarse con materiales y reactivos estériles, y en condiciones de esterilidad. Se sembraron de forma masiva los hongos en medio de agar Dextrosa Sabouraud y se incubaron a 37°C durante 24 h, posteriormente, se resiembran las levaduras en medio liquido Dextrosa Sabouraud y se incubó a 37°C por aprox. 12 h.

7.10.2 CONTEO DE LEVADURAS EN CÁMARA DE NEUBAUER

Para el conteo en cámara Neubauer se tomaron de 20 -a30 μL de la solución de levaduras y se suspende en PBS. Se cargó la cámara de Neubauer y se contó al microscopio, posteriormente se ajustó a una concentración de 10^4 células / ml.

Cálculo de la concentración en cámara Neubauer:

$$\text{Lev} / \text{mL} = 1 + 2 + \dots n = 10 / 10 \times 250,000$$

7.10.3 TERAPIA FOTODINÁMICA

Todos los experimentos fueron realizados 2 veces por triplicado, excepto para *C. glabrata* ATCC2001 y *C. glabrata* 20; la TFD se realizó 4 veces por triplicado para confirmar los resultados. La metodología de la TFD se estandarizó con las cepas *C. albicans* CAF2, *C. tropicalis* MYA3404 y *C. glabrata* ATCC2001 con 10 μM de FS azul de metileno y una dosis de luz de 55 J / cm^2 utilizando un dispositivo LED de luz roja. Para cada experimento se utilizó un control levaduras sin irradiación y sin AM, un control de toxicidad en oscuridad que contenía levaduras y AM sin irradiaciones, un control de luz que solo tenía levaduras y además recibió irradiaciones a una dosis de 55 J / cm^2 y por último, el tratamiento que combina la muestra de levaduras, el AM e irradiación a una dosis luz de 55 J / cm^2 .

A partir de la concentración de levaduras anterior se tomaron 50 μL de levaduras y se colocaron en pocillos de una placa de microtitulación (96 pocillos), y se adicionaron 50 μL de la solución del FS o PBS según fuera el caso. Se incubaron por 30' a 37 °C en oscuridad. Seguido a esto se irradió a una densidad luz de 55 J / cm^2 , (figura 14). Se recuperaron las muestras y se resembraron en placas con medio SB por 48 h a 30 °C en oscuridad y se contaron las UFC de 48 h para cada especie.

Para la TFD repetida en *C. glabrata* se siguió el mismo procedimiento; luego de la primera irradiación, se volvieron a incubar por 30' a 37 °C en oscuridad, y se repitió el proceso TFD una vez más en las mismas condiciones, posteriormente se resembraron en medio SB, y al cabo de 48 hrs se contaron las UFC.

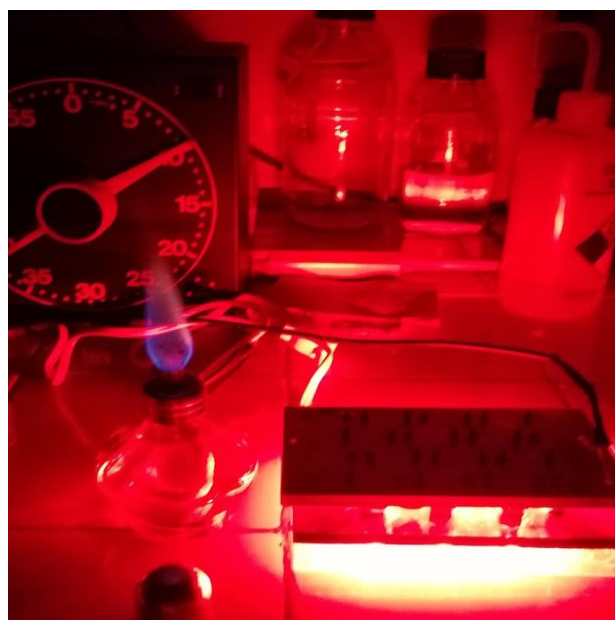


Figura 14. Aplicación de Inactivación fotodinámica sobre placa de 96 pocillos con levaduras *Candida*.

7.11 ANÁLISIS DE DATOS

La información obtenida fue recogida, codificada y archivada en un archivo de Excel una vez analizados los datos se transportaron al programa OriginPro 2018 para los análisis pertinentes. Cada experimento se normalizó para tener solo un grupo de estudio para cada cepa y luego se analizaron mediante estadística descriptiva media, desviación estándar y porcentajes para las variables categóricas en cada grupo. Posteriormente la eficacia de los tratamientos se evaluó analizando mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, para esto se consideró un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$), que indica una diferencia estadísticamente significativa. El análisis se logró con el software OriginPro 2018.

8. RESULTADOS

8.1 IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE ESPECIES POR EL MÉTODO CONVENCIONAL CHROMagar® *Candida*

En este estudio se recuperaron del cepario del laboratorio de micología del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Un total de 67 cepas fueron identificadas por el medio cromogénico CHROMagar® *Candida*. Los aislados que presentaron una coloración verde claro fueron identificadas como *C. albicans*, las colonias que manifestaron la coloración de azul verdoso a azul metálico fueron identificadas como *C. tropicalis* y las colonias que presentaron una coloración rosa a lila fueron identificadas como *C. glabrata* / *C. krusei* presuntivamente según las instrucciones de uso, ver figura 15.



Figura 15. Colonias típicas de *C. albicans* (color verde), colonias típicas de *C. tropicalis* (azul metálico) y colonias típicas de *C. glabrata* (color rosa) según el inserto en CHROMagar, 48 a 72 h de crecimiento (Izquierda a derecha). Las cepas de referencia utilizadas como control positivo fueron *C. albicans* CAF2 y *C. tropicalis* MY34-04 y *C. glabrata* ATCC 2001.

8.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los genes ribosomales que codifican las subunidades 5.8S están dispuestos en tándem formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma de las levaduras entre 100 y 200 veces. Los oligonucleótidos ITS1 e ITS2, son utilizados por su alto número de copias y su característica conservada (Vásquez, C. J. A., *et al.* 2016). Por otra parte, el gen *RPS0* codifica para una proteína que es un componente de la maquinaria de traducción y está extremadamente conservada entre las especie

8.2.1 IDENTIFICACIÓN POR PCR A PARTIR DE GENES QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS 5.8S ARNr

Para la identificación del género se esperaba encontrar un amplificado de aproximadamente 135 pb, y todas las cepas que se trabajaron dieron positivas al género *Candida*, los resultados se muestran a continuación en la figura 16.

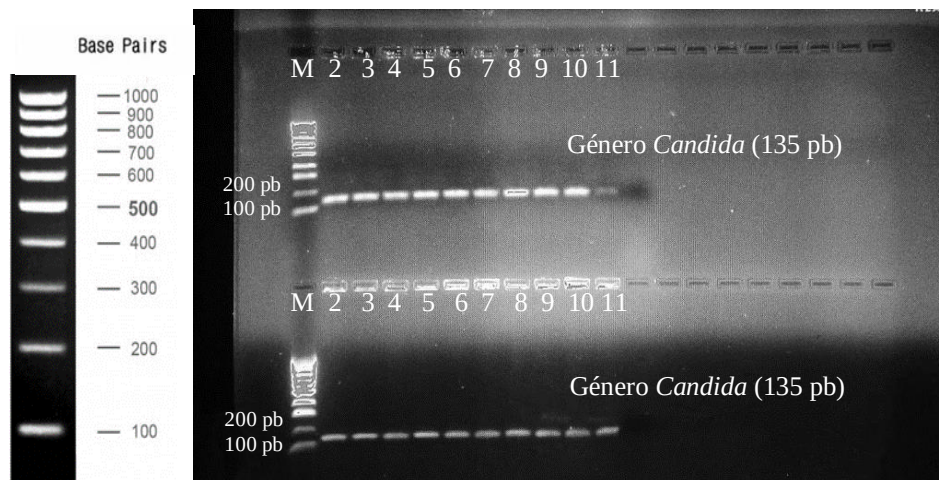


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 2 %. Se muestran bandas del amplificado para genes de proteínas 5.8S ARNr en los pocillos 2 - 11 superior e inferior correspondientes al género *Candida*, peso aproximado de 135 pb. Los controles utilizados fueron CAF2, MYA3404 y ATCC 2001; para *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* respectivamente. (M) Marcador de peso molecular.

8.2.2 IDENTIFICACIÓN POR PCR DE COLONIA A PARTIR DEL GEN INTRÓN *RPS0* CON OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECIE – ESPECÍFICOS PARA *C. glabrata*

Para la identificación de *C. glabrata* se esperaba encontrar un amplificado de aproximadamente 406 pb, los resultados se muestran a continuación en la figura 17.

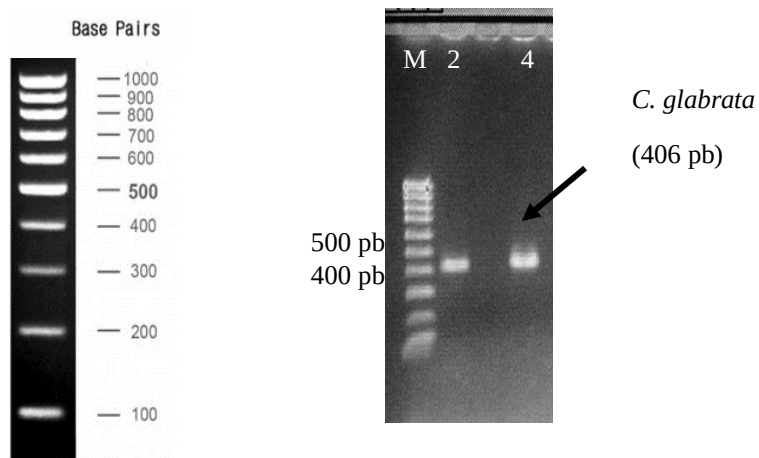


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 2 %. Se muestran amplificados del fragmento gen intrón *RPS0* en los pocillos 2 y 4, correspondientes a levaduras *C. glabrata*, peso aproximado de 406 pb. El control utilizado fue ATCC 2001. (M) Marcador de peso molecular.

8.2.3 IDENTIFICACIÓN POR PCR DE COLONIA A PARTIR DE LAS REGIONES ITS 1 E ITS 2 CON OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECIE – ESPECÍFICOS PARA *C. albicans* y *C. tropicalis*.

Para la identificación de *C. tropicalis* se esperaba encontrar un amplificado de aproximadamente 357 pb, para *C. albicans* se esperaba encontrar un amplificado de aproximadamente 272 pb, los resultados se muestran a continuación en la figura 18.

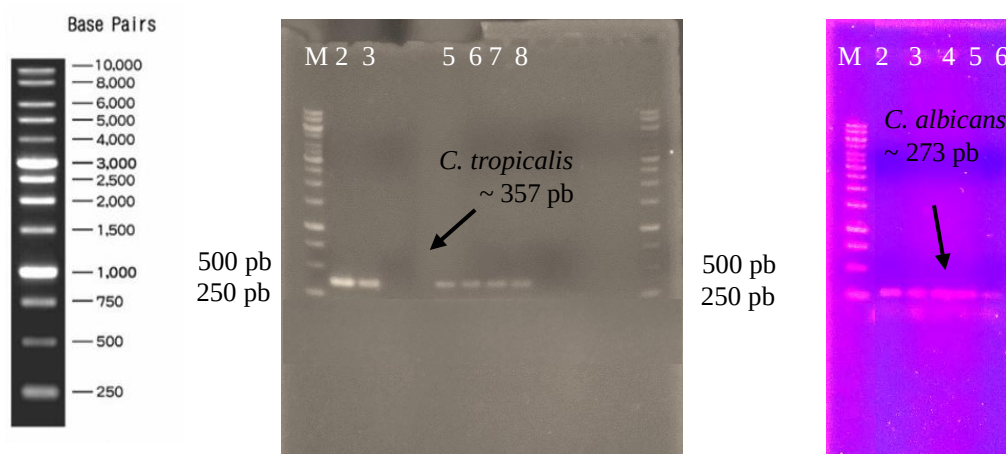


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % con amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 para *C. tropicalis* con peso aproximado de 357 pb (en 2,3,5-8 pocillos) y

para *C. albicans* peso aproximado de 273 pb (en 2 - 6 pocillos). Los controles utilizados MYA3404 y CAF2 respectivamente. (M) Marcador de peso molecular.

8.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE EL SISTEMA MALDITOF VTK MS IVD

La espectrometría de masas, conocida como matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), es una técnica utilizada en la identificación de microorganismos mediante la creación de un espectro basado en el perfil de proteínas. En este estudio se utilizó el sistema VITEK MS IVD, utilizado para la identificación de cepas (género y especie) de importancia clínica en el laboratorio de microbiología del hospital Universitari i Politènic La Fe (Valencia, España). Los resultados se describen a continuación en la tabla 6:

Tabla 6. Resultados de la identificación presuntiva por método convencional CHROMagar® *Candida* e identificación molecular confirmatoria por PCR especie – específica y MALDITOF. Para este rpo se descartaron todas la especies diferentes a *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

Cepas	CHROMagar®	PCR	MALDITOF
Tipo MYA3404	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
7809	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
2130	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
7806	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
2131	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
71	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
74	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
14	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
2657	Azul / halo oscuro	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Tipo CAF2	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
146	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2641	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
56 27P	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
44 19 CI	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
46 19P	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
43 19CD	Verde	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

Tipo ATCC 2001	Rosa / café	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
20 2600	Rosa / café	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
219 – 2	Rosa / Lila	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
152 – 2	Rosa / Lila	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
34 - 2	Rosa / Lila	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
131 – 2	Rosa / Lila	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
179	Rosa pálido	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
190	Rosa / Lila	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> / <i>C. guilliermondii</i>

Las cepas tomadas se identificaron correctamente por PCR y por MALDI TOF. La cepa *C. glabrata* 190 obtuvo un resultado indefinido de 50 / 50 % de probabilidad entre dos especies diferentes por MALDI TOF; por lo tanto, se procedió a realizar un BLAST del oligonucleótido utilizado y asegurar la identificación por PCR.

8.4 BLAST DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados para la identificación por la PCR especie - específico fueron analizados por medio de BLAST en la base de datos de NCBI. Para *C. albicans*, figura 19, para *C. tropicalis*, figura 20 y para *C. glabrata*, figura 21.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Candida albicans isolate U5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	44.1	44.1	100%	0.025	100.00%	MK729537.1
Candida albicans isolate Oral Candidiasis internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S	44.1	44.1	100%	0.025	100.00%	MK690509.1
Candida albicans strain AUMC 13546 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribos	44.1	44.1	100%	0.025	100.00%	MH534945.1
Candida albicans strain AUMC 13545 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribos	44.1	44.1	100%	0.025	100.00%	MH534944.1

Figura 19. Resultados del análisis de los oligonucleótidos utilizados para *C. albicans* por la herramienta de búsqueda de alineación local básica de nucleótidos (Nucleotide BLAST).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Candida tropicalis voucher biopsy tissue internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S riboso	44.1	44.1	100%	0.025	100.00%	MN171542.1
Candida tropicalis SRF61 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and comp	44.1	44.1	100%	0.025	100.00%	LC473000.1
Candida tropicalis strain L2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed	44.1	44.1	100%	0.025	100.00%	MK752673.1
Candida dubliniensis strain Pe2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA	44.1	44.1	100%	0.025	100.00%	MK752670.1

Figura 20. Resultados del análisis de los oligonucleótidos utilizados para *C. tropicalis* por la herramienta de búsqueda de alineación local básica de nucleótidos (Nucleotide BLAST).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Candida glabrata strain CBS138 chromosome M complete sequence	50.1	50.1	100%	0.001	100.00%	CR380959.2

Figura 21. Resultados del análisis de los oligonucleótidos utilizados para *C. glabrata* por la herramienta de búsqueda de alineación local básica de nucleótidos (Nucleotide BTLAST).

8.5 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO DE KIRBY Y BAUER

De las cepas anteriormente confirmadas por género y especie se seleccionaron solo 5 cepas resistentes para *C. albicans* y *C. tropicalis*, en tanto que para las cepas de *C. glabrata* se realizó la prueba de sensibilidad a antifúngicos por el método de difusión en disco de Kirby y Bauer para seleccionar 5 cepas, que se describen en la tabla 7 y 8.

Tabla 7. Cepas seleccionadas y su resistencia antifúngica.

Cepas	Resistencia
<i>C. albicans</i> CAF2	KET, FCA
<i>C. albicans</i> 56 27P	KET, FCA
<i>C. albicans</i> 44 19CI	AB, FCA
<i>C. albicans</i> 43 19CD	AB, KET, FCA
<i>C. albicans</i> 46 19P	AB, FCA
<i>C. albicans</i> 2641	KET, FCA
<i>C. tropicalis</i> MYA3403	----
<i>C. tropicalis</i> 2130	FCA
<i>C. tropicalis</i> 7809	FCA
<i>C. tropicalis</i> 7806	FCA, ITR
<i>C. tropicalis</i> 71	FCA
<i>C. tropicalis</i> 2131	KET, FCA

Nota: KET: Ketoconazol, FCA: Fluconazol, AB: Anfotericina B, ITR: Itraconazol.

Tabla 8. Resultados de la prueba de sensibilidad para *C. glabrata* y selección de cepas.

Cepa	Resistencia
<i>C. glabrata</i> ATCC2001	FCA, KET
<i>C. glabrata</i> 20	FCA
<i>C. glabrata</i> 190	CTR
<i>C. glabrata</i> 152 – 2	Intermedio FCA
<i>C. glabrata</i> 131 – 2	Intermedio KET
<i>C. glabrata</i> 219 – 2	Intermedio FCA / KET

Nota: KET: Ketoconazol, FCA: Fluconazol, AB: Anfotericina B, ITR: Itraconazol.

8.6 TERAPIA FOTODINÁMICA *IN VITRO*

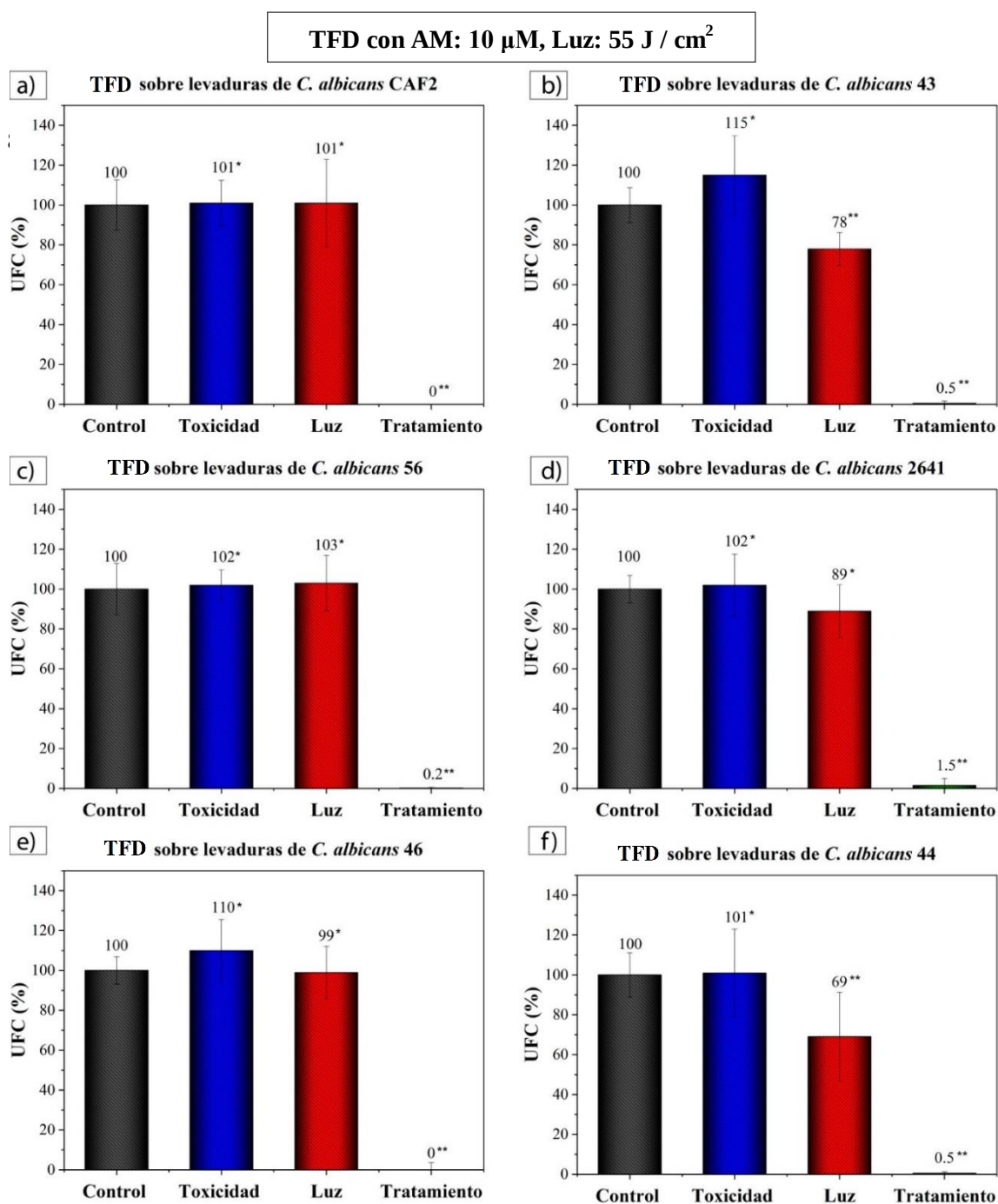
Los resultados de la TFD *in vitro* con azul de metileno (10 μ M, dosis de luz: 55 J / cm²) presentaron un efecto positivo contra el crecimiento de todas las cepas de referencia y cepas de aislados clínicos utilizados en este estudio (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*).

La TFD mostró una inhibición significativa sin importar si eran cepas de referencia o aislados clínicos resistentes a antifúngicos. Los resultados del análisis estadísticos ANOVA mostraron para las levaduras *C. albicans* que todos los tratamientos después de la TFD fueron significativos con respecto a su control, gráfica 3. Además, mostraron que los controles de toxicidad en la oscuridad; donde se empleó AM sin activar con luz, no se afectó de manera significativa el crecimiento de ninguna de las cepas *C. albicans*. Con respecto al control de luz; donde se irradiaron la levaduras en ausencia de FS, el crecimiento de las cepas no se ve afectada en 4 / 6 cepas incluida la cepa *C. albicans* CAF2, no así, para los aislados clínicos *C. albicans* 43 y *C. albicans* 44 (incisos b y f de la gráfica 3), donde la luz reduce el número de UFC a 78 y 69 % respectivamente. Los resultados de las UFC en placas petri se muestran en el anexo 1.

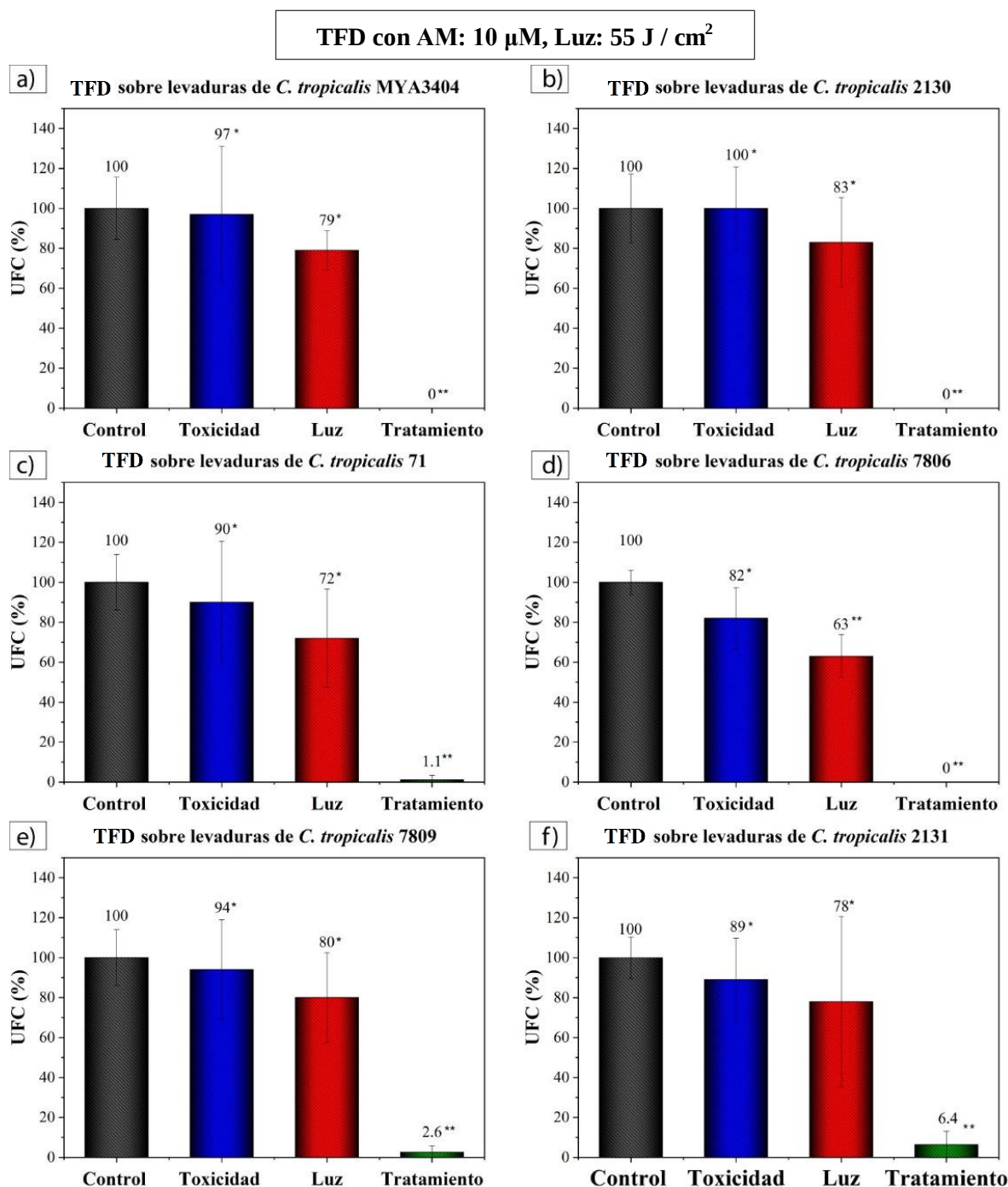
Los resultados del análisis estadísticos ANOVA para las levaduras *C. tropicalis* mostraron que todos los tratamientos después de la TFD fueron significativos con respecto a su control. Además, mostraron que los controles de toxicidad en la oscuridad; no afectaron de manera significativa el crecimiento de ninguna de las cepas *C. tropicalis*. Con respecto al control de luz, el crecimiento de las cepas no se ve afectada en 5 / 6 cepas, incluida la especie *C. tropicalis* de referencia, no así, para la cepa *C. tropicalis* 7806 (inciso d, de la gráfica 4) donde la luz por si sola reduce el número de UFC a 63 %. Los resultados de las UFC en placas petri se muestran en el anexo 2.

Para las levaduras *C. glabrata* los resultados del análisis estadístico ANOVA, mostraron que todos los tratamiento después de la TFD fueron significativos con respecto a su control, gráfica 5. Además, mostraron que los controles de toxicidad en la oscuridad; no afectaron de manera significativa el crecimiento de ninguna de las cepas *C. glabrata* que se utilizaron. Con respecto al control de luz, el crecimiento de las cepas no se ve afectada en 5 / 6 cepas incluida la especie *C. glabrata* de referencia, no así, para la cepa *C. glabrata* 219

– 2 (inciso b de la gráfica 5) donde la luz reduce el número de UFC a 77 %. Los resultados de las UFC en placas petri se muestran en el anexo 3.

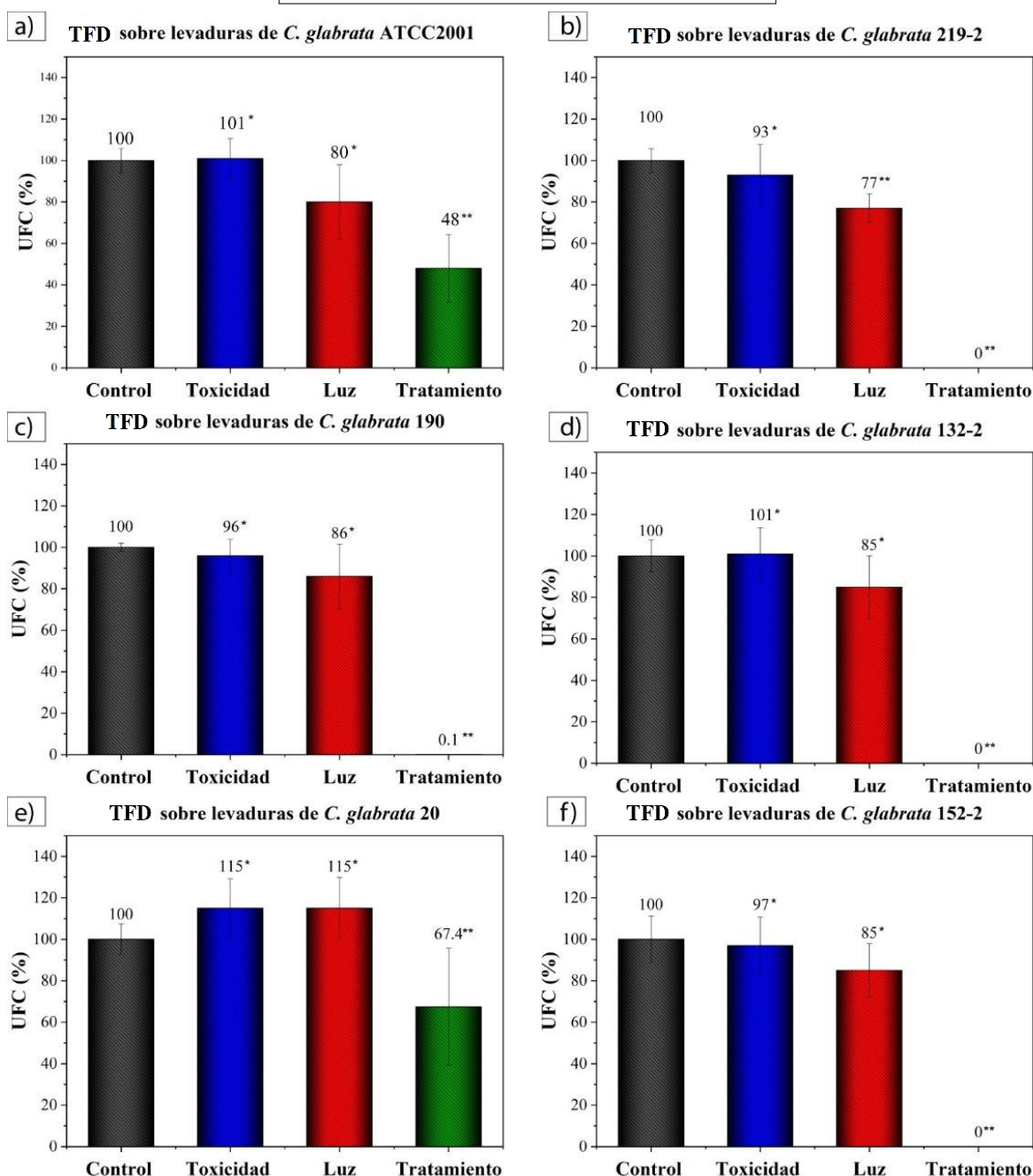


Gráfica 3. Porcentaje de UFC de los controles con AM [10 μ M] a 55 J / cm² sobre levaduras *C. albicans* de referencia y aislados clínicos resistentes a antifúngicos. Los gráficos muestran una diferencia significativa tanto en la cepa *C. albicans* CAF2 (a) como en los aislados clínicos resistentes a antifúngicos (b, c, d y e) respecto de su control (ver tabla 7 para las resistencias a antifúngicos). De acuerdo con el ANOVA y la prueba de Tukey, se consideró una diferencia no significativa* $p > 0.05$ y una diferencia significativa ** si $p < 0.05$.



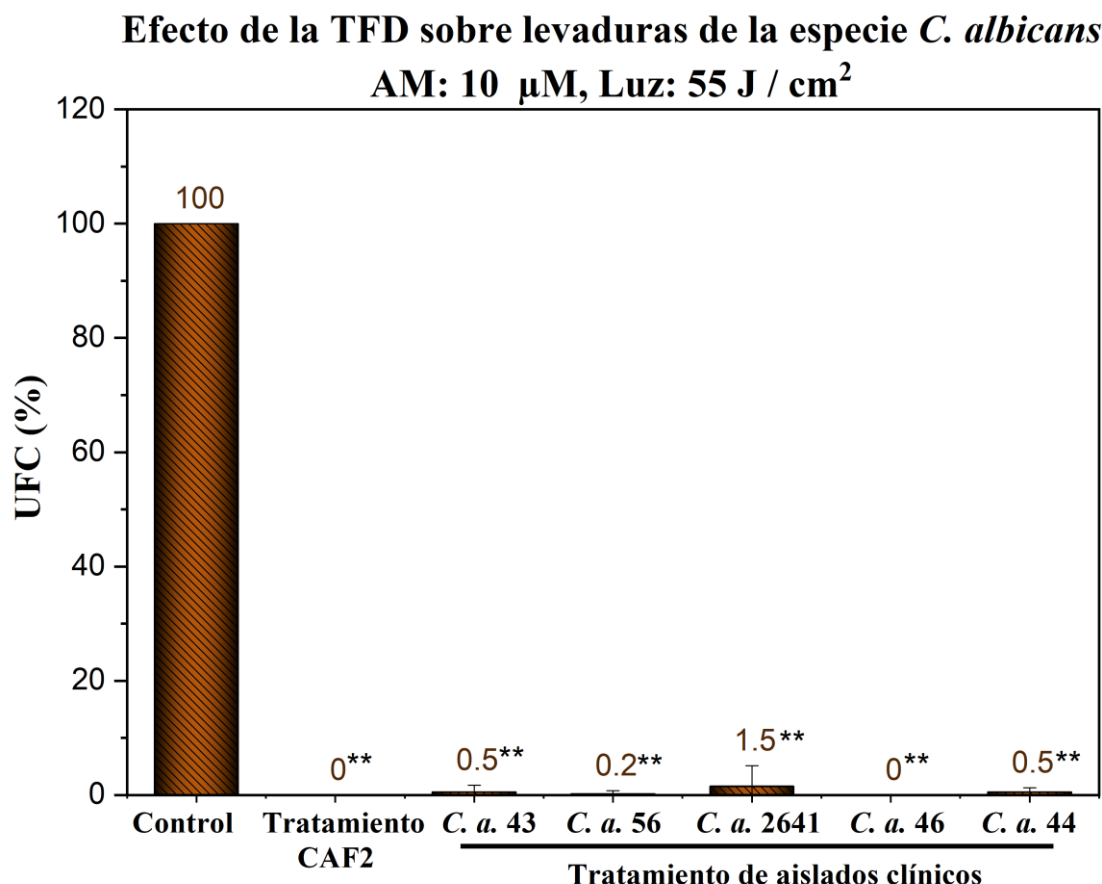
Gráfica 4. Porcentaje de UFC de los controles con AM [10 μ M] a 55 J / cm² sobre levaduras *C. tropicalis* de referencia y aislados clínicos resistentes a antifúngicos. Los gráficos muestran una diferencia significativa tanto en la cepa *C. tropicalis* CAF2 (a) como en los aislados clínicos resistentes a antifúngicos (b, c, d y e) respecto de su control (ver tabla 7 para las resistencias a antifúngicos). De acuerdo con el ANOVA y la prueba de Tukey se consideró una diferencia no significativa* $p > 0.05$ y una diferencia significativa ** si $p < 0.05$.

TFD con AM: 10 μ M, Luz: 55 J / cm²



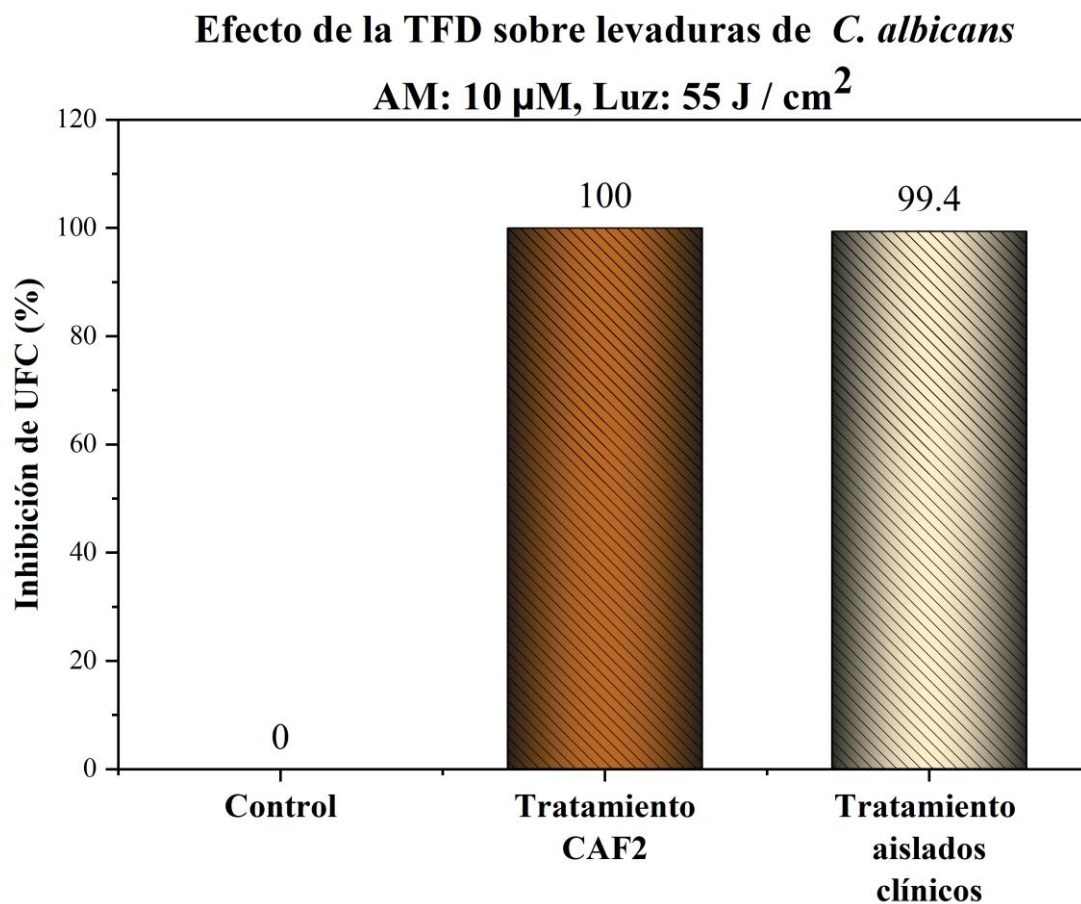
Gráfica 5. Porcentaje de UFC de los controles con AM [10 μ M] a 55 J / cm² sobre levaduras *C. glabrata* de referencia y aislados clínicos resistentes a antifúngicos. Los gráficos muestran una diferencia significativa tanto en la cepa *C. glabrata* ATCC2001 (a) como en los aislados clínicos resistentes a antifúngicos (b, c, d y e) respecto de su control (ver tabla 8 para las resistencias a antifúngicos). De acuerdo con el ANOVA y la prueba de Tukey se consideró una diferencia no significativa* $p > 0.05$ y una diferencia significativa ** si $p < 0.05$.

Los resultados demuestran que la TFD no discrimina entre cepas *C. albicans* resistentes a antifúngicos como el fluconazol, ketoconazol y anfotericina B (ver resistencia a antifúngicos de *C. albicans* en la tabla 7). En la gráfica 6 se resumen y comparan los resultados de la TFD para todas las cepas (6 / 6) incluyendo la cepa de referencia *C. albicans* CAF2.



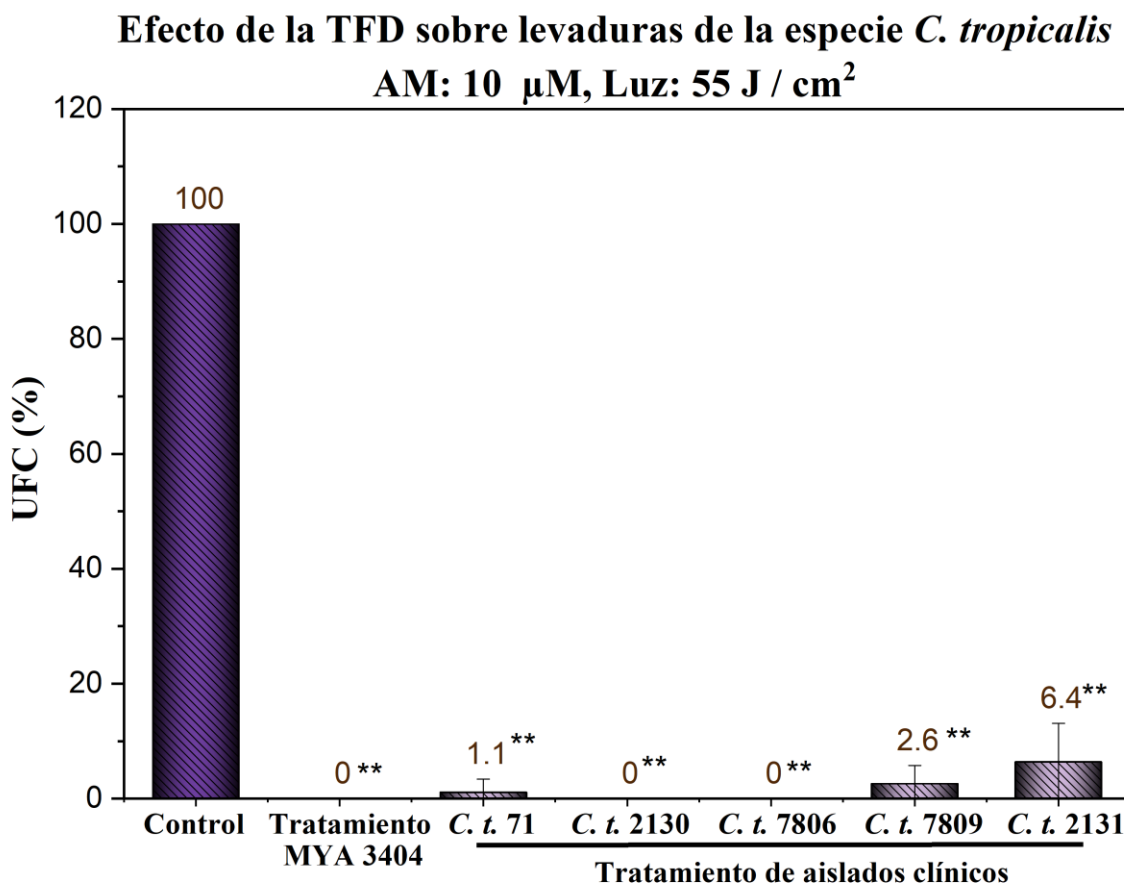
Gráfica 6. Resumen y comparación de la viabilidad después de la TFD entre la cepa de referencia *C. albicans* CAF2 y aislados resistentes: *C. albicans* 43, *C. albicans* 56, *C. albicans* 2641, *C. albicans* 46 y *C. albicans* 44. La gráfica muestra el porcentaje de UFC, de acuerdo con el ANOVA y la prueba de Tukey se consideró una diferencia no significativa (*) si $p > 0.05$, y una diferencia significativa (**) si $p < 0.05$.

Por otro lado, la gráfica 7 compara el efecto de la TFD con respecto a la inhibición de las UFC (%) para la cepa de referencia *C. albicans* CAF2 y la inhibición promedio de las UFC (%) de los aislados clínicos de *C. albicans*.



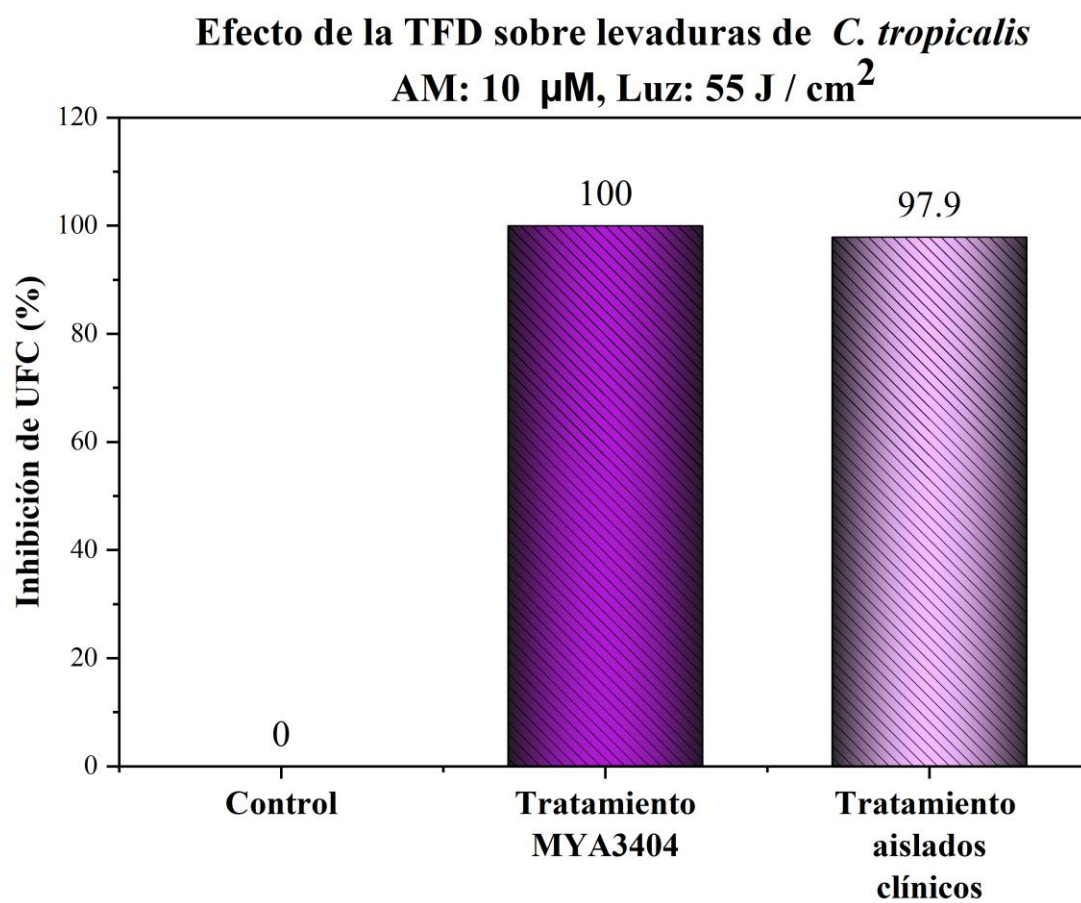
Gráfica 7. Efecto de la inhibición de UFC (%) después de la TFD. Cepa de referencia *C. albicans* CAF2 (100 %) y el promedio de la inhibición de UFC de todas los aislados clínicos *C. albicans* (99.4 %).

Los resultados demuestran que la TFD no discrimina entre cepas *C. tropicalis* resistentes a antifúngicos como el fluconazol, ketoconazol y anfotericina B (ver resistencia a antifúngicos de *C. tropicalis* en la tabla 7), dado que, en todas la cepas se mostró una diferencia significativa con respecto a su control, los resultados se muestran en la gráfica 8.



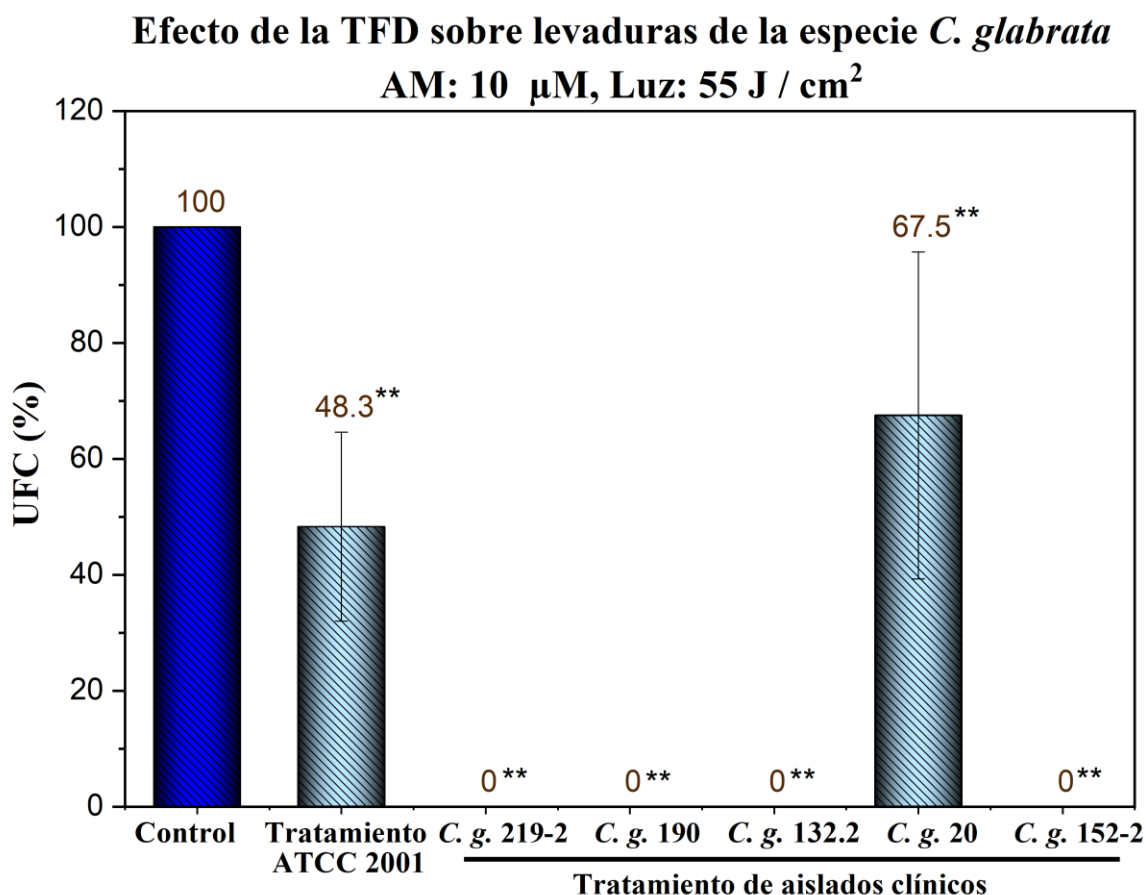
Gráfica 8. Resumen y comparación de la viabilidad después de la TFD entre la cepa de referencia *C. tropicalis* MYA3404 y aislados clínicos resistentes: *C. tropicalis* 2130, *C. tropicalis* 71, *C. tropicalis* 7806, *C. tropicalis* 7809 y *C. tropicalis* 2131 (ver resistencia antifúngicos en la tabla 7). La gráfica muestra el porcentaje de UFC, de acuerdo con el ANOVA y la prueba de Tukey se consideró una diferencia no significativa (*) si $p > 0.05$, y una diferencia significativa (**) si $p < 0.05$.

Por otro lado, en la gráfica 9 se muestra el efecto de la TFD sobre la inhibición de las UFC (%) en la cepa de referencia y la inhibición promedio de las UFC (%) en los aislados clínicos de *C. tropicalis*.



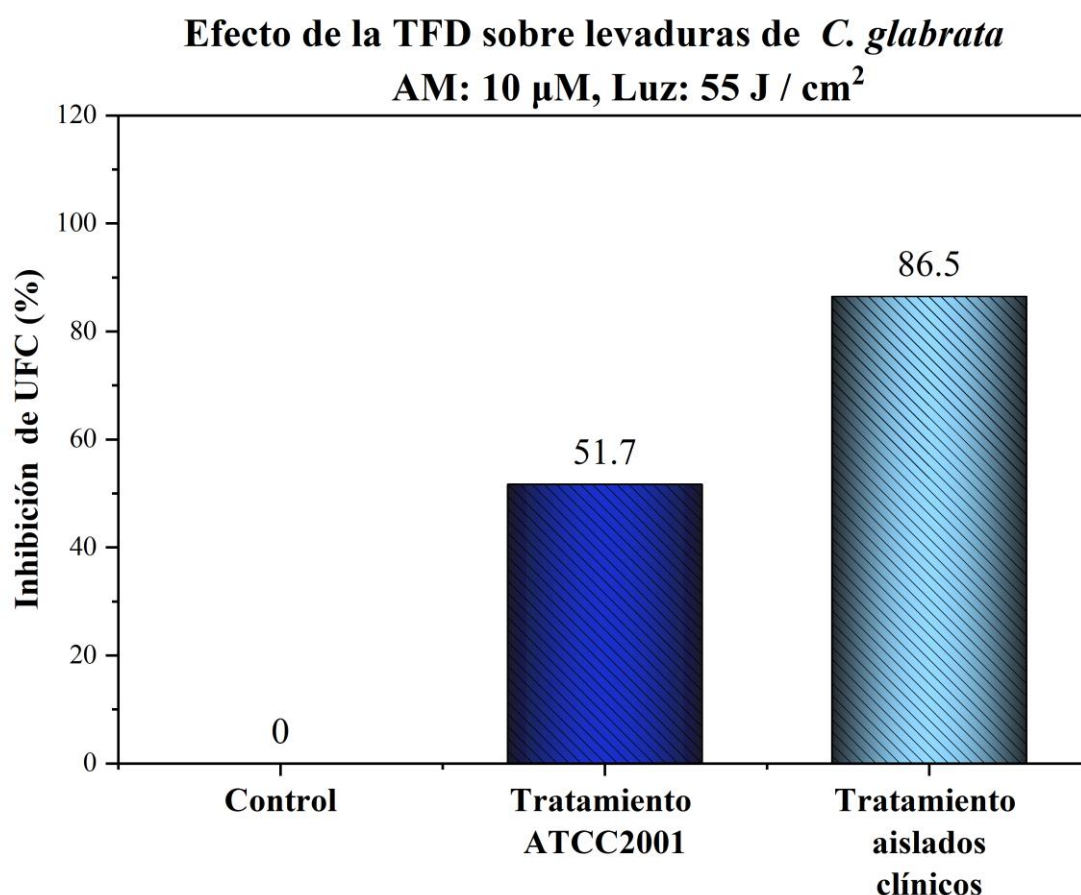
Gráfica 9. Efecto de la inhibición de UFC (%) después de la TFD. Cepa de referencia *C. tropicalis* MYA3404 (100 %) y el promedio de la inhibición de UFC de todas los aislados clínicos *C. tropicalis* (97.9 %).

La TFD inhibe en cierto grado el crecimiento de cepas *C. glabrata* resistentes y resistencias intermedias a antifúngicos (tabla 8), los resultados muestran una diferencia significativa en todos los aislados clínicos 6 / 6 con respecto a su control, incluyendo la cepa de referencia *C. glabrata* ATCC2001. Finalmente, los resultados demuestran cierto grado inhibición para la mayoría de la cepas *C. glabrata* utilizadas, gráfica 10.



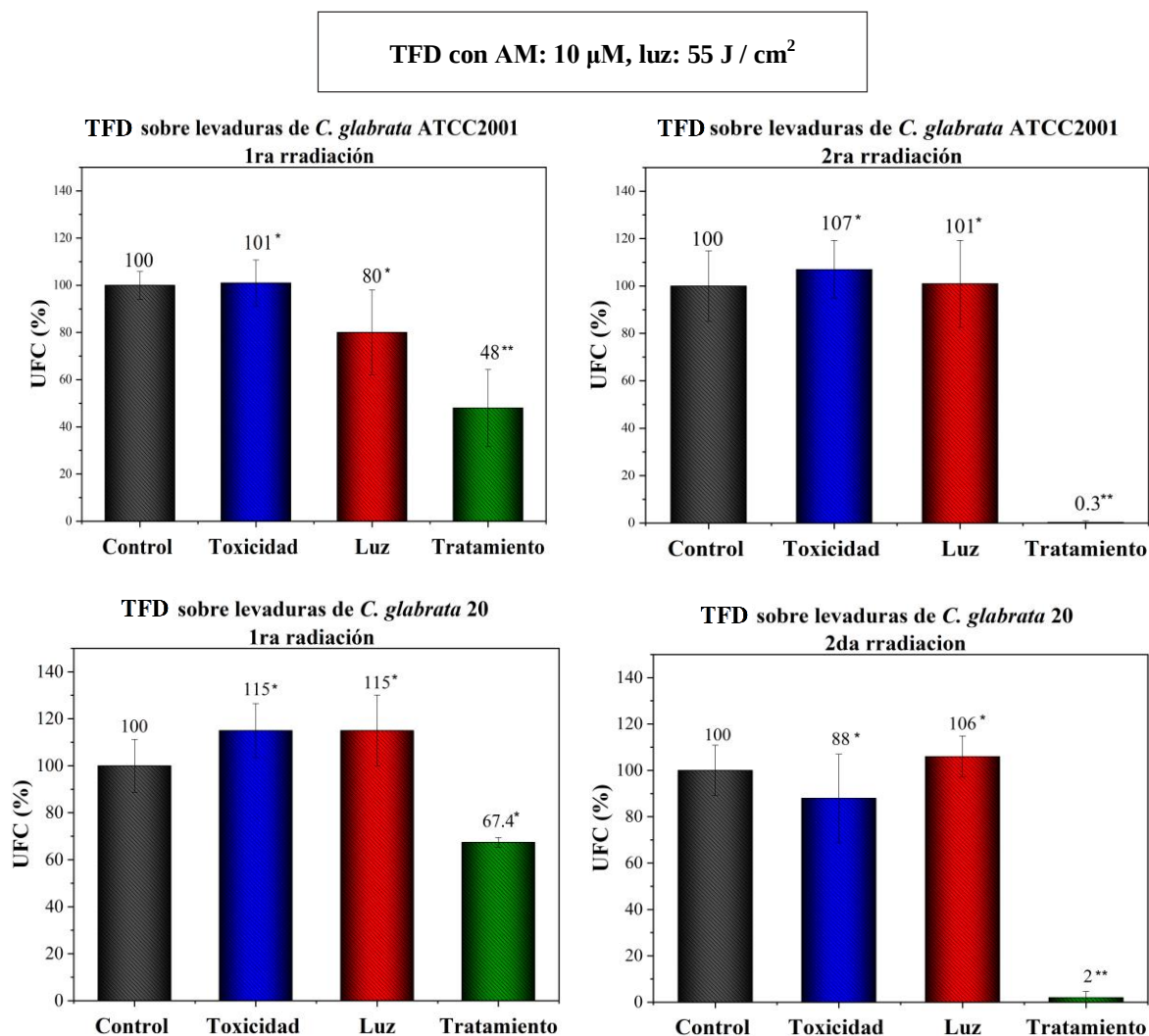
Gráfica 10. Resumen y comparación de la viabilidad después de la TFD entre la cepa de referencia *C. glabrata* ATCC2001 y aislados clínicos resistentes: *C. glabrata* 219-2, *C. glabrata* 190, *C. glabrata* 132-2, *C. glabrata* 20 y *C. glabrata* 152-2 (ver resistencia antifúngicos en la tabla 8). La gráfica muestra el porcentaje de UFC, de acuerdo con el ANOVA y la prueba de Tukey se consideró una diferencia no significativa (*) si $p > 0.05$, y una diferencia significativa (**) si $p < 0.05$.

Por otro lado, en la gráfica 11 se muestran los resultados de la inhibición de UFC (%) en la cepa tipo *C. glabrata* ATCC2001 y el promedio de la inhibición de todos los aislados clínicos, es importante aclarar que tal como se observa en la gráfica 9, existe una eficiencia del 100% en la inhibición de UFC en 4 / 6 cepas, excepto en la cepa *C. glabrata* 20 y la cepa de referencia, lo cual modifica el resultado.



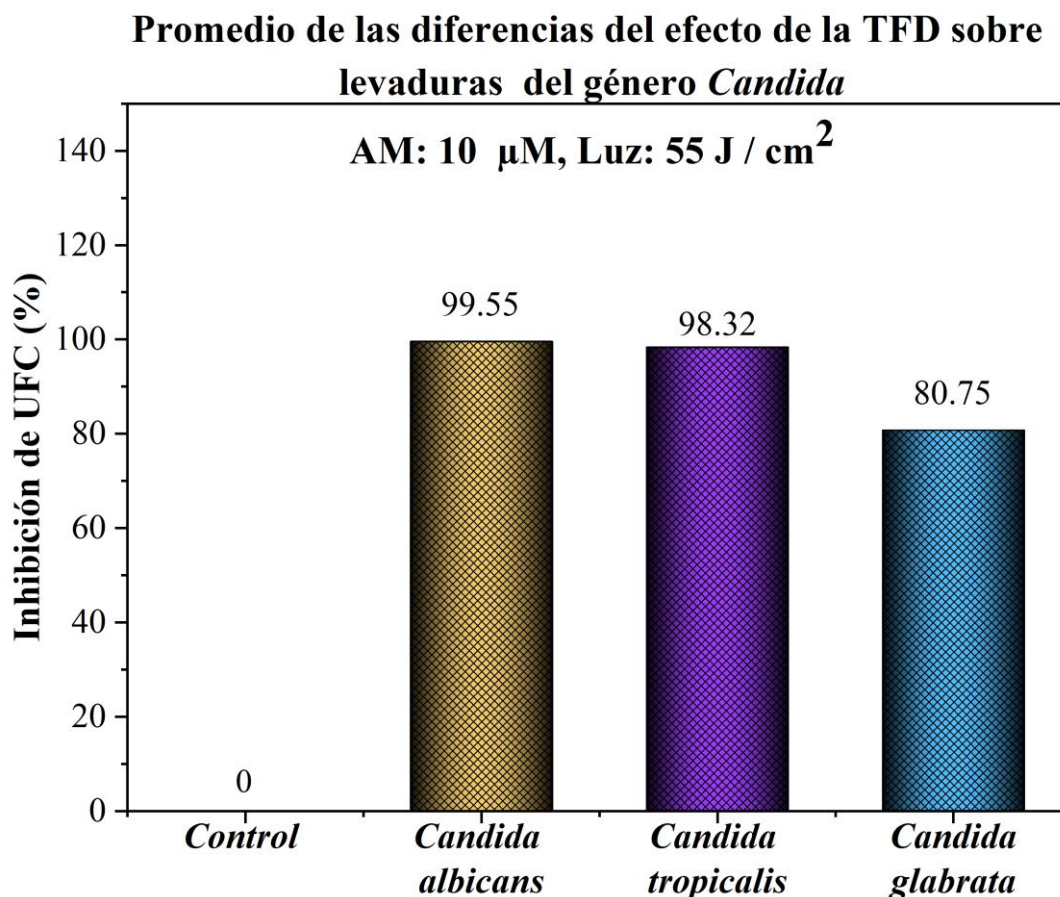
Gráfica 11. Efecto de la inhibición de UFC (%) de la cepa de referencia *C. glabrata* ATCC2001 (51.7 %) y el promedio de la inhibición de UFC de todas los aislados clínicos *C. glabrata* (86.5 %).

Posterior a los resultados de TFD anteriores de *C. glabrata*, se realizó la TFD con dosis repetidas de irradiación sobre *C. glabrata* de referencia ATCC2001 y *C. glabrata* 20 utilizando las mismas condiciones del experimento (10 μ M de AM, luz de 55 J / cm²) solo con un intervalo de 30 min de incubación en oscuridad a 37 °C entre cada irradiación. Los resultados se describen en la gráfica 12.



Gráfica 12. Resultados de las TFD con dosis repetidas de irradiación sobre *C. glabrata* ATCC2001 y *C. glabrata* 20. Los resultados muestran una diferencia significativa para *C. glabrata* ATCC2001; donde disminuye de un 48 % en la primera radiación a 0.3 % UFC en la segunda irradiación, para *C. glabrata* 20; disminuye de un 67.4 % UFC en la primera radiación a un 2% de UFC en la segunda radiación. De acuerdo con el ANOVA y la prueba de Tukey se consideró una diferencia no significativa (*) si $p > 0.05$, y una diferencia significativa (**) si $p < 0.05$. Los resultados de las UFC en placas petri se muestran en el anexo 4. Arriba se muestra *C. glabrata* ATCC2001 y abajo *C. glabrata* 20.

Por último, se hizo una comparación del efecto de la TFD que incluye cepas de referencia más los aislados clínicos. Se muestra la inhibición de UFC contra el tratamiento después de la TFD para cada especie, donde se observan muy buenos resultados para *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*: 99.5, 98.3 % y 80.7 % de UFC respectivamente, gráfica 12.



Gráfica 13. Resultados de la TFD para *C. albicans* 6 / 6, *C. tropicalis* 6 / 6 y *C. glabrata* 6 / 6, la TFD mostraron buenos resultados en la inhibición del crecimiento 99.55 %, 98.32 % y 80.75 % respectivamente. Aunque en *C. glabrata* se obtuvo menor efecto sobre el crecimiento de UFC, también se demostró que la TFD con dosis repetidas de irradiación y un intervalo de tiempo de 30' entre cada tratamiento puede mejorar el resultado.

9. DISCUSIÓN

Las levaduras del género *Candida* spp viven de forma habitual en la piel y mucosas como parte de la microbiota, lo cual es un factor importante predisponente de la infección, porque el paciente puede llegar a desarrollar infecciones profundas, sistémicas o diseminadas que son generalmente severas; esto siempre y cuando, se rompa la barrera ecológica o la función inmunitaria se encuentre dañada y se favorezcan su diseminación. En los últimos años se ha observado un aumento en la incidencia de infecciones fúngicas nosocomiales, debido al aumento de factores que predisponen la adquisición de estas (Vega Sánchez, D. C. 2015). Usualmente, *C. albicans* ha sido aislada con mayor frecuencia, sin embargo, en las últimas décadas se ha observado que levaduras *C. no albicans* han incrementado su prevalencia (Pappas, P. G., *et al.* 2018), como es el caso de *C. glabrata* y *C. tropicalis*; es por eso, que en este estudio se incluyó el estudio de estas 3 especies.

La identificación de especies rápida y precisa es de suma importancia para una correcta aplicación del tratamiento, disminución de cepas resistentes, así como también para la implementación de medidas efectivas de control de infecciones, pues cada especie de *Candida* presenta sus propias características con respecto a la propensión para causar enfermedades invasivas, su virulencia y susceptibilidad antifúngica (McCarty & Pappas, P. G. 2016). En algunos países se ha detectado el aislamiento de *C. auris*, una levadura multirresistente y mortal en pacientes infectados, que puede confundirse fácilmente con otras especies del mismo género (Chowdhary, A. 2016).

Existen diferentes métodos para la identificación convencional de cepas *Candida*, que incluyen criterios morfológicos, bioquímicos e inmunológicos, aunque pueden presentar algunos inconvenientes cuando se trata de especies poco comunes, además se requiere de varios días para lograr una identificación por especies (OPATHY Consortium, Gabaldón T., 2019). En este estudio se realizó una identificación presuntiva por medio diferencial CHROMagar® *Candida* (figura 15), técnica que se fundamenta en la producción de un color desarrollado por las colonias debido a los cambios del indicador de pH y la fermentación de sustancias orgánicas específicas o sustrato cromogénico para identificar levaduras clínicamente importantes (Rodrigues Araujo, C., 2005). Aunque los resultados sugieren que el medio CHROMagar® *Candida* es útil en la identificación presuntiva de *Candida* spp., algunos autores proponen realizar pruebas adicionales para confirmar la identidad de la cepa en estudio (Ghelardi, E., *et al.* 2008; Godoy Martinez, P., *et al.* 2001), pues algunos inconvenientes en la identificación de cepas clínicas por esta técnica son el tiempo, y que además se necesita cierta experiencia del personal, porque los colores expresados pueden tener cierta similitud entre especies diferentes. En este estudio, se encontró cierta similitud en los colores expresados en el medio CHROMagar® *Candida* entre especies *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*.

Después de haber identificado presuntivamente por medio diferencial las cepas, se procedió a confirmarlas por métodos moleculares como PCR y espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) utilizando el sistema de VITEK MS IVD, tabla 6. Técnicas que aumentan la sensibilidad y especificidad para identificar microorganismos a nivel de género y especie (Maldonado, I., *et al.* 2018). Dentro de las técnicas para identificación molecular se

encuentran los análisis de las regiones ribosomales (5.8S, 18S y 26S), los espaciadores internos transcritos ITS, entre otras (Vásquez, C. J. A., *et al.* 2016).

Los genes ribosomales que codifican las subunidades 5.8S están dispuestos en tándem formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma de las levaduras entre 100 y 200 veces, y se utiliza como un excelente marcador para la identificación del género *Candida* (Rusu, E., *et al.* 2015; Guo, Y., *et al.* 2015). Todas las cepas fueron procesadas y confirmadas para el género *Candida* por PCR de colonia, utilizando oligonucleótidos para la amplificación de genes 5.8S del ARNr (figura 16), siguiendo la metodología de Ruiz Gaitán, A. C., *et al.* 2018.

El gen *RPS0* codifica para una proteína que es un componente de la maquinaria de traducción y está extremadamente conservada entre las especies. A continuación, se realizó la PCR especie – específica con oligonucleótidos diseñados del gen *RPS0* por García Martínez M. *et al.*, 2010 para especies *C. glabrata* (figura 17). Posteriormente, los oligonucleótidos utilizados fueron sometidos a un análisis de BLAST, figura 21.

Los oligonucleótidos ITS1 e ITS2, son utilizados por su alto número de copias y su característica conservada para la identificación de especies como *C. albicans* y *C. tropicalis* (Vásquez, C. J. A., *et al.* 2016). Por lo tanto, todas las cepas identificadas presuntivamente por medio diferencial como *C. albicans* y *C. tropicalis* fueron confirmadas por la técnica de PCR especie – específico por amplificación de las regiones ITS 1 e ITS 2 (figura 18). Los oligonucleótidos que se utilizaron para su identificación fueron los diseñados por Luo & Mitchel, 2002. Luego, los oligonucleótidos utilizados fueron sometidos a un análisis de BLAST, figura 19, 20.

Las cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* identificadas por PCR especie - específico y las cepas que dieron negativas para PCR, fueron confirmadas por la técnica molecular MALDI TOF, esto con la finalidad de descartar especies *C. auris*. La técnica de MALDI TOF a diferencia de la PCR, se fundamenta en el análisis de proteínas de la célula que son comparadas por medio de un sistema de datos hasta encontrar una similitud e identificar el microorganismo a nivel género y especie, para eso, se utilizó el sistema VITEK MS IVD, que es utilizado en la identificación de cepas de importancia clínica tabla 6. En las cepas identificadas no se obtuvo ninguna cepa positiva para *C. auris*, datos no mostrados.

Actualmente uno de los problemas que ha cobrado mucha preocupación en el área de la salud es la aparición de resistencias antifúngicas, lo cual limita las opciones de tratamientos y tiene en algunos casos consecuencias devastadoras en el paciente, por lo tanto, se buscan nuevas alternativas efectivas y que a su vez disminuyan la aparición de resistencias antifúngicas (Perlin, D. S., 2017). La TFD es una técnica que incluye el uso de tres elementos: un fotosensibilizador, una fuente de luz y oxígeno, que al reaccionar se vuelven tóxicos para las células provocando su muerte. La TFD / AM se ha utilizado con éxito contra hongos dermatofitos del género *Trichophyton* y *Microsporum* (López-Chicón, P., *et al.* 2016, Spezzia-Mazzocco, T., *et al.* 2016), en cepas ATCC *C. albicans* (Souza, *et al.* 2009; Pupo, Y. M., *et al.* 2011) y especies resistentes (Huang, M. C., *et al.* 2018).

En este estudio, la TFD se desarrolló utilizando el AM como fotosensibilizador y un dispositivo LED de luz roja contra 3 especie de levaduras del género *Candida* de aislados clínicos resistentes a antifúngicos; 5 especies *C. albicans*, 5 especies *C. tropicalis* y 5 especies *C. glabrata* (tabla 7 y 8), en este estudio, se obtuvieron 3 / 6 cepas *C. glabrata* resistente a fluconazol, clotrimazol y 3 / 6 cepas con resistencia intermedia a ketoconazol y fluconazol (tabla 8).

Para iniciar la TFD, se estandarizó un procedimiento de evaluación de TFD comparativa entre cepas *C. albicans* CAF2, *C. tropicalis* MYA3404 y *C. glabrata* ATCC2001. Para esto se verificó la caracterización del dispositivo LED mediante la medición de su potencia de emisión promedio (gráfica 1) y su espectro de absorción (gráfica 2), además otros factores como el pH y el uso de agua tridestilada, que mejoraron las condiciones para realizar una TFD efectiva. Finalmente, se identificó que a 10 μM de AM y luz de 55 J / cm^2 se obtienen resultados significativos sobre el crecimiento de las cepas de referencia: *C. albicans* CAF2, *C. tropicalis* MYA3403 y *C. glabrata* ATCC20001. Concordando con estudios realizados no se encontró toxicidad en oscuridad significativa en ninguna de las cepas utilizadas, gráfica 3, 4 y 5 (Dovigo, L. N., *et al.* 2011; Pupo, Y. M., *et al.* 2011), de manera que el AM es un buen fotosensibilizador capaz de ser activado a una longitud de onda específica. Por otro lado, en algunas cepas en estudio se encontró una diferencia significativa en ausencia de fotosensibilizador (AM), tan solo con las irradiaciones, (gráfica 3, 4 y 5). Puede ser que en algunas levaduras existan componentes fotosensibilizantes endógenos de forma natural, lo cual permita cierta sensibilidad con la sola irradiación de luz, tal como demuestra Sales Rocha, L. De S., *et al.* 2014 y Souza, S. C., *et al.* 2006, mostrando concordancia en la disminución de UFC al exponerse a una fuente de luz, pero para confirmarlo se necesitan más investigaciones respecto al tema.

En todas las cepas *Candida* de estudio se demuestra una diferencia significativa después de la TFD con respecto a cada control (gráfica 6, 8 y 10), concordando en estudios realizados por Souza, *et al.* 2009, Pupo, Y. M., *et al.* 2011 y Torres Hurtado, *et al.* 2019. Además, se observó que existe mayor efectividad fungicida en cepas de referencia *C. albicans* CAF2 y *C. tropicalis* MYA2001 (gráficos 7 y 9).

También se observó que la TFD no discrimina entre cepas resistentes a antifúngicos, pues se observó una diferencia significativa en aislados clínicos resistentes a antifúngicos *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* (99.4, 97.9 y 86.5% inhibición de UFC respectivamente), gráfica 7, 9 y 11. Los resultados para la cepa de referencia *C. glabrata* y un aislado clínico *C. glabrata* 20, aunque muestran una diferencia significativa, no se obtiene un 100 % de inhibición de UFC (gráfica 10), aun así, la TFD inhibe un 51.7 y 32.5 % tanto para la cepa de referencia ATCC2001 como para la cepa *C. glabrata* 20 respectivamente, resistentes a FCA.

Aunque, *C. glabrata* no tiene la capacidad de formar hifas a diferencia de *C. albicans* o *C. tropicalis*, presenta diversos factores que le confieren virulencia, como su capacidad de formar biopelículas, sobrevivir en fagocitos, cambio morfológico en sus colonias, regulación, expresión de adhesinas, producción de pigmentos y también se caracteriza por la expresión de múltiples mecanismos de resistencia antifúngica (Muñoz de Valle, G. M. 2014). *C. glabrata*, es caracterizada como una levadura con susceptibilidad intrínsecamente

baja a los azoles, pero esta también puede surgir durante el tratamiento prolongado, y como consecuencia desarrollar una mayor resistencia a los azoles. Se ha descrito que la resistencia celular en esta especie se encuentra acompañada por un aumento al flujo de salida del antifúngico y abundancia de transcripciones de transportadores de fármacos (Bennett, J. E., *et al.* 2004; Tsai, H. F., *et al.* 2006). También se ha descrito en cepas *C. glabrata*, la producción de pigmentos que están implicadas en la actividad contra ERO y la producción de β - glucanos entre otros (Bairwa, *et al.* (2014; Tscherner, *et al.* 2011). De acuerdo con estas investigaciones, podemos suponer que esas características en *C. glabrata* le proporcionan a esta levadura la capacidad de reaccionar de manera diferente a la TFD. Ya sea permitiendo el flujo de salida del AM y así limitar la acción fotodinámica, o que sea capaz de producir agentes antioxidantes que le permitan cierta tolerancia temporal a las ERO.

Las investigaciones por Dovigo, L. N., *et al.* (2011) han encontrado cierta resistencia a la TFD en cepas *C. glabrata*, pero logran el efecto fungicida, aumentando la dosis de luz. Así mismo, Torres Hurtado, S. A., *et al.* (2019) concluyeron que la TFD repetitiva mejora el efecto fungicida en células que presentan cierta resistencia a la TFD. Por lo tanto, en este estudio se realizó una TFD con dosis repetidas de irradiación con un intervalo de incubación en oscuridad de 30 min a 37 ° C. Los resultados para la TFD con dosis repetidas mostraron una mayor efectividad en la inhibición de UFC tanto para *C. glabrata* ATCC2001, como para *C. glabrata* 20, gráfica 12.

Finalmente, para todas las cepas en este estudio, se observó que la TFD inhibe el crecimiento de especies como *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* que presentan resistencias a antifúngicos y resistencias intermedias a antifúngicos (99.55, 98.32 y 80.75 % respectivamente), gráfica 13.

Por medio del presente trabajo se demostró que la TFD *in vitro* reduce significativamente el crecimiento de levaduras de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* resistentes a antifúngicos, otros estudios como el de Tan, J., *et al.* 2019 muestran resultados exitosos utilizando la TFD *in vitro* contra especies multirresistentes, como *C. auris*. Cabe mencionar que los resultados de TFD *in vitro* alientan a que este tratamiento fotodinámico puede ser una opción de tratamiento exitosa en pacientes en los que la administración de antifúngicos es contraindicada o en quienes presenten infecciones con resistencias antifúngicas, por lo tanto, se sugiere continuar el trabajo realizando estudios de TFD.

10. CONCLUSIÓN

Cepas presuntivas del género *Candida* fueron confirmadas por PCR, utilizando oligonucleótidos especie – específico.

La especie *C. glabrata* se confirmó por amplificación del fragmento intrón, gen *RPS0*. Las especies *C. albicans* y *C. tropicalis* se confirmaron por amplificación de las regiones ITS 1 e ITS 2.

La identidad de las especies *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* se confirmaron por la técnica de MALDITOF utilizando el sistema VITEK MS IVD.

El perfil de resistencia FCA, KET, CTR permitieron la selección de cepas resistentes y resistencia intermedia para las especies *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

Se estandarizó un procedimiento de evaluación de TFD comparativa entre cepas de referencia y aislados clínicos para levaduras *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

La TFD / AM mostró efectos estadísticamente significativos para la inhibición de UFC en un 100 % para la cepa de referencia *C. albicans* CAF2 y para los aislados clínicos *C. albicans* en un 99.4 %.

La TFD / AM mostró efectos estadísticamente significativos para la inhibición de UFC en un 100 % para la cepa de referencia *C. tropicalis* MYA3403 y para los aislados clínicos un 97.9 %.

La TFD / AM mostró efectos estadísticamente significativos para la inhibición de UFC en un 51.7 % para la cepa de referencia *C. glabrata* ATCC2001 y para los aislados clínicos un 86.5 %, sin embargo, una TFD repetitiva fue más efectiva en la inhibición del crecimiento para esta especie.

La TFD / AM fue efectiva para inhibir el crecimiento de levaduras *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* que presentan resistencias y resistencias intermedias a antifúngicos

La TFD / AM puede usarse como una alternativa para inhibir el crecimiento de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

11. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Por medio del presente trabajo se demostró que la TFD *in vitro* utilizando AM como fotosensibilizador reduce significativamente el crecimiento de levaduras, esto alienta a que en un futuro la TFD puede ser un tratamiento exitoso contra infecciones por *Candida*, por lo tanto, se sugiere:

- Comparar resultados de TFD utilizando diferentes fotosensibilizadores como el rosa de bengala y curcumina con cepas resistentes.
- Ampliar el estudio de cepas *C. glabrata* no resistentes y resistentes a antifúngicos.
- Realizar estudios para identificar el tipo de muerte celular que produce la TFD sobre levaduras del género *Candida*
- Realizar estudios de TFD con biopelículas sobre materiales *in vitro* e *in vivo*.
- Continuar el trabajo estandarizando la metodología de TFD *in vivo* utilizando con animales o tejidos infectados por *Candida*.
- Realizar estudios de TFD sobre pacientes infectados por *Candida*.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Abdel Kader, M. H. (2014). Photodynamic therapy: from theory to application. Berlin: Springer Berlin Heidelberg. Pag. 3-22, 59-66 y 237-253.
doi:10.1007/978-3-642-39629-8_1; doi:10.1007/978-3-642-39629-8_3; doi:10.1007/978-3-642-39629-8_11
2. Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347-364. doi:10.1042/bj20150942
3. Arango Díaz, A., López Berrío, S., Vera Núñez, D., Castellanos Sánchez, E., Rodríguez Sanabria, P. M., Rodríguez Feitó, M. B. (2018). Epidemiología de las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria. *Acta Médica del Centro*. 12(3):262-272
4. Aguilar, G., Araujo, P., Godoy, E., Falcón, M., Centurión, M.G., Ortiz, R., *et al.* (2017) Identificación y características de *Candida spp.* en secreción vaginal de pacientes embarazadas y no embarazadas que acudieron al Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*; 15(3): 6-12
5. Arias Flores, R., Rosado Quiab, U., Vargas Valerio, A. & Grajales Muñiz, C. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 54(1): 20-4.
6. Arendrup MC (2013). *Candida* y candidaemia. Susceptibilidad y epidemiología. *Dan Med J*. 60 (11): B4698
7. Aspiroz, C., Sevil, M., Toyas, C., & Gilaberte, Y. (2017). Photodynamic therapy with methylene blue for skin ulcers infected with *Pseudomonas aeruginosa* and *Fusarium spp.* *Actas Dermo-Sifiliográficas* (English Edition), 108(6), e45-e48.
doi:10.1016/j.adengl.2017.05.010
8. Bairwa, G., Rasheed, M., Taigwal, R., Sahoo, R., & Kaur, R. (2014). GPI (glycosylphosphatidylinositol)-linked aspartyl proteases regulate vacuole homeostasis in *Candida glabrata*. *Biochemical Journal*, 458(2), 323-334. doi:10.1042/bj20130757
9. Bal, A.M. & Gill, M. Mc. (2018). Rapid species identification of *Candida* directly from blood culture broths by Sepsityper-MALDI-TOF mass spectrometry: impact on antifungal therapy. *J R Coll Physicians Edinb*. 48(2): 114-119

10. 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*, 6:202. doi:10.3389/fmicb.2015.00202
11. Bennett, J. E., Izumikawa, K., & Marr, K. A. (2004). Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(5), 1773–1777. doi:10.1128/aac.48.5.1773-1777.2004
12. Benov, L. (2015). Photodynamic therapy: current status and future directions. *Medical Principles and Practice*, 24(s1), 14–28. doi:10.1159/000362416
13. Böhringer, M., Pohlers, S., Schulze, S., Albrecht Eckardt, D., Piegsa, J., Weber, M., Martin, R., Hünninger, K., Linde, J., Guthke, R., & Kurzai, O. (2016). *Candida albicans* infection leads to barrier breakdown and a MAPK/NF-κB mediated stress response in the intestinal epithelial cell line C2BBel. *Cellular Microbiology*, 18(7), 889–904. doi:10.1111/cmi.12566
14. Campoy, S., & Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochemical Pharmacology*, 133: 86-96. doi: 10.1016/j.bcp.2016.11.019
15. CDC. (2019). Tracking *Candida auris*. 11 octubre 2019, de CDC Sitio web: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>
16. Canals, M., Sabbagh, E., & Chernilo, S. (2014). Neumonías en el inmunocomprometido: perspectiva desde el diagnóstico por imágenes, e inferencia Bayesiana. *Revista Chilena Infectología*, 31 (2): 139-152
17. Castañón Olivares, L. R. (2016). Candidiasis, Candidosis. septiembre de 2019, de Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM Sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
18. Chowdhary, A., Voss, A., & Meis, J. F. (2016). Multidrug-resistant *Candida auris*: “new kid on the block” in hospital-associated infections? *Journal of Hospital Infection*, 94(3), 209–212. doi: 10.1016/j.jhin.2016.08.004
19. Cieplik, F., Deng, D., Crielaard, 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. doi:10.1080/1040841x.2018.1467876
20. Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D., & Perlin, D. S. (2014). Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 5(7), a019752. doi:10.1101/cshperspect.a019752
21. Da Silva Dantas, A., Lee, K. K., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., & Gow, N. A. (2016). Cell biology of *Candida albicans* –host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 111–118. doi:10.1016/j.mib.2016.08.006

22. Delmonte, M. L., *et al.* (2017) "Frecuencia del género *Candida* en vagina de mujeres en edad reproductiva." *Kasmera, Gale Academic Onefile* 45(1):44+
23. Dovigo, L. N., Pavarina, A. C., de Oliveira Mima, E. G., Giampaolo, E. T., Vergani, C. E., & Bagnato, V. S. (2011). Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*, 54(2), 123–130. doi:10.1111/j.1439-0507.2009.01769.x
24. Figueiredo Souza, L. W., Souza, S. V. T., & Botelho, A. C. C. (2014). Randomized controlled trial comparing photodynamic therapy based on methylene blue dye and fluconazole for toenail onychomycosis. *Dermatologic Therapy*, 27(1), 43–47. doi:10.1111/dth.12042
25. Gacon, I., Loster, J. E. & Wieczorek, A. (2019). Relationship between oral hygiene and fungal growth in patients: users of an acrylic denture without signs of inflammatory process. *Clin Interv Aging*. 14:1297–1302. doi: 10.2147/CIA.S193685.
26. Garcia Martinez, J. M., Valentin Gomez, E., Pemán J., Cantón, E., Gomez García, M., & del Castillo Agudo, L. (2009). Identification of pathogenic yeast species by polymerase chain reaction amplification of the *RPS0* gene intron fragment. *Journal of Applied Microbiology*. 108(6): 1917–1927 doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04595.x
27. 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. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01872.x
28. Godoy Martinez, P., Almeida, L. P. Lopes Colombo A (2001). Manuais Convencionais e pelo método Cromógeno Chromagar *Candida*. *Revista De Patologia Tropical*. 34(1): 37-42
29. Gunsalus, K. T. W., Tornberg Belanger S. N., Matthan, N. R., Lichtenstein, A. H., & Kumamoto, C. A. (2015). Manipulation of Host Diet To Reduce Gastrointestinal Colonization by the Opportunistic Pathogen *Candida albicans*. *mSphere*, 1(1). doi:10.1128/msphere.00020-15
30. Guo, Y., Yang, J., & Liang, G. (2015). A Real-time PCR assay based on 5.8S rRNA Gene (5.8S rDNA) for rapid detection of *Candida* from whole blood samples. *Mycopathologia*, 181(5-6), 405–413. doi:10.1007/s11046-015-9977-z
31. Hernández Botero, J. S., & Pérez Cárdenas, J. E. (2015). Identificación de *Candida glabrata* y otras especies comunes del género *Candida* mediante el uso secuencial del medio de cultivo cromógeno y la prueba del tubo germinal. *Iatreia*, 28(4) Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1805/180541348001>
32. 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. doi:10.3390/ijms19020434

33. Jabra Rizk, M. A., Kong, E. F., Tsui, C., Nguyen, M. H., Clancy, C. J., Fidel, P. L., & Noverr, M. (2016). *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. *Infection and Immunity*, 84(10), 2724–2739. doi:10.1128/iai.00469-16

34. Jeffery, Smith, A., Taori, S. K., Schelenz, S., Jeffery, K., Johnson, E. M., Borman, A., Rohini, M. & Brown, C. S. (2017). *Candida auris: a Review of the Literature*. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(1): 1-18 doi:10.1128/cmr.00029-17

35. Jiménez Guerra G., Moreno-Torres I. C., Gutiérrez Soto M., Vazquez-Alonso F., Sorlózano Puerto A., Navarro Marí J. M., & Gutiérrez Fernández J (2018). Candiduria en pacientes hospitalizados: etiología sensibilidad a fármacos, antifúngicos y factores de riesgo. *Rev Esp Quimioter*. 31(4): 323–328.

36. Juarranz, Á., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, F., Cuevas, J., & González, S. (2008). Photodynamic therapy of cancer. *Basic principles and applications*. *Clinical and Translational Oncology*, 10(3), 148–154. doi:10.1007/s12094-008-0172-2

37. Kara, A., Devrim, İ., Meşe, T., Bayram, N., Yilmazer, M. & Gülfidan, G. (2018). The Frequency of Infective Endocarditis in *Candida* Bloodstream Infections: a Retrospective Study in a Child Hospital. *Braz. J. Cardiovasc. Surg.* 33(1)

38. Katzung, B. G. (2013). *Farmacología básica y clínica*. Sn Francisco: McGraw Hill Interamericana.

39. Kauffman, C. A. (2005). Candiduria. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Supplement_6): S371–S376. doi:10.1086/430918

40. Khan, H. A, Baig, F. K. & Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical*. 5(7): 509-514

41. Keighley, C., Chen, S. C. A., Marriott, D., Pope, A., Chapman, B., Kennedy, K., Bak, N., Underwood, N., Wilson, H. L., McDonald. K., Darvall, J., Halliday, C., Kidd, S., Nguyen, P., Hajkowicz, K., Sorrell, T. C., Van Hal, S. & Slavin, M. A. (2019). Candidaemia and a risk predictive model for overall mortality: a prospective multicentre study. *BMC Infectious Diseases*, 19(445). doi:10.1186/s12879-019-4065-5

42. Kordalewska, M., Zhao, Y., Lockhart, S. R., Chowdhary, A., Berrio, I., & Perlin, D. S. (2017). rapid and accurate molecular identification of the emerging multidrug-resistant pathogen *Candida auris*. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(8), 2445–2452. doi:10.1128/jcm.00630-17

43. Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. (2015). Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373(15), 1445–1456. doi:10.1056/nejmra1315399

44. López Chicón, P., Gulías, Ò., Nonell, S., & Agut, M. (2016). Terapia fotodinámica antimicrobiana in vitro aplicada sobre *Trichophyton mentagrophytes* con nuevo azul de metileno como fotosensibilizador. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 107(9), 765–770. doi:10.1016/j.ad.2016.06.004
45. Luo, G., and Mitchell, G. T. (2002) rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal Of Clinical Microbiology*. 40(8): 2860–2865.
46. Mahmoudi, K., Garvey, K. L., Bouras, A., Cramer, G., Stepp, H., Jesu Raj, J. G., . . . Hadjipanayis, C. G. (2019). 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 141(3), 595–607. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03103-4>
47. Maldonado Alvarado, E., Osorio Peralta, M. O., Moreno Vázquez, A., Martínez Guzmán, L. A., Melo Petrone, M. E., Enriquez Mar, Z. I., ... Ramón Gallegos, E. (2017). Effectiveness of photodynamic therapy in elimination of hpv-16 and HPV-18 associated with cin i in mexican women. *Photochemistry and Photobiology*, 93(5), 1269–1275. doi:10.1111/php.12769
48. Maldonado, I., Cataldi, S., Garbasz, C., Rellosio, S., Striebeck, P., Guelfand, L., ... Sorge, A. (2018). Identificación de levaduras del género *Candida*: los métodos convencionales frente a MALDI-TOF MS. *Revista Iberoamericana de Micología*. 35(3): 151–154. doi:10.1016/j.riam.2018.02.002
49. Maldonado, N. *et al.* (2018) La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. 22(1): 35-45
50. Maisch, T. (2015). Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 14(8), 1518-1526 doi:10.1039/c5pp00037h
51. McCarty, T. P., & Pappas, P. G. (2016). Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1):103–124. doi:10.1016/j.idc.2015.10.013
52. Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 487–494. doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.02.022
53. Morton, C., Szeimies, R. M., Wennberg, A. M., Basset Seguin, N., Calzavara Pinton, P., Gilaberte, Y., Hofbauer, G., Hunger, R., Karrer, S., Lehmann, P., Piaserico, S., Ulrich C., Braathen, Y. L. (2015) European dermatology forum guidelines on topical photodynamic therapy. *Eur J Dermatol*. 25(4): 296-311 doi:10.1684/ejd.2015.2570
54. Mothibe, J. V., & Patel, M. (2017). Pathogenic characteristics of *Candida albicans* isolated from oral cavities of denture wearers and cancer patients wearing oral prostheses. *Microbial Pathogenesis*, 110, 128–134. doi:10.1016/j.micpath.2017.06.036

55. Muñoz del Valle, G. M. (2015). *Candida glabrata*: Un patógeno emergente. *Biociencias*. 10(1): 89-102. DOI: 10.18041/2390-0512/bioc..1.2859
56. Naglik, J. R., Moyes, D. L., Wächtler, B., & Hube, B. (2011). *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and Infection*, 13(12-13), 963–976. doi:10.1016/j.micinf.2011.06.009
57. Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2016). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology*, 15(2), 96–108. doi:10.1038/nrmicro.2016.157
58. OPATHY Consortium, Gabaldón, T., (2019) Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS, *FEMS Microbiology Review*, 43(5): 517–547. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz015>
59. Organización mundial de la salud / CDC. (2003). Prevention of hospital acquired infections. Septiembre 2019, de World Health Organization Sitio web: https://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12/en/
60. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2016-2020. Recuperado 12 octubre, 2019, de <http://www.fao.org/3/b-i5996s.pdf>
61. Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Cavling, A. M., Ostrosky Zeichner, L. & Kullberg, B. J., (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews*. 4(18026): 1-20.
62. Patil, S., Rao, R. S., Majumdar, B., & Anil, S. (2015). Clinical Appearance of Oral *Candida* Infection and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01391
63. Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(12), e383–e392. doi:10.1016/s1473-3099(17)30316-x
64. Perlin, D. S., Shor, E., & Zhao, Y. (2015). Update on antifungal drug resistance. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2(2), 84-95. doi:10.1007/s40588-015-0015-1
65. Pujol, M. & Limón, E. (2013). Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31(2): 108–113. 10.1016/j.eimc.2013.01.001
66. Pupo, Y. M., Gomes, G. M., Santos, E. B., Chaves, L., Michel, M. D., Kozłowski Jr V. A., Gomes, O. M. M., Gomes, J. C. (2011) Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes. *Acta Odontol. Latinoam*. 24(2):188-192

67. Quindós, G. (2014). Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(1), 42–48. doi: 10.1016/j.riam.2013.10.001
68. Richardson, J.P., Ho, J. & Naglik, J. R. (2018). *Candida*–Epithelial Interactions. *Journal of fungi. J. Fungi*, 4(22): doi:10.3390/jof4010022
69. Rodrigues de Araujo, C., Carvalho Miranda, K., Sena Passos, X., Hasimoto Souza, L. K., de Aquino Lemos, J., Abbas Khrais, C. H., Rodrigues Costa, C., Rodrigues Silva, M. R. e Lisboa Fernandes, O. de F. (2005) Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos Manuais Convencionais e pelo método Cromógeno Chromagar *Candida*. *REVISTA DE PATOLOGIA TROPICAL*. 34(1): 37-42
70. Rodríguez Salgado, M. (2018). Frecuencia de infecciones asociadas a la atención de la salud en los principales sistemas de información de México. Recuperado de http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin17/frecuencia_infecciones.pdf
71. Ruhnke, M. (2018). Clinical Syndromes: *Candida* and Candidosis. *Clinically Relevant Mycoses*, 45–75. doi:10.1007/978-3-319-92300-0_4
72. Ruiz Gaitán, A. C., Fernández-Pereira, J., Valentin, E., Tormo-Mas, M. A., Eraso, E., Pemán, J., & de Groot, P. W. J. (2018). Molecular identification of *Candida auris* by PCR amplification of species-specific GPI protein-encoding genes. *International Journal of Medical Microbiology*. 308(7): 812-818. doi:10.1016/j.ijmm.2018.06.014
73. Rusu, E., Enache-Soare, S., Pelinescu, D., Sarbu, I., Manole C. & Vassu T. (2015) Identification of species of the genus *Candida* by analysis of 5.8S rRNA gene. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(4): 10584-110591.
74. Sadeghi, G., Ebrahimi-Rad, M., Mousavi, S. F., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Emergence of non- *Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(1), 51–58. doi:10.1016/j.mycmed.2017.12.008
75. Sales Rocha, L. De S., Rodrigues Cardoso, A. M., Rodrigues Limeira, F. I., Dantas de Medeiros, A. C., Chaves de Vasconcelos Catão, M. H., Queiroga de Castro Gomes, D. (2014) Irradiação a Laser de baixa intensidade sobre cepas de *Candida in vitro*. *Revista Cubana de Estomatología*. 51(3):358-365
76. Sobel, J. D. (2014). Genital candidiasis. *Medicine*, 42(7): 364 –368 doi: 10.1016/j.mpmed.2014.04.006
77. Soll, D. R. (2014). The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. *Journal of Oral Microbiology*, 6(1), 22993. doi:10.3402/jom.v6.22993

78. Sousa, J. N. L. De, Queiroga, B. H. De, Kocerginsky, P. De O., Marinho, P. H. C., & Araki, Â. T. (2015) Photoinactivation of *Candida albicans* using methylene blue as photosensitizer. *RGO - Revista Gaúcha de Odontologia*, 63(4), 411–417. doi:10.1590/1981-863720150003000063028
79. Souza, R. C., Junqueira, J. C., Rossoni, R. D., Pereira, C. A., Munin, E., & Jorge, A. O. C. (2009). Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers in Medical Science*, 25(3), 385–389. doi:10.1007/s10103-009-0706-z
80. Souza, S. C, Junqueira J. C., Balducii I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorde AOC. (2006) Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B*. 83(1):34-8.
81. Silva, M. L. F., Alves, P. M., Souza, D. M., Silva, M. V., Dos Santos, J. P., Paulino, T. P., . . . Rodrigues, V. (2019). Analysis of macrophage activation markers in an experimental model of cutaneous leishmaniasis treated with photodynamic therapy mediated by 5-aminolevulinic acid. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 37(5), 298–304. <https://doi.org/10.1089/photob.2018.4574>
82. 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). doi:10.1515/plm-2016-0021
83. Tan, J., Liu, Z., Sun, Y., Yang, L., & Gao, L. (2019). Inhibitory effects of photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida auris*. *Mycopathologia*. doi:10.1007/s11046-019-00352-9
84. Taha, M., & Zaghloul, A. B. (2018). Superficial Fungal Infections. Pigmented Ethnic Skin and Imported Dermatoses, 37–51. doi:10.1007/978-3-319-69422-1_5
85. Tian-Ao, X., Ye-Ling, L., Chuan L., Yuan-Yuan, H., Jin-Wei, L., Zhong-Wei, L., Shu-Jin, F., Jin-Tao, C., Yong, X., Xiao-Yan, L., Shi, O., Tian-Xing, J. & Xu-Guang, G. (2019). Accuracy of matrix-assisted LASER desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Candida*. *Bioscience Reports*, 39(10). <https://doi.org/10.1042/bsr20190859>
86. Torres-Hurtado, S. A., Ramírez-Ramírez, J., Larios-Morales, A. C., Ramírez-San-Juan, J. C., Ramos-García, R., Espinosa-Texis, 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*. doi:10.1016/j.pdpdt.
87. Tsai, H.-F., Krol, A. A., Sarti, K. E., & Bennett, J. E. (2006). *Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole

resistance in clinical isolates and petite mutants. antimicrobial agents and chemotherapy, 50(4), 1384–1392. doi:10.1128/aac.50.4.1384-1392.2006

88. Tscherner, M., Schwarzmüller, T., & Kuchler, K. (2011). Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals*, 4(1), 169–186. doi:10.3390/ph4010169

89. Tsakiri, S., Aneji, C., Domonoske, C., Mazur, L., Benjamin, D. K., & Wootton, S. H. (2018). Voriconazole Treatment for an Infant with Intractable *Candida glabrata* Meningitis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 37(10): 999-10011. doi:10.1097/inf.0000000000002073

90. Ucar, E., Seven, O., Lee, D., Kim, G., Yoon, J., & Akkaya, E. U. (2019). Selectivity in Photodynamic Action: Higher Activity of Mitochondria Targeting Photosensitizers in Cancer Cells. *ChemPhotoChem*. doi:10.1002/cptc.201800231

91. Vásquez, C. J. A., Ramírez Castrillón, M., Monsalve, F. Z. I. (2016) Update on molecular characterization for yeast of industrial interest. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 28(2): 129-139 DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61530

92. Vázquez Tsuji, Ó & Campos Rivera, T. (2014). Candidemia. *Acta Pediátrica de México Instituto Nacional de Pediatría*. 27(1):30-35.

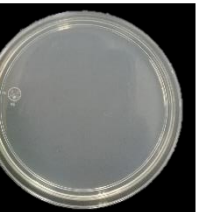
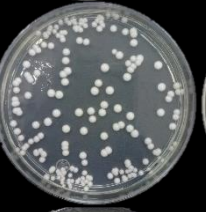
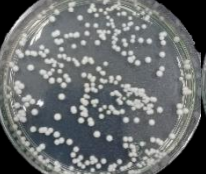
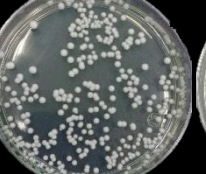
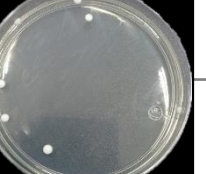
93. Vega Sánchez, D. C., Bernal López, L. E., Villanueva Recillas, S., & Arenas Guzmán, R. (2015). Infecciones urinarias por *Candida* spp. Estudio de 29 pacientes en un hospital general. *Med Int Méx*. 31:19-24

94. World Health Organization. (2013). Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria. OMS, Recuperado 12 septiembre, 2019, de https://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/

95. Zhao, Y., Chan, J. F.-W., Tsang, C.-C., Wang, H., Guo, D., Pan, Y., Woo, P. C.-Y. et al. (2015). Clinical Characteristics, Laboratory Identification, and In Vitro Antifungal Susceptibility of *Yarrowia (Candida) lipolytica* Isolates Causing Fungemia: a Multicenter, Prospective Surveillance Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(11), 3639–3645. doi:10.1128/jcm.01985-15

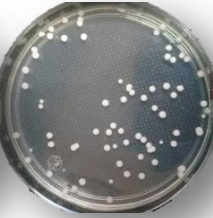
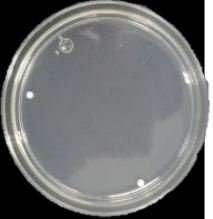
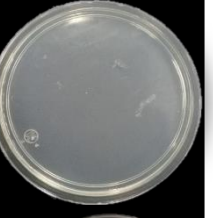
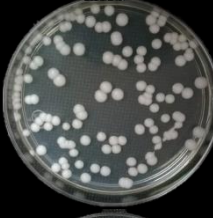
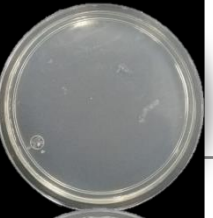
12. ANEXOS

ANEXO 1

	Control de levaduras	Control de toxicidad en oscuridad	Control de Luz	Tratamiento
<i>C. albicans</i> CAF2				
<i>C. albicans</i> 44				
<i>C. albicans</i> 56				
<i>C. albicans</i> 43				
<i>C. albicans</i> 2641				

Anexo 1. Resultados de la TFD sobre levaduras del género *C. albicans*.

ANEXO 2

	Control de levaduras	Control de toxicidad en oscuridad	Control de Luz	Tratamiento
<i>C. tropicalis</i> MYA3404				
<i>C. tropicalis</i> 7809				
<i>C. tropicalis</i> 7806				
<i>C. tropicalis</i> 71				
<i>C. tropicalis</i> 2130				

Anexo 2. Resultados de la TFD sobre levaduras del género *C. tropicalis*.

ANEXO 3

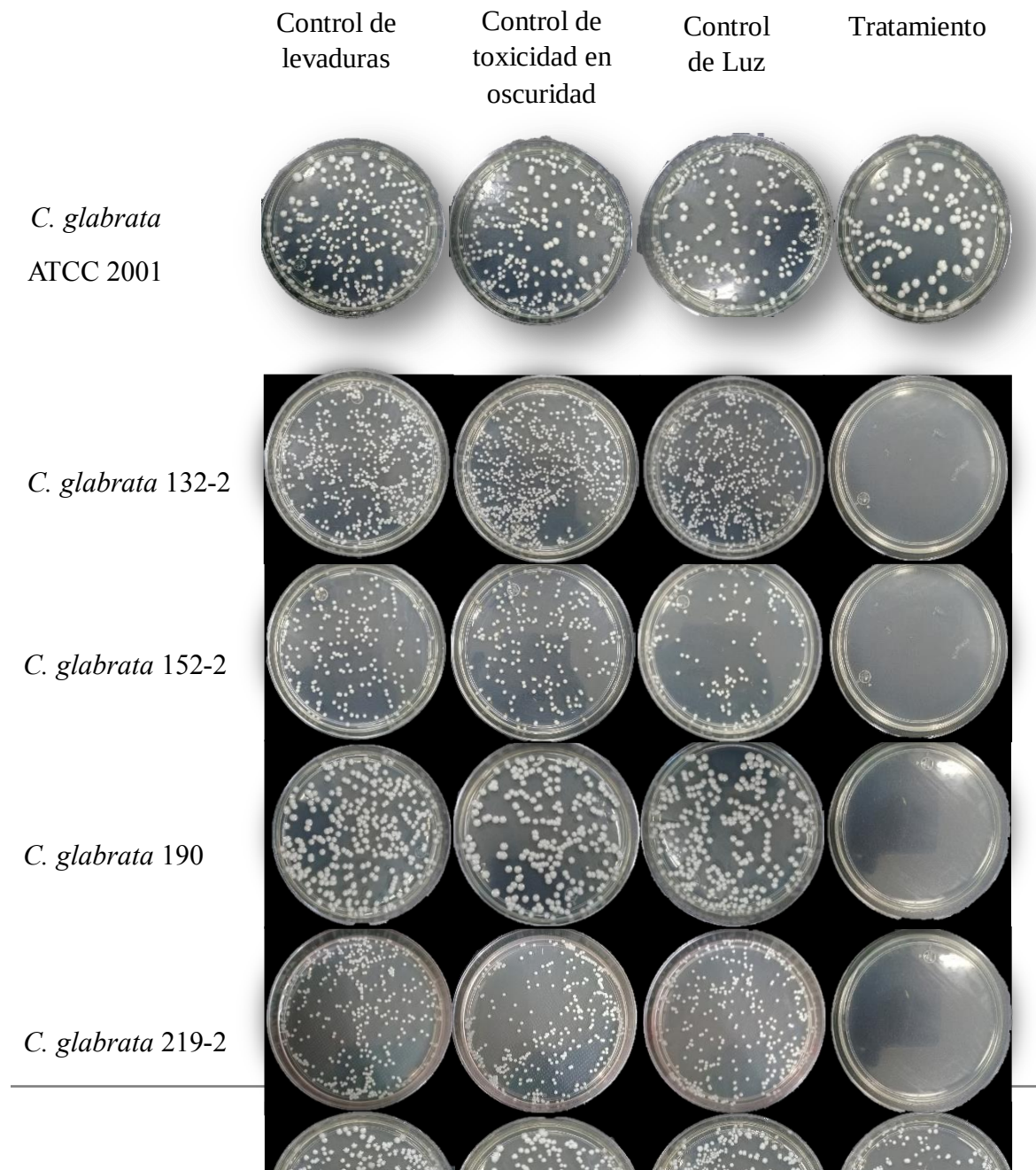
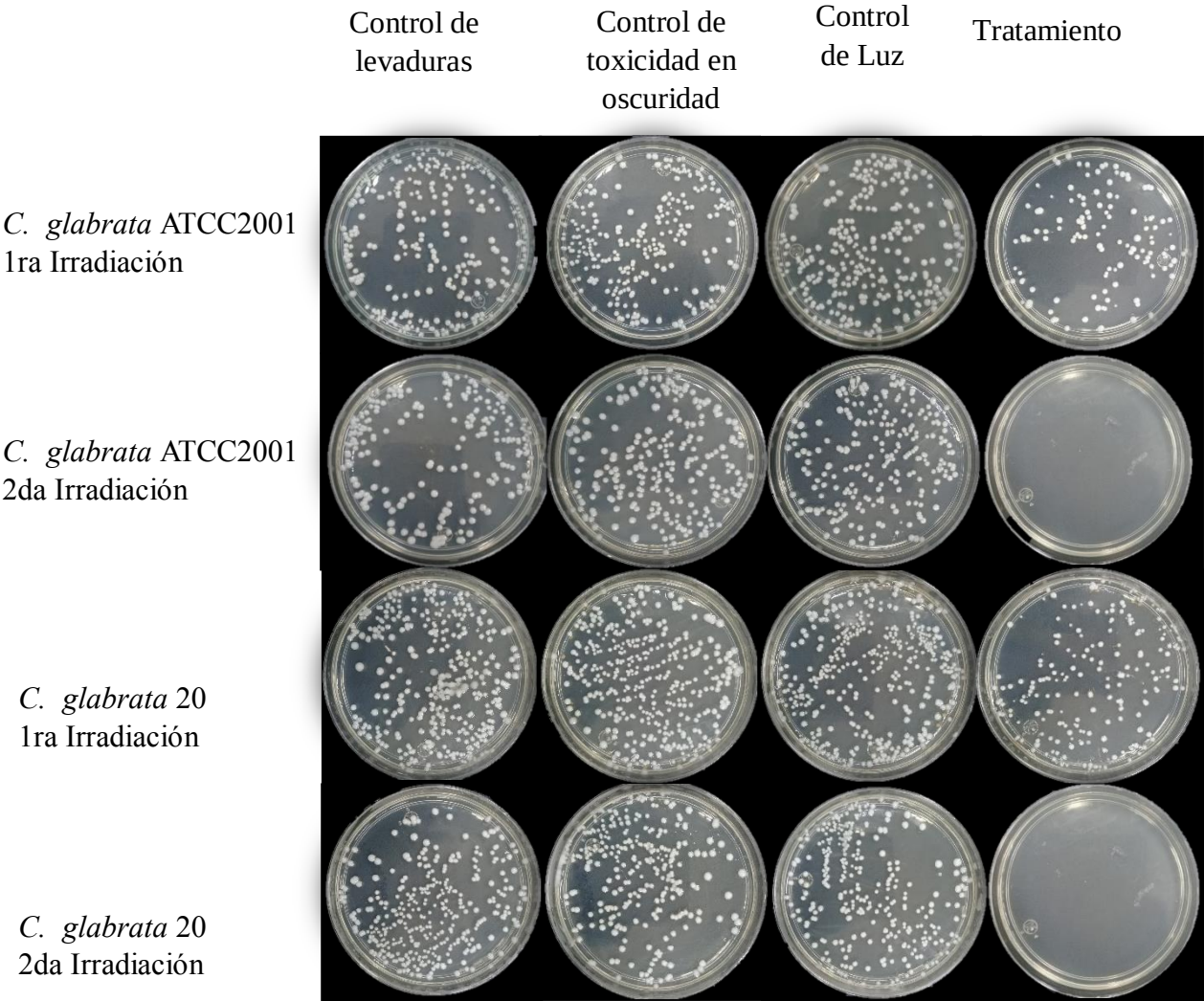


Figura Anexo3. Resultados de la TFD sobre levaduras del género *C. glabrata*.

ANEXO 4



Anexo 4. Resultados de la TFD con dosis repetida de irradiación con un intervalo de 30 min sobre levaduras del género *C. glabrata* ATCC2001 y *C. glabrata* 20.