



INFORME BREVE

Optimización de variables en ensayos de actividad antifúngica fotodinámica frente a especies de *Candida*

Lucía Bulacio^{a,*}, Silvana Ramadán^{a,1}, Hernán Dalmaso^a, Alicia Luque^a
y Maximiliano Sortino^{a,b}

^a Centro de Referencia de Micología (CEREMIC), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fe, Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Rosario, Santa Fe, Argentina

Recibido el 29 de julio de 2020; aceptado el 31 de diciembre de 2020

Disponible en Internet el 27 de febrero de 2021

PALABRAS CLAVE

Candida;
Terapia fotodinámica;
Azul de toluidina

KEYWORDS

Candida;
Photodynamic
antifungal therapy;
Orthotoluidine blue

Resumen Las infecciones orales causadas por levaduras del género *Candida* son muy comunes en pacientes con factores predisponentes, ya sea por estados fisiológicos o ciertas patologías de base. Estos cuadros pueden, además, evolucionar hacia formas diseminadas. En este trabajo se evaluaron *in vitro* algunos protocolos de terapia antifúngica fotodinámica contra levaduras del género *Candida*, para establecer las condiciones óptimas de radiación luego de aplicar compuestos fotosensibilizantes. Se evaluaron 39 cepas de distintas especies de *Candida*, que se expusieron a 12 colorantes, 8 fuentes de radiación y 3 tiempos de exposición. El azul de toluidina combinado con la exposición a luz proveniente de lámpara de diodo emisor de luz (LED) tipo reflector de 20 W durante 60 minutos mostró una buena actividad fotodinámica. Dadas las desventajas asociadas al uso de antifúngicos convencionales, como la aparición de cepas resistentes, de recidivas y de efectos adversos, la terapia antifúngica fotodinámica es una estrategia promisorio para el tratamiento de infecciones localizadas.

© 2021 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Optimization of variables in photodynamic antifungal assays against *Candida* species

Abstract Oral infections due to yeasts of the genus *Candida* are very common in patients with predisposing factors, such as physiological conditions or certain underlying diseases. Moreover, oral candidiasis can also evolve into disseminated forms. In this work, strains of the genus *Candida* were studied to establish the optimal radiation conditions for photosensitizing compounds, in a photodynamic antifungal therapy protocol. A total of 39 isolates were evaluated. The strains

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lcbulacio@hotmail.com (L. Bulacio).

¹ Ex aequo.

were exposed to twelve dyestuffs, eight radiation sources and three different exposure times. Orthotoluidine blue exhibited good photodynamic activity, in combination with exposure to a 20 W reflector lamp LED (light-emitting diode) light for 60 minutes. When considering the difficulties of using conventional antifungal drugs, the emergence of resistant strains, recurrences, and adverse reactions of certain commonly used drugs, the photodynamic antifungal therapy is a promising strategy for the treatment of localized infections.

© 2021 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Las candidiasis, producidas por levaduras de diversas especies pertenecientes al género *Candida*, presentan una amplia variedad de cuadros clínicos¹. Estos hongos forman parte de la microbiota habitual de la boca, el sistema gastrointestinal, la piel y la vagina, y solo producen infección en la mucosa en presencia de factores predisponentes, de ahí que sean considerados hongos oportunistas¹³. Generalmente, la candidiasis se origina de manera endógena y suele atribuirse a una de estas dos causas: desequilibrio de la microbiota acompañante o enfermedades y procesos que influyen en la respuesta inmunitaria, como tratamientos prolongados con corticoides, edades extremas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, entre otros. Habitualmente, las candidiasis se manifiestan como enfermedades leves de la mucosa oral y genital, de la piel y de las uñas. En ocasiones, pueden volverse recurrentes y en forma menos frecuente presentarse como candidiasis invasoras en individuos inmunocomprometidos, con morbilidad y mortalidad muy altas¹¹.

La especie más importante desde el punto de vista médico-odontológico es *Candida albicans*, aunque de acuerdo con diversos autores, se han aislado de la cavidad bucal otras especies, como *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis* y *Candida parapsilosis*, así como levaduras de otros géneros incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*^{8,12,14}. En concordancia con esto, un trabajo realizado en 60 pacientes oncológicos en tratamiento con radioterapia y que presentaron lesiones bucales mostró como especie prevalente a *C. albicans* (22 cepas), seguida de *C. tropicalis* (13 cepas), *C. parapsilosis* (6 cepas), *C. dubliniensis* (1 cepa) y *S. cerevisiae* (1 cepa). La mayoría de los aislamientos fueron sensibles a clotrimazol y nistatina, fármacos usualmente empleados en forma tópica; no se observó lo mismo con miconazol. En cuanto a la evaluación del comportamiento frente a fármacos de uso sistémico, aunque en general fueron sensibles a anfotericina B, fluconazol, itraconazol y voriconazol, se observaron cepas resistentes a algunos azoles².

Las dificultades que se presentan en el tratamiento de estas infecciones están relacionadas, fundamentalmente, con el reducido número de agentes antifúngicos disponibles en el mercado, la aparición de cepas resistentes y la habilidad de este grupo para desarrollar biopelículas.

Las levaduras en biopelículas presentan una capacidad alrededor de 1.000 veces mayor que las células planctónicas

para comportarse como tolerantes a fármacos antifúngicos, aun sin portar genes específicos de resistencia⁷.

La terapia antifúngica fotodinámica, llamada también terapia fotosensitiva o fotoquimioterapia, adquirió gran relevancia en los últimos años en respuesta a la demanda de tratamientos eficaces contra algunas infecciones⁷. Este proceso utiliza compuestos fotosensibilizantes seguido de una activación con una lámpara de luz específica⁶ en presencia de oxígeno molecular. De este modo se generan especies reactivas del oxígeno, que son nocivas para los microorganismos¹⁵, con la ventaja de que los efectos secundarios son escasos (por lo común, picazón, ardor, calor o dolor, que se alivian con la aplicación de aire frío, agua fría o algún anestésico de uso local), predecibles y manejables. Este tratamiento no afecta al tejido sano⁵; además, ha demostrado ser efectivo tanto frente a células planctónicas como a aquellas que se encuentran formando biopelículas⁷.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad de diferentes colorantes, fuentes de irradiación y tiempos de exposición, a fin de establecer las condiciones óptimas que permitan su aplicación en terapia fotodinámica.

Se utilizaron 39 cepas de *Candida* aisladas de candidiasis orofaríngea, provenientes de la Colección de Cultivos del Centro de Referencia de Micología (CEREMIC) dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario. Las levaduras se sembraron en agar Sabouraud glucosa (ASG) (Britania) y se incubaron a 28 °C por 24-48 h. Se realizó un inóculo en solución fisiológica estéril, que se ajustó a $1-5 \times 10^3$ UFC/ml.

La actividad antifúngica fotodinámica se determinó siguiendo los lineamientos del documento M27-Ed4 emitido por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*)³. Las determinaciones fueron realizadas en paralelo, bajo irradiación con luz blanca proveniente de diferentes lámparas de uso comercial para iluminación domiciliar y en oscuridad. Se ensayaron lámparas bajo consumo tipo espiral de 15 W y 23 W, lámparas de diodos emisores de luz [*light-emitting diode* (LED)] tipo bulbo de 15 W y 20 W; lámparas LED tipo diólicas de 7 W y 11 W, y reflectores LED de 10 W y 20 W. Se evaluaron 12 colorantes: violeta de genciana, azul de metileno, rojo de metilo, azul de toluidina, heliantina, rosa de bengala, rojo fenol, naranja de acridina, verde de malaquita, azul de anilina, púrpura de bromocresol y sangre de dragón.

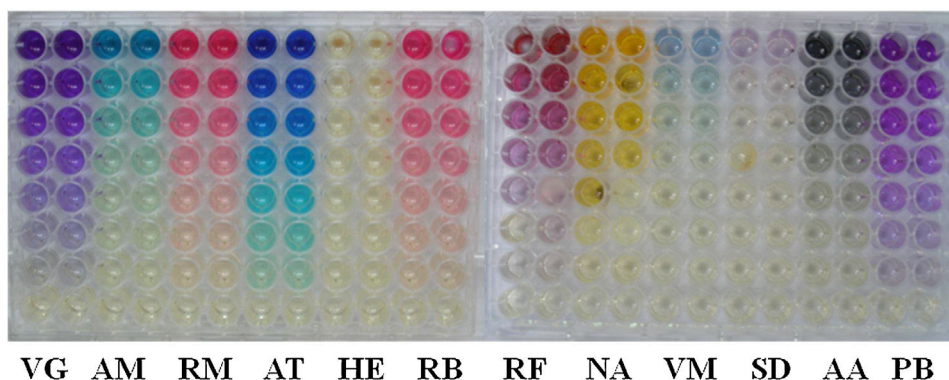


Figura 1 Microplacas con concentraciones decrecientes de los colorantes ensayados: violeta de genciana (VG), azul de metileno (AM), rojo de metilo (RM), azul de toluidina (AT), heliantina (HE), rosa de bengala (RB), rojo fenol (RF), naranja de acridina (NA), verde de malaquita (VM), sangre de dragón (SD), azul de anilina (AA) y púrpura de bromocresol (PB).

Con los colorantes se prepararon soluciones madre de 12,5 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO). Con diluciones 1/25 de estas soluciones se completó la primera hilera de pocillos de microplacas de 96, y luego se hicieron diluciones al medio en forma seriada en el medio Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) (SIGMA), a los efectos de obtener, luego de realizados los inóculos, concentraciones finales en el rango 250-0,12 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 1). A continuación, se colocó el inóculo de las levaduras y se expusieron las placas a radiación con las diferentes fuentes de luz visible durante 30, 60 y 90 minutos. Posteriormente se incubaron durante 24 h a 37°C. Se realizaron los siguientes controles: control de viabilidad del microorganismo en medio de cultivo sin ningún colorante, control de esterilidad de los compuestos ensayados y control de esterilidad del medio de cultivo. La máxima concentración de DMSO utilizada en los ensayos, que correspondió a la primera hilera de pocillos, fue del 2%; la misma concentración se reprodujo en los pocillos de control de viabilidad; sin que se afecte el desarrollo fúngico en ningún caso. Paralelamente, se realizaron ensayos bajo las mismas condiciones, pero en microplacas cubiertas con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

Transcurrida la incubación, se evaluó la viabilidad en los pocillos mediante la realización de subcultivos en ASG. De este modo se determinó la concentración fungicida mínima (CFM), interpretada como la menor concentración de colorante que inhibió totalmente el desarrollo fúngico (fig. 2). Se consideraron fotosensibilizantes aquellos colorantes que demostraron actividad (CFM < 250 $\mu\text{g/ml}$) solamente bajo irradiación.

No se observó actividad antifúngica fotosensibilizante en los experimentos irradiados con lámparas de LED tipo bulbo y tipo dicroicas, mientras que fueron eficaces las lámparas bajo consumo tipo espiral (23 W flujo luminoso 1.450 lm, eficacia lumínica $\eta = 63 \text{ lm/W}$ luz clara 6.500 K) y los reflectores LED (18 mm \times 18 mm, de 20 W, flujo luminoso 1.800 lm, luz clara, ángulo de incidencia 120°, 6.000 K). Bajo estas condiciones, la mayor actividad antifúngica fotosensibilizante se observó con el azul de toluidina (tabla 1), en tanto que el verde de malaquita y el naranja de acridina presentaron solo actividad marginal. El violeta de genciana demostró actividad tanto bajo irradiación como en oscuridad

(CFM = 125 $\mu\text{g/ml}$), por lo que esta no puede relacionarse con fotosensibilización, mientras que el resto de los colorantes fueron inactivos bajo ambas condiciones (CFM > 250 $\mu\text{g/ml}$). El menor tiempo de exposición que permitió obtener resultados satisfactorios fue 60 minutos.

En pacientes oncológicos, trasplantados o con otros estados de inmunocompromiso, son frecuentes las complicaciones orales, entre ellas, las infecciones producidas por levaduras. Esto último pone de manifiesto la necesidad de buscar nuevas estrategias para el abordaje de estas patologías, en especial, para aquellos pacientes sometidos a múltiples protocolos de tratamiento por su enfermedad de base, que presentan infecciones con sensibilidad disminuida a los fármacos de uso común.

Si bien las terapias fotodinámicas fueron descriptas hace más de un siglo⁴, el desarrollo de nuevas fuentes de radiación representa un avance novedoso en el tema. Los resultados de este estudio, en concordancia con lo descripto por Qin et al.¹⁰ respecto de infecciones bacterianas, muestran que el azul de toluidina puede ser útil en el tratamiento de pacientes con candidiasis orofaríngeas, utilizando como fuentes de radiación para la terapia antifúngica fotodinámica láseres y fuentes de luz no coherente. Sin embargo, para la dermatología, las fuentes no láser son superiores a los sistemas láser debido a su gran campo de iluminación, menor costo, tamaño, confiabilidad y fácil configuración⁹.

Para minimizar o incluso evitar los efectos adversos de esta terapia, entre los que se incluyen las ya mencionadas molestias como ardor o dolor, es altamente promisorio el hecho de disponer en la actualidad de nuevos sistemas que emplean lámparas de LED, las que proporcionan una luz visible de banda estrecha, de elevada pureza de espectro y sin producción de calor, con lo que se presentan mínimas o incluso ninguna molestia, ya que al ser una emisión de baja potencia, no es un sistema invasivo; de esta forma, los efectos indeseados se limitarían solo a una coloración transitoria de la zona de aplicación del colorante fotosensible.

El establecimiento de protocolos que incluyan una correcta combinación de la fuente de radiación y el colorante apropiado redundará en el éxito de la terapia, especialmente si se tiene en consideración que los fotosensibilizantes eficientes deben tener la capacidad de absorber la radiación, excitarse y transferir su energía al oxígeno

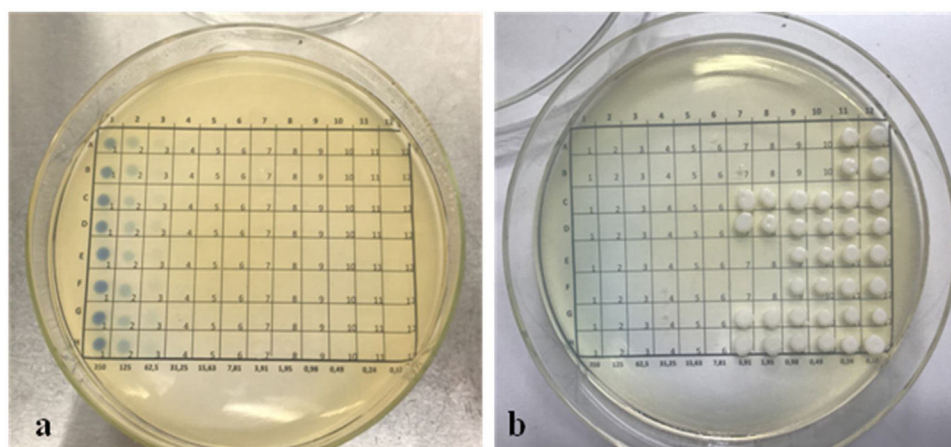


Figura 2 Control de viabilidad luego de la exposición a azul de toluidina con lámpara tipo reflector de 20 W e incubación a 37 °C durante 24 h, con subcultivo de los pocillos en agar Sabouraud glucosa: a) antes de la incubación; b) luego de la incubación.

Tabla 1 Concentración fungicida mínima de azul de toluidina con exposición a diferentes fuentes de luz y sin exposición a la luz

| Especie | Rango CFM (µg/ml) Tipo espiral (23 W) | Tipo reflector LED (20 W) | Oscuridad |
|------------------------------|--|---------------------------|-----------|
| <i>C. albicans</i> (n=21) | 1,95-7,81 | 0,48-7,81 | > 250 |
| <i>C. parapsilosis</i> (n=7) | 3,95-15,63 | 0,98-3,95 | > 250 |
| <i>C. tropicalis</i> (n=9) | 0,98-3,95 | 0,48-3,95 | > 250 |
| <i>C. krusei</i> (n=1) | 0,98 | 3,95 | > 250 |
| <i>C. glabrata</i> (n=1) | 7,81 | 3,95 | > 250 |

CFM: concentración fungicida mínima.

molecular, y que ciertos colorantes, al poseer estructuras con un alto grado de conjugación⁵, cumplen con las características mencionadas.

El uso de la terapia antifúngica fotodinámica para el tratamiento de infecciones localizadas representa un novedoso campo de investigación abocado a hallar las ventajas de este tipo de tratamiento frente a los tratamientos antimicóticos convencionales, que muchas veces resultan poco eficaces y originan una alta tasa de fracasos terapéuticos, como se puede observar frecuentemente en la clínica.

Asimismo, estos resultados abren la posibilidad de realizar nuevos estudios diseñados para conocer en mayor profundidad qué impacto tiene la terapia fotodinámica sobre la expresión de los diferentes factores de virulencia asociados a la agresividad de las candidiasis, o incluso a la frecuencia de recidivas relacionadas con el fracaso terapéutico.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Rosario la gestión y administración de los subsidios que favorecieron el

desarrollo de este trabajo de investigación. Subsidio UNR-SCyT:1BIO527 - CUDI-EXP UNR 8033/2018. RR 5601/2018.

Bibliografía

1. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 5.^a ed. McGraw-Hill. México DF, 2015, p. 322.
2. Bulacio L, Paz M, Ramadán S, Ramos L, Pairoba C, Sortino M, Escovich L, López C. Oral infections caused by yeasts in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. Identification of the yeasts and evaluation of their antifungal susceptibility. J Mycol Med. 2012;22:348–53, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.08.002>.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. 4th ed, 2017; M27. Wayne, PA, EE. UU.
4. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections-state of the art. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2009;6:170–88, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2009.10.008>.
5. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. Microbiol Res. 2008;163:1–12, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2007.08.001>.
6. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci. 2004;3:436–50, <http://dx.doi.org/10.1039/b311900a>.
7. Huang MC, Shen M, Huang YJ, Lin HC, Chen CT. Photodynamic inactivation potentiates the susceptibility of antifungal agents against the planktonic and biofilm

- cells of *Candida albicans*. Int J Mol Sci. 2018;19:434, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19020434>.
8. Luque A, Biasoli M, Tosello M, Lupo S, Magaró H. Oral yeast carriage in infected and non infected HIV populations in Rosario, Argentina. Mycoses. 2009;52:53–9, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01542.x>.
9. Lyon JP, Moreira LM, de Moraes PC, dos Santos FV, de Resende MA. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. Mycoses. 2011;54:e265–71, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01966.x>.
10. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. J Periodontal Res. 2008;43:162–7, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.01007.x>.
11. Quindós G. Micología Clínica. Barcelona: Elsevier; 2015. p. 87.
12. Redding SW, Zellars RC, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Caceres MA, Fothergill AW, Lopez-Ribot JL, Bailey CW, Rinaldi MG, Patterson TF. Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. J Clin Microbiol. 1999;37:3896–900, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.37.12.3896-3900.1999>.
13. Rodríguez Ortega J, Miranda Tarragó J, Morejón Lugones H, Santana Garay JC. Candidiasis de la mucosa bucal: Revisión bibliográfica. Rev Cubana Estomatol. 2002;39:187–233.
14. Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. Curr Drug Targets. 2006;7:495–504, <http://dx.doi.org/10.2174/138945006776359421>.
15. Sharma SK, Mroz P, Dai T, Huang YY, St Denis TG, Hamblin MR. Photodynamic therapy for cancer and for infections: What is the difference? Isr J Chem. 2012;52:691–705, <http://dx.doi.org/10.1002/ijch.201100062>.