



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**EFICACIA DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA SOBRE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS ORALES DE *CANDIDA SPP.*
PROVENIENTES DE INDIVIDUOS CON VIH/SIDA Y CANDIDIASIS
BUCAL**

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRÍA EN PATOLOGÍA Y MEDICINA BUCAL

P R E S E N T A

C.D. Ana Erika Martínez Martínez

Comité tutorial:

Co-Directora: M. en O. Estela de la Rosa García

Co-Director: Dr. Luis Octavio Sánchez Vargas

Asesora: Dra. Velia Aydeé Ramírez Amador

Asesor: Dr. Irvin Fabián Bonola Gallardo

Ciudad de México, septiembre de 2020

La Maestría en Patología y Medicina Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad de CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el registro 5020.

El jurado asignado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la unidad Xochimilco aprobó la ICR que presentó:

ANA ERIKA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Comité tutorial:

Co-Directora: M en O. Estela de la Rosa García

Co-Director: Dr. Luis Octavio Sánchez Vargas

Asesora: Dra. Velia Aydeé Ramírez Amador

Asesor: Dr. Irvin Fabián Bonola Gallardo

Jurado:

Dr. Marcos Agustín Muñiz Lino (Presidente)

Dr. Jaime Bustos Martínez (Secretario)

Dra. Irma Gabriela Anaya Saavedra (Vocal)

M en PMB. Martha Estela García Sánchez (Vocal)

A mi mamá

AGRADECIMIENTOS

*Muy especialmente al Dr. Luis Octavio Sánchez Vargas
por abrirme las puertas de su laboratorio, enseñarme
y ser tan paciente conmigo.*

*A toda mi familia por toda su ayuda,
apoyo incondicional, esfuerzo y sacrificio.*

*A mi directora de tesis la Dra. Estela de la Rosa García
por guiarme en la realización de este trabajo con disposición,
apertura y su valioso tiempo.*

*A la Dra. Araceli, a mis compañeros y amigos del
Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología Bucal
de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma
de San Luis Potosí, por su valiosa ayuda, enseñanzas
y por aceptarme en su laboratorio y regalarme su tiempo.*

*A la Mtra. Selene Acosta por su apoyo, tiempo y
por enseñarme a hacer el híbrido.*

*Mis agradecimientos más sinceros al Dr. Alejandro de las Peñas
y a las Dras. Irene Castaño Navarro y Guadalupe Gutiérrez Escobedo
por apoyarme en la extracción de ADN y por dejarme trabajar
con sus cepas de *C. glabrata*, además de acogerme en su laboratorio
y abrirme un espacio en el IPICyT.*

	Pág.
ÍNDICE	
Abreviaturas	I
Índice de cuadros	II
Índice de figuras	III
Resumen	1
1. Marco teórico	2
1.1 Género <i>Candida</i>	2
1.2 Factores de virulencia.....	3
1.3 Respuesta inmune a <i>Candida</i>	5
1.4 Identificación molecular de especies <i>Candida</i>	6
1.5 Tratamiento de las infecciones por <i>Candida</i>	7
1.5.1 Medicamentos antifúngicos.....	8
1.5.2 Mecanismos de resistencia antifúngica	10
1.6 Terapia fotodinámica	12
1.6.1 Antecedentes	12
1.6.2 Fundamento.....	14
1.6.3 Fotosensibilizadores	17
1.6.4 Híbrido clorina-grafeno	20
1.6.5 Luz (LED y láser)	22
1.6.6 Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica.....	23
1.7 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).....	26
1.7.1 Epidemiología del VIH/SIDA	26
1.7.2 Etiopatogenia de la infección por VIH/SIDA	26
1.7.3 Manifestaciones orales del VIH/SIDA.....	28
1.7.4 Infección por <i>Candida</i> en individuos con VIH/SIDA	28
2. Planteamiento del problema y justificación	30
3. Objetivos	31
3.1 Objetivo general	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. Materiales y métodos	32
4.1 Diseño de estudio	32
4.2 Universo, lugar y periodo de realización del estudio	32
4.3 Procedimientos para la recolección de información	33
4.4 Procedimientos clínicos	34
4.5 Procedimientos de laboratorio	35
4.6 Variables	46
4.7 Definición operacional de las variables	46
4.8 Análisis estadístico	46
4.9 Consideraciones bioéticas	47
5. Resultados	48
6. Discusión	56
7. Conclusiones y perspectivas	61
8. Referencias	63
9. Anexos	75

ABREVIATURAS

ADS	Agar Dextrosa Sabouraud
ACTG	AIDS Clinical Trials Group
ATCC	American Type Culture Cell
ALS	Agglutinin-like sequence
aPDT	Terapia fotodinámica antimicrobiana (Antimicrobial Photodynamic Therapy, por sus siglas en inglés)
ASM	Sociedad Americana de Microbiología (American Society of Microbiology, por sus siglas en inglés)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicales</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
cél.	Células
Ce6	Clorina e6
Ce6 L⁺	Clorina e6 expuestos a la luz
Ce6 L⁻	Clorina e6 no expuestos a la luz
cm	Centímetros
TARc	Terapia Antiretroviral combinada
CENASIDA	Centro Nacional para la prevención del SIDA
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standard Institute, por sus siglas en inglés)
cm²	Centímetro cuadrado
°C	Grados Celsius
EAP1	Proteína de Adherencia al Poliestireno 1 (Enhanced Adherence to Polystyrene 1, por sus siglas en inglés)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (Epidermic Growth Factor Receptor, por sus siglas en inglés)
EPS	Sustancias Poliméricas Extracelulares (Extracellular Polymeric Sustances, por sus siglas en inglés)
EY	Eritrosina
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés)
FGL-Ce6	Híbrido grafeno-clorina e6
FGL-Ce6 L⁺	Híbrido de grafeno-clorina e6 expuestos a la luz
FGL-Ce6 L⁻	Híbrido de grafeno-clorina e6 no expuestos a la luz
Gp	Glicoproteína
GPI	Glucanosilfosfatidilinositol
HDP	Hematoporfirina
Hwp1	Proteína 1 de la pared de la Hifa (Hyphal wall protein, por sus siglas en inglés)
IL	Interleucinas
J	Joule

LR C	Receptores de lectina tipo C
LED	Luz de Emisión de Diodos
MB	Azul de Metileno
min	Minutos
ml	Mililitros
μl	Microlitros
Mpb	Marcador de pares de bases
MRR	Regulador Multidrogoresistente (Multidrug Resistance Regulator, por sus siglas en inglés)
mTHPC	M-tetrahidroxofenil clorine
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
Ng	Nanogramos
NLR	Nodlike receptors
Npe6	Mono-L-aspartil clorine e6
NPS	Nanopartículas
OHARA	Oral HIV/AIDS Research Alliance
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAS	Ácido periódico de Schiff
Pb	Pares de base
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline, por sus siglas en ingles)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés)
TFD	Terapia Fotodinámica (Photodynamic Therapy, por sus siglas en inglés)
PRR	Receptores de reconocimiento de daño
PS	Fotosensibilizador (Photosensitizer, por sus siglas en inglés)
RB	Rosa bengala
rpm	Revoluciones por minuto
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleíco
ARNm	Ácido ribonucleíco mensajero
SAP	Serin proteasas
spp.	Especies de <i>Candida</i>
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TLR	Toll like receptors
TMPyP	Meso-tetra-(N-methylpyridinium-4-yl)-porphyrin
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
UAM-X	Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UNAIDS	United Nations Acquired Immunodeficiency Syndrome
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
W	Longitud de onda (Wavelength, por su sigla en inglés)
YPD	Caldo para hongos Peptona-Dextrosa (Yeast Peptone Dextrose, por sus siglas en inglés)

ÍNDICE DE CUADROS		Pág.
Cuadro 1	Estudios <i>in vitro</i> utilizando cepas ATCC de <i>Candida albicans</i>	14
Cuadro 2	Estudios <i>in vitro</i> que han utilizado clorina e6	20
Cuadro 3	Programación del termociclador para la identificación de especies de <i>Candida</i>	39
Cuadro 4	Características demográficas de 24 pacientes con VIH/SIDA con candidiasis bucal	51
Cuadro 5	Grupos de tratamiento de la terapia fotodinámica sin exposición a la luz LED (660 nm)	52
Cuadro 6	Grupos de tratamiento de la terapia fotodinámica con exposición a la luz LED (660 nm)	53
Cuadro 7	Conteo de UFC's por aislamientos sensibles y resistentes a fluconazol de <i>Candida</i> spp. tratadas con terapia fotodinámica	54

ÍNDICE DE FIGURAS		Pág.
Figura 1.	Vías de señalización que discriminan entre la levadura de <i>Candida</i> spp. y las hifas.....	6
Figura 2	Blancos celulares de los antifúngicos	8
Figura 3	Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica	24
Figura 4	Lámpara para terapia fotodinámica con LEDs activos de 2.85 mW	43
Figura 5	Dilución y sembrado por goteo	44
Figura 6	Prueba de susceptibilidad a fluconazol	45
Figura 7	Aislamiento correspondiente a <i>C. albicans</i> después de la fotoactivación con Ce6 y FGL-Ce6 + luz LED	55
Figura 8	Aislamiento correspondiente a <i>C. krusei</i> después de la fotoactivación con Ce6 y FGL-Ce6 + luz LED	55

RESUMEN

Introducción: Las infecciones fúngicas orales causadas por *Candida albicans* y especies no-*albicans* son frecuentes en los individuos con VIH/SIDA, su condición inmunológica los predispone a episodios repetitivos, combinación de variedades clínicas y frecuentemente son recalcitrantes, resistentes a los compuestos azólicos y a otros antifúngicos, por lo que se han propuesto alternativas de tratamiento, como la terapia fotodinámica.

Objetivo: Evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de Ce6 y el híbrido FGL-Ce6 activados mediante terapia fotodinámica comparándolo con el efecto de fluconazol sobre especies de *Candida* aisladas de la infección de la mucosa oral de pacientes con VIH/SIDA.

Materiales y métodos: Estudio experimental *in vitro*, realizado en el periodo comprendido entre febrero y julio de 2018, con aislados clínicos provenientes de individuos con VIH/SIDA con candidiasis oral que asistían a la consulta externa de las clínicas Condesa, las muestras se obtuvieron previo consentimiento informado, mediante un hisopado de las lesiones. La identificación de especies se realizó con PCR, mediante la identificación de fragmentos ITS1 e ITS2. Las levaduras fueron tratadas con 1mg/ml de Ce6 y FGL-Ce6, pre irradiadas 20 min y expuestas 45 min a luz LED (660 nm) a una fluencia de 7.69 J/cm². Para valorar el efecto de la TFD se sembraron las muestras en placas de agar dextrosa Sabouraud mediante la técnica de placa única en serie con goteo por dilución (SP-SDS Single-Plate-Serial Dilution Spotting) y se contabilizaron las unidades formadoras de colonias (UFC) a las 12 y 24 h post-tratamiento. La sensibilidad antifúngica se evaluó mediante el método de difusión en disco. Se utilizó el paquete estadístico JMP V.9 para el análisis estadístico ($\alpha < 0.05$).

Resultados: Se incluyeron 24 individuos con VIH/SIDA (96% hombres, mediana de edad: 33 años). Se obtuvieron 36 aislamientos, identificando 15 (41.62%) *C. albicans*, 8 (25%) *C. glabrata*, 4 (10.5%) *C. krusei*, 1 (2.7%) *C. tropicalis*, 1 (2.7%) *C. parapsilosis* y 7 (19.4%) inespecíficos. Se observó resistencia a fluconazol en 22 (61.1%) aislamientos. Los grupos de tratamiento expuestos a la luz mostraron reducción en el conteo de UFC de *Candida* spp., la reducción observada fue de 0.9% para Ce6 ($p=0.014$) y 11.5% para el híbrido FGL-Ce6 ($p=0.004$) con respecto al grupo control. El análisis de los aislamientos sensibles y resistentes a fluconazol tratados con TFD mostró reducción en el conteo de UFC en los aislamientos sensibles tratados con híbrido FGL-Ce6 ($p=0.0244$) y en los aislamientos resistentes tratados con Ce6 ($p=0.0082$).

Conclusiones: El efecto en la reducción de UFC de las especies de *Candida* con terapia fotodinámica utilizando Ce6 e híbrido FGL-Ce6 fueron satisfactorios considerando las dosis bajas de fotosensibilizador y baja fluencia utilizadas, por lo que la terapia fotodinámica se propone como una posible opción terapéutica alternativa para las infecciones fúngicas resistentes a fluconazol.

Palabras clave: Terapia fotodinámica, VIH/SIDA, candidiasis bucal, Ce6

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Género *Candida*

El género *Candida* representa un grupo heterogéneo, dentro del cual se han identificado aproximadamente 200 especies de levaduras en este género (Sharma y cols., 2019; Williams y cols., 2013). Taxonómicamente, el género *Candida* pertenece a la clase Deuteromicetos, y una característica importante de las especies de *Candida* es su capacidad de crecer polimórficamente, ya sea en forma de levaduras (blastoconidias/blastosporos) o filamentos (hifas verdaderas y pseudohifas) (Williams y cols., 2013; Naglik y cols., 2011).

De forma habitual, estos microorganismos se encuentran colonizando las superficies cutáneas y superficies mucosas húmedas (Carvalho y cols., 2017; Williams y cols., 2013; Lilly y cols., 2006). Aunque son considerados inocuos, en ocasiones exhiben un comportamiento oportunista y producen infección si las condiciones locales (disminución de flujo salival, antibiótico de amplio espectro) y sistémicas (nutrición deficiente, desequilibrio hormonal o cuando la inmunidad del hospedero se encuentra comprometida (Alves y cols., 2017; Quishida y cols., 2015; Mayer y cols., 2013).

Se han identificado alrededor de 20 especies de *Candida* asociadas a infecciones (candidiasis) en humanos (Williams y cols., 2013). La prevalencia de colonización en la cavidad oral en individuos sanos, como portadores asintomáticos, puede variar entre el 60 hasta el 80% de la población general (Vila y cols., 2020; Williams y cols., 2013; Mang y cols., 2010). A pesar de que *Candida albicans*, es por mucho la especie más comúnmente aislada de las infecciones, algunas otras especies *Candida no-albicans*, en particular *Candida glabrata*, ha sido reportada como agente etiológico en el desarrollo de las candidiasis orales,

especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Goulart y cols., 2018). Las formas clínicas incluyen: candidiasis pseudomembranosa, candidiasis eritematosa y queilitis angular, las características clínicas se muestran en el anexo 1 (Vila y cols., 2020; Patil y cols., 2015; Shiboski y cols., 2009).

1.2 Factores de virulencia

Los factores de virulencia son los mecanismos que posee un microorganismo para producir infección y desencadenar la respuesta inmune (Naglik y cols., 2011). *Candida spp.* posee ciertas particularidades que favorecen la infección en la mucosa oral como: la transición morfológica de levadura a pseudohifas e hifas (polimorfismo), la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, la capacidad de encontrar discontinuidad entre las células y penetrar al interior de los tejidos (tigmotropismo), la formación de biofilm, la producción de enzimas hidrolíticas, secreción de hidrolasas, adaptación a variación de pH, adaptación metabólica y respuesta al estrés ambiental (Mayer y cols., 2013; Naglik y cols., 2011; Thomson y cols., 2011).

Adherencia de *Candida* a superficies mucosas

La superficie epitelial y la superficie de *Candida* tienen cargas negativas así que la adherencia depende de superar diversos factores, como lo son: las fuerzas de Lifshitz-van der Waals, la interacción hidrofóbica y las fuerzas de movimiento Browniano, entre otras. (Thompson y cols. 2011). Una vez superadas las fuerzas repulsivas la adherencia de *Candida* es mediada por proteínas específicas, como las aglutininas de secuencia similar (ALS, agglutinin-like sequence), la proteína análoga de integrina (INT), la fibronectina (FN), la proteína 1 de la pared de la hifa (HWP1, Hyphal wall protein, por sus siglas en inglés) y la proteína de

adherencia al poliestireno 1 (EAP1, Enhanced Adherence to Polystyrene 1, por sus siglas en inglés) (Romo y cols., 2020; Williams y cols. 2013; Mayer y cols., 2013; Thompson y cols. 2011).

Detección de contacto e invasión

Una vez que la adherencia a las superficies mucosas se ha establecido, se lleva a cabo la colonización y el crecimiento de *Candida* en forma de unidades formadoras de colonias (UFC). Al entrar en contacto con la superficie celular, las levaduras cambian su morfología a hifas (dimorfismo) (Naglik y cols., 2011), las cuales permiten un contacto estrecho entre el hongo y las células epiteliales, quienes desencadenan un proceso denominado “endocitosis inducida”, seguida por una fase de invasión, que finalmente conduce a daño tisular (Naglik y cols., 2011; Fidel y cols., 2011; Weidong y cols., 2010). En la endocitosis, se expresan proteínas especializadas en la superficie celular que median la unión a ligandos del hospedero como E-cadherina o mediante un proceso activo en el que intervienen el aspartato serinproteasas (SAP) así como lipasas y fosfolipasas (Williams y cols., 2013; Mayer y cols., 2013; Brand y cols., 2007). Tras la penetración de *Candida* en la superficie celular oral y en capas más profundas del epitelio, éste sufre un alto recambio celular el cual sirve como mecanismo de defensa para eliminar las células infectadas (Romo y cols., 2020; Williams y cols., 2013; Mayer y cols., 2013; Fidel y cols., 2011; Weidong y cols., 2010).

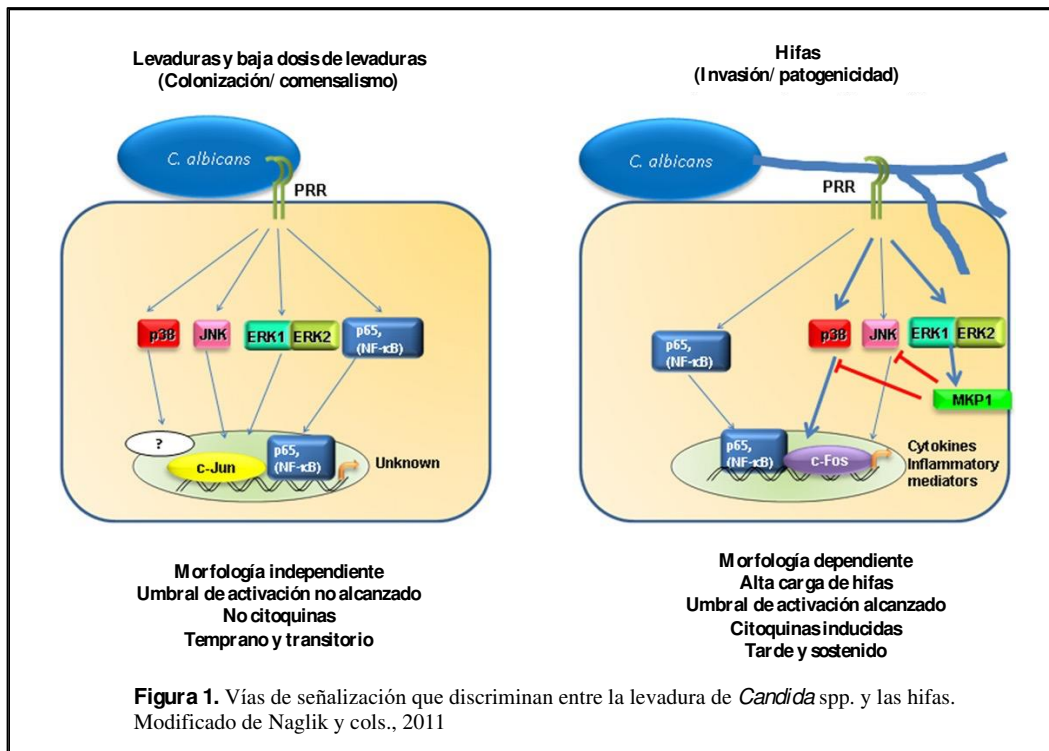
La formación de hifas promueve la virulencia mediante varios mecanismos: 1. Invaden las capas de células epiteliales al ejercer fuerzas mecánicas, 2. rompiendo y causando daño en las células endoteliales y 3. después de la fagocitosis, el crecimiento de hifas puede causar lisis de macrófagos y neutrófilos (Thompson y cols., 2011).

1.3 Respuesta inmune a *Candida*

Los tipos celulares que participan en la inmunidad innata frente a *Candida* son las células epiteliales y polimorfonucleares (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas), éstas últimas activadas por diversas citocinas proinflamatorias que sirven como señales para que las células inflamatorias de la mucosa potencien su actividad antifúngica (Albuquerque y cols., 2013). Como células clave en la inmunidad innata del hospedero, las células epiteliales reconocen a *Candida* en su estado patogénico y a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), interactúan con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) en células microbianas y ejemplos de éstos en *C. albicans* incluyen componentes de pared celular y ácidos nucleicos. Los PRR se dividen en tres grupos principales, receptores tipo Toll (TLR), receptores de tipo lectina de tipo C (CLR) y receptores no nodlike (NLR) (Romo y cols., 2020; Albuquerque y cols., 2013; Moyes y cols. 2011; Naglik y cols., 2011).

La activación de PRR por *Candida* activa vías de transducción de señales que derivan en la estimulación de citoquinas, fagocitosis y muerte fúngica. En la activación de citoquinas están involucrados TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9 que luego de reconocer las estructuras microbianas activan las vías NF κ B, MAPK, así como la familia de citoquinas IL-17 (Conti y cols., 2015; Albuquerque y cols., 2013; Williams y cols., 2013; Mayer y cols., 2013; Fidel y cols., 2011; Naglik y cols., 2011). Las células epiteliales pueden modular la respuesta innata de *Candida* a través de la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), en una primera fase, a los 30 min de exposición la activación de NF- κ B depende de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y del factor transcripcional c-Jun y es independiente de la morfología de *Candida*. En una segunda fase, a las 2 h de contacto, la activación de MAPK

conduce a la activación de MKP1 y de c-Fos, lo cual es dependiente de la presencia de hifas y/o de la carga fúngica, de tal forma que, ante una baja carga fúngica el epitelio no libera citoquinas y cuando éste se expone a un alta carga fúngica se activa una respuesta específica, como lo es la vía MAPK/MKP1/c-Fos que es fundamental para responder al cambio desde el comensalismo al estado patogénico (Romo y cols., 2020; Albuquerque y cols., 2013; Williams y cols., 2013; Naglik y cols., 2011; Thompson y cols., 2011).



1.4 Identificación molecular de las especies *Candida*

Debido a la alta resistencia de las especies de *Candida* como agentes etiológicos de infecciones micóticas hace necesaria la identificación de las levaduras a partir de diversas muestras clínicas. Hoy en día, existe una gran variedad de especies de *Candida* y los métodos de identificación disponibles difieren en el procedimiento, poder de discriminación y costo (Paul y cols., 2019; Daef y cols., 2014; Neppelenbroek y cols., 2014; Estrada-Barraza y cols., 2011).

En general, los procedimientos de identificación de levaduras comienzan con la siembra del aislado clínico en medios cromogénicos (Estrada-Barraza y cols., 2011; Murray y cols., 2005), cuando la levadura no se puede identificar con este método, se realizan pruebas adicionales como el cultivo en agar de harina de maíz, fermentación de carbohidratos y pruebas de asimilación de carbohidratos (Daef y cols., 2014; Estrada-Barraza y cols., 2011).

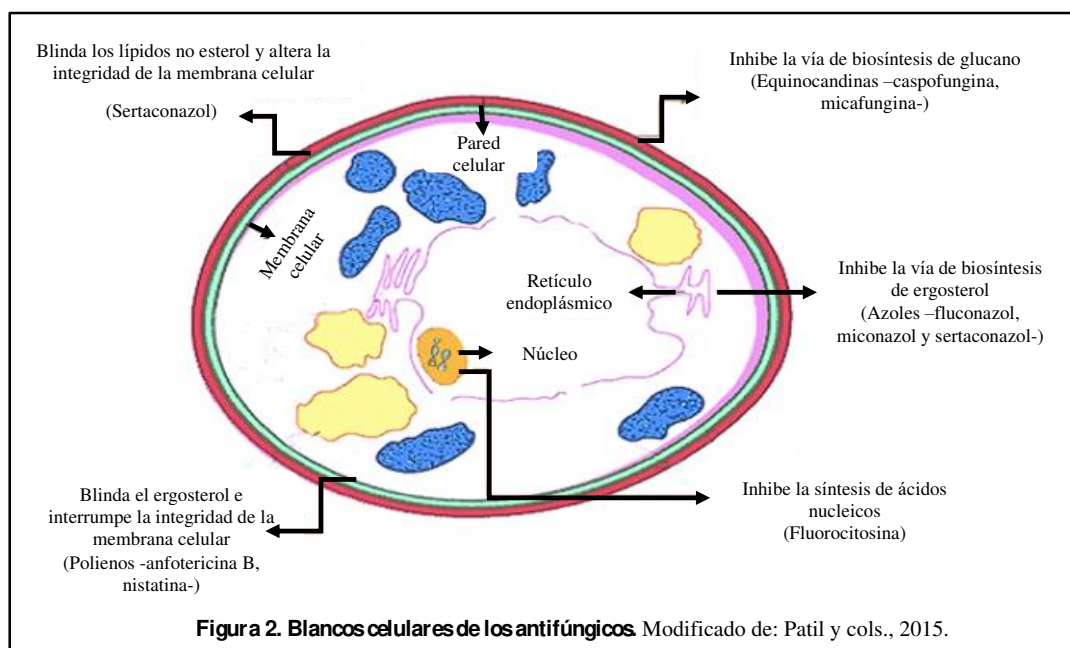
La identificación por PCR se basa en la amplificación de dos fragmentos de las regiones ITS1 e ITS2 de genes rRNA (18S, 28S y 5.8S) o el gen de la topoisomerasa II, combinando dos cebadores específicos de levadura (Paul y cols., 2019; Neppelenbroek y cols., 2013; Estrada-Barraza y cols., 2011; Carvalho y cols., 2007; Leaw y cols., 2006). Por lo tanto, debido a su gran sensibilidad y especificidad la prueba PCR, se señala como una herramienta rápida y segura para la identificación de varios hongos patógenos, incluyendo diferentes especies de *Candida*, inclusive a aquellas que posiblemente no son observadas debido al sobrecrecimiento de una especie sobre otra (Daef y cols., 2014; Estrada-Barraza y cols., 2011).

1.5 Tratamiento de las infecciones por *Candida spp.*

El tratamiento de candidiasis oral se basa en la severidad de la infección y en el estado sistémico del paciente (Patil y cols., 2015). Se recomienda un tratamiento tópico como primera elección (Pappas y cols., 2016; Ford y cols., 2015). Sin embargo, en pacientes con inmunosupresión severa existe una alta tasa de recurrencia, requiriendo una combinación de terapia tópica y sistémica (Pappas y cols., 2016; Ford y cols., 2015; Quishida y cols., 2015; Patil y cols., 2015; García-Cuesta y cols., 2014; Lopes-Colombo y cols., 2013).

1.5.1 Medicamentos antifúngicos

La elección del agente antifúngico tiene como principal objetivo la eliminación de los signos y síntomas de la infección por *Candida* y/o reducir o eliminar la colonización de *Candida* a niveles que puedan ser controlados por las defensas del hospedero. Existen tres blancos principales: la membrana celular, la pared celular y los ácidos nucleicos. Se agrupan en cuatro categorías: 1. Polienos, 2. Azoles, 3. Pirimidinas y 4. Equinocandinas (Patil y cols., 2015; Sardi y cols., 2013; Lopes-Colombo y cols., 2013).



Polienos

Su mecanismo de acción se debe a la unión al ergosterol, el componente lipídico principal de la membrana célula de *Candida* spp. que resulta en poros acuosos, con lo que la permeabilidad celular es alterada y conduce a la fuga de componentes del citoplasma, por ende, la muerte del organismo. Ver figura 2 (Spampinato y cols., 2013; Pappas y cols., 2009). Dentro de este grupo de medicamentos se encuentra la nistatina y la anfotericina B.

Azoles

Su función es inhibir el citocromo P450 de la 14α -desmetilasa, codificada por el gen ERG11, en la ruta de biosíntesis de ergosterol. De manera específica, el átomo de nitrógeno libre del anillo de azol se une a un átomo de hierro dentro del grupo hemo de la enzima, esto evita la activación del oxígeno y, a su vez, la desmetilización del lanosterol, que inhibe el proceso de biosíntesis de ergosterol. Como el ergosterol es un componente esencial de las membranas celulares de los hongos, esta inhibición es tóxica; los esteroides metilados se acumulan en la membrana celular fúngica y se detiene el crecimiento celular (Berkow y Lockhart, 2017). Dentro de este grupo se encuentran los derivados del imidazol: miconazol y clotrimazol y los triazoles: fluconazol, itraconazol y voriconazol.

Fluconazol: El mecanismo de acción del fluconazol consiste en inhibir al citocromo P-450 fúngico de la enzima 14α -desmetilasa, esta inhibición evita la conversión de lanosterol en ergosterol, componente esencial de la membrana citoplasmática del hongo. En diversos ensayos clínicos el fluconazol ha demostrado una eficacia comparable a la anfotericina B deoxicolato en el tratamiento de las candidiasis y es considerado el antifúngico de elección para el tratamiento en candidiasis orofaríngea por ser considerado eficaz y seguro. Su administración es por vía oral o parenteral, se elimina casi por completo por vía renal y puede desarrollar hepatotoxicidad en tratamientos de larga duración, sin embargo, es rara en tratamiento de la candidiasis oral. Se ha reportado que su uso no es recomendable para terapias preventivas largas puesto que puede causar resistencias (Alves y cols., 2017; Berkow y cols., 2017), además presenta varias interacciones farmacológicas (Whaley y cols., 2017; Pappas y cols., 2016; Lopes-Colombo y cols., 2013).

Pirimidinas

Flucitosina: Es un derivado fluorado de la citosina, también se conoce como 5-fluorocitosina, su mecanismo de acción se basa en interferir con la actividad de la timidilato sintetasa y así de la síntesis de ADN del hongo. Ha demostrado una amplia actividad antifúngica contra la mayoría de las especies de *Candida*, con la excepción de *C. krusei*. La toxicidad depende de la concentración y da como resultado supresión de la médula ósea y hepatitis. (Pappas y cols., 2016).

Equinocandinas

La caspofungina, la anidulafungina y la micafungina están disponibles solo como preparaciones parenterales. El mecanismo de acción de este antifúngico, se basa en la inhibición de la síntesis de la pared celular de polisacáridos beta-glucanos mediante el bloqueo de la enzima 1,3 beta glucano sintetasa. (Perlin DS, 2014, Wiederhold NP, 2003). La principal vía de eliminación es la degradación no enzimática (Pappas y cols., 2016).

1.5.2. Mecanismos de resistencia antifúngica

Una de las principales complicaciones causadas por el uso frecuente de antifúngicos azólicos es la capacidad de *Candida* para adquirir resistencia a éstos, principalmente a fluconazol (Favre-Godal y cols., 2014). Debido a que el fluconazol es fungistático, el tratamiento brinda la oportunidad de que se desarrolle una resistencia adquirida (Berkow y cols., 2017) y como la mayoría de las células de *Candida* no existen como organismos libres sino como grupos de células organizadas en un biofilm, el cual presenta diferentes propiedades que incrementan la resistencia a la terapia antifúngica adicionado a los tratamientos previos con estos compuestos. (Whaley y cols., 2017; Berkow y cols., 2017; Favre-Godal y cols., 2014).

Se han identificado diversos mecanismos de resistencia a fluconazol en especies de *Candida*:

1. Alteraciones en la biosíntesis de esteroides mediante la inactivación de la enzima Δ 5,6-esterol desaturasa, evitando la producción de esteroides metilados tóxicos en presencia de azoles y minimiza el efecto del fluconazol en la célula, 2. Aneuploidía y otras anormalidades cromosómicas, 3. Salida del fármaco mediada por proteínas transportadoras de membrana pertenecientes a la familia de transportadores de ATP (ABC-CDR1 y CDR2) o a la superfamilia de facilitadores principales (MDR1 y FLU1), lo que da como resultado que el fármaco no se acumule intracelularmente generando resistencia (Berkow y cols., 2017; Whaley y cols., 2017; Sanguinetti y cols., 2005; Goldman y cols., 2004)

A diferencia de cepas ATCC y “salvajes” los aislados clínicos de *Candida albicans* sobreexpresan ERG11, este gen codifica el ergosterol, y a menudo involucra Upc2p, un factor de transcripción de grupos de zinc (Berkow y cols., 2017; Perea y cols., 2011, Costa y cols., 2006; Graybill y cols., 1998). Adicionalmente, algunas mutaciones puntuales en la región codificante del gen ERG11, afectan la susceptibilidad al fluconazol y conducen a sustituciones de aminoácidos que alteran la estructura de la proteína, haciendo menos eficaz la unión de los azoles (Berkow y cols., 2017; Sanguinetti y cols., 2005). EGR11 parece no desempeñar un papel importante en la resistencia al fluconazol en *Candida no-albicans* (Teo y cols., 2019; Berkow y cols., 2017; Mane y cols., 2016; Sanguinetti y cols., 2005). Los mecanismos moleculares no explican completamente el alto nivel de resistencia observado en los aislados clínicos, a menudo, es la combinación de múltiples mecanismos adquiridos escalonadamente independiente al estado inmunológico de cada individuo (Berkow y cols., 2017; Pfaller y cols., 2012). Si bien estos mecanismos de resistencia a antifúngicos se han

estudiado en diferentes grupos de riesgo, en la infección por VIH/SIDA no se ha identificado mecanismos particulares relacionados con este grupo.

1.6. Terapia fotodinámica (TFD)

1.6.1. Antecedentes

Existen documentos que reportan el uso de luz combinada con una sustancia fotosensible desde los años 1200-2000 a.n.e, éstos muestran que los médicos egipcios, chinos e hindúes utilizaban combinaciones de extractos de plantas con exposición a la luz solar con el fin de tratar trastornos de la piel (Carrera y cols., 2016; Baltazar y cols., 2015). En 1900 Oskar Raab y Hermann Tappeiner descubrieron que el protozooario *Paramecium spp.* moría después de teñirlo con naranja acridina y exponerlo a la luz (Baltazar y cols., 2015; Tappeiner 1900). Sin embargo, el término de terapia fotodinámica fue acuñado en 1907, cuando Tappeiner notó que el efecto fototóxico no ocurría en ausencia de oxígeno, por lo que introdujo el término “acción fotodinámica” para nombrar a esta reacción (Baltazar y cols., 2015; Dai y cols., 2012).

En la década de los 70’s, la terapia, comenzó a ser utilizada para tratar cáncer y degeneración macular y en la actualidad la terapia fotodinámica antimicrobiana se propone como una alternativa para el tratamiento de infecciones localizadas ya que es capaz de sobrepasar las defensas antioxidantes de las células e iniciar el proceso de muerte celular por diferentes vías (Baptista y cols., 2017; Carrera y cols., 2016; Dai y cols., 2012). La terapia fotodinámica implica el uso de un tinte sensible a la luz no tóxico, en concentraciones bajas, llamado fotosensibilizador (PS, por sus siglas en inglés) combinado con luz visible de la longitud de onda adecuada para que coincida con el espectro de absorción del PS. Comparada con otras

terapias, tiene notables ventajas, tales como una alta especificidad, pocos efectos indeseados y una poco probable resistencia al tratamiento. (Carrera y cols., 2016; Dovingo y cols., 2013).

Dado que algunos PS se unen de forma rápida y selectiva a células microbianas, se sugirió que la terapia fotodinámica (TFD) podría usarse con un enfoque antimicrobiano; esto se hizo realidad a mediados de la década de 1990 (Dai y cols., 2012). A partir de los años 2000 se han realizado diversos estudios aplicando la terapia fotodinámica en cepas control ATCC de *Candida albicans* y especies de *Candida* no-*albicans* utilizando diferentes fotosensibilizadores como el azul de metileno, azul de toluidina, porfirina, curcumina, eosina y rosa bengala; en algunos diseños experimentales mediante la activación con luz láser y la mayoría utilizando luz LED con longitudes de onda de 440nm a 684 nm y con tiempos de exposición que van desde los 2 min hasta 3 h (Cuadro 1).

Cuadro 1. Estudios de terapia fotodinámica *in vitro* utilizando cepas ATCC de *Candida*

Autor, año	Especie (ATCC)	FS (concentración e internalización)	Tiempo de exposición	Resultado
Munin y cols., 2007 Giraldo y cols., 2009	<i>C. albicans</i> (10231)	AM (0.027-0.27mM)	Laser (684nm)	Reducción dependiente
Peloi y cols., 2008	<i>C. albicans</i> (10231)	AM	LED 10, 20 y 30 min	Reducción 2.77 a 2.87 log ₁₀
Carvalho y cols., 2009	<i>C. albicans</i> (10231)	AT (0.1mg/ml)	LED (684nm)	Reducción 80-90%
Soares y cols., 2009	<i>C. albicans</i> (18804) <i>C. tropicalis</i> (750) <i>C. parapsilosis</i> (22019)	AT (25µM)	LED	Si inhibe el crecimiento
Dovigo y cols., 2011	<i>C. albicans</i> (90028)	Curcumina (20 µM)	LED (440-460nm)	Reducción 68-87%
González y cols., 2013	<i>C. albicans</i> (MYA-273)	TMPyP (0.1-50µM) 4h XF-73 (1-10µM) 4h	LED 60 min	TMPyP 50µM reducción ≥ 5 log ₁₀ XF-73 1µM reducción ≥ 5 log ₁₀
Kato y cols., 2013	<i>C. albicans</i> (90028)	AM (0.5mM, 10 min)	LED (660nm) 2-6 min	No hubo reducción
Rossoni y cols., 2014	<i>C. albicans</i> (36801-02)	AM (30 µM, 5 min)	LED 285 seg.	Reducción < 2 log ₁₀
Oliviera y cols., 2014	<i>C. albicans</i> (10231)	AM (50µM)	Laser	Reducción <72.41%
Roseti y cols., 2014	<i>C. albicans</i> (10231)	AT (0.05-1mg/ml, 10 min)	LED 1, 2 y 3h	Reducción 30-62%
Freire y cols., 2014	<i>C. albicans</i> (18804)	EY (6.25-400µM) RB (6.25-400µM)	LED EY (480-580nm) RB (450- 550nm)	EY (400µM) reducción de UFC RB (6.25µM) reducción <100%

ATCC= American Type Culture Cell; FS=fotosensibilizador; AM=Azul de metileno; AT=Azul de Toluidina; TMPyP=porfirina tetracatiónica; XF-73= cloruro de exeporfirio; EY=eritrosina; RB=rosa bengala; LED= luz de emisión de diodos; UFC=unidades formadoras de colonias.

1.6.2 Fundamento

La terapia fotodinámica necesita de tres componentes (Cieplik y cols., 2014, Mima y cols., 2012). Un fotosensibilizador, luz visible de una longitud de onda apropiada y oxígeno (Baltazar y cols., 2015; Dai y cols., 2012).

Cuando las células se tratan con FS deben realizarse una serie de pasos antes de lograr la muerte celular. Es decir, el FS debe ser internalizado por la célula, equilibrarse y acumularse en localizaciones subcelulares, excitarse y solo oxidar las biomoléculas. Al mismo tiempo, la luz debe alcanzar las moléculas absorbentes, así como el oxígeno debe estar disponible o suministrarse adecuadamente (Bacellar y cols., 2015; Cieplik y cols., 2014).

Cuando el FS se activa mediante la exposición de luz visible no térmica en una longitud de onda apropiada en presencia de oxígeno, el FS se transforma de su estado fundamental a su estado de triplete excitado y comienza dos mecanismos oxidativos: la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (NOS) (Baltazar y cols., 2015, Dai y cols., 2012) (Tipo I) y oxígeno singlete (1O_2) (Tipo II) que es una forma altamente reactiva de las formas de especies reactivas de oxígeno, que interactúa con la mayoría de las biomoléculas, lípidos, proteínas del ADN/ARN así como preferencia por regiones ricas en electrones que imparten una forma de selectividad a su interacción (Koh y cols., 2016; Bacellar y cols., 2015; Quishida, 2015; Dovingo y cols. 2013).

En general, se espera que el fotosensibilizador se internalice en la célula, por lo que la membrana celular se considera el objetivo inicial del proceso fotodinámico, sin embargo, el FS que no logra ser internalizado por la célula puede reaccionar en el medio circundante y los compuestos oxidantes generados pueden fluir a través del medio y generar daño en la parte externa de la célula (Quishida y cols., 2015). Los ROS promueven el daño a componentes vitales de los microorganismos, tales como, su ADN, proteínas y lípidos lo que resulta en muerte celular (Carvalho y cols., 2017; Bacellar y cols., 2015; Quishida, 2015;

Rosseti y cols.,2014). Algunas de sus múltiples ventajas son: blancos terapéuticos altamente específicos, pocos efectos secundarios no deseados e improbable desarrollo de resistencia antimicrobiana (Dovigo y cols., 2013). Dentro de sus múltiples aplicaciones se ha reportado como coadyuvante en el tratamiento de la inflamación crónica y en las infecciones de bacterias drogo-resistentes (Kwiatkowski y cols., 2018).

La American Society of Microbiology señala que cualquier enfoque novedoso debe lograr una tasa de reducción de UFC de más de 3 log₁₀ para usar los términos "antibacteriano" o "antimicrobiano" (Ribeiro y cols., 2013; Cieplik y cols., 2014). A este respecto, estudios sobre aislamientos de *C. tropicalis*, *C. glabrata* la terapia fotodinámica utilizando concentraciones de 50-75mg^l⁻¹ de clorina e6 y a 37.5 Jcm⁻² de luz LED, se observó la reducción de la viabilidad de estas cepas en 5.6 y 4.3 logs, respectivamente y comparadas con el grupo control. En cuanto a *C. albicans* una concentración de 75mg^l⁻¹ con 25.5 Jcm⁻² de luz LED logro inactivarlas, mostrando una reducción de 6.4 log₁₀ y tratadas con una concentración de 50-75mg^l⁻¹ de clorina e6 a 37.5 Jcm⁻² de luz LED mató por completo a las levaduras con respecto al grupo control (Dovigo y cols., 2013).

Diversos estudios realizados en aislamientos de *Candida* spp. y el uso de la terapia fotodinámica, utilizando diferentes fotosensibilizadores como hematoporfirinas (HPD), rosa bengala (RB) y azul de metileno (MB) en cepas ATCC de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Ferreira y cols., 2016; Dovingo y cols., 2013, Dovingo y cols., 2009) así como en aislados clínicos de pacientes con VIH/SIDA (Scwingel y cols., 2012; Mang y cols., 2010), demostraron una reducción significativa de UFC dependiendo de la concentración del fotosensibilizador y del tiempo de exposición (Alves y cols., 2018; Alves

y cols., 2017; Taraszkiecz y cols., 2015; Freire y cols., 2014; Roseti y cols., 2014; Oliviera y cols., 2014; Rossoni y cols., 2014; Gonzáles y cols., 2013; Dovigo y cols., 2013; Soares y cols., 2013). Ensayos en modelos murinos han demostrado que la terapia tiene una actividad biológica in vivo, como lo demuestran ciertos grados de daño tisular; con concentraciones bajas de fotosensibilizador y/o dosis menores de luz pueden mitigar los posibles efectos adversos y mostrar actividad antimicrobiana (da Silva y cols., 2017; Carmello y cols., 2016; Alves y cols., 2014; Fontana y cols., 2013; Mima y cols., 2011; Martins y cols., 2011). Por otra parte, ensayos clínicos desarrollados en pacientes con VIH⁺ utilizando azul de metileno como fotosensibilizador (450gμ/mL), lograron la erradicación del 100% de las UFC después una sola aplicación y no se observó recurrencia de la infección 30 días posteriores a su aplicación (Sewingel y cols., 2012). Sin embargo, algunas cepas de *C. albicans* y *C. glabrata* resistentes a fluconazol han mostrado sensibilidad reducida y respuesta no homogénea a la terapia fotodinámica al ser comparadas con cepas ATCC sensibles a fluconazol (Alves y cols., 2018; Alves y cols., 2017).

1.6.3 Fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores son colorantes que tiene la capacidad de absorber la energía de una fuente lumínica y transferir esa energía a otra molécula (Baltazar y cols., 2015, Quishida y cols., 2015). Generalmente son moléculas aromáticas orgánicas que consisten en sistemas conjugados de dobles enlaces que pueden considerarse como un cromóforo central con cadenas laterales auxiliares unidas (auxocromos) que son responsables de una mayor deslocalización eléctrica del FS (Cieplik y cols., 2014). Debido a la extensa deslocalización de electrones, los FS tienden a estar profundamente coloreados, esto significa que la energía

requerida para excitar los electrones del orbital molecular menos ocupado al orbital molecular más ocupado es baja en comparación con las moléculas menos deslocalizadas y, por lo tanto, las bandas de absorción están en la región espectral de longitud de onda más larga (roja) y son grandes, lo que refleja la alta probabilidad de excitación (Cieplik y cols., 2014; Dai y cols., 2012; Calzavara-Pinton y cols., 2012).

Un fotosensibilizador efectivo se caracteriza por ser soluble en agua, ser químicamente puro, barato y de fácil fabricación (Kwiatkowski y cols., 2018), absorción óptima, distribución y metabolismo (Carrera y cols., 2016), toxicidad mínima en oscuridad, alto rendimiento cuántico de O₂ (Dovigo y cols., 2013; Allison y cols., 2013), bajo potencial mutagénico, ser estable químicamente (Carrera y cols., 2016; Soukos y Goodson, 2011), acumularse específicamente en la diana celular (Alves et al., 2009). y eliminarse rápidamente después de la administración para evitar fotosensibilización prolongada (Cieplik y cols., 2014; Allison y cols., 2013). Sin embargo, algunos fotosensibilizadores son hidrofóbicos y al ser agregados en un medio acuoso su capacidad se ve reducida, otras de sus desventajas son una longitud de onda insuficiente para su excitación y baja producción de ROS debido a hipoxia (Zarrintaj y cols., 2018).

El fotosensibilizador puede: 1). no unirse a las células y permanece afuera, por lo que el daño se limita a la pared celular; 2). unirse a las células, de manera laxa, y ubicarse más externa o internamente por difusión, dependiendo del modo de interacción con los componentes celulares o 3). unirse a las células y transportarse activamente a la célula a través de la pared a la membrana plasmática (Bacellar y cols., 2015; Alves y cols., 2014). Esta unión y su internalización en las células se ve afectada por varios factores, tales como, la estructura de

FS, el grado de hidrofobicidad, el número de cargas positivas y la distribución espacial de los sustituyentes (Alves y cols., 2014; Uliana y cols., 2014).

A lo largo de los años, diversos compuestos han sido evaluados para la terapia fotodinámica tales como las porfirinas, fotodiazinas, fluoresceínas, ftalocianinas, clorinas y en años recientes, la curcumina y los derivados de peronaftenona y fullerenos, por tener un espectro de absorción en el rango de longitud de onda azul (427-476 nm) se han pensado como un fotosensibilizador factible para TFD (Baltazar y cols., 2015; Cieplik y cols. 2014; Dovigo y cols., 2013).

Con referencia a las clorinas, derivadas de las clorofilas naturales, forman parte de la segunda generación de fotosensibilizadores, están relacionados biosintéticamente con la protoporfirina IX, en consecuencia, poseen mayor biocompatibilidad. La banda Soret de las clorinas se encuentra alrededor de los 400 nm y sus bandas Q en los 600 nm (Mojziso va y cols., 2007; Cieplik y cols., 2014; Uliana y cols., 2014) se ha demostrado que tienen mayor selectividad por microorganismos en comparación con células de mamíferos (Uliana y cols., 2014), además poseen tiempos de incubación bajos y periodos cortos de fotosensibilización y absorción de luz a longitudes de onda más largas (que penetran más en los tejidos) así como mayores rendimientos de O₂ (Baltazar y cols., 2015; Mojziso va y cols., 2007). Debido a su alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete (¹O₂), algunos estudios señalan su eficacia en la inactivación de células en cultivo de *C. albicans* y *C. guilliermondii*. (Carvalho y cols., 2017; Park y cols., 2010; Quishida y cols., 2015; Dovingo y cols. 2013). Sin embargo, debido a que el tamaño de *C. albicans* es aproximadamente 25-50 veces mayor que las bacterias, se necesitarían mayores cantidades de oxígeno singlete (¹O₂) por célula para inactivar las

levaduras (Quishida y cols., 2015). Las clorinas tienden a localizarse en los lisosomas después de su captación celular por endocitosis ya que siguen el tráfico intracelular y terminan fusionándose con los lisosomas (Bacellar y cols.,2015).

Cuadro 2. Estudios de terapia fotodinámica, *in vitro*, utilizado clorina e6 como fotosensibilizador

Autor, año	Especie	Concentración e internalización	Tiempo de exposición	Resultado
Dovingo y cols., 2013	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i>	25-75 mg/mL 20 min	12-25 min	Reducción: 61.1% <i>albicans</i> 76.0% <i>tropicalis</i> 76.9% <i>glabrata</i>
Quishida y cols., 2015	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i> (ATCC 90028 y 2001)	100-200 mg/L 20 min	9 min	Reducción > 1 log ₁₀
Carvalho y cols., 2017	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	1-10 µg/L 20 min	--	Reducción 50-90%
Alves y cols., 2017	<i>C. albicans</i> FS (ATCC 90028) <i>C. albicans</i> FR (ATCC 96901)	100 mg/L 20 min	9 min	Reducción UFC y FV
Carmello y cols. 2017	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	100 mg/L 20 min	14 min	Reducción de 3 log ₁₀

ATCC= American Type Culture Cell; FS=fotosensibilizador; Ce6=clorina e6; FS= fluconazol sensible; FR= fluconazol resistente; UFC=unidades formadoras de colonias, FV= factores de virulencia.

1.6.4 Híbrido clorina-grafeno

Los compuestos híbridos utilizados como fotosensibilizadores suelen ser mucho más efectivos que los fotosensibilizadores comunes ya que poseen gran afinidad por moléculas específicas como: iones, ADN, ARN, proteínas, glúcidos e infinidad de bacterias; además de haber demostrado una vida media superior y menor toxicidad (Hosseinzadeh y cols., 2018; Zarrintaj y cols., 2018).

Se consideran nanopartículas (NPS) a aquellas partículas que miden entre 1 y 100 nm y que se comportan como una unidad completa en términos de sus propiedades y transporte. Por su composición química, las nanopartículas se dividen en orgánicas e inorgánicas; a las nanopartículas orgánicas pertenecen los fullerenos, nanotubos de carbono y dendrímeros. A las nanopartículas inorgánicas pertenecen aquellas que incluyen materiales nobles, semiconductores, compuestos magnéticos y sus combinaciones (Zarrintaj y cols., 2018; Zuchowska y cols., 2017).

Las NPS tienen grandes aplicaciones en la industria química, óptica y electrónica, sin embargo, en los últimos años han surgido aplicaciones biomédicas de las NSP, entre las que se incluyen la administración de fármacos, la creación de marcadores biológicos fluorescentes para la investigación y diagnóstico de algunas enfermedades, vectores para terapia génica, detección de proteínas, estudios de resonancia magnética y terapia contra el cáncer (Hosseinzadeh y cols., 2018; Zuchowska y cols., 2017).

A este respecto, se han utilizado algunas conjugaciones con otros materiales para mejorar la eficacia clínica de la clorina como fotosensibilizador, tal es el caso de la conjugación de clorina e6 con polivinilpirrolidona (Ce6-PVP), conocido comercialmente como Photolon™ (Copley y cols., 2007) Esta conjugación provee mayor estabilidad a las moléculas de clorina, mejor solubilidad en agua, mayor rendimiento cuántico de oxígeno singlete (1O_2) (Copley y cols., 2007). Este híbrido se ha utilizado con éxito para tratar melanomas de cabeza, cuello y piel, con una efectividad del 95% (Petrov y cols., 2004), Así como en otros tipos de melanomas en piel utilizando nanopartículas activadas mediante terapia fotodinámica (Mongue-Fuentes y cols., 2014)

Otro nano material que ha ganado popularidad en los últimos años ha sido el grafeno, derivado alotrópico del carbono, el cual tiene una estructura delgada constituida por átomos de carbonos dispuestos en forma hexagonal y tiene una hibridación sp_2 , alta conductividad térmica y eléctrica. Sus propiedades físicas (absorbancia intrínseca alta cercana al infrarrojo) y químicas (alta área de superficie específica) inusuales han provocado que se estudien sus propiedades biológicas. Adicionalmente, el grafeno es un material delgado, resistente, transparente y químicamente resistente (Zuchowska y cols., 2017).

El grafeno tiene baja toxicidad, acción local y tiene la habilidad de inducir a apoptosis, tiene la capacidad de causar efectos mínimos en las células normales pero ser tóxico para células tumorales, debido a que la mayoría de los fotosensibilizadores tienen afinidad por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuáles proporcionan a los tejidos el colesterol necesario para la creación de la membrana celular después de la división celular, dicha afinidad resulta particularmente importante debido al papel en el transporte del fotosensibilizador a las células blanco (Kwiatkowski y cols., 2018), su ingreso a la membrana celular aumenta la actividad metabólica y la producción de especies reactivas de oxígeno (Kakaei y cols., 2016).

1.6.5. Luz (LED y láser)

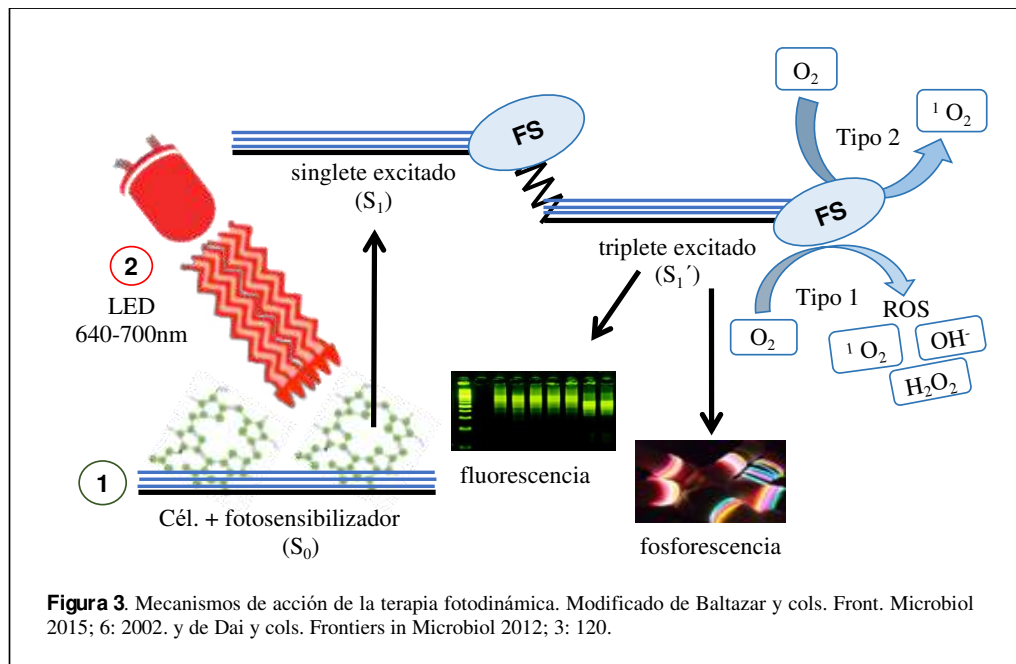
Actualmente se utilizan fuentes de luz coherentes (láser) como no coherentes (Emisión de Diodos de Luz-LED); los diferentes tipos de láser (CO_2 , Ar, Er, Er: YAG, Nd: YAG) pueden emitir luz con altos grados de monocromaticidad que pueden enfocarse en una fibra óptica, sin embargo, el alto costo y las dificultades de transporte son algunos de los inconvenientes (Carrera y cols., 2016; Baltazar y cols., 2015, Migliario y cols., 2013).

Un LED es una fuente de luz basada en semiconductores que utiliza electricidad para excitar la emisión de luz mediante la recombinación de los orificios y los electrones generados en el espacio de banda del semiconductor sin ningún aumento de temperatura. Los LED pueden diseñarse para emitir luz en los tres colores de luz visible (rojo, azul y verde) y también en la región cercana al infrarrojo; la luz LED es casi monocromática y su bajo costo y longitudes de onda la ha llevado a un uso generalizado (Carrera y cols., 2016).

Los LEDs son menos costosos, fácilmente transportables y se utilizan cada vez más en aplicaciones experimentales y clínicas de terapia fotodinámica. Es muy importante minimizar el daño a los tejidos normales, por lo que la dosis de luz utilizada durante la terapia no debe ser superior a 200 mW/cm^2 (Baltazar y cols., 2015).

1.6.6. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica

El estado fundamental de un fotosensibilizador es el estado singlete (S_0), la activación por la luz da como resultado el tránsito de electrones a un orbital diferente, el fotosensibilizador cambia a un estado excitado y pasa a ser una molécula inestable (S_1) con semivida corta. Para volver a su estado fundamental estable el fotosensibilizador emite fluorescencia o fosforescencia. La emisión de fluorescencia no altera el giro del electrón, la fosforescencia cambia el giro de un estado singlete a excitado a un estado de triplete excitado (S_1^{\wedge}), que tiene semivida más larga. (Figura 3) (Baltazar y cols., 2015, Cieplik y cols. 2014; Dai y cols., 2012).



El estado triplete excitado es el principal mediador de las reacciones fotodinámicas, pueden ocurrir dos tipos de reacciones fotodinámicas:

1. Reacción tipo I: el triplete del fotosensibilizador transfiere un electrón o hidrógeno a una biomolécula produciendo intermedios reactivos: anión peróxido, (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilos (OH^\cdot), óxido nítrico (NO). Esta cascada de reacciones conduce a estrés oxidante (Kwiatkowski y cols., 2018, Carreta y cols., 2016, Baltazar y cols., 2015).
2. Reacción tipo II: Como resultado de la transición del fotosensibilizador al estado de triplete excitado, la energía es transferida a una molécula de oxígeno produciendo oxígeno singlete (1O_2) que es un oxidante poderoso con tiempo de vida corto que puede reaccionar con varias biomoléculas como lípidos y proteínas (Kwiatkowski y cols., 2018).

Los radicales generados por TFD tienen vidas cortas y solo reaccionan en sus sitios de formación, lo que reduce su toxicidad para los tejidos adyacentes normales, éstos radicales alteran la estructura de la pared celular y la membrana de los hongos (Dantas y cols., 2015). Ambas reacciones contribuyen al daño celular, si éste ocurre en la mitocondria conducirá a la célula a muerte por apoptosis, se destruirá la membrana y se perderá la integridad celular induciendo necrosis, pero si el daño ocurre en los lisosomas o en el retículo endoplásmico provocará la autofagia celular (Kwiatkowski y cols., 2018; Baltazar y cols., 2015; Dantas y cols., 2015; Saini y cols., 2014; Dai y cols., 2012).

La ocurrencia de reacciones fotodinámicas dependerá de los sustratos que el radical encuentra, ya que, la distancia de difusión de los radicales depende de su reactividad, es así que los radicales más reactivos reaccionan antes y no se difunden a grandes distancias. Este es el caso del radical hidroxilo, cuya velocidad de reacción está controlada por difusión. Por otro lado, el radical superóxido es una especie poco reactiva, por lo que viaja distancias mayores antes de ser consumido. De hecho, se sabe que los radicales superóxidos (O_2^- , H_2O_2 , OH^- y NO) actúan como mensajeros en las vías de señalización celular y rara vez son los radicales que causarán el daño final (Bacellar y cols., 2015; Dantas y cols., 2015).

Es posible extraer algunas conclusiones de este análisis para las fotooxidaciones en TFD: (a) la difusión de especies reactivas fotoinducidas en un entorno biológico está muy limitada y, por lo tanto, el fotodaño se produce en el nanoambiente donde se absorbe el fotón; (b) la mayoría de la oxidación molecular comienza con oxígeno singlete (1O_2), pero las reacciones mediadas por radicales son fundamentales para formar especies intermedias importantes, que permiten alcanzar puntos de daño celular sin retorno; (c) dirigirse a biomoléculas específicas

puede desencadenar diferentes mecanismos de muerte celular programada; (d) la oxidación de objetivos específicos puede conducir a un mejor efecto TFD que la oxidación extensa y genérica (Bacellar y cols., 2015).

1.7 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

1.7.1 Epidemiología del VIH/SIDA

El Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (UNAIDS) publicó en su reporte global que, a nivel mundial, existían 37.9 millones de personas infectadas con VIH a finales de 2018 y 24.5 millones tienen acceso a la terapia antirretroviral altamente activa (Global HIV & AIDS statistics – 2019 fact sheet, 2019).

El UNAIDS publicó que, a finales de 2018, en América Latina 1.8 millones de personas vivían con la infección por VIH/SIDA y la terapia altamente activa es accesible, en promedio, para el 58% de ellos; en México, al 31 de diciembre de 2019, se reportaron 179, 640 mil personas que viven con VIH de las cuales, 141 mil tenían acceso al tratamiento antirretroviral, cada año hay 112 mil nuevas infecciones y se estima que para el 2020 serán 250 mil (CENSIDA, 2019).

1.7.2 Etiopatogenia de la infección por VIH/SIDA

Se han descrito dos tipos de virus de la inmunodeficiencia humana, los cuales pueden distinguirse por variaciones en los genes que codifican para la envoltura viral, el tipo 1 (VIH-1) descrito en 1983 siendo el tipo predominante a nivel mundial y el tipo 2 (VIH-2) descrito en 1986, el cual se encuentra prácticamente confinado a los países de África Occidental. (Sharp y cols., 2011; Lau y cols., 2013; Tobón y cols., 2008).

El VIH es un *lentivirus* que pertenece a la familia de los retrovirus, ésta se caracteriza por presentar un curso crónico con un período largo de incubación y una replicación persistente del virus, éstos se caracterizan por integrar su material genético en la célula hospedera pasando de ARN a ADN por transcripción inversa (Sharp y cols., 2011). De afuera hacia adentro de la partícula viral, se encuentra la envoltura conformada por la gp120 y gp41 además de lipoproteínas en la membrana de la célula a la que infecta; por debajo de la envoltura se encuentra una matriz proteica compuesta por p17, después sigue la cápside compuesta por la proteína p24, dentro de la contiene dos copias de ARN de cadena simple y enzimas necesarias para la replicación viral (transcriptasa reversa p66, proteasa p11 e integrasa p32) (Maartens y cols., 2014; Moir y cols., 2011; Tobón y cols., 2008).

El ARN codifica para nueve genes que son *gag*, *pol* y *env*, los cuales tienen información para producir las proteínas estructurales para las nuevas partículas virales y los otros genes *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* son genes reguladores. Adicionalmente el VIH, tiene tropismo por receptores de linfocitos CD4+ y a receptores de interleucinas en macrófagos y se une a ellos a través del receptor CXCR4 y CCR5 respectivamente (Moir y cols., 2011; Tobón y cols., 2008).

Para que el virus pueda replicarse necesita invadir una célula, el primer paso es la adherencia mediante la interacción de la gp120 viral y el receptor CXCR4 o el CCR5, esta unión protege el sitio de unión de la glicoproteína de los anticuerpos. Una vez dada la adherencia la envoltura viral y la membrana celular de la célula hospedera se fusionan, una vez que el ARN es liberado a la célula la transcriptasa reversa hace una copia de ADN viral, posteriormente se forma una cadena complementaria de ADN la cual se unirá al ADN del hospedero, para

ello se transporta la cadena hasta el núcleo y la integrasa es la encargada de integrarla al genoma del hospedero (Maartens y cols., 2014; Moir y cols., 2011). Después de la integración, se sintetizan ARNm para producir nuevas partículas virales, las copias del ARN salen del núcleo y el ARNm es traducido para producir enzimas y proteínas estructurales virales con la ayuda de la proteasa, en tanto, las demás proteínas, enzimas y material genético son encapsulados para formar una partícula viral que saldrá de la célula por gemación (Tobón y cols., 2008).

1.7.3 Manifestaciones orales del VIH/SIDA

Desde el inicio de la epidemia del VIH/SIDA, las manifestaciones orales se han considerado como una parte importante por su valor diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (Patton y cols., 2013; Shiboski y cols., 2009). El Grupo de Ensayos Clínicos del SIDA (ACTG) creó en 2006 la Alianza para la investigación del VIH/SIDA en la mucosa bucal denominada OHARA con el objetivo de investigar las manifestaciones orales asociadas a estas entidades. Son más de 40 manifestaciones orales las se han asociado en mayor o menor proporción con la infección por el VIH/SIDA, sin embargo, han sido clasificadas de acuerdo a su etiología en micóticas, virales, bacterianas, neoplásicas y otras (Shiboski y cols., 2009).

1.7.4. Infección por *Candida* en individuos con VIH/SIDA

La candidiasis bucal es, la infección fúngica más frecuente en pacientes con VIH/SIDA, se estima que del 84-100% de los individuos VIH-positivos se encuentran colonizados por *Candida* spp. y que más del 90% de éstos desarrollarán al menos un episodio de candidiasis (Vidya y cols., 2016; Freire y cols., 2014; Owotade y cols., 2014; Lin y cols., 2013; Jamil y cols., 2013; Cassone y cols., 2012; Santa Anna y cols., 2006). Siendo ésta un indicador de

progresión de la infección por VIH, sobre todo en aquellos con conteo de linfocitos T CD4+ bajo (<200 cél/mm³) y conteos de carga viral mayores a 10,000 copias/ml. (Kirti y cols., 2018; Menezes y cols., 2016; Berberi y cols., 2015; Ramírez-Amador y cols., 2009; Gaitán y cols., 2008; Ramírez-Amador y cols., 2007; Sánchez-Vargas y cols., 2005).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las infecciones fúngicas orales causadas por *Candida* spp son frecuentes en los individuos con VIH/SIDA, son recurrentes de acuerdo con la condición inmunológica de los individuos y en ocasiones resistentes al tratamiento antifúngico lo que genera severas fallas al mismo. Así mismo, su condición inmunológica los predispone a cursar con infecciones por diferentes especies de *Candida*, como son *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, entre otras.

El fluconazol, es uno de los antifúngicos más utilizados como profiláctico para infecciones por *Candida* spp. en individuos con VIH/SIDA e inmunocomprometidos por diferentes causas, y en consecuencia se ha reportado tener efectos secundarios, alta resistencia especialmente para *C. glabrata* y *C. krusei*

En consecuencia, se ha insistido en la búsqueda de métodos terapéuticos alternativos, como la TFD que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de diversos tipos de neoplasias, así como, para inactivar *in vitro* especies de *Candida* como tratamiento para la candidiasis oral, sin embargo, se desconoce el efecto de la TFD utilizando el fotosensibilizador Ce6 o un híbrido FGL-Ce6 en aislamientos clínicos orales de individuos con VIH/SIDA. El presente estudio *in vitro* permitirá comparar el efecto antifúngico de la TFD para inactivar UFC en aislamientos clínicos de candidiasis oral utilizando Ce6 y el híbrido FGL-Ce6 comparándolo con el efecto de fluconazol, así mismo, aportará información para futuras investigaciones para su posible uso como tratamiento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de Ce6 y el híbrido FGL-Ce6 activados mediante terapia fotodinámica comparándolo con el efecto de fluconazol sobre especies de *Candida* aisladas de la infección de la mucosa oral de pacientes con VIH/SIDA.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de especies de *Candida* aisladas de la infección de la mucosa bucal de pacientes con VIH/SIDA.

- Determinar la frecuencia de sensibilidad y resistencia al fluconazol por especies de *Candida* aisladas de la infección de la mucosa oral de pacientes con VIH/SIDA.

- Determinar el efecto antifúngico de Ce6 y del híbrido de FGL-Ce6 en las especies de *Candida* aisladas de la infección de la mucosa oral, con y sin activación fotodinámica vs un control sin tratamiento.

- Comparar el efecto antifúngico de Ce6 y el híbrido FGL-Ce6, en especies de *Candida* sensibles y resistentes a fluconazol, con y sin activación fotodinámica comparándolas con fluconazol.

4. MATERIALES Y MÉTODO

4.1 Diseño de estudio

Estudio experimental realizado en individuos con VIH/SIDA con candidiasis oral que asistían a la consulta externa de las Clínica Condesa y Condesa Iztapalapa. En colaboración con la Maestría en Patología y Medicina bucal (UAM-X), el Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología Bucal de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) y el laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).

4.2 Universo, lugar y periodo de realización del estudio

Se incluyeron individuos adultos diagnosticados con VIH/SIDA que asistieron a la consulta de Patología y Medicina Bucal de la Clínica Especializada Condesa y Condesa Iztapalapa, que autorizaron su participación en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado, durante el período comprendido entre febrero y junio de 2018.

Criterios de inclusión

- Individuos mayores o con 18 años cumplidos de ambos sexos, con diagnóstico confirmado de VIH/SIDA con candidiasis oral confirmado por métodos microbiológicos.

Criterios de exclusión

- Individuos con diagnóstico confirmado de VIH/SIDA con candidiasis oral que estén, o hayan recibido tratamiento antifúngico oral o sistémico en el mes previo a su inclusión en el estudio.

Criterios de eliminación

- Aislamientos de *Candida* spp obtenidos de la mucosa oral de individuos con VIH/SIDA y candidiasis, que no demostraron crecimiento de UFC, contaminados con otros microorganismos o cuyo ADN no pudo ser extraído o se encontró degradado.

4.3 Procedimientos para la recolección de información

La información se recolectó, previa firma del consentimiento informado (Anexo 2), en una ficha de recolección de datos (Anexo 3), La ficha se dividió en tres apartados:

- a) Clínico: se incluyeron datos de identificación, demográficos (edad, sexo, fecha de nacimiento, escolaridad, lugar de residencia y ocupación), antecedentes de la condición sistémica (fecha de diagnóstico, carga viral, conteo de linfocitos T CD4+, tratamiento antirretroviral, falla previa a Terapia Antirretroviral Combinada (TARc)), hábitos (consumo de alcohol y tabaco), datos del examen bucal sistemático, tipo de candidiasis de acuerdo a los criterios de Shiboski y cols., (2009) y tratamiento antibiótico o antifúngico previo
- b) Microbiológico y biología molecular: resultados de la citología exfoliativa, datos de crecimiento de UFC en Agar Dextrosa Sabouraud, identificación de levaduras por medios cromogénicos (CHROMAgar®), identificación de las especies de *Candida* por PCR, datos de la terapia fotodinámica (cantidad de levaduras por ml, fotosensibilizador utilizado, concentración y tiempo de exposición) y datos del crecimiento de especies después de la terapia fotodinámica mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml.
- c) Códigos: se incluyeron los códigos que se emplearon para el llenado de la ficha de recolección de datos.

4.4 Procedimientos clínicos

A los participantes se les informó sobre el objetivo del proyecto, sus beneficios y repercusiones, y se les solicitó firmar un consentimiento informado. Se les interrogó y completó la ficha de recolección de datos, se realizó el examen bucal el cual se llevó a cabo por dos especialistas en medicina bucal, siguiendo un orden topográfico estricto (Anexo 4), utilizando guantes y abate lenguas de madera desechables. El diagnóstico y clasificación de candidiasis oral se realizó con base en los criterios clínicos establecidos por Shiboski y cols., 2009, y se confirmó mediante citología exfoliativa y cultivo.

La muestra citológica se obtuvo mediante un raspado de la zona lesionada con abate lenguas de madera, el material obtenido se extendió en un portaobjetos previamente rotulado con los datos del paciente (nombre, edad, sexo, localización de la lesión y fecha de la toma de muestra), por último, se fijó con spray citológico (Coronado y cols., 2013; Quindos G y cols., 2007) y se llevó al Laboratorio de Histopatología de la UAM Xochimilco para su análisis microscópico, el cual se realizó por dos especialistas en patología bucal previamente calibrados (Kappa =0.80).

Para la toma de muestra y su posterior cultivo, el individuo debió estar en ayuno por lo menos 2 horas y no haberse realizado ningún procedimiento de higiene bucal o colutorio. Se realizó la toma de muestra mediante hisopado de la mucosa bucal utilizando un hisopo estéril y girando todo el tiempo en contra de las manecillas del reloj en las zonas de la mucosa bucal con lesión de candidiasis. La muestra se colocó en un medio de transporte (medio Stuart) para mantener la viabilidad de *Candida* spp. (Tooyama y cols., 2015; Williams y cols., 2000)

se rotulo con el código correspondiente, CI-# de sujeto-año o CC-#de sujeto-año, para la clínica Condesa Iztapalapa y Clínica Condesa respectivamente.

4.5 Procedimientos de laboratorio

Las pruebas de laboratorio se realizaron tanto en el laboratorio de Histopatología y el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la UAM Xochimilco, así como, en el Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y el laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT),

Diagnóstico citológico

En el laboratorio de histopatología de la UAM Xochimilco, los portaobjetos fueron teñidos con tinción de ácido peryódico de Schiff (tinción de PAS), una vez teñidos se realizó, por especialistas, un análisis microscópico para determinar la presencia de hifas de *Candida* spp., (Padilha y cols., 2014; Mehrotra y cols., 2011; Terai y cols., 2009) y emitir el diagnóstico citológico de Candidiasis positiva o negativa. Se elaboraron reportes con el resultado de la observación y se entregaron a los sujetos de investigación (Anexo 5).

Diagnóstico microbiológico

En una zona de trabajo aséptica y cerca del calor de un mechero de Fisher, se rotularon las cajas de CHROMA[®] *Candida* (Paul y cols., 2019; Hassan y cols., 2018, Devi y cols., 2014; Neppelenbroek y cols., 2014) con la codificación correspondiente al aislamiento y fecha de sembrado; después se agitó el medio de Stuart con la ayuda de un agitador vórtex. El sembrado se realizó descargando el inóculo contenido en el hisopo con movimientos

horizontales sobre las placas de cultivo cromogénicas. Se incubaron a 36° C por 48 h y se realizó la identificación presuntiva de especies de *Candida*, de acuerdo con las características colorimétricas indicadas por el fabricante (Anexo 6).

Los cultivos positivos a una o más especies se resembraron y purificaron en nuevas placas de CHROMAgar® (Paul y cols., 2019; Harsha y cols., 2011; Linares y cols., 2007), hasta separar las diferentes colonias; éstas, se resembraron en placas de ADS adicionado con cloranfenicol (Neppelenbroek y cols., 2014; Williams y cols., 2000), utilizando la técnica de cultivo puro, para poder obtener el crecimiento de colonias separadas, las placas fueron incubadas a 36 °C por 48 h. Una vez identificadas y aisladas se preservaron, para ello se utilizaron tubos de ensayo estériles con 3 ml de caldo Sabouraud glucosado y un inóculo de la muestra, se incubaron a 36 °C durante 24 h y posteriormente, se transfirieron 500 µl del inóculo y 500 µl de glicerol al 30%, se congelaron a -30°C para su uso posterior (Quindos G y cols., 2007).

Caracterización molecular

Se realizó la extracción de ADN mediante la técnica diseñada por en el departamento de Microbiología molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), la cual se detalla a continuación:

Se colocaron inóculos de las muestras en 3ml de caldo dextrosa Sabouraud, se incubaron a 37°C durante 24 h, se centrifugaron a 500 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante, se agregaron 5 ml de PBS, se agitaron con vórtex y se centrifugaron a 500 rpm por 5 minutos.

Después se desechó el sobrenadante y se adicionó 1ml de PBS, se agitaron y transfirieron a tubos cónicos de 1.5 ml, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se re suspendieron las pastillas en 500 µl de Buffer A (Tris 50mM (0.05M, EDTA 10mM (0.01M), NaCl 150mM (0.15M), Tritón 1%, SDS 1% y H₂O di destilada y autoclaveada).

Resuspendidas las pastillas se transfirieron a tubos cónicos de 1.5mL con 500µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1, se agitaron con vórtex durante 4 minutos y se incubaron a 44 °C por 30 min. Transcurrido el tiempo se agitó 4 minutos y se centrifugó a 13, 000 rpm durante 10 min, se recuperó la fase acuosa (aproximadamente 450-600 µl) y fue transferida a nuevos tubos cónicos de 1.5 ml, se añadieron 50 µl de buffer A y 0.3µl de cóctel de ARNsas, se agitó e incubó a 44 °C durante 30 min. Transcurrido el tiempo, se retiraron de la incubadora y se les agregó 1 ml de etanol frio al 100%, se mezcló suavemente hasta observar el ADN formando un pellet, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min y se desechó el sobrenadante. A continuación, se lavó el pellet con 1ml de etanol frio al 70%, se desechó el sobrenadante sin perder de vista el pellet de ADN, se dejaron secar las pastillas a 44 °C hasta que se evaporó el etanol. Las muestras se rehidrataron con 50 µl de Tris 10 mM, 0.3µl de cóctel de ARNsas y 50µl EDTA 10 mM, finalmente se incubaron a 37 °C, por 30 minutos.

Cuantificación de ADN

Para la cuantificación de ADN se tomó 1 µl de cada tubo que lo contenía utilizando el programa Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer®. Se muestran las

mediciones de cada uno de los aislamientos (Anexo 7). Con la razón Abs260/Abs280 se determinó la cantidad de ADN extraído:

- Abs260/Abs280 < 1.4 indicaba que había más proteína que ácidos nucleicos.
- Abs260/Abs280 > 2.0 indicaba que el ADN estaba degradado.
- Abs260/Abs280 de 1.4 a 2.0 indicaba que el ADN es de buena calidad.

Identificación molecular

La identificación se realizó mediante PCR simple y se inició con *C. albicans* sometiendo a todos los aislamientos identificados como esta especie por métodos cromogénicos, posteriormente se identificaron las especies de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Para la reacción de PCR se preparó una alícuota con 12.5 µl de 2X Go Taq Master Mix (Promega, Inc. USA), 2.4 µl de primer mix (sentido y antisentido) de cada especie (Invitrogen Inc. USA), 2 µl del ADN previamente extraído y se aforó a 25 µl con agua sin ARNasas en un tubo cónico de 50 µl. Adicionalmente, se preparó un control negativo conteniendo únicamente agua en lugar de ADN y un control positivo para cada especie. Se programó el termociclador (MULTIGENE Labnet Internacional, Inc.USA) para las reacciones de PCR con las siguientes condiciones de temperatura y tiempo para cada especie (Cuadro 3).

Cuadro 3. Programación del termociclador para la identificación de especies de *Candida*

Etapas	Alineación		Elongación	
	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo
Paso 1 (1 ciclo)	94 °C	1 min		
Paso 2 (40 ciclos)				
Fase de desnaturalización	94 °C	15 seg		
Fase de alineación				
<i>C. albicans</i>	62 °C	20 seg	72 °C	15 seg
<i>C. glabrata</i> y <i>C. krusei</i>	60 °C	20 seg	72 °C	40 seg
<i>C. tropicalis</i>	57 °C	20 seg	72 °C	15 seg
<i>C. parapsilosis</i>	55 °C	20 seg	72 °C	15 seg
Paso 3 (1 ciclo)	72 °C	5 min		
	20°C	∞		

°C= grados Celsius

En la reacción de PCR fueron empleados cebadores específicos para cada especie, que amplifican los genes específicos de cada especie de *Candida*; los primers empleados se encuentran patentados por el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), por lo cual las secuencias utilizadas en este proyecto no se describen, cabe mencionar que estas patentes han sido desarrolladas por el equipo de investigadores adscritos al Laboratorio de Microbiología Molecular de dicho Instituto (Dra. ICN, Dr. APN). Los números de registro de las patentes son las siguientes: *C. albicans*: México: MX348351; *C. glabrata*: México: MX352246 B y Europa: EP2410052 B; *C. tropicalis*: México: MX355488; *C. parapsilosis*: México: MX348352. Por lo anterior en el presente trabajo nos reservamos el derecho de describir las secuencias completas utilizadas para la identificación de cada especie.

Posteriormente se realizó un análisis electroforético de los productos de la PCR de las especies de *Candida* visualizado las reacciones en un gel de agarosa al 1.5 % con 1 µg/ml de bromuro de etidio; para dicho análisis se prepara el amortiguador Tris/Acético/EDTA (TAE) 1X, el cual se vertió en la cámara electroforética (Gel XL Ultra V2 Labnet International, Inc., USA) conteniendo el gel de agarosa, cada pozo del gel de agarosa se cargó con 5 µl del producto de la PCR con ayuda de micropipeta, uno de los pozos se cargó con 5 µl del marcador de pares de bases pBR322 digerido con *HaeIII*.

A la cámara se le aplicó un voltaje de 100 V durante 25 min, los amplicones y los marcadores de pares de bases se visualizaron en un transiluminador (Dyna Light Dual Intensity UV Transiluminator Labnet International, Inc. USA). La documentación fotográfica de los geles se realizó con el sistema VersaDoc (Bio-RAD, EUA).

Síntesis, caracterización y esterilidad del híbrido de grafeno y clorina e6 (FGL-Ce6)

El híbrido a base de grafeno y clorina e6 fue elaborado con base en lo descrito por Acosta y cols., (2017). Esta síntesis involucra la exfoliación de grafeno usando como solvente agua. Todos los solventes y químicos se obtuvieron de proveedores comerciales, la clorina e6 (Ce6) y el grafito se adquirieron de Frontier Scientific Logan y Bay Carbon, Inc. (SP-1 graphite powder, lote N° 04100 para grafito y lot. N° 011705 para Ce6, www.baycarbon.com). La lámpara UV que se utilizó para la esterilización de los materiales es de la marca SPECTROLINE modelo Q-22S, UV-luz blanca, 115V, 60Hz.

La síntesis del híbrido se llevó a cabo pesando 1mg de grafito se colocó en un vial de vidrio, ambos fueron expuestos a luz UV por medio de una lámpara durante 45 minutos para su esterilización. Durante la esterilización se preparó una solución de clorina e6 en metanol a una concentración de 1mg/ml después, esta solución se filtró usando un filtro PTFE de 0.2 μm . Posteriormente, se mezclaron el grafito con 2 ml de la solución de clorina e6/metanol y 8 ml de agua destilada estéril, obteniendo una solución final de 10ml, la mezcla se realizó dentro de una campana con un flujo laminar de aire que evita la contaminación de la solución. La mezcla se sometió a ultrasonicación por 45 minutos para realizar la exfoliación de grafito, agregando de manera constante hielo al baño sónico para evitar que la mezcla se calentara. Después de la sonicación, la mezcla fue centrifugada a 500 rpm durante 90 minutos para eliminar el grafito que no haya sido exfoliado el sobrenadante se recuperó y filtró con una membrana de teflón de 0.2 μm colocada en un sistema de filtrado previamente esterilizado, posteriormente la membrana es lavada con agua estéril hasta que el remanente resultó transparente, durante este paso se elimina la clorina que no esté unida al grafeno. El material de interés queda sobre la membrana y se re suspendió en 10 ml de agua destilada estéril, la cual es agitada con ayuda de vórtex durante 10 minutos.

La caracterización de FLG-Ce6 se llevó a cabo por medio de espectroscopia UV-Vis, el equipo empleado para los espectros UV-Vis fue un espectrofotómetro UV-Visible Cary 60 empleando cubetas de cuarzo de 10 mm de longitud. Para cada una de las mediciones realizadas se restó la línea base, esto para restar el espectro obtenido del disolvente (Acosta y cols., 2017).

Para comprobar la esterilidad del nanohíbrido FLG-Ce6 se colocaron 50µl del híbrido en 5 ml de caldo YPD (extracto de levadura, peptona, dextrosa), la mezcla fue colocada en una incubadora con agitación a 115 rpm y a 37°, se observó el crecimiento a las 24 y 48 hrs. Adicionalmente se utilizaron controles de crecimiento, como control positivo se usó una inoculación de levadura en 5 ml de medio YPD y como control negativo se usa 5 ml de medio YPD fresco estéril.

Terapia Fotodinámica

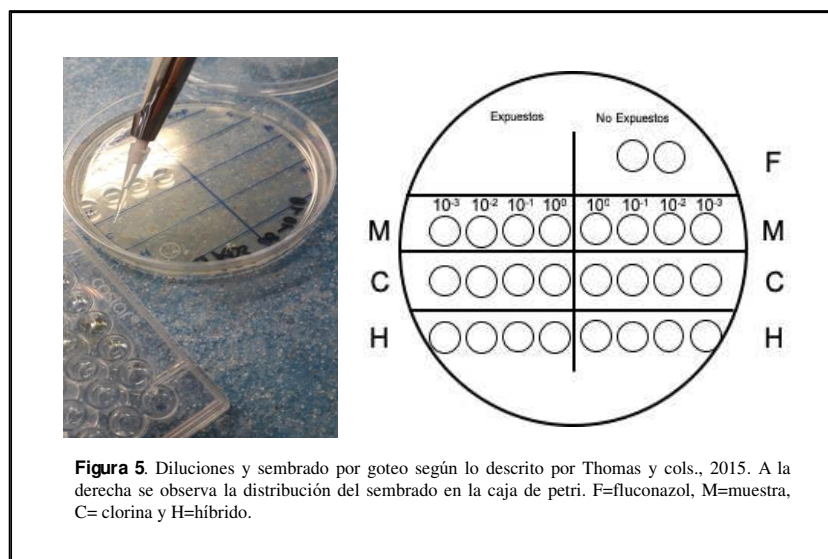
Se tomaron 1 a 2 colonias de cada aislamiento sembrado en ADS, se inocularon en un tubo Falcon con 15 ml de caldo YPD e incubaron 24 h a 37°C. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y dieron dos baños con PBS finalmente se agregaron 5 ml de PBS, se agitaron y realizaron diluciones 1:100 y 1:10 para realizar conteo celular utilizando la cámara de Neubauer (Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting, 2020) la concentración se ajustó a 1×10^5 para cada uno de los aislamientos.

Para la aplicación de la terapia fotodinámica se utilizaron microplacas de 96 pocillos estériles, se colocaron cuatro muestras por placa y los pocillos se aforaron a 200µl, distribuyéndose en el pocillo uno 100 µl de células (a una concentración de 1×10^5 cél/mm³) y 100 µl de fluconazol (a una concentración de 64µg de fluconazol). El pocillo dos se dejó vacío, en el pocillo tres se colocaron 100 µl de células (concentración de 1×10^5 cél/mm³) y 100 µl de PBS (control negativo), en el pocillo cuatro se colocaron 100 µl de células (concentración de 1×10^5 cél/mm³), 4.2 µl de Ce6 (a una concentración de 1mg/ml) y 95.8 µl

de PBS, en el pocillo cinco se colocaron 100 μl de células (concentración de 1×10^5 cél/ mm^3), 74 μl de Ce6 (a una concentración de 1mg/ml) y 26 μl de PBS. Las microplacas, se incubaron a 37° bajo completa oscuridad durante 20 minutos, trascurrido el tiempo, una placa no fue expuesta a la luz y la otra se expuso durante 45 min a luz LED. La lámpara constó de un conjunto de LEDs conectados en paralelo que emitían luz a una longitud de onda de 660 nm, ésta, fue una modificación (figura 4) de un dispositivo LED llamado Bio Table diseñado por el Instituto de Física de San Carlos (Universidad de Sao Paulo, Sao Carlos, SP, Brasil) (Dovigo y cols., 2009). La potencia de cada LED fue de 2.85 mW, éstos se colocaron a 10 cm de las placas, debido al espacio que hay entre los LEDs y la muestra, es difícil conocer la potencia entregada, la fluencia calculada de cada LED es de 7.9 J/ cm^2 . La fluencia se calculó mediante la siguiente fórmula: Fluencia (J/ cm^2) = Intensidad de la luz (W/ cm^2) x tiempo de exposición (segundos).

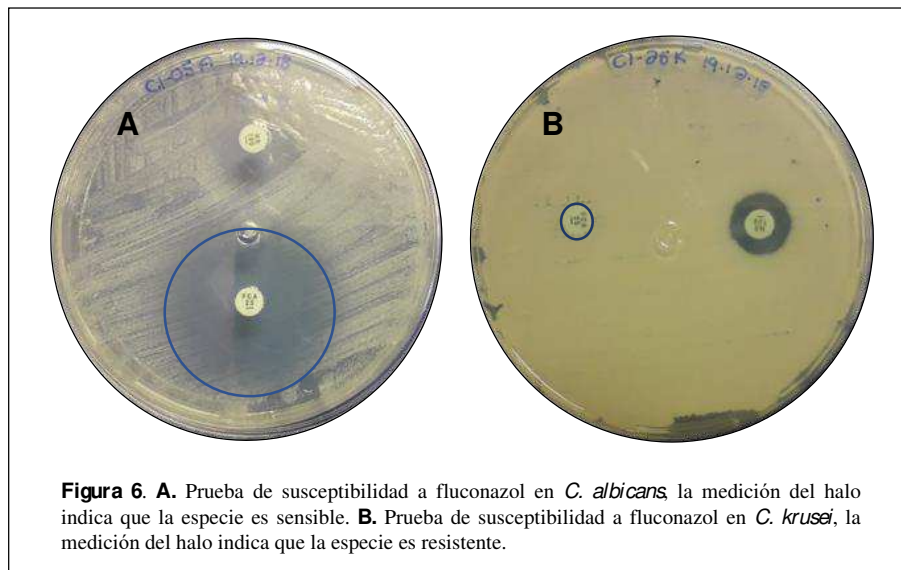


Transcurrido el tiempo de irradiación se sembró el contenido de los pocillos realizando diluciones seriadas de 10^0 , 10^1 , 10^2 y 10^3 de cada uno, se tomaron $10 \mu\text{l}$ de cada dilución y se colocó en una placa de ADS, las placas se incubaron a 37°C durante 24 h (Figura 5). La lectura se realizó manualmente a las 12 y 24 h post-incubación, en caso de no observar los límites entre una colonia y otra se utilizó el microscopio estereoscópico para visualizar mejor las colonias.



Resistencia antifúngica

Para determinar la susceptibilidad y resistencia antifúngica se usó el método de difusión en disco, se inoculó con un cultivo sin diluir (0.5 estándar McFarland) en agar Mueller-Hinton suplementado con glucosa al 2% y 0.5 µg/ml azul de metileno (M44-A del CLSI) descrito por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI [antes NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory standards, por sus siglas en inglés]). Se utilizaron discos de 9 mm con 25 µg de fluconazol para evaluar la susceptibilidad, las placas se incubaron a 37° C durante 24 h. Los diámetros de la zona de inhibición se determinaron midiendo el milímetro entero en un punto en el que había una reducción de crecimiento o ningún crecimiento visible. Se consideró sensible cuando la medición del halo resultara ≥ 19 mm y resistente cuando el halo fuera ≤ 14 mm (figura 6).



4.6 Variables

Dependientes: Efecto antifúngico de la terapia fotodinámica en el conteo de UFC para cada una de las especies de *Candida*.

Independientes: Demográficas (género, edad, fecha de nacimiento, escolaridad, lugar de residencia), antecedentes de la condición sistémica (fecha de diagnóstico, carga viral, conteo de linfocitos T CD4⁺, tiempo de uso de TARc), hábitos (consumo de alcohol y tabaco), variedad clínica de candidiasis y susceptibilidad a fluconazol.

4.7 Definición operacional de las variables

La definición y operacionalización de las variables se describen en el anexo 8

4.8 Análisis estadístico

Los datos de la ficha de recolección fueron capturados utilizando el software JMP versión 9.0. Se obtuvieron proporciones de las variables nominales, y se calcularon medidas de tendencia central (medias y medianas) y de dispersión (desviación estándar e intervalos intercuartiles) para las variables continuas.

El análisis entre el grupo control de tratamiento y el crecimiento de UFC por especie con los tratamientos de Ce6 y FGL-Ce6 de *Candida* spp. se realizó a través de la prueba de T de Student. Las pruebas de hipótesis se realizaron a un nivel de alfa ≤ 0.05 .

4.9 Consideraciones bioéticas

A todos los participantes incluidos en este estudio se les explicó el objetivo del protocolo y los procedimientos a realizar confirmando que eran no invasivos y que, en caso de aceptar su inclusión, se les solicitó la firma de un consentimiento informado, señalando que sus datos demográficos, clínicos, citológicos y microbiológicos serían usados con fines de investigación. Se les aseguró que estos datos son estrictamente confidenciales y nunca se identificará su persona. En aquellos casos en los que se negaran a participar no habría repercusiones sobre su tratamiento estomatológico y consulta clínica. El presente estudio se clasificó dentro del rubro de investigación sin riesgo en el que no se realiza ninguna intervención invasiva en los individuos que participan en éste de acuerdo al artículo 17 del reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Las fichas de recolección de datos y las muestras (citológicas) incluidas se encuentran bajo resguardo del Laboratorio de Patología y Medicina bucal de la UAM-Xochimilco, los aislados microbiológicos se encuentran resguardados en el Laboratorio de Biología Molecular de la UAM-Xochimilco.

5. RESULTADOS

En el presente estudio se incluyó un total de 36 aislamientos orales provenientes de 24 individuos con VIH/SIDA, 14 (58.3%) provenientes de la Clínica Especializada Condesa-Iztapalapa y 10 (41.6%) de la Clínica Especializada Condesa. La mayor parte (96%) eran del sexo masculino, con una mediana de edad de 33 años (Q_1 - Q_3 = 27-40). Dos terceras partes (67%) se encontraban en el estadio avanzado de la infección por VIH/SIDA. El 50% (n=12) de los sujetos recibían terapia antirretroviral combinada (TARc). De los individuos incluidos, 18 (75%) fumaban y 62.5% (n=15) mencionaron ingerir alcohol al interrogatorio (Cuadro 4).

La variedad clínica de candidiasis oral más frecuente fue la eritematosa con 15 casos (62.5%), 4 casos (16.6%) pseudomembranosa y los 5 restantes fueron combinaciones de candidiasis pseudomembranosa, eritematosa, crónica hiperplásica y queilitis angular. La localización más frecuente fue el paladar (53.8%). En cuanto a la citología exfoliativa en 18 casos (75%) resultó positiva y en 6 (25%) fue negativa. Para la identificación de especies, se realizó una identificación presuntiva mediante cultivos cromogénicos y se confirmó mediante pruebas moleculares.

En la identificación con CHROMAgar *Candida*®, en 10 (41.6%) de los 24 sujetos incluidos en el estudio se identificaron dos o tres especies, resultando 36 aislamientos en total. De éstos, *Candida albicans* fue la especie más frecuente con 17 (47.2%) aislamientos, seguida de *C. glabrata* 13 (36.1%), *C. krusei* 5 (13.8%), *C. tropicalis* 1 (2.7%) y 2 (5.5%) especies diferentes. De acuerdo a la identificación molecular, se identificaron 15 (41.62%) *C. albicans*, 8 (25%) *C. glabrata*, 4 (10.5%) *C. krusei*, 1 (2.7%) *C. tropicalis*, 1 (2.7%) *C.*

parapsilosis y 7 (19.4%) resultaron ser de otra especie. Para la fase experimental se usó la identificación molecular de las especies de *Candida*.

La susceptibilidad o resistencia a fluconazol, se identificó de acuerdo con el punto de corte establecido por el CLSI (medición del halo en mm susceptible ≥ 19 , resistente o sin halo ≤ 14), de acuerdo a lo anterior 14 (38.8%) aislamientos resultaron sensibles a fluconazol y 22 (61.1%) resistentes. Los detalles de las especies sensibles y resistentes a fluconazol se muestran en el anexo 9.

En el tratamiento con la terapia fotodinámica, los grupos sin exposición a la luz (LED 660nm) tratados únicamente con el fotosensibilizador (Ce6 y FGL-Ce6) se comportaron de manera similar al control, es decir, no hubo reducción en el conteo de UFC de *Candida* por especie (Ce6 $p= 0.742$ y FGL-Ce6 $p=0.956$, respectivamente) (Cuadro 5).

Los grupos de tratamiento expuestos a la luz (LED 660nm) mostraron una reducción estadísticamente significativa de acuerdo al análisis realizado mediante la prueba de T. Al comparar el conteo de UFC de *Candida* spp. tanto en el grupo tratado con Ce6 ($p=0.014$) como en el grupo tratado con FGL-Ce6 ($p=0.004$) (Cuadro 6), la reducción observada fue de 0.9% para Ce6 y 11.5% para el híbrido FGL-Ce6 con respecto al grupo control.

En el análisis por especie, *Candida albicans* mostró reducción en el conteo de UFC de 11.25% en el tratamiento con Ce6 ($p= 0.0027$) y del 10% con tratamiento con FGL-Ce6 ($p=0.008$), al ser comparados con el grupo control (Figura 7), no se observó una diferencia

estadísticamente significativa al comparar otras especies en los diferentes grupos de tratamiento vs el control (Figura 8) (Cuadro 6).

Al realizar el análisis de los grupos sensibles y resistentes a fluconazol expuestos a la terapia fotodinámica, se observó reducción en el conteo de UFC en los aislamientos sensibles tratados con FGL-Ce6 ($p=0.024$) y en los aislamientos resistentes tratados con Ce6 ($p=0.008$) (Cuadro 7).

Cuadro 4. Características demográficas de 24 sujetos con VIH/SIDA con candidiasis bucal.

Características	n=24	(%)
Sexo		
Femenino	1	(4.0)
Masculino	23	(96.0)
Mediana de edad (años) (Q₁- Q₃)	33	(27-40)
Categoría de transmisión		
Heterosexual	4	(16.6)
HSH	20	(83.3)
Estadio clínico (CDC)		
No SIDA	8	(33.3)
SIDA	16	(66.6)
Mediana de CD4⁺ (Q₁- Q₃) cél/mm³	195	(57 - 300)
Distribución		
≤ 200 células/mm ³	13	(54.1)
> 200 células/mm ³	11	(45.8)
Mediana de CV (Q₁- Q₃) copias/ml	72,268	(19,436 – 201,676)
Distribución		
CV indetectable	4	(16.6)
< de 10,000 copias ARN/ml	3	(12.5)
≥ de 10,000 copias ARN/ml	17	(70.8)
Uso de TARc		
Si	12	(50.0)
No	12	(50.0)
Mediana de uso de TARc (Q₁- Q₃) días (n=12)	1,104	(435 – 1,832)
Distribución (n=12)		
30–365 días	1	(8.3)
> 365 días	11	(91.6)
Consumo de tabaco	18	(75.0)
Consumo de alcohol	15	(62.5)

HSH= hombre que tiene sexo con hombre CDC= Centers for Disease Control and Prevention, SIDA=síndrome de inmunodeficiencia adquirida, CV= carga viral, TARc= terapia antirretroviral combinada, ARN=ácido ribonucleico, ml=mililitro, mm³=milímetro cúbico

Cuadro 5. Grupos de tratamiento de la terapia fotodinámica sin exposición a la luz LED (660 nm).

	Control L ⁻ (n=36)			Ce6 L ⁻ (n=36)			D	p*	UFC log ₁₀
	N	UFC log ₁₀	IC 95%	UFC log ₁₀	IC 95%				
<i>Candida spp.</i>	36	5.87	(5.61-6.14)	5.93	(5.67-6.20)	0.0619	0.742	5.86	
Especie de <i>Candida</i>									
<i>C. albicans</i>	15	5.60	(5.33-5.87)	5.65	(5.38-5.92)	0.0446	0.814	5.59	
<i>C. glabrata</i>	8	6.67	(5.79-7.54)	6.72	(5.85-7.60)	0.0550	0.927	6.64	
<i>C. krusei</i>	4	5.78	(5.32-6.23)	5.91	(5.45-6.36)	0.1325	0.651	5.79	
Sin identificar (<i>spp.</i>)	7	5.65	(5.25-6.05)	5.70	(5.30-6.09)	0.0457	0.866	5.71	
<i>C. tropicalis</i> / <i>C. parapsilosis</i>	2	4.41	--	5.48	--	--	--	4.84	

L⁻=Control sin exposición a la luz; Ce6 L⁻= Clorina e6 sin exposición a la luz; FGL-Ce6 L⁻= Híbrido clorina e6-grafeno sin exposición a la luz, UFC= Unidades Formadoras Colonias
 IC 95%= Intervalo de confianza al 95%, D= Diferencia, p= valor de p
 El valor de p en los grupos de Ce6 y FGL-Ce6 corresponde a la comparación de los grupos de tratamiento contra el grupo control
 * Prueba de T

Cuadro 6. Grupos de tratamiento de la terapia fotodinámica con exposición a la luz LED (660 nm).

	Control L ⁻ (n=36)			Ce6 L ⁺ (n=36)			D	p	UFC log ₁₀
	N	UFC log ₁₀	IC 95%	UFC log ₁₀	IC 95%				
<i>Candida spp.</i>	36	5.87	(5.54-6.20)	5.29	(4.96-5.62)	0.5872	0.014 ^{a*}	5.19	
Especie de <i>Candida</i>									
<i>C. albicans</i>	15	5.60	(5.35-5.86)	4.97	(4.71-5.22)	0.6386	0.002 ^{a*}	5.04	
<i>C. glabrata</i>	8	6.67	(5.90-7.44)	6.26	(5.49-7.02)	0.4112	0.714	6.17	
<i>C. krusei</i>	4	5.78	(5.27-6.28)	5.58	(5.08-6.08)	0.1975	0.807	5.51	
Sin identificar (<i>spp.</i>)	7	5.45	(4.52-6.78)	5.64	(3.51-5.76)	1.012	0.394	4.28	
<i>C. tropicalis / C. parapsilosis</i>	2	4.41	--	5.48	--	--	--	4.84	

L⁻=Control sin exposición a la luz; Ce6 L⁺= Clorina e6 con exposición a la luz; FGL-Ce6 L⁺= Híbrido clorina e6-grafeno con exposición a la luz, UFC= Unidades Formadoras

IC 95%= Intervalo de confianza al 95%, DC= Diferencia de cuadrados, p= valor de p

^a Comparación entre el grupo control vs tratamiento con Ce6, ^b Comparación entre el grupo control vs tratamiento con FGL-Ce6

* Prueba de T

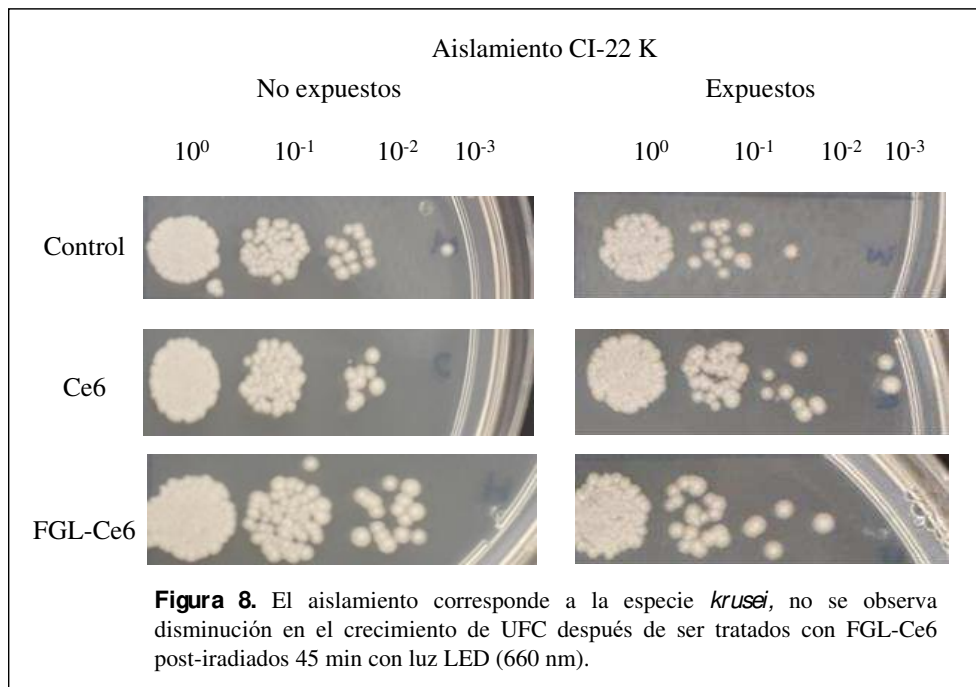
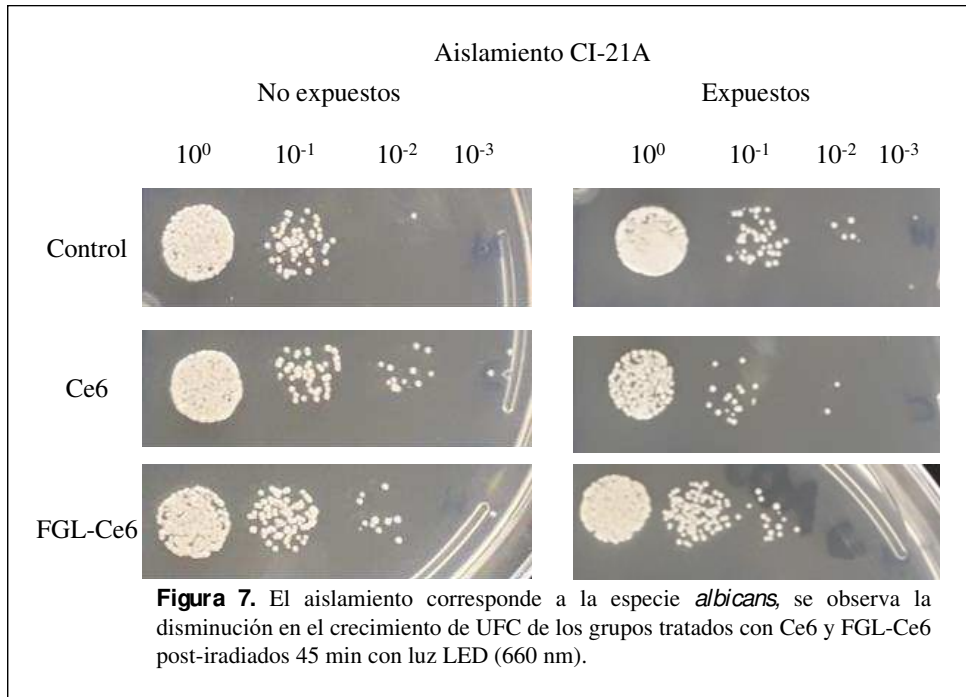
Cuadro 7. Conteo de UFC's por aislamientos sensibles y resistentes a fluconazol de *Candida* spp. tratadas con terap

	Control L ⁻			Ce6 L ⁺			D	p	UFC log ₁₀
	n	UFC log ₁₀	IC 95%	UFC log ₁₀	IC 95%				
Sensibles	14	5.72	(5.21-6.21)	5.37	(4.78-5.96)	0.3442	0.4177	4.73	
Resistentes	22	5.98	(5.63-6.32)	5.23	(4.72-5.74)	0.7418	0.0082*	5.48	

L⁻=Control sin exposición a la luz; Ce6 L⁺= Clorina e6 con exposición a la luz; FGL-Ce6 L⁺= Híbrido clorina e6-grafeno con exposición a la luz.

^a Comparación entre el grupo control vs tratamiento con Ce6, ^b Comparación entre el grupo control vs tratamiento con FGL-Ce6

* Prueba de T



6. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio mostraron un efecto antifúngico al ser tratados con terapia fotodinámica utilizando clorina e6 ($p=0.014$) y el híbrido clorina-grafeno ($p=0.004$) sobre aislamientos de *Candida* spp. obtenidos de la mucosa bucal de 24 pacientes con VIH/SIDA, al compararse con el grupo control.

En México, en el 2019 el Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y SIDA reportó que más del 80% de los sujetos con VIH/SIDA son hombres entre 30 y 34 años, información que coincide con lo observado en este estudio (Reporte CENSIDA, 3^{er} trimestre 2019). Una alta proporción (66.6%) se encontraba con criterios de SIDA y la mitad de los individuos estaban bajo terapia antirretroviral combinada (TARc), lo que coincide a lo reportado por CENSIDA que informa que en México alrededor del 64% de las personas con VIH/SIDA reciben tratamiento antirretroviral (CENSIDA, diciembre 2019).

La candidiasis eritematosa (62.5%) fue la variedad más frecuente en los 24 individuos incluidos y la segunda fue la pseudomembranosa (16.6%), información que contrasta con estudios que reportan a la variedad pseudomembranosa como la más frecuente seguida de la forma eritematosa (Kirti y cols., 2019; Mushi y cols., 2017; Berberi y cols., 2015; dos Santos Abrantes 2014; Lin y cols., 2013; Santa Anna y cols., 2006). Diversas investigaciones han demostrado que la candidiasis pseudomembranosa se presenta en individuos con mayor deterioro inmunológico y cuentas de $CD4^+$ por debajo de 200 células/ mm^3 , en este estudio, un poco más de la mitad tenía un conteo por debajo de esta cifra, por lo que posiblemente se observó una combinación de variedades, lo que confirma que la candidiasis se presenta en

individuos que tienen cuentas menores de 500 células/mm³ CD4⁺ y que es un indicador de la progresión de la infección viral o de posible falla al tratamiento (Kirti y cols., 2019).

En cuanto a las especies identificadas, *Candida albicans* (41.6%) y *Candida glabrata* (25%) fueron las más frecuentes lo que coincide con la mayoría de los estudios en sujetos con VIH/SIDA, quienes reportan frecuencias de *C. albicans* del 69.4% (Pour y cols., 2018) a 82.8% (dos Santos Abrantes y cols., 2014) y para *C. glabrata* del 9.4% (dos Santos Abrantes y cols., 2014) a 23.46% (Pour y cols., 2018; Mushi y cols., 2016; de Paula y cols., 2015). A este respecto, se ha sugerido que la variedad de especies no-*albicans* en estos individuos se debe a diferentes factores, como la disminución de CD4⁺, no haber iniciado TARc, edad mayor a 50 años y áreas geográficas, en especial en aquellas donde la prevalencia de la infección VIH/SIDA es alta (Kirti y cols., 2018; Mushi y cols., 2017; Mushi y cols., 2016; Thanyasrisung y cols., 2016; dos Santos Abrantes y cols., 2014; Chattopadhyay y cols., 2013; Lin y cols., 2013). Sin embargo, se ha reportado asociación de alta carga viral y presencia de especies no-*albicans* en la cavidad oral (Clark-Ordoñez, 2017), lo que se confirma en el presente trabajo, donde el 58.3% de las especies eran no-*albicans* y el 17 (70.8%) de los individuos con VIH/SIDA tenían cargas virales mayores a 100 00 copias ARN/ml a pesar de estar bajo TARc. Otros, reportan a *C. tropicalis* como la segunda especie más frecuente aislada de la mucosa bucal de pacientes con VIH/SIDA (Paul y cols., 2019; Tercas y cols., 2017; Clark-Ordóñez y cols., 2017; Mushi y cols., 2016, Berberi y cols., 2015, Lin y cols., 2013) y/o *C. dubliniensis* (Khendri y cols., 2017). En otras poblaciones de individuos con compromiso sistémico como diabéticos y con enfermedad renal crónica con hemodiálisis se han observado valores más altos para *C. albicans* (82%), y menores para *C. glabrata* (12%)

(de la Rosa y cols., 2020; Pieralisi y cols., 2015; Jamil y cols., 2013; López-Pintor y cols., 2013; Thorman y cols., 2009).

En la identificación microbiológica y molecular de las especies se encontró una diferencia (2 *C. albicans*, 5 *C. glabrata*, 1 *C. krusei*), ésta podría explicarse en parte, a que algunos aislamientos atípicos no pudieron ser clasificados plenamente por un color y textura característica en CHROMAgar *Candida*®, en el estudio molecular fueron identificados como otra especie (Neppelenbroek y cols., 2013; Estrada Barraza y cols., 2011). CHROMAgar *Candida*® ha mostrado ser excelente para la identificación de *C. albicans* (sensibilidad 97%, especificidad 97.9%) (Daef y cols., 2014; Estrada-Barraza y cols., 2011; Cárdenes y cols., 2004; Williams y cols., 2000), si bien, los métodos cromogénicos tienen la ventaja de una identificación rápida de las especies de *Candida*, se recomienda practicar pruebas fenotípicas adicionales (fermentación de carbohidratos, formación de tubo germinativo) para la confirmación de las especies (Estrada-Barraza y cols., 2011; Pemán y cols., 2001). La prueba molecular no puede señalar si se trata de una infección o colonización, el diagnóstico de candidiasis debe ser sustentado por evidencia clínica, cultivo positivo, histología u otras pruebas diagnósticas (Ahmad y cols., 2010; Daef y cols., 2014).

Se observó sensibilidad a fluconazol en 14 (38.8%) aislamientos y resistencia en los 22 (61.1%) restantes, la mitad de los aislamientos resistentes correspondía a especies *Candida* no-*albicans*, lo que puede explicarse por la presencia de especies como *C. glabrata* y *C. krusei*, que son intrínsecamente no susceptibles a fluconazol (Paul y cols., 2019; Goulart y cols., 2018; Vidya y cols., 2016; Abrantes y cols., 2014; Lin y cols., 2013). A este respecto, estudios en pacientes con VIH/SIDA, han reportado una resistencia a fluconazol similar

(63.3%), en donde el 71.7% eran especies no-*albicans* (*C. glabrata* y *C. tropicalis*) (Paul y cols., 2019). Adicionalmente, dos Santos Abrantes (2014), en un estudio realizado en Sudáfrica y Camerún reportó que el 50% de *Candida albicans* fueron resistentes. También se han reportado frecuencias más bajas de 1% (Goulart y cols., 2018), 9% (Enwuru y cols., 2008), 12.2% (Moges y cols., 2016) y 18% (Tercas y cols., 2017; de Paula y cols., 2015). La resistencia a azoles se ha asociado al uso profiláctico a largo plazo de fluconazol, episodios previos de candidiasis, al estado inmunológico ($<CD4^+$), la presencia de co-morbilidades y mayor prevalencia de *Candida* no-*albicans* (Paul y col., 2019; Goulart y cols., 2018; Khendri y cols., 2017; Enwuru y cols., 2008) y se ha demostrado que la resistencia a un fármaco antifúngico específico da como resultado una resistencia cruzada con otros fármacos de la misma clase (dos Santos Abrantes, 2014; Muller y cols., 2000).

Se observó la reducción de UFC en los aislamientos tratados con Ce6 ($p=0.0027$) e híbrido FGL-Ce6 ($p=0.0089$) de *Candida albicans* mediante la TFD. Bacellar (2015) reportó que la clorina e6 usada como fotosensibilizador actúa sobre los lisosomas produciendo daño severo y muerte celular dependiendo de la dosis de la terapia, dosis altas de ésta inducen la degradación completa del organelo y liberan altas concentraciones de enzimas lisosomales (catepsinas B, D, L, hidrolasas) en el citoplasma, lo que genera necrosis no regulada y muerte celular (Bacellar y cols., 2015; Dantas y cols., 2015). La TFD utilizando clorina con grafeno tiene afinidad por la membrana celular de células tumorales, su ingreso al citoplasma ocasiona gran actividad metabólica, daño en la membrana, incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno y tiene un efecto tóxico bajo en las células normales (Zuchowska y cols., 2017, Hosseinzadeh y cols., 2017; Bacellar y cols., 2015). Lo anterior se demostró en este trabajo con la reducción de UFC en los aislamientos clínicos.

En cuanto a las especies *Candida no-albicans* tratadas con Ce6 L⁺ e híbrido FGL-Ce6 L⁺, no se observó reducción en el conteo de UFC. En contraste, se ha reportado una reducción significativa del 76.0% de *C. tropicalis* y 76.9% *C. glabrata* dependiendo de la concentración del fotosensibilizador y del tiempo de exposición (Carvalho y cols., 2017; Mushi y cols., 2016; Rosseti y cols., 2014 y Dovigo y cols., 2013).

En la terapia fotodinámica se identificó una reducción en el conteo de UFC en los aislamientos sensibles tratados con 1 µg/ml de FGL-Ce6 (p=0.0244) y resistentes a fluconazol tratados con 1 µg/ml de Ce6 (p=0.0082) con una fluencia de 7.69 J/cm². A pesar de observar el efecto antimicrobiano de manera clara en los grupos tratados, la reducción en el número de UFC entre grupos tratados y no tratados no rebasó un Log₁₀. A este respecto, se han mostrado resultados satisfactorios en aislamientos sensibles y resistentes a fluconazol, al ser tratados con concentraciones de fotosensibilizador de 25 mg/ml y 100 mg/ml con fluencias de 37.5 J/cm² (Alves y cols., 2017; Ferreira y cols., 2016; Dovigo y cols., 2009) *C. albicans* tuvo mejor respuesta que *C. glabrata* con menos dosis de FS y menor fluencia (Dovigo y cols., 2009). No obstante, Dovigo (2011) señaló que los efectos de la terapia dependen de la especie tratada y que los aislamientos resistentes son menos susceptibles posiblemente debido a mutaciones puntuales y a la sobreexpresión del gen Erg11, alterando la fluidez de los lípidos de la membrana e impidiendo la difusión del fotosensibilizador (Dovigo y cols., 2011). Mang (2010), reportó disminución de UFC dependiente de la fluencia al tratar cepas ATCC de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* con 25 µg/ml a fluencias de 45, 90 y 135 J/cm², todas las cepas resistentes o sensibles examinadas mostraron susceptibilidad significativa al efecto de la TFD (Mang y cols., 2010). En este estudio, es

probable que la baja concentración del fotosensibilizador y la baja fluencia empleadas, comparada con la de otros estudios, sea la causa de que los resultados en especies no-*albicans* no fueran significativos, por lo tanto, se sugiere que en futuros trabajos se incremente la dosis de FS y fluencia. Estudios realizados en especies de *Candida* resistentes a azoles no se observó disminución en la susceptibilidad a la terapia a pesar de la exposición repetida (Ferreira y cols., 2016; Vera y cols., 2012) demostrando que la TFD es capaz de erradicar microorganismos sin producir aislados resistentes y que por su naturaleza no selectiva y falta de dianas moleculares específicas para los ROS producidos hace poco probable que se desarrolle una vía de resistencia específica (Vera y cols., 2012).

Entre las limitaciones identificadas en el presente estudio experimental, se encuentran la falta de réplicas de los experimentos a diferentes y mayores concentraciones de FS, tiempos de irradiación y potencia y comparar los resultados para corroborar la hipótesis, sin embargo, se obtuvieron resultados significativos y favorables.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este estudio es uno de los pocos realizados en aislamientos clínicos obtenidos de la mucosa bucal de pacientes con VIH/SIDA. Su realización permitió demostrar que Ce6 ($p=0.0027$) y el híbrido FGL-Ce6 ($p=0.0089$) activados mediante terapia fotodinámica tienen un efecto antifúngico, especialmente en *C. albicans*, con una reducción $<1 \log_{10}$ con respecto al grupo control, por lo que se puede considerar como una alternativa terapéutica en individuos con VIH/SIDA ya que a pesar de la utilización de TARc, la candidiasis bucal continúa siendo la infección más frecuente en estos individuos.

En este estudio *Candida albicans* fue la especie con mayor prevalencia como agente etiológico de candidiasis, seguida de *C. glabrata*, lo que es de especial interés ya que esta especie suele tener resistencia intrínseca a los compuestos azólicos lo que hace necesario otras alternativas terapéuticas como la terapia fotodinámica.

Los resultados del presente estudio sirven de base de nuevos estudios con un mayor número de aislamientos clínicos de pacientes colonizados e infectados con *Candida* spp., con mayor potencia de fotoactivación y con nuevos objetivos como evaluar el posible sinergismo de la TFD con los compuestos azólicos existentes y evaluar el efecto directo en la disminución de factores de virulencia a través de la aplicación de la TFD. Se requieren realizar más investigaciones en diferentes grupos vulnerables a infecciones orales oportunistas por *Candida* spp. para confirmar el efecto antifúngico de la terapia fotodinámica.

8. REFERENCIAS

- Abrantes, PMDS, McArthur, CP, Africa, CWJ. Multi-drug resistant (MDR) oral *Candida* species isolated from HIV-positive patients in South Africa and Cameroon. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79: 222-227.
- Aguirre JM. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 17-21.
- Al-Ahmad A, Walankiewicz A, Hellwig E, Follo M, Tennert C, Wittmer A y cols. Photoinactivation using visible light plus water-filtered infrared-A (vis+wIRA) and chlorine e6 (Ce6) eradicates planktonic periodontal pathogens and subgingival biofilms. *Front in Microbiol* 2016; 7: 1900.
- Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Semi nested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2483-2489.
- Alastruey-Izquierdo AA, Mielhem MSC, Bonfietti LX, Rodríguez- Tudela JL. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Rev Inst Med Trop* 2015; 57: 57-64.
- Albuquerque C, Tapia CV. Interacción de *Candida albicans*-hospedero: un proceso complejo en el que la inmunidad innata juega un importante papel. *Biol Micol* 2013; 28: 37-47.
- Alves E, Faustino MAF, Neves M, Cunha A, Tome J, Almeida A. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Med Chem* 2014; 6: 141-164.
- Alves F, Alonso GC, Carmello JC, Mima EGO, Bagnato V, Pavarina AC. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by photodithazine in the treatment of denture stomatitis. A case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018; 21: 168-171.
- Alves F, Carmello JC, Mima EGO, Costa CA, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodithazine mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole- resistant *Candida albicans* *in vivo*. *Med Micol* 2019; 5: 609-617.
- Alves F, Mima EG, Passador RCP, Bagnato VS, Jorge JH, Pavarina AC. Virulence factors of fluconazol-suceptible an fluconazol-resistant *Candida albicans* after antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2017; 32: 815-826.
- Alves F, Mima EG, Dovigo LN, Bagnato VS, Jorge JH, Costa CA, Pavarina AC. The influence of photodynamic therapy parameters on the inactivation of *Candida* spp: *in vitro* and *in vivo* studies. *Lasers Phys* 2014; 24: 045601.
- Allison RR, Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT Mechanism. *Clin Endosc* 2013; 46: 24-29.
- Anibal PC, Orlandi-Sardi J de C, Alves-Peixoto IT, de Carvalho-Moraes JJ, Höfling JF. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Braz J Microbiol* 2010; 41: 824-31.
- Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol* 2007; 45: 569-587.

- Araujo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi MEM. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci* 2014; 29: 629-635.
- Bacellar IO, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *Int. J Mo Sci* 2015; 16: 20523-20559.
- Baltazar LM, Ray A, Santos DA, Cisalpino PS, Friedman AJ, Nosanchuk. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Front in Microbiol* 2015; 6: 202.
- Baptista A, Sabino CP, Núñez SC, Miyakawa W, Martin AA, Ribeiro MS. Photodynamic damage predominates on different targets depending of cell phase of *Candida albicans*. *J Photochem Photobiol B* 2017; 177: 76-84.
- Brand A, Shanks S, Duncan VM, Yang M, Mackenzie K, Gow NA. Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism. *Curr Biol* 2007; 17:347-52.
- Berberi A, Noujeim Z, Aoun G. Epidemiology of oropharyngeal candidiasis in Human-Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome patients and CD4⁺ counts. *J Int Oral Health* 2015; 7: 20-23.
- Berkow EL, Lockhart SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect Drug Resist* 2017; 10: 237-245.
- Calzavara-Pinton P, Rossi MT, Sala R, Venturini M. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochem Photobiol* 2012; 88: 512-522.
- Carmello JC, Alves F, Basso FG, Costa CAS, Bagnato VS, Mima EGO y cols. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine®. Mediated photodynamic therapy *in Vivo*. *PLOS One* 2016; 11: e0156947.
- Carvalho ML, Pinto AP, Raniero LJ, Costa MS. Biofilm formation by *Candida albicans* is inhibited by photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), using chlorine e6: increase in both ROS production and membrane permeability. *Lasers Med Sci* 2017; 33: 647-653.
- Carvalho A, de Oliveiras SC, Martins ML, Pina-Vaz C, Rodrigues GA, Ludovico P y cols. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida species*. *Med Mycol* 2007; 45: 619-627.
- Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, Hamblin MR, Rastelli ANS. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a clinical review. *Laser Phys* 2016; 26: 123001.
- Collins CD, Cookinham S, Smith J. Management of oropharyngeal candidiasis with localized oral miconazole therapy: efficacy, safety and patient acceptability. *Patient Prefer Adherence* 2011; 5: 369-374.
- Comisión Nacional contra las Adicciones (CONADICT 2016-2017) Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco, ENCODAT 2016-2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud%7Cconadic/acciones-y-programas/encuesta-nacional-de->

[consumo-de-drogas-alcohol-y-tabaco-encodat-2016-2017-136758](#). Consultado el día 25 de mayo de 2019.

- Conti HR, Whibley N, Coleman BM, Garg AV, Jaycox JR, Gaffen SL. Signaling through IL-17C/IL-17RE is dispensable for Immunity to systemic, oral and cutaneous candidiasis. PLoS ONE 2015; 10(4): e0122807.
- Coronado-Castellote L, Jiménez Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. J Clin Exp Dent 2013; 5: 279-86.
- Costa CR, Lemus JA, Passos XS, AraujoCR, Cohen AJ y cols. Species distribution and antifungal susceptibility profile by oral *Candida* isolates from HIV-infected patients in the antiretroviral therapy era. Micopatología 2006; 162: 5-50.
- Cieplik F, Tabenski L, Buchala W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. Front in Microbiol 2014; 5: 1-17.
- Copley L van der Watt P, Wirtz KW, Parker MI, Leaner VD. Photolon TM, a chlorin e6 derivate, triggers ROS production and light-dependent cell death via necrosis. Int J Biochem Cell Biol 2008; 40: 227-235.
- Chattopadhyay A, Patton LL. Smoking as a risk factor for oral candidiasis in HIV-infected adults. J Oral Phatol Med 2013; 42: 302-308.
- Clark-Ordóñez I, Callejas-Negrete OA, Aréchiga-Carvajal ET, Mouriño-Pérez RR. *Candida* species diversity and antifungal susceptibility pattern in oral samples of IHV/AIDS patients in Baja California, México. Med Micol 2017; 55: 285-294.
- Dai T, Fuchs BB, Coleman JJ, Prates Ra, Astrakas C, Denis TG, y cols. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. Front in Microbiol 2012; 3: 120.
- Dantas SA, Day A, Ikeh M, Kos I, Achan B, Quinn J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. Biomolecules 2015; 5: 142-165.
- Daef E, Moharram A, Eldin SS, Elsherbiny N, Mohammed M. Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. Braz J Microbiol 2014; 45: 255-262.
- Demidova TN, Hambin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. Antimicrob Agents Chemother 2005; 40: 2329-2335.
- da Silva NR, Ribeiro DG, Issa JP, Bonfá K, Menezes MS, Oliveira V, de Souza R. Preclinical study of cost-effective photodynamic therapy for treating oral candidoses, Lasers Med Sci 2017; 32: 1253-1260.
- De la Rosa-García E, Miramontes-Zapata M, Bustos J, Mondragón-Padilla A. Especies de *Candida* en candidosis bucal en pacientes diabeticos con y sin insuficiencia renal crónica. Revista ADM 2013; 70: 302-308.
- De la Rosa García E, Olalde-Hernández MJ, Irigoyen-Camacho ME, Mondragón-Padilla A, Mendoza-Juache A, Sánchez-Vargas LO. Antifungal susceptibility of oral isolates of *Candida* species from chronic kidney disease patients on chronic dialysis, J Micol Med; 2020.

- Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 1978; 38: 2628-2635.
- Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. *Biofouling*. 2013; 29: 1057-67.
- Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG; Adriano CS, Bagnato VS. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by Photogem®. *Braz J Microbiol* 2011; 41: 42-49.
- Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses* 2009; 54: 123-130.
- Estrada-Barraza D, Martínez AO, Padilla LF, Mendoza de Elias R, Sánchez-Vargas LO. Comparación entre métodos convencionales. CHROMAgar *Candida* ® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol* 2011; 28: 36-42.
- Enwuru CA, Ogunledon A, Idika N, Enwuru NY, Ogbonna F y cols. Fluconazole resistant opportunistic oropharyngeal *candida* and non-*candida* yeast like isolates from HIV infected patients attending ARV clinics in Lagos Nigeria. *Afr Health Sci* 2008; 8: 142-148.
- Favre-Godal Q, Dorsaz S, Ferreira E, Conan C, Marcourt L, Eko BP y cols. Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of *in vivo* activity with the *Galleria mellonella* model. *Phytochem* 2014; 105: 68-78.
- Ferreira LR, Sousa AS, Alvarenga LH, Deana AM, de Santi MEO, Kato IT y cols. Antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* pre-treated by fluconazol delayed yeast inactivation. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2016; 15: 25-27.
- Freire F, Costa ACBP, Pereira CA, Junior MB, Junqueira JC, Jorge AOC. Comparison of the effect of rose bengal-and eosinY- mediated photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*. *Lasers Med Sci* 2014; 29: 949-955.
- Fidel PL. *Candida*-host interactions in HIV disease: implications for oropharyngeal candidiasis. *Adv dent Res* 2011; 23: 45-49.
- Fontana CR, Lerman MA, Patel N, Grecco C, Costa CAS, Amiji MM y cols. Safety assessment of oral photodynamic therapy in rats. *Lasers Med Sci* 2013; 28: 479-486.
- Ford CB, Font JM, Abbey D, Issi L Guducci C, Martínez DA y cols. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *eLife* 2015; 4: e00662.
- García-Cuesta C, Sarrion-Pérez M, Bagán JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *J Clin Exp Dent* 2014; 6: e576-82.

- Gamaletsou MN, Walsh TJ, Sipsas NV. Invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: emergence of resistant pathogens and new antifungal therapies. *Turk J Haematol.* 2018; 35:1–11.
- Goldman GH, Ferreira MES, Marque ER, Savoldi M, Perlin D, Park S y cols. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50: 25-32.
- Gonzales FP, Feigenträger A, Báumier W, Maisch T. Fungicidal photodynamic effect of a two fold positively charged porphyrin against *Candida albicans* planktonic cells and biofilms. *Future Microbiol* 2013; 8: 785-797.
- Goulart LS, Werika WRS, Vieira CA, de Lima JS, de Olinda RA, Araújo C. Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients: Association and antifungal susceptibility study. *Einstein* 2018; 16: eAO4224.
- Global HIV & AIDS statistics — 2019 fact sheet. (2019). Recuperado 20 de agosto de 2020, de UNAIDS website: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
- Grayhill JR, Montalbo E, Kirkpatrick WR, Luther MF, Revankar SG, Patterson TF. Fluconazole versus *Candida albicans*: A complex relationship. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 2938-2942.
- Hernández-Santos N, Huppler AR, Peterson AC, Khader SA, McKenna KC, Geffen S. Th17 cells counter long term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. *Mucosal Immunol* 2013; 6: 900-910.
- Hirakawa MP, Martínez DA, Sakthikumar S, Anderson MZ, Berlin A, Gujja S, Zeng Q y cols. Genetic and phenotypic intra-species variation in *Candida albicans*. *Genome Res* 2015; 25: 413-425.
- Hosseinzadeh R, Khorsand K, Hosseinzadeh G. Graphene oxide-methylene blue nanocomposite in photodynamic therapy of human breast cancer. *J Biomol Struct Dyn* 2018; 36: 2216-2223.
- Jamil B, Bokhari MTM, Saced A, Bokhari MZM, Hussain Z y cols., Candidiasis: Prevalence and resistance profiling in a tertiary care of hospital of Pakistan. *J Pak Med Assoc* 2013; 67: 688.
- Javed F, Romanos GE. Does photodynamic therapy enhance standard antibacterial therapy in dentistry? *Photomed Laser Surg* 2013; 31: 512- 518.
- Javed F, Samaranoyake LP, Romanos G. Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: A systematic review of currently available evidence. *Photochem Photobiol Sci* 2014; 13: 726-734.
- Kakari K, Hamidi M, Hosseinduost. Chlorine-doped reduced graphene oxide nanosheets as an efficient and stable electrode for supercapacitor in acid medium. *J Colloid Interf Sci* 2016; 479: 121-126.
- Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial Photodynamic Inactivation Inhibits *Candida albicans*

- Virulence Factors and Reduces In Vivo Pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 445-451.
- Khendri S, Santos ALS, Roubary M, Hodighi R, Falahati M. Iranian HIV/AIDS patients with oropharyngeal candidiasis: identification, prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species. *Lett Appl Microbiol* 2018; 67: 392-399.
 - Kirti YK. Prevalence of oral candidiasis in Indian HIV sero-positive patients with CD4+cell account correlation. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2019; 71: 124-127.
 - Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Sacko J, Kedzierska, Knap-Czop K y cols. Photodynamic therapy, mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother* 2018; 106: 1098-1107.
 - Lau KA, Wong JLL. Current trends of HIV recombination worldwide. *Infect Dis Report* 2013; 5: s1e4.
 - Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions *J Clin Microbiol* 2006; 44: 693-699.
 - Li B, Zhou I, Wu D, Peng H, Yan K, Zhou Y y cols., Photochemical chlorination of graphene. *ACS Nano* 2011; 5: 5957-5961.
 - Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiol* 2003; 149: 353-362.
 - Lilly EA, Leigh JE, Joseph SH, Fidel Jr. PL. *Candida* induced oral epithelial cell responses. *Mycopathologia* 2006; 162: 25-32.
 - Lin JN, Lin CC, Len CH, Yang YL, Chen HT y cols., Predisposing factor for oropharyngeal colonization of yeast in human immunodeficiency virus-infected patients: A prospective cross-sectional study. *J Microbiol Immunol Infect* 2013; 46: 129-135.
 - Lopes-Colombo A, Guimarães T, Aranha Camargo LF, Richtmann R, de Queiroz-Telles F, Costa-Salles MJ y cols. Brazilian guidelines for the management of candidiasis- a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedades Paulista de Infectologia and Sociedades Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis* 2013; 17: 283-312.
 - López-Jornet P, Bermejo-Fenoll A, Bagán-Sebastian JV, Gómez P. Comparison of a new test for the measurement of resting whole saliva with the draining and the swab techniques. *Braz Dent J* 1996; 7: 81-86.
 - López-Pintor RM, Hernández G, de Arriba I, de Andrés A. Oral candidiasis in patients with renal transplants. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* 2013, 18: e381-387.
 - Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies y cols., The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *PNAS*, 2007; 17: 7223-7228.
 - Mang TS, Mikulski L, Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010; 7:98-105.

- Mane A, Vidhate P, Kusro C, Waman V, Saxena V, Kulkarni-Kale U y cols. Molecular mechanisms associated with fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* isolates from India. *Mycoses*. 2016; 59: 93-100.
- Mane A, Galkwad S, Bembalkar S, Risbud. Increased expression of virulence attributes in oral *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Med Microbiol* 2012; 61: 285-290.
- Manfredi M, McCollough MJ, Polonelli L y cols. *In vitro* antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol* 2016; 21: 177-182.
- Mongue-Fuentes N, Moehlmann LA, de Azevedo RB. Perspectives on the application of nanotechnology in photodynamic therapy for the treatment of melanoma. *Nano Rev* 2014; 5: 10.3402/nano.v5.24381.
- Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention. *Lancet* 2014; 384: 258-271.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; 4: 119-128.
- Migliario M, Rizzi M, Rocchetti V, Cannas M, Renó F. *In vitro* toxicity of photodynamic antimicrobial chemotherapy on human keratinocytes proliferation. *Lasers Med Sci* 2013; 28: 565-569.
- Mima EG, Vergani CE, Machado AI, Massucato EMS, Colombo AI, Bagnato VS y cols. Comparison of photodynamic therapy *versus* conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: e380–e388.
- Mima Eg, Pavarina CA, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: *In vitro* study. *Photomed Laser Surg* 2011; 29: 827-834.
- Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2011; 6: 223-248.
- Mojzisoava H, Bonneau S, Vever-Bizet C, Brault D. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1768: 2748-2756.
- Moyes DL, Naglik JR. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 346307.
- Mushi MF, Memiska Cj, Bader O, Cii C, Mirambo MM, Grop U, Hshama SE. High oral carriage of non-*albicans* *Candida* spp. among HIV-infected individuals. *Int J Infect Dis* 2016; 49: 185-188.
- Mushi MF, Bader O, Taveme-Ghadwal L, Bii C, Grob U, Mshana SE. Oral candidiasis among African human immunodeficiency virus-infected individuals: 10 years of systematic review and meta-analysis from Sub-Saharan Africa. *J Oral Microbiol* 2017; 9: 1317579.

- Naglik JR, Moyes DL, Wachtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* 2011; 13: 963-976.
- Neppelenbroek KH, Seo RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH y cols. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory a review of conventional, commercial and molecular techniques. *Oral Diseases* 2014; 20: 329-344.
- Nishimura S, Nagata N, Shimbo T, Asayana N, Akiyama J, Ohmagari N y cols. Factors associated with esopharyngeal candidiasis and its endoscopic severity in the era of antiretroviral therapy. *PLOS One* 2013; 8: 1-6.
- Owotade FJ, Patel M. Virulence of *Candida* isolated from VIH-positive women with oral candidiasis and asymptomatic carriers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014; 18: 455-460.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L y cols. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* 2016; 62: e-1-50.
- Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Front Microbiol* 2015; 6: 1391.
- Paul S, Kannan I. Molecular identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species isolated from HIV infected patients with candidiasis. *Curr Med Mycol* 2019; 5: 21-26.
- Park JH, Moon YH, Bang IS, Kim YC, Kim AS, Ahn AG, Yoon JH. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6. *Lasers Med Sci* 2010; 25: 705-710.
- Patton LL, Ramírez-Amador V, Anaya-Saavedra G, Nittayananta W, Carrozzo M, Ranganathan K. Urban legends series: oral manifestations of HIV infection. *Oral Diseases* 2013; 19: 533-550.
- Paul S, Kannan I. Molecular identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species isolated from HIV infected patients with candidiasis. *Curr Med Micol* 2019; 5: 21-26.
- Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio-Calvo MC. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología médica (2ª ed.). Bilbao Revista Iberoamericana de Micología 2001.
- Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, Crielaard W. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 755-764.
- Perlin DS. Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis implications for patient management. *Drugs* 2014; 74: 1573-1585.
- Petrov PT, Trukhachera T, Isakov GA, Turyn MC, Kravchenko E, Photolon™ an agent for photodynamic diagnosis and therapy: non-clinical and clinical experience. *Acta Bioopt Inform Med* 2004; 10: 6-7.

- Perialist N, Godoy J, Yamada S, Santana R, Svidzinski T. Oral lesions and colonization by yeast in hemodialysis patients. *J Oral Pathol Med* 2015; 44: 385-390.
- Pinto-Cardoso S, Klatt NR, Reyes-Terán G. Impact of antiretroviral drugs on the microbiome: unknown answers to important questions. *Curr Opin HIV AIDS* 2018; 13: 53-60.
- Pour AH, Salari S, Almani PGN. Oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients a non-HIV subjects in the Southeast of Iran. *Curr Med Mycol* 2018; 4: 1-6.
- Purkins L, Wood N, Kleinermans D, Greenhalgh K, Nichols D. Effect of food on the pharmacokinetics of multiple-dose oral voriconazole. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56: 17–23.
- Quindos G, Eraso E, Escurra PA, Carrillo-Muñoz AJ. Pocosamiento de las muestras de la cavidad bucal y otorrinolaringológicas. *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Rev Iberoam Micol* 2007; 8: 1-9.
- Quishida CCC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci* 2015; 30: 685-694.
- Ribeiro APD, Andrade MC, da Silva JF, Jorge JH, Primo FL y cols. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. *Photochem Photobiol* 2013; 89: 111-119.
- Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 673-688.
- Rosseti IB, Chagas LR, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. *Lasers Med Sci* 2014; 29: 1059-1064.
- Romo JA, Kumamoto CA. On commensalism of *Candida*. *J Fungi* 2020;6: 16.
- Rossoni RD, Barbosa JO, de Oliveira FE, de Oliveira LD, Jorge AOC, Junqueira JC. Biofilms of *Candida albicans* serotypes A and B differ in their sensitivity to photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2014; 29: 1679-84.
- Saini RK, Varshney GK, Dube A, Gupta PK, Das K. A comparative study on the effect of curcumin and chlorin-p₆ on the diffusion of two organic cations across a negatively charged lipid bilayer probed by second harmonic spectroscopy. *J Mol Struct* 2014; 1074: 22-26.
- Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 83–92.
- Santa Anna LM, Zaragoza MTI, Rodallegos EG, Herrero LB, Sánchez NH. Candidiasis oral en pacientes seropositivos al VIH y casos SIDA. Aspectos clínicos, microbiológicos y terapéuticos. *Rev Cubana Med Trop* 2006; 58.

- Santos NH, Huppler AR, Peterson AC, Khader SA, McKenna KC, Gaften SL. Th17 cells counter long term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. *Mucosal Immunol* 2013; 6(5): 900-910.
- Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013; 62: 10-24.
- Shiboski CH, Patton LL, Webster-Cyriaque JY, Greenspan D, Trabouisi RS, Ghannoum M y cols. Oral HIV/AIDS research alliance, subcommittee of the AIDS clinical trial group. *J Oral Pathol Med* 2009; 36: 481-488.
- Snell SB, Foster TH, Haidaris CG. Miconazole induces fungistasis and increases killing of *Candida albicans* subjected to photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol* 2012; 88: 596–603.
- Sundstorm P. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Micol* 2002; 4: 461-469.
- SoukosNS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000 2011; 55: 143-166.
- Scwingel AR, Barcessat AR, Núñez SC, Ribeiro MS. Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of oral candidiasis in HIV-infected patients. *Photomed Laser Surg*. 2012; 30: 429-432.
- Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; 1: a006841.
- Soares BM, da Silva LD, Sousa GR, Amorim JCF, de Resende MA, Pinotti M y cols., *In vitro* photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J Photochem Photobiol Biol* 2009; 94: 65-70.
- Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets and resistance mechanism: Traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 204237.
- Tappeiner, H. V. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. *Muench. Med. Wochenschr* 1900; 47, 5–7.
- Taraszkievicz A, Szewczyk G, Sarna T, Bielawski KP, Nakonieczna. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* with imidazoacridinones: influence of irradiance, photosensitizer uptake and reactive oxygen species generation. *PLOS One* 2015; 10: e0129301.
- Thanyasrisung P, Kesakomol P, Pipattanagovit P, Youngnak-Piboonratanakit P, Pitiphat W, Matangkasombut O. Oral *Candida* carriage and immune status in Thai human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Med Microbiol* 2014; 63: 753–9.
- Teo JQ, Lee SJ, Tun A, Lim RS, Cai Y, Lim T y cols., Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida* blond stream isolates. *BMC Infect Dis* 2019; 19: 63.
- Technical Note – Neubauer Chamber Cell Counting (2020). Consultado el 20 de abril de 2020 de https://www.academia.edu/38485266/Conteo_Camara_Neubauer?auto=download

- Tobón PJC, Montoya AIT. Estudio del paciente con infección por VIH. *Medicina y Laboratorio* 2008; 14: 11-42.
- Thomas P, Sekhar AC, Upreti R, Mojawar MM, Pasha SS. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast CFU enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnol Rep* 2015; 8: 45-55.
- Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell* 2011; 10: 1173-1182.
- Thorman R, Neorius M, Hylander B. Clinical findings in oral health during progression of chronic kidney disease to end-stage renal disease in a Swedish population. *Scand J Urol and Nephrol* 2009; 43: 154-159.
- Tooyama H, Matsumoto T, Hayashi K, Kurashina K, Kurita H, Uchida M, y cols. *Candida* concentrations determined following concentrated oral rinse culture reflect clinical oral signs. *BMC Oral Health* 2015; 15: 150.
- Uliana MP, Pires L, Pratacieira S, Brocksom TJ, de Oliveira KT, Bagnato VS, Kurachi C. Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents. *Photochem Photobiol Sci.* 2014;13(8):1137-1145.
- Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral candidiasis: A disease of opportunity. *J Fungi.* 2020; 6: 15.
- Vidya KM, Rao UK, Nittayananta W, Liu H, Owotade FJ. Oral mycoses and other opportunistic infections in HIV: therapy and emerging problems- a workshop report. *Oral Diseases* 2016; 22: 158-165.
- Vera DMA, Haynes MH, Ball AR, Dai T, Astrakas C, Kelso MJ y cols. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. *Photochem Photobiol* 2012; 88: 499-511.
- Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* species. *Front Microbiol* 2017; 7: 2173.
- Wiederhold NP. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *Int J Antimicrob Agents* 2018; 51: 333-339.
- Williams DW, Jordan RPC, Wei XQ, Alves CT, Wise MP y cols. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J Oral Microbiol* 2013; 5: 22434.
- Williams DW, Lewis MAO. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Diseases* 2000; 6: 3-11.
- Yan Z, Liu X, Liu Y, Han Y, Lin M, Nang W y cols., The efficacy and safety of miconazole nitrate mucoadhesive tablets versus itraconazole capsules in the treatment of oral candidiasis: An open-label, randomized multicenter trial. *PLOS One* 2016; 11: e0167880.

- Zarrintaj P, Zahed a, Hosseinneshad M, Saeb MR, Laheurte P, Mozafari M. Photosensitizers in medicine: Does nanotechnology make a difference? *Materials Today: Proceedings* 2018; 5:15836-15844.
- Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol* 2010; 12 (3): 273-282.
- Zuchowska A, Chudy M, Dybko A, Brzozka Z. Graphene as a new material in anticancer therapy- *in vitro* studies. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2017; B243: 152-165.

9. ANEXO 1. Características clínicas de las variedades de candidiasis oral

Variedad de candidiasis	Características clínicas
Pseudomembranosa	Se presenta como placas multifocales blanco-amarillentas en toda la mucosa oral, las placas, que consisten en células epiteliales e inmunes descamadas junto con la levadura y las hifas, pueden eliminarse raspando suavemente, dejando una base roja erosiva.
Eritematosa	Esta forma de candidiasis se presenta como una placa roja central elíptica o romboide de atrofia y eritema en el dorso de la lengua posterior a la línea media y anterior a las papilas circunvaladas, a menudo dolorosas.
Hiperplásica cónica	Generalmente surge en la mucosa retrocomisural, pero también puede presentarse en el dorso lingual, que es el segundo sitio más común de aparición, se presentan como placas blancas bien delimitadas y fisuradas que no se pueden eliminar con un raspado suave.
Queilitis angular	Afecta las comisuras labiales y se presenta con eritema, fisuras, formación de costras o combinación de estos. La presentación puede ser unilateral, pero con mayor frecuencia es bilateral y se asocia comúnmente con candidiasis eritematosa.

Anexo 2. Consentimiento informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN "Eficacia de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre aislamientos clínicos orales de *Candida spp.* provenientes de sujetos adultos con VIH/SIDA" Y PARA EL ALMACENAMIENTO Y USO FUTURO DE MUESTRAS SIN USAR

Yo, _____ con expediente _____ que acudo a la Clínica Especializada Condesa _____ al servicio de Patología y Medicina Bucal, en pleno uso de mis facultades mentales DECLARO que la Dra. _____, especialista en Patología y Medicina Bucal me ha informado que la UAM-Xochimilco a través del Área de Ciencias Básicas del Departamento de Atención a la Salud y en colaboración con el Laboratorio de Microbiología y Patología Bucal de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), están realizando el proyecto de investigación "Eficacia de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre aislamientos clínicos orales de *Candida spp.* provenientes de sujetos adultos con VIH/SIDA", que pretende obtener información sobre las características clínicas y microbiológicas de lesiones ocasionadas por hongos (*Candida spp.*) debido a que estas tienen una gran incidencia en pacientes con un sistema inmune comprometido pudiendo ocasionar en algunos de ellos infecciones severas y/o diseminadas. De ahí la importancia de detectarlos, controlarlos y plantear nuevas opciones terapéuticas para su tratamiento eficaz y mínimamente invasivo.

Es de mi consentimiento que, en caso de acceder, mi seguimiento clínico en la CPMB-UAM-X será registrado en una base de datos que posteriormente será analizada, junto con la información de otros sujetos de investigación. Para ello los médicos recabarán la información de mi expediente clínico, me harán preguntas sobre mis antecedentes de infecciones previas y de tratamiento antifúngico o antimicrobiano para tratarlas y se me realizará un examen minucioso de la mucosa bucal. En caso de que mi expediente esté incompleto, accedo a que se me realice un interrogatorio adicional que incluya preguntas en relación a uso de medicamentos y antecedentes de tabaco, alcohol y otras toxicomanías.

Es necesario para la realización de esta investigación que se me realice un frotis citológico e hisopado de mi mucosa bucal para que dicho material sea analizado citológicamente, microscópicamente, bioquímicamente y molecularmente, por lo cual, previamente se me ha explicado que se trata de un procedimiento no invasivo y que no causará dolor, así mismo autorizo a la Dra. Estela de la Rosa García para almacenar las muestras sin usar para un uso futuro, en mi propio diagnóstico y tratamiento, o en investigaciones futuras.

ACEPTO () o NO ACEPTO () QUE SE TOME FROTIS CITOLÓGICO E HISOPADO DE MI MUCOSA BUCAL, SE QUE PUEDO NEGARME A PARTICIPAR Y QUE EN CASO DE QUE LO HAGA, LA ATENCIÓN QUE COMO PACIENTE RECIBO NO SE VERÁ AFECTADA.

Se me ha informado que los investigadores adquieren la obligación de informarme inmediatamente los resultados obtenidos en caso de que tengan relevancia clínica, es decir, si los microorganismos que aislaron de mi mucosa bucal son resistentes a tratamiento con fluconazol, además se me ha explicado que ninguna de mis muestras se utilizará con fines de lucro, y que cualquier investigación en que se use mi muestra deberá ser aprobada por los Comités Científicos y de Bioética de las Instituciones participantes. Así mismo se me ha informado que mi participación en este estudio no implica la administración gratuita de medicamentos, mismos que me serán indicados de acuerdo al criterio de los médicos.

MAESTRÍA EN PATOLOGÍA Y MEDICINA BUCAL

Calz. Del Hueso 1100, Laboratorio H-109, Col. Villa Guadalupe, Coyoacán 04960, Ciudad de México, México

Se ha hecho de mi conocimiento que no existirá ningún cargo por los procedimientos que se realicen (frotis citológico, estudio microbiológico, bioquímico y molecular) o por las consultas efectuadas, y obtendré un resultado citológico y microbiológico de la muestra que se haya tomado de mi mucosa bucal. El resto de las consultas o los procedimientos relacionados con mi padecimiento de base y no relacionados con este estudio correrán por mi cuenta de acuerdo con la clasificación socioeconómica _____ que se me ha asignado en la _____.

Se me ha garantizado que toda la información que se obtenga de este estudio, será confidencial y se consignará en el expediente correspondiente. No será identificado en ninguna publicación o presentación que provenga de este estudio. Y que si existe alguna duda será contestada y aclarada por la Dra. Erika Martínez en la Clínica Especializada Condesa o en la UAM-Xochimilco a los teléfonos (55) 5483 72 06 en la Ciudad de México.

Entiendo que puedo negarme a autorizar el almacenaje de mis muestras, o poner restricciones sobre las mismas, sin pérdida de beneficios, ya que mi atención en la CPMB-UAM-X no será afectada de ninguna manera. Sé que puedo retirar mi permiso en cualquier momento, pero debo hacerlo por escrito a través de correo electrónico a la Dra. Estela de la Rosa García (delarosa0712@gmail.com).

ACEPTO () o NO ACEPTO () FORMAR PARTE EN ESTE ESTUDIO. SE QUE PUEDO NEGARME A PARTICIPAR O SUSPENDER MI PARTICIPACIÓN EN EL MOMENTO QUE LO DECIDA, EN CASO DE QUE LO HAGA, LA ATENCIÓN QUE COMO PACIENTE RECIBO NO SE VERÁ AFECTADA.

He leído la información anterior y comprendo los propósitos del uso de mis muestras biológicas, así como los beneficios de mi participación como sujeto de estudio. He tenido la oportunidad de preguntar mis dudas y todas han sido aclaradas. Me he quedado con una copia de la firma de este consentimiento.

El presente consentimiento informado se realizó conforme la Ley General de Salud de acuerdo al Título V de Investigación para la Salud, Artículo 100 de Investigación en seres humanos, Capítulos 97 al 103; y al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud del consentimiento informado, Título II de los aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, Capítulo I, Artículo 20 al 22; y fue aprobado por el Comité Científico y de Bioética correspondiente.

Ciudad de México, a los ____ días del mes de _____ de 2018.

Nombre del sujeto de investigación: _____ firma: _____

Nombre del testigo: _____ firma: _____

Nombre del testigo: _____ firma: _____

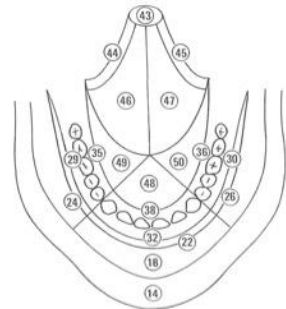
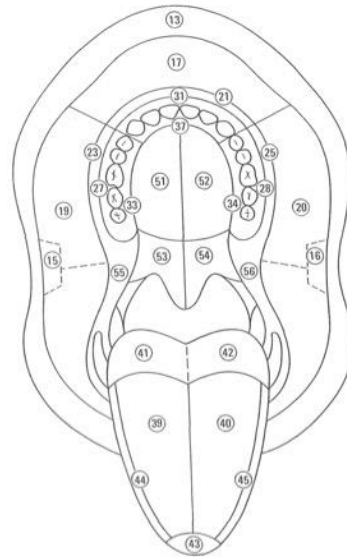
Responsable de la CPMB-UAM-X: Dra. Estela de la Rosa García firma: _____

Anexo 4. Examen bucal sistemático



El examen intrabucal se realizará siguiendo un orden establecido propuesto por Roed Petersen y Grete Renstrup en 1969 y modificado por la OMS en 1980, en dicho examen se clasifican topográficamente a la mucosa bucal y puede ser utilizado para describir cualquier tipo de lesión.

El orden es el siguiente:

1. Comisura derecha
2. Mucosa yugal derecha
3. Comisura izquierda
4. Mucosa yugal izquierda
5. Mucosa labial superior
6. Mucosa labial inferior
7. Surco vestibular superior derecho
8. Surco labial superior
9. Surco vestibular superior izquierdo
10. Surco vestibular inferior derecho
11. Surco labial inferior
12. Surco vestibular inferior izquierdo
13. Proceso alveolar bucal sup der.
14. Proceso alveolar labial sup ant.
15. Proceso alveolar bucal superior izq.
16. Proceso alveolar bucal inferior izq.
17. Proceso alveolar labial inferior ant.
18. Proceso alveolar bucal inferior izq.
19. Proceso alveolar palatino derecho
20. Proceso alveolar palatino anterior
21. Proceso alveolar palatino izquierdo
22. Proceso alveolar lingual derecho
23. Proceso alveolar lingual anterior
24. Proceso alveolar lingual izquierdo
25. Piso de boca derecho
26. Piso anterior de boca
27. Piso de boca izquierdo
28. Vientre de lengua lado derecho
29. Vientre de lengua lado izquierdo
30. Borde lateral derecho de lengua
31. Borde lateral izquierdo de lengua
32. Punta de lengua
33. Dorso de lengua derecho
34. Dorso de lengua izquierdo
35. Base de lengua
36. Paladar blando derecho
37. Paladar duro izquierdo
38. Paladar duro derecho
39. Pilar amigdalino derecho
40. Pilar amigdalino izquierdo



Anexo 5. Reporte de estudio citológico

 <p>Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA Unidad Xochimilco</p>	 <p>CONEDERA SEMME</p> <p>Maestría en Patología y Medicina Bucal</p>
REPORTE DE ESTUDIO CITOLÓGICO	
Eficacia de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre aislamientos clínicos orales de <i>Candida spp.</i> provenientes de pacientes con VIH/SIDA con candidiasis bucal	
Nº de citología: CE-CI-18- _____	Fecha: _____
Nombre del paciente: _____	Edad: _____ Sexo: _____
Descripción citológica:	
Diagnóstico citológico:	
_____ Firma del patólogo	
Recibí reporte original	
_____ Firma del paciente	

Anexo 6. Técnica para la identificación de especies en CHROMagar

Candida®

Toma de las muestras					Identificación <i>Candida</i>							
?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
					Candidiasis							
?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?

Agar Dextrosa Sabouraud

Siembra en ósped

?

Cultivos positivos

?

CHROMagar *Candida*

Siembra gotamiento

?

48h

35°C

?

?

Apariencia de las colonias

?

?

?

?

Aislamiento de cada colonia

CHROMagar *Candida*

?

?

?

Resiembra Agar

Dextrosa Sabouraud

48h 37°C

Agar Dextrosa Sabouraud

45°C, 48h

C. dubliniensis

Verde = *C. albicans*

Verde intenso = posible *C. dubliniensis* + oscuro

Azul = *C. tropicalis*

Rosa lisa = *C. glabrata*

Rosa rugosa = *C. krusei*

Anexo 7. Cuantificación de AND en Nanodrop®

#	Muestra ID	ARN	Unidades	ARN óptimo 260/280 (1.6-2.0)
01	CI-03K	117,3	ng/μl	1,71
02	CI-03G	185,0	ng/μl	1,76
03	CI-05G	193,4	ng/μl	1,86
04	CI-05A	194,7	ng/μl	1,72
05	CI-O6G	155,0	ng/μl	1,78
06	CI-07A	496,1	ng/μl	2,17
07	CI-08G	97,9	ng/μl	1,72
08	CI-10A	168,6	ng/μl	2,23
09	CI-12A	451,9	ng/μl	2,18
10	CI-12G	271,7	ng/μl	1,73
11	CI-14G	196,3	ng/μl	1,80
12	CI-15A	234,1	ng/μl	2,24
13	CI-16G	327,3	ng/μl	2,16
14	CI-18A	268,8	ng/μl	2,21
15	C-19A	147,2	ng/μl	2,25
16	CI-19K	176,5	ng/μl	1,78
17	CI-20A	225,3	ng/μl	2,22
18	CI-21A	170,1	ng/μl	2,25
19	CI-22K	431,9	ng/μl	1,89
20	CI-22A	140,7	ng/μl	2,24
21	CI-22T	202,6	ng/μl	1,76
22	CI-23A	149,3	ng/μl	2,24
23	CI-24A	88,3	ng/μl	2,23
24	CI-24G	359,7	ng/μl	2,15

#	Muestra ID	ARN	Unidades	ARN óptimo
				260/280 (1.6-2.0)
25	CI-25K	187,7	ng/μl	2,23
26	CI-25A	202,6	ng/μl	1,78
27	CC-01G	212,6	ng/μl	1,77
28	CC-01K	298,8	ng/μl	1,70
29	CC-03G	141,4	ng/μl	1,72
30	CC-O5G	187,2	ng/μl	1,75
31	CC-05A	318,6	ng/μl	1,81
32	CC-06A	119,6	ng/μl	1,72
33	CC-09A	531,1	ng/μl	2,20
34	CC-09G	302,0	ng/μl	1,80
35	CC-09R	139,9	ng/μl	1,67
36	CC-10A	181,7	ng/μl	1,73
37	CC-10G	139,6	ng/μl	1,75
38	CI-05R	176,0	ng/μl	1,71
39	<i>C. krusei</i>	508,0	ng/μl	1,94
40	<i>C. albicans</i>	307,5	ng/μl	1,93
41	<i>C. tropicalis</i>	703,9	ng/μl	2,03
42	<i>C. parapsilosis</i>	378,5	ng/μl	1,96
43	<i>C. glabrata CBS138</i>	1 516,3	ng/μl	2,15
44	<i>C. glabrata CGM1 BG!4</i>	429,2	ng/μl	2,12

Anexo 8. Definición operacional de las variables

	Tipo	Definición operacional	Definición conceptual
Variables dependientes			
Efecto antifúngico	Discreta	Nº de colonias	Efecto antifúngico de la terapia fotodinámica expresado en el conteo de UFC post-tratamiento con Ce6 e híbrido FGL-Ce6 comparado con un grupo control.
Variables independientes			
Género	Categórica	Femenino= F Masculino= M	Hace referencia a los conceptos sociales de las funciones, comportamientos, actividades y atributos que cada sociedad considera apropiados para los hombres y las mujeres.
Edad	Numérica	Años cumplidos	Tiempo que ha vivido una persona.
Fecha de nacimiento	Numérica	dd/mm/aaaa	Indicación escrita del día, mes y año en el que tiene lugar un suceso.
Escolaridad	Categórica	Analfabeto/a=1 Primaria (completa o incompleta) =2 Secundaria (completa, incompleta, carrera técnica) =3 Bachillerato/Preparatoria=4 Licenciatura=5 Posgrado =6	Conjunto de cursos que un estudiante sigue en un establecimiento docente
Lugar de residencia	Categórica		Acción y efecto de estar establecido en un lugar.

Fecha de diagnóstico	Numérica	dd/mm/aaaa	Indicación escrita del día, mes y año en el que tuvo lugar un diagnóstico de VIH ⁺ .
Conteo de CD4+	Discreta	≤ 200 células/mm ³ =1 ≥ 200 células/mm ³ =2	Se realiza mediante un análisis de laboratorio en el cual se obtiene la cantidad de linfocitos TCD4 ⁺ , notificados como la cantidad de éstas células por milímetro cúbico de sangre.
Carga viral (CV)	Discreta	CV indetectable =1 < de 10,000 copias ARN/ml=2 \geq de 10,000 copias ARN/ml=3	Cantidad de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH/SIDA) en una muestra de sangre, notificada como el número de copias de ARN del VIH/SIDA por milímetro de sangre.
Tiempo de uso de TARc	Continúa	Días de uso	Espacio de tiempo en el que el individuo ha estado usando la Terapia Antirretroviral combinada desde su prescripción.
Consumo de alcohol	Categórica	Días de consumo Bebedor o no Si =1 No=2 Ex bebedor =3 Tipo de bebida Cerveza =1 Licor =2 Vino =3 Pulque =4	El consumo de bebidas alcohólicas fue calculado en unidades de bebida (UB) de acuerdo al tipo de bebida consumida.
Consumo de tabaco	Categórica	Días de consumo Fumador o no Si =1 No=2 Ex fumador =3	Los no fumadores fueron individuos que reportaron nunca haber fumado. Los fumadores fueron definidos como individuos que habían fumado al menos un cigarrillo al día durante el año previo a su inclusión.

Los exfumadores fueron aquellos individuos que habían dejado de fumar al menos 12 meses antes de su inclusión en el estudio

Variedad clínica de candidiasis	Nominal	Pseudomembranosa=1 Eritematosa =2 Hiperplásica =3 Queilitis angular =4	Signos clínicos de candidiasis bucal, se clasifico de acuerdo a los criterios de Shiboski, 2009.
Susceptibilidad a fluconazol	Nominal	Resistente=1 Sensible=2	Crecimiento o no de la levadura inhibida por una concentración de un agente antifúngico, valorado mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el método de difusión en disco descrita en el manual M27-A3 (Sensibles halo ≥ 19 mm; resistentes halo ≤ 14 mm).

Anexo 9. Distribución de las especies susceptibles a fluconazol

Especie de <i>Candida</i>	N	Susceptibilidad a fluconazol	
		Sensibles	Resistentes
	36		
<i>C. albicans</i>	15	3	12
<i>C. glabrata</i>	8	4	4
<i>C. krusei</i>	4	--	4
Sin identificar (<i>spp.</i>)	7	3	4
<i>C. tropicalis</i>	1	1	--
<i>C. parapsilosis</i>	1	1	--

