

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

**FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**“ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE FACTORES DE VIRULENCIA Y
CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE *Candida albicans* EXPUESTA A CORRIENTE
ELÉCTRICA Y UV-C”**

POR:

VENECIA JAZMIN RUELAS CASAS

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

FEBRERO DE 2025

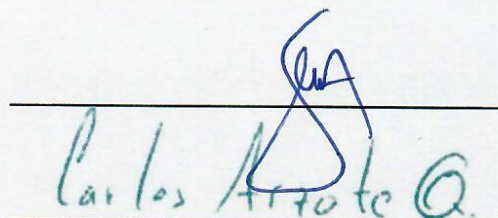


Universidad Autónoma de Chihuahua
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Secretaría de Investigación y Posgrado.



La tesis "ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE FACTORES DE VIRULENCIA Y CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE *Candida albicans* EXPUESTA A CORRIENTE ELÉCTRICA Y UV-C" que presenta Venecia Jazmín Ruelas Casas, como requisito parcial para obtener el grado de: Maestría en Ciencias Biomédicas ha sido revisada y aprobada por la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas

DR. SAID ALEJANDRO DE LA CRUZ REY
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

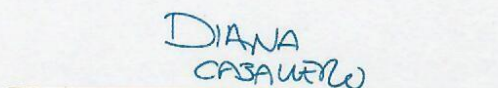


D.C. CARLOS ARZATE QUINTANA
Director de Tesis
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

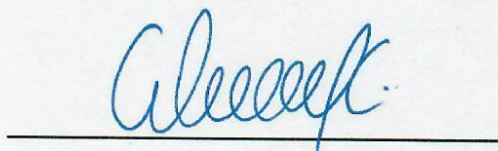
D.C. CLAUDIA ADRIANA RAMÍREZ VALDESPINO
Co-Directora de Tesis
CIMAV, Chihuahua



D.C. DIANA E. CABALLERO HERNÁNDEZ
Asesora
Facultad de Biología
Universidad Autónoma de Nuevo León



D.Ph. ALVA ROCÍO CASTILLO GONZÁLEZ
Asesora
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua



D.C. SUSANA AIDÉE GONZÁLEZ CHÁVEZ
Asesora
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua



Se certifica, bajo protesta de decir verdad, que las firmas consignadas al pie del presente documento son de carácter original y auténtico, correspondiendo de manera inequívoca a los responsables de las labores de dirección, seguimiento, asesoría y evaluación, en estricta conformidad con lo dispuesto en la normativa vigente de esta institución universitaria.

RESUMEN

En 2022, se aplicaron a una cepa ATCC 10231 de *Candida albicans* tratamientos de corriente eléctrica y luz UV-C, para evaluar los efectos sobre la viabilidad celular, susceptibilidad a Anfotericina-B, producción de biopelícula y morfología. Se compararon 5 combinaciones de tratamiento: Corriente Eléctrica (50V), Radiación UV-C (254nm), Corriente Eléctrica (50V) + Radiación UV-C (254nm), Corriente Eléctrica (50V) seguida de Radiación UV-C (254nm) y Radiación UV-C (254nm) seguida de Corriente Eléctrica (50V). Para cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones y el experimento se realizó en tres ocasiones. Se observó que el daño celular más extenso fue causado por el tratamiento de Corriente Eléctrica (50V) + Radiación UV-C (254nm) después de aplicarlo durante 5 minutos. Las células que se trataron con corriente eléctrica (50 V) seguida inmediatamente de UV-C, se observaron paredes celulares rotas, restos celulares y pseudohifas. En el caso donde las células se trataron primero con UV-C seguido de corriente eléctrica (50 V), el daño a la pared celular, los restos celulares y las pseudohifas es menor. Las células tratadas con Corriente eléctrica (50V) al mismo tiempo que con UV-C exhiben características similares los tratamientos anteriores, pero también incluye paredes celulares rotas y desechos celulares en la muestra. La combinación de corriente eléctrica con UV-C lograron aumentar la sensibilidad al antimicótico por parte de la cepa estudiada. Nuestro estudio proporciona evidencia convincente de que la aplicación de corriente eléctrica y luz UV-C puede inducir cambios morfológicos en *Candida albicans*.

Palabras clave: *Candidiasis; Biopelícula; Resistencia Antifúngica; Radiación UV; Electricidad.*

ABSTRACT

In 2022, treatments involving electric current and UV-C light were applied to a *Candida albicans* ATCC 10231 strain to evaluate their effects on cell viability, susceptibility to Amphotericin-B, biofilm production, and morphology. Five treatment combinations were compared: Electric Current (50V), UV-C Radiation (254nm), Electric Current (50V) + UV-C Radiation (254nm), Electric Current (50V) followed by UV-C Radiation (254nm), and UV-C Radiation (254nm) followed by Electric Current (50V). Each treatment was replicated three times, and the experiment was conducted on three separate occasions. The most extensive cellular damage was observed with the Electric Current (50V) + UV-C Radiation (254nm) treatment after 5 minutes of application. Cells treated with electric current (50V) immediately followed by UV-C showed broken cell walls, cellular debris, and pseudohyphae. When cells were treated first with UV-C followed by electric current (50V), the damage to the cell wall, cellular debris, and pseudohyphae was less severe. Cells treated with Electric Current (50V) simultaneously with UV-C exhibited characteristics like the previous treatments but included broken cell walls and cellular debris in the sample. The combination of electric current and UV-C increased the strain's sensitivity to the antifungal. Our study provides compelling evidence that applying electric current and UV-C light can induce morphological changes in *Candida albicans*.

Keywords: *Candidiasis; Biopelícula; Resistencia Antifúngica; Radiación UV; Electricidad.*



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 06 de enero del 2025

DR. SAID ALEJANDRO DE LA CRUZ REY
SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T E.

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que el **C. VENECIA JAZMÍN RUELAS CASAS** con número de matrícula **301690**, estudiante del programa de **MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS (MCB)** ha concluido la escritura de la tesis titulada **"ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE FACTORES DE VIRULENCIA Y CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE *Candida albicans* EXPUESTA A CORRIENTE ELÉCTRICA Y UV-C"**.

Así mismo manifestamos que la tesis ha sido revisada y aprobada por los abajo firmantes; autorizamos a la estudiante a proceder con los trámites administrativos de liberación de tesis y solicitar fecha de examen de grado de MCB.

Sin otro particular, quedamos de usted

Atentamente,
Miembros del Comité de Tesis:

D.C. CARLOS ARZATE QUINTANA
Director de Tesis
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
UACH

D.C. DIANA E. CABALLERO HERNÁNDEZ
Asesora
Facultad de Biología UANL

D.C. SUSANA AÍDEE GONZÁLEZ CHÁVEZ
Asesora
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
UACH

D.C. CLAUDIA ADRIANA RAMÍREZ
VALDESPINO
Co-Directora de Tesis
CIMAV, Chihuahua

D.Ph. ALVA ROCÍO CASTILLO GONZÁLEZ
Asesora
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
UACH

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

“Maravillarse es el primer paso para un descubrimiento”. - Louis Pasteur

A aquellos que me cuidan desde el cielo.

A mis padres África y Alejandro, ejemplos de amor atreves de la perseverancia, dedicación, respeto y responsabilidad.

A mis hermanas Grecia e Irlanda, mis cómplices y apoyo inigualables a lo largo de mi vida.

A mis mascotas, que forman parte de mi familia.

A Mimi, por estar y mantenerse en mi vida, le mejor amiga que el universo me pudo dar.

A mi director de tesis, el Doctor Carlos Arzate Quintana, por recibirme y confiar en mi para este proyecto y a mis asesoras de tesis, todas doctoras con gran trayectoria y que son el ejemplo de cómo quiero ser.

A mis compañeros de maestría y laboratorio, Gisselle, Amauri, Yuliana, Eduardo, María Fernanda, María José e Iván, que se volvieron amigos para toda la vida.

El tiempo ha ido pasando

Porque cada victoria tuve que pelear

Los golpes fueron curtiendo mi cuerpo, mi alma, mi personalidad...

Pero no me rendiré, pues una victoria merece luchar

Me levantaré una vez más

Condenado – WarCry



ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Candida albicans	1
1.2 Candida albicans como agente patógeno	1
1.3 Biopelículas en Candida albicans.....	3
1.4 Resistencia antimicrobiana en Candida albicans	5
1.5 Impacto de Candida albicans en pacientes inmunocomprometidos y de la resistencia antimicrobiana en los servicios de salud	7
1.6 Radiación UV como tratamiento antimicrobiano	9
1.7 Uso de la corriente eléctrica como método de esterilización.....	11
2. ANTECEDENTES	14
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	17
4. JUSTIFICACIÓN	18
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	19
6.1 Objetivo general.....	19
6.2 Objetivos específicos	20



7.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
7.1	Diseño	20
7.2	Cálculo del tamaño de la muestra	20
7.3	Definición del grupo control	21
7.4	Definición de variables y unidades de medida	21
7.5	Técnicas y procedimientos	23
7.5.1	Tratamientos con radiación UV-C y corriente eléctrica	23
7.5.2	Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en microplaca.....	25
7.5.3	Análisis de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT en microplaca.....	26
7.5.4	Cuantificación de Biopelícula en microplaca	26
7.5.5	Preparación de muestra para microscopía electrónica de barrido	26
7.6	Diseño y plan de análisis de datos.....	27
8.	RESULTADOS	27
8.1	Ensayos de inhibición	27
8.1.1	Tratamientos con luz UV-C y corriente eléctrica	27
8.1.1.1	Cambios en la morfología de las células levaduriformes.....	27



8.1.1.2	Conteo de UFC/ml en células levaduriformes expuestas a los tratamientos de UV-C y corriente eléctrica	30
8.2	Ensayos de formación de biopelículas y sensibilidad a antimicóticos.....	30
8.3	Morfología	33
9.	DISCUSIÓN	35
10.	CONCLUSIONES	38
11.	ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD.....	39
12.	ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	40
12.1	Programa de trabajo	40
12.2	Recursos humanos	40
12.3	Recursos materiales	41
12.4	Fuente de financiamiento.....	41
12.5	Lugar en donde se realizará la investigación.....	41
13.	REFERENCIAS.....	42



Figura 1 Cambios de morfología y tamaño de <i>C. albicans</i> expuestas a los diferentes tratamientos en una solución acuosa.....	29
Figura 2 Efecto de los tratamientos de UV-C y electricidad en el número de células levaduriformes de <i>C. albicans</i> en medio de cultivo Dextrosa-Sabouraud	30
Figura 3 Cambios morfológicos observados en <i>C. albicans</i> después de la aplicación de los tratamientos	34
Tabla 1 Variable independiente para estudio	21
Tabla 2 Variables dependientes para estudio	22
Tabla 3 Comparación de viabilidad entre las diferentes generaciones expuestas a los tratamientos de UV-C y corriente eléctrica.	31
Tabla 4 Resultados generales de los tratamientos de UV-C y electricidad, promediando todas las muestras analizadas independientemente del número de generación.....	32
Tabla 5 Resultados Agrupados por Generaciones: Impacto de Tratamientos Combinados de Corriente Eléctrica y Radiación UV-C en la Viabilidad Celular de Candida albicans ATCC 10231.....	33
Tabla 6 Cronograma.....	40



1. MARCO TEÓRICO

1.1 *Candida albicans*

Existen más de 150 especies dentro del género *Candida*, la ausencia de forma sexual es su característica principal, exceptuando algunas especies micóticas. Se les clasifica como levaduras, hongos que se desarrollan predominantemente de manera unicelular. Dentro del género *Candida* apenas una docena de especies pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre al poder adaptarse a una temperatura de 37°C.[1]

La presencia de *C. albicans* como comensal en cavidad bucal, tractos genitourinario y gastrointestinal, secreción bronquial y piel del hombre y de ciertos animales es común, en sujetos sanos, existe un balance entre los mecanismos de defensa del hospedero y el potencial invasivo por parte de las levaduras.[1–4]

1.2 *Candida albicans* como agente patógeno

Cuando el sistema de defensa del hospedero se daña, tal y como ocurre en sujetos inmunosuprimidos o médicamente comprometidos, la infección oportunista por *C. albicans*, así como por otras especies de *Candida* puede derivar en el desarrollo de infecciones superficiales y sistémicas potencialmente mortales.[1–4]

Estadísticamente, *Candida albicans* es el agente responsable del 90-100% de las infecciones de las mucosas, la cuarta causa principal de infecciones nosocomiales con mayor frecuencia en niños, neonatos y en unidades de cuidados intensivos, y el tercer patógeno aislado con mayor frecuencia del torrente sanguíneo según las clasificaciones del Centro para el Control de Enfermedades, ya que el 40% de los pacientes se han contaminado con cepas de *C. albicans* a través de catéteres produciendo fungemia que atribuye una tasa de mortalidad del 35-50% en Individuos inmunocomprometidos y críticamente enfermos.[5–7]



En los últimos años ha aumentado de manera exponencial la cantidad de dispositivos biomédicos (catéteres intravasculares, válvulas cardíacas, prótesis articulares, marcapasos, sondas urinarias, stents ureterales, prótesis intravasculares, etc.) que se colocan en los hospitales. Una de las complicaciones que más frecuentemente se asocia a su uso es la infección.[8]

La mayoría de las infecciones por microorganismos comensales provienen de la colonización endógena. Sin embargo, la contaminación exógena, como las infecciones transmitidas a través de los empleados del hospital, la atmósfera del hospital y los dispositivos invasivos contaminados con biopelículas, como los catéteres, también pueden ocurrir.[9]

La candidiasis invasiva se asocia con frecuencia a la formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis dentales o cardíacas y otros biodispositivos médicos que pueden actuar como sustrato para el desarrollo de estas, convirtiéndose en un foco de diseminación de la infección, lo que entorpece las funciones propias de estos dispositivos, incrementa la mortalidad cruda asociada a las infecciones invasivas por especies de *Candida* hasta el 80% según algunos estudios. La candidiasis invasiva se asocia además con un aumento de la estancia media y con un aumento del coste económico que genera la asistencia médica.[3,8]

Varios factores contribuyen a la transición de *C. albicans* entre comensalismo y patogenicidad. Esta transición se rige en gran parte por la capacidad de *C. albicans* para intercambiar entre 2 morfologías: formas de levadura e hifas. Ambas formas son cruciales para el desarrollo y mantenimiento de la patogenicidad de *C. albicans*. La primera forma es necesaria para la unión a las células huésped y la posterior diseminación y la última forma es necesaria para la invasión de tejidos y la formación de biopelículas. El cambio de levadura a hifa se desencadena por diversas condiciones ambientales, incluida la hipoxia, la temperatura de 37°C, la disponibilidad de suero, el pH de neutro a básico, el agotamiento de la glucosa y el contacto con una célula huésped. En ambas morfologías,



las células están unidas por una pared celular que se modifica continuamente durante la morfogénesis y el crecimiento.[5]

El uso más generalizado de los azoles se da a partir de su desarrollo en la década de los setenta y en los años ochenta con el surgimiento de los triazoles y el fluconazol, su representante más importante, entre otras razones porque coincidió con la pandemia de SIDA y las indicaciones terapéuticas para este síndrome. Además, las ventajas farmacocinéticas del fluconazol en relación con su posología, pues se le considera el primer antifúngico sistémico con toxicidad reducida y con un excelente perfil farmacocinético, y la disponibilidad en el mercado ya que tiene presentaciones para formulación oral o intravenosa, facilitaron su uso. [3,4]

Debido al uso inadecuado de medicamentos necesarios para el tratamiento de las micosis, se ha observado de manera importante que el número de pacientes con estas infecciones ha incrementado, siendo este uso indebido el principal contribuyente para que levaduras como *Candida* spp. aumenten su resistencia.[3]

1.3 Biopelículas en *Candida albicans*

Podemos definir de una manera sencilla una biopelícula como una comunidad de microorganismos que están en ambos tipos de superficies, ya sean abióticas o bióticas (como dispositivos y tejidos médicos implantados), adheridos a una superficie y englobados por una matriz extracelular autoproducida. A pesar de que esta forma de vida se conoce desde hace mucho tiempo, es hasta hace poco se ha reconocido el gran impacto tanto médico como industrial que representan aquellos microorganismos que pueden vivir adheridos a superficies.[6–8]

Se ha demostrado en diversos estudios realizados por diferentes equipos de investigaciones hasta la fecha se han centrado en biopelículas bacterianas, habiéndose prestado mucha menos atención a las biopelículas fúngicas. Sin embargo, hoy en día, y debido a los factores anteriormente mencionados, el número de infecciones fúngicas ha



cochado una mayor relevancia en nuestro medio. Para desarrollar estrategias, preventivas o terapéuticas que, contribuyan a disminuir la morbilidad elevada y el gran gasto económico que se asocia con este tipo de infecciones, es fundamental conocer el proceso de formación, composición y citoarquitectura de las biopelículas fúngicas.[8]

El análisis de las biopelículas de *C. albicans* por microscopía de fluorescencia muestra que están formadas por una red compleja de células levaduriformes, hifas y pseudohifas interconectadas con una matriz extracelular constituida fundamentalmente de polisacáridos y proteínas que brindan resistencia a un espectro amplio de antifúngicos

incluyendo fluconazol y anfotericina B. El mayor componente de la matriz extracelular son los hidratos de carbono (39.6%, de ellos el 32.2% es glucosa, el 5% proteínas, el 3.3% hexosaminas, el 0.5% fósforo y el 0.1% ácido úrico).[7,8]

La infección por *C. albicans* dependerá de forma particular, de su capacidad de adhesión aunado a diversos factores de virulencia. Esta capacidad es esencial para la patogenicidad porque favorece la formación del complejo de biopelícula sobre la superficie de los dispositivos médicos de uso frecuente y propicia la invasión y diseminación de la infección permitiéndole adherirse firmemente, debido a esto, se le reconoce como un mecanismo importante de resistencia antifúngica. El desarrollo de biopelículas en los catéteres puede ocurrir hasta en un 30% de los casos.[3,7,8,10]

Estudios reportan que existe una resistencia mayor de células en biopelículas comparadas con aquellas que crecen en suspensión, sugieren además que, gracias a que las células forman capas, se propicia la protección de los microorganismos como consecuencia de la inadecuada penetración de los agentes antimicóticos en las capas internas. Este hecho es la causa de que los tratamientos antimicrobianos fracasen habitualmente y haya que retirar los biodispositivos en la mayor parte de las ocasiones para conseguir erradicar la infección.[3,6,8]



1.4 Resistencia antimicrobiana en *Candida albicans*

Varios estudios han demostrado que las biopelículas de *Candida* presentan resistencia intrínseca a varios agentes antifúngicos como la Anfotericina B desoxicolato, al fluconazol, a la flucitosina, al itraconazol y al ketoconazol. En la misma línea, se ha demostrado que los azoles voriconazol y revuconazol son poco eficaces contra las biopelículas de *Candida*. En cuanto a la resistencia antifúngica de las biopelículas, los mecanismos moleculares implicados siguen siendo poco estudiados.[3,8]

Para dilucidar el mecanismo de resistencia a los medicamentos por parte de las biopelículas y abordar el problema, muchos estudios se han centrado en la biopelícula de *C. albicans*. El incremento en tasas de resistencia de las especies de *Candida* se ha condicionado por un uso desmedido e inadecuado de antifúngicos. Aunque las biopelículas de *Candida* muestran resistencia a estos fármacos, ninguno de los mecanismos clásicos está implicados y aun no se ha podido describir un único mecanismo que explique la asociación de la resistencia y las biopelículas de *Candida*, en cambio, se han propuesto varios mecanismos combinados para explicarla, entre los que destacan:

a) Restricción en la penetración del antibiótico a través de la matriz de la biopelícula: El grado de maduración, la actividad metabólica y la cantidad, composición y arquitectura de la matriz extracelular tienen relación directa con la sensibilidad a fármacos antifúngicos de las biopelículas. La actividad antifúngica es mayor sobre las biopelículas de 24h que sobre las de 48h. El que las biopelículas sean resistentes a azoles y sensibles a equinocandinas y anfotericina B es, en general, un hecho en el que coinciden todos los autores. También coinciden en que la sensibilidad depende de la especie de *Candida* y del aislamiento. Además, se ha informado que la producción de una matriz extracelular por parte de la biopelícula de *C. albicans*, que se compone principalmente de β -1,3-glucanos y proteínas, contribuye a la resistencia a los agentes antifúngicos. Se demostró que los β -1,3-glucanos pueden unirse a los azoles y aumentar la resistencia.[8,10]



b) Existencia de sistemas de señalización intercelular (quorum sensing) capaces de generar respuestas de estrés: Se conoce que el farnesol y tirosol son moléculas de comunicación intracelular producidas por *C. albicans*. Estas estructuras aceleran y bloquean la transición morfológica de levadura a hifa y actúan significativamente durante las fases temprana, intermedia y de crecimiento del organismo.[7]

c) Sobreexpresión de genes implicados en mecanismos de resistencia: El primer mecanismo se debe a mutaciones moleculares de la enzima diana del antifúngico azólico. El segundo mecanismo asociado con la disminución de la sensibilidad de *Candida* spp. a los azoles (que también tiene efecto sobre Anfotericina B) es la inducción de bombas de expulsión que disminuyen la concentración del fármaco en la célula fúngica, se ha descrito, además, que la sobreexpresión de las bombas de expulsión contribuye a la resistencia de las biopelículas de *C. albicans* a los agentes antifúngicos.[3,4,8]

d) Generación de microambientes hostiles a la acción antifúngica en el interior de la biocapa: con baja tensión superficial de oxígeno, capaces de inactivar los fármacos antifúngicos.[8]

e) Presencia de una tasa de crecimiento alterada: (fase de crecimiento cero, estado estacionario, estado latente o células persistentes).[8]

La producción de varias enzimas extracelulares que dañan los tejidos hidrolíticos, la transición de hifas y la formación biopelícula resistente a los medicamentos en aislamientos de *Candida* spp. hace que la complejidad en el diagnóstico y en el tratamiento de las infecciones fúngicas asociadas a dispositivos biomédicos haya aumentado de manera exponencial en los últimos años, es por esto mismo que se necesitan estrategias innovadoras para desarrollar agentes antifúngicos más nuevos y seguros con actividad de amplio espectro que supriman y erradiquen los factores de virulencia involucrados en la patogenicidad de *Candida* spp. que amenaza la vida.[6,8]



1.5 Impacto de *Candida albicans* en pacientes inmunocomprometidos y de la resistencia antimicrobiana en los servicios de salud

Varios factores contribuyen a la alta incidencia de sepsis en la unidad de cuidados intensivos (UCI) y a los resultados por paciente asociados.[11]

El estado de inmunocompromiso inducido por el virus de la inmunodeficiencia humana es la principal condición que puede conducir a varias manifestaciones sistémicas y locales, que a menudo culminan en la mortalidad. Las infecciones fúngicas invasivas (IFI) causadas por *Aspergillus* spp. y *Candida* spp., representan alrededor del 95% de los casos de IFI. Esta última es la cuarta causa más común de infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo (BSI) en los EE. UU. (9%) con una media de 22 días desde el ingreso hasta la infección.[12–14]

En pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) la candidiasis oral fue una de las infecciones oportunistas más prevalentes observadas en estos pacientes siendo *Candida* el único hongo aislado en isopos de lesiones en mucosa oral.[15,16]

El uso profiláctico o prolongado de fármacos antimicóticos ha permitido que aumente la resistencia en muchos patógenos bien conocidos, por ejemplo, muchas especies de *Candida* manifiesten resistencia a azoles, polienos, equinocandinas y análogos de pirimidina. En comparación con otras clases de antifúngicos, la resistencia a los antifúngicos azólicos es mucho más común, presumiblemente debido a su naturaleza fungistática.[17,18]

Recientemente ha habido un mayor reconocimiento de la importancia de las coinfecciones fúngicas con otros microbios, incluidos los patógenos respiratorios, que a menudo conducen a malos resultados en los pacientes.[17]

A pesar de los recientes avances en el diagnóstico y tratamiento de las infecciones fúngicas invasivas (IFI), la mortalidad debida a infecciones fúngicas en la UCI se ha



informado en un amplio rango de 5 a 70%, particularmente en ausencia de un diagnóstico temprano y un inicio rápido del tratamiento antifúngico, dos factores que son los predictores más importantes de supervivencia de estas infecciones. Cuando se observan las investigaciones de prevalencia internacional, se puede notar que la mortalidad en cuidados intensivos aumentó dos veces en infecciones bacterianas y aproximadamente cuatro veces en infecciones fúngicas. La candidiasis invasiva se asocia con una alta morbilidad y mortalidad en pacientes crítico, además, en pacientes diagnosticados de COVID-19, la tasa de mortalidad asociada a candidemia es mayor en UCI.[13,14,19]

Infecciones asociadas a la atención médica resistentes a múltiples fármacos (MDR HAI) parece estar fuertemente asociado con enfermedades graves e ingresos hospitalarios prolongados, aumentando una mayor utilización de recursos y resultados de salud, según lo evaluado por el costo y/o los cargos directos del proveedor, la duración prolongada de la estadía y la mortalidad de los pacientes en una amplia gama de entornos de atención médica. Este alto costo de la atención médica genera riesgo de empobrecimiento a largo plazo, morbilidad y mortalidad no tratadas. Este fenómeno conduce en última instancia a la pérdida de capital humano.[20–22]

Los informes oficiales han estimado que un aumento continuo de la resistencia para 2050 provocaría la muerte de 10 millones de personas cada año y una reducción del 2% al 3.5% en el Producto Interno Bruto. Le costaría al mundo hasta 100 billones de dólares.[22]

La RAM es un problema de salud mundial relacionado con el uso excesivo y el uso indebido de antimicrobianos en la medicina humana dentro de la comunidad y el entorno sanitario, así como el uso indebido en animales. Sin embargo, un enfoque global requiere muchos otros elementos, como mejorar las políticas de vigilancia y control de infecciones, promover acciones sobre el medio ambiente y la necesidad de desarrollar estrategias diagnósticas y terapéuticas novedosas.[22]



1.6 Radiación UV como tratamiento antimicrobiano

La luz ultravioleta (UV) es una forma de radiación electromagnética con más energía que la luz visible, pero menos energía que los rayos X. Se clasifican en tres tipos en función de la longitud de onda:

- UV-A (315-400nm)
- UV-B (280-315nm)
- UV-C (100-280nm)

Su efecto germicida se descubrió hace más de un siglo por Niels Finsen y aún es la opción de desinfección que más promete ante la actual problemática que enfrenta la salud pública.[23–25]

La luz ultravioleta tiene varios efectos en función a su longitud de onda y el efecto mutagénico que este provoca:

- La UV-A es pobremente absorbida por las células, por lo cual su efecto mutagénico es muy bajo, pero puede causar daño genético adicional a través de la producción de especies reactivas de oxígeno, que causan la oxidación de las bases del material genético de la célula.
- La onda UV-B causa la absorción de sus fotones que actúan directamente en las bases de pirimidina como timina, citosina y 5-metilcitosina, también actúa, aunque en menor medida en bases de purina, esta acción, aunque es similar a la UV-C es de 20 a 100 veces menor en cuanto al efecto anti replicante.
- La UV-C es absorbida por las bases de ARN y ADN de los microorganismos por su baja longitud de onda, tiene su efecto sobre la modificación genética celular a partir de procesos oxidativos sobre la estructura de ADN de cualquier microorganismo que este en un rango aproximado causando la fusión fotoquímica



de dos pirimidinas adyacentes en dímeros unidos covalentemente, que luego se convierten en bases que no se emparejan alterando las hélices de ADN interfiriendo con la duplicación, replicación y otras funciones de las células microbianas, logrando de esta manera la inactivación. El potencial biocida de la luz UV-C que probado y descrito en numerosos estudios en las últimas cuatro décadas, su rango de longitud de onda corta de 250 ± 10 nanómetros (nm), es letal para bacterias, virus, protozoos, hongos, levaduras y algas porque las moléculas de ADN absorben la radiación a un máximo de 260nm.[23,24,26]

La luz UV-C germicida (GUV) es altamente eficiente para evitar el crecimiento microbiano, esta eficiencia varía según la superficie en que se trabaje, se debe considerar diferente longitud de onda para agua, aire y superficies, pero los rayos UV deben incidir directamente sobre el patógeno. No será posible que los organismos que no reciban la UV o estén situados debajo de la superficie del agua sean destruidos.

La dosis UV es la cantidad de energía necesaria para inactivar un microorganismo, por la emisión de luz UV-C. El termino dosis se utiliza para describir la capacidad total de energía absorbida por un microorganismo, para eliminar e inhabilitar su reproducción. Por tanto, la dosis es el producto de intensidad de radiación por el tiempo de exposición, y como tal, permite calcular la capacidad de tratamiento ultravioleta de cualquier sistema. La dosis de inactivación para los microorganismos difiere del medio en el que se encuentran, por lo que será un valor distinto si fuese en agua, superficie o aire.

En cuanto a las superficies, se debe tomar en cuenta el material con que está elaborada el área, según este dato el tiempo de radiación puede aumentar o disminuir ± 5 minutos.

En medios líquidos, los sistemas que se emplean para desinfección tienen un diseño diferente de los utilizados para superficie o aire. La irradiación en el agua se produce dentro de los 15cm, por lo cual, se requiere niveles de potencia UV más altos.



La cantidad de inactivación de patógenos en superficies es directamente proporcional a la dosis de radiación UV-C, donde la dosis se define como el producto de la intensidad (W/m^2) por la duración de la exposición (s). La dosis de UV necesaria varía en función del patógeno que se quiera desinfectar, y también depende de las condiciones ambientales como, por ejemplo, la humedad relativa.[23,26]

La luz ultravioleta de alta intensidad como la UV-C es aplicada en centros de atención médica como técnica para control y prevención de infecciones intrahospitalarias. La eficacia de la aplicación de luz UV-C dependería del tiempo de exposición que se determine, donde entre 15 a 93 minutos son ideales para inactivar organismos a 254nm hasta por aproximadamente 2 metros de su aplicación. El rango de los rayos UV-C se encuentra entre 200 y 280nm, estudios demuestran que se puede alcanzar una actividad germicida óptima sin rebasar los 220nm, sin poner en riesgo la salud del personal, ya que esta longitud de onda puede penetrar microorganismos pequeños ($<1\mu m$) pero no es capaz de ingresar al citoplasma de células de mamíferos ni a las del estrato córneo. Una actividad de onda que rebase los 250nm puede crear eritema y melanomas, también daños en la retina, cataratas y tumores oculares, el personal de salud no debe encontrarse en la sala al momento de la desinfección. Actualmente en el mercado existen dispositivos controlados que interrumpen su acción cuando se detecta movimiento en el área a desinfectar.[24]

1.7 Uso de la corriente eléctrica como método de esterilización

La estimulación eléctrica (ES) o generación de corrientes/potenciales electroquímicos de bajo nivel ha demostrado ser eficaz para erradicar patógenos microbianos. La tecnología de campo eléctrico pulsado (PEF, por sus siglas en inglés), se ha propuesto como un método potencial de esterilización no térmica con el que inactivar microorganismos mediante la alteración física de la membrana celular. Las tecnologías no térmicas son



procesos que son capaces de inactivar microorganismos a temperaturas inferiores a las normalmente utilizadas en el procesamiento térmico.[27–29]

Los PEF se utilizan para una amplia gama de aplicaciones en las ciencias de la vida, porque tienen varios efectos biológicos según la duración y la intensidad de los pulsos eléctricos. Las primeras predicciones teóricas y los experimentos demostraron que los pulsos eléctricos más cortos de nanosegundos de duración (nsEP significa pulsos eléctricos de nanosegundos; a menudo llamados "campos eléctricos pulsados de nanosegundos" o nsPEF) tienen efectos más profundos en el interior de la célula que los pulsos más largos de microsegundos y milisegundos de duración.[30,31]

La exposición de materiales biológicos (suspensiones celulares, tejidos) a nsPEF de alto voltaje provoca un fenómeno que hoy en día se denomina electroporación: se generan pequeños poros (nanoporos) provocando que las membranas celulares se vuelvan más permeables a moléculas que de otro modo no podrían atravesarlas.[30,31]

En los últimos 15 años, numerosos investigadores han demostrado que la aplicación de estos tratamientos provoca una inestabilidad electromecánica en la membrana celular que afecta a los orgánulos celulares, aumenta el calcio intracelular, las respuestas de estrés y provoca apoptosis dándose así la inactivación de formas vegetativas de bacterias, levaduras y mohos.[27,30]

La electroporación ha sido ampliamente estudiada y utilizada como base para aplicaciones en medicina y biotecnología, como la electroquimioterapia, la electrotransferencia de genes, la ablación de tejidos, la extracción de diversos compuestos y la inactivación microbiana en la conservación de alimentos.[30]

Este método ha recibido una atención creciente porque es ecológico y conveniente para la automatización. Se sabe que el enfoque eléctrico controla la adhesión bacteriana utilizando las interacciones eléctricas entre las células bacterianas y las superficies conductoras a través de la transferencia de electrones. Entre los diversos métodos para



controlar las biopelículas, el enfoque que utiliza una corriente eléctrica puede usarse para separar las bacterias adheridas o prevenir la adhesión bacteriana. Los estudios de los efectos de la corriente eléctrica en la prevención de la adhesión bacteriana están limitados en términos del simple efecto cualitativo de una corriente eléctrica específica sobre la adhesión. Entre las corrientes eléctricas examinadas para el desprendimiento bacteriano, se informa que una corriente positiva tiene un fuerte efecto de inactivación contra las bacterias adheridas, pero bajo las condiciones iniciales de adherencia, el efecto de inactivación de las corrientes eléctricas (incluyendo las negativas y alternas) no ha sido reportado.[32]

La electroporación, al funcionar independientemente de los mecanismos de crecimiento de los patógenos, constituye una excelente alternativa contra la resistencia a los antimicrobianos que se encuentra comúnmente en muchos sistemas microbianos ya que potencia sus efectos sobre las biopelículas a través de un fenómeno conocido como efecto bioeléctrico.[28]

Aunque el tratamiento con PEF se considera una tecnología térmica, la temperatura puede aumentar significativamente durante los tratamientos con PEF de alta intensidad debido a la energía térmica que se disipa en el producto debido a su resistencia al flujo de corriente. Los resultados reportados en la literatura muestran que la inactivación microbiana por PEF suele potenciarse cuando se aumenta la temperatura del medio de tratamiento, incluso en rangos de temperaturas que no son letales para los microorganismos. Este efecto se ha atribuido a cambios en la estructura de la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares, de una consistencia gelatinosa a un estado líquido cristalino que es causado por el aumento de temperatura. El aumento de la fluidez de la membrana reduce su estabilidad y facilita la electroporación provocada por el PEF en la membrana celular. Generalmente, las investigaciones sobre la influencia de la temperatura en la inactivación microbiana por PEF se han realizado en cámaras de tratamiento de flujo continuo. En estos casos, la temperatura de salida era variable y



dependía de la temperatura de entrada y la energía específica total aplicada al producto en la cámara de tratamiento.[27]

2. ANTECEDENTES

A continuación, se presenta una serie de estudios realizados previamente, los cuales, gracias a su relevancia dan pie a que se realice el presente proyecto.

En el estudio realizado por Li *et al.*, 2010 se irradiaron con UVA-LED (365nm) biopelículas de *Candida albicans*, se evaluaron los efectos germicidas mediante la determinación de UFC. El cambio morfológico se observó mediante microscopía electrónica de barrido. Después de 5 minutos de irradiación, se eliminó más del 90% de los microorganismos viables en las biopelículas, y la irradiación pulsada (1–1000Hz) tuvo una capacidad germicida significativamente mayor que la irradiación continua. La irradiación pulsada (100Hz, 60min) eliminó casi por completo los microorganismos en la biopelícula (>99±9%), y la irradiación de 20min dañó en gran medida ambas especies microbianas. Curiosamente, se encontraron pocas hifas en las biopelículas de *Candida* irradiadas. El estudio demostró que la irradiación UVA-LED pulsada tiene un fuerte efecto germicida (máximo a 100Hz, durante 5 minutos de irradiación) y provoca la desaparición de las formas hifales de *Candida*.

El estudio publicado por Shim *et al.*, 2011 investigó el papel de las corrientes eléctricas (negativas, positivas, alternas) para prevenir la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* y lograr la inactivación bacteriana. La aplicación de una corriente negativa impidió significativamente la adhesión bacteriana (*81% a 15.0 mA cm²). La corriente positiva no inhibió significativamente la adhesión (520% a 15.0mA cm²), en comparación con el caso no polarizado. La corriente alterna tuvo un efecto similar al de la corriente negativa en la prevención de la adhesión bacteriana, pero también exhibió efectos bactericidas, por lo que es el método más adecuado para el control de la adhesión bacteriana.



En el trabajo realizado por Parry-Nweye *et al.*, 2019 se trabajó la cepa de *C. albicans* SC 5314, se colocaron en solución de NaCl 154mMN y se expusieron a corriente continua (10.5 y 70 μ A/cm²) y voltaje (entre 1 y 4 V durante 1h) Se tomaron alícuotas de 130 μ L de la muestra a intervalos de tiempo de 20min para evaluar la viabilidad de las células mediante conteo de UFC. Se hicieron 3 repeticiones de cada experimento. Después de realizar los tratamientos electroquímicos, las suspensiones de *C. albicans* se expusieron posteriormente a concentraciones de fármaco entre 2 y 12.5 μ g/mL de FLU. Durante los tratamientos, se tomaron 100 μ L de la muestra de cada cubeta cada 20 minutos durante 1h para evaluar la viabilidad de las células de *C. albicans* diluyendo en serie, colocando gotas en placas y luego contando las UFC el día de la incubación posterior. Se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para comparar los cambios morfológicos y se realizaron imágenes de vivo/muerto para evaluar la viabilidad de *C. albicans* células tratadas por las corrientes electroquímicas. Se mostró que *C. albicans* se puede controlar fácilmente con corrientes/potenciales eléctricos, lo que reduce la cantidad de células planctónicas viables en un 99.7% y las células de biopelícula en un 96.0-99.99%. Se encontró que el tratamiento electroquímico mejora sustancialmente la actividad destructora de fluconazol. Si bien el fluconazol solo exhibe una baja eficacia contra la fase estacionaria y las células de biopelícula de *C. albicans*, se logra la erradicación completa correspondiente a 7 logaritmos de destrucción cuando el fármaco antifúngico se administra posteriormente al tratamiento electroquímico.

En el trabajo de Lemons *et al.*, 2020 expusieron dos aislamientos de *C. albicans* a 11 dosis de UV que oscilaban entre 10 y 150mJ/cm² y luego se cultivó para evaluar la viabilidad celular. Se aplicó un modelo de regresión logística para estimar mejor las dosis requeridas para una inactivación del 99.999% para *C. albicans* se requirió una energía UV de (7880mJ/cm²) para inactivarla.

Ese mismo año se llevó a cabo por Tapia-Guerrero *et al.*, 2020 un estudio donde se probó la esterilización con radiación UV (100 μ J/cm²) por 2 horas. La eficiencia de la esterilización por irradiación se realizó mediante una prueba de esterilidad usando 1 $\times$



108CFU/mL de *Candida albicans*. Se estudiaron las propiedades fisicoquímicas y la viabilidad celular antes y después de la esterilización. El monitoreo microbiológico reveló que el método fue suficiente para la esterilización.

Lee *et al.*, 2021 trabajaron con *Candida albicans* (*C. albicans*, ATCC 10231), prepararon bolsas de PVDF rellenas con 2mL de suspensión microbiana y se empaparon en la cámara que contenía 50mL de suspensión microbiana, se trataron con una corriente constante de 20mA cm⁻² durante 5s a 20min. Después del tratamiento con ES, las suspensiones bacterianas obtenidas del interior y el exterior de las bolsas se inocularon C para determinar la inactivación microbiana. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y el análisis SEM se realizaron para analizar la histología y la estructura de los tejidos. Un valor SAL (niveles de garantía de esterilidad) de 10⁻⁶ implica que la probabilidad de que los microorganismos sobrevivan al proceso de esterilización es de uno en un millón. Para investigar la eficacia del proceso de esterilización en este estudio; se verificó un valor SAL de 10⁻⁶. El efecto de esterilización se cuantificó contando colonias viables en diferentes intervalos de tiempo. *C. albicans* dentro y fuera de las bolsas se inactivó dentro de los 180 y 60 s de la aplicación actual, respectivamente, *C. albicans* tardó 355 s en lograr el SAL óptimo desde el interior de la bolsa.

Santos y de Castro., 2021 utilizaron dosis de luz UV-C a 254 nm de 0.912 J/cm² durante 20 s de aplicación en ambas condiciones (in vitro y hospitalaria) para *C. albicans*. Después del tratamiento se observó una reducción de aproximadamente 4 logaritmos de crecimiento para la levadura *C. albicans*. En todas las superficies del hospital, el número de colonias de microorganismos se redujo significativamente después del procedimiento.

La unidad de descontaminación de sala UV-C probada por Rutala *et al.*, 2021 logró una reducción general de *C. albicans* de 4.44 log₁₀ (IC 95%, 3.00 5.88) con FCS y 4.01 log₁₀ (IC 95%, 3.20–4.82) sin FCS. Para *C. albicans*, aunque la UV-C directa tuvo una mayor reducción log₁₀ (5.26 con FCS y 5.07 sin FCS) en comparación con la exposición indirecta (3.96 con FCS y 3.56 sin FCS), esta diferencia no fue estadísticamente diferente.



Dentro del equipo de investigación, Faudoa-Arzate *et al.*, 2021 inocularon con *Candida albicans* ATCC 10231 películas delgadas de SnO₂ y realizaron el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Después de la exposición a la luz ultravioleta, *C. albicans* mostró una reducción del 36.5% en las células viables, y cuando se incluyó SnO₂, la viabilidad celular se redujo en un 60.2%.

Después del análisis de la bibliografía no se encontraron reportes que mencionen la comparación del comportamiento de factores de virulencia antes y después de los tratamientos realizados, nuestro proyecto puede contribuir en este aspecto al poner de manifiesto el compartimiento de *C. albicans* frente a situaciones de estrés y más adelante dilucidar que significan los cambios de la expresión de genes en cuanto al manejo y aplicación de métodos de esterilización que contribuyan a la disminución de multirresistencia presente en este y otros microorganismos que ponen en peligro la salud.

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El resurgimiento de cepas infecciosas con alta resistencia a los tratamientos antimicrobianos ha reavivado el interés por generar nuevos tratamientos en contra de tales agentes infecciosos. Distintas especies bacterianas y fúngicas presentes en superficies e instrumentos del ambiente hospitalario son capaces de adquirir resistencia a los antibióticos por medio de la exposición continua a estos compuestos. Además, al compartir el medio ambiente llevan a cabo intercambio de plásmidos de resistencia a las quimioterapias antimicrobianas tradicionales. [34,35]

Si bien, la generación de nuevos antibióticos es una herramienta indispensable en la lucha contra la amenaza que generan dichos microorganismos multirresistentes, es un proceso largo y laborioso que requiere años de investigación hasta llegar al usuario final, por requerir de la aprobación por medio de pruebas preclínicas y clínicas. Esto hace que,



la introducción de nuevos antibióticos al mercado no es una opción sencilla, por no mencionar que en los últimos treinta años no se ha diseñado un nuevo tipo de antibiótico cuyo mecanismo de acción no sea una variación de los ya conocidos. A su vez, dichos productos suelen tener espectros antimicrobianos estrechos, y las bacterias a las que están dirigidos terminan generando nuevamente resistencia, tal situación nos obliga a diseñar perpetuamente nuevos tratamientos. Por todo lo anterior, el diseño y la mejora de los métodos de desinfección y esterilización de superficies, material médico y otros instrumentos del ambiente hospitalario puede ser una herramienta de gran utilidad para disminuir la velocidad con la que los microorganismos se adaptan a los antibióticos y antimicóticos, y además abre la posibilidad de disminuir o eliminar la presencia de estos microorganismos, por lo que se atacaría el problema desde un ángulo preventivo.[36,37]

La presente investigación pretende comprender la influencia que tienen los métodos de desinfección basados en procesos físicos en la expresión genética de los microorganismos expuestos a corriente eléctrica y luz UV, ya que esta información podría ser importante para maximizar la eficacia con la cual se llevan a cabo los procesos de desinfección en los hospitales y clínicas que son una fuente de generación e infección por microorganismos resistentes a antimicrobianos.

4. JUSTIFICACIÓN

El ambiente hospitalario favorece el intercambio genético entre bacterias y hongos resistentes, generando así multirresistencia a antimicrobianos, esto es un problema cuya tasa de mortalidad continuará elevándose en los próximos treinta años, siendo los principales afectados los niños y los pacientes inmunocomprometidos. Los fómites más comunes de transmisión de infecciones nosocomiales son las superficies de quirófanos, ropa del personal, equipo y material médico. Por lo tanto, es importante enfocarse en desarrollar estrategias preventivas y técnicas más efectivas de desinfección que contribuyan a evitar el contagio y la diseminación de enfermedades de alta morbilidad y mortalidad de origen bacteriano, fúngico o viral.[34–38]



Debido a las dificultades ya mencionadas para la generación de nuevos antimicrobianos, es imperativo asistir el problema desde diferentes ángulos, incluido el de la prevención de infecciones. Las propiedades ya conocidas de la luz UV aunadas y en sinergia con la corriente eléctrica se pueden aprovechar para su aplicación con fines preventivos en contra de la transmisión de infecciones intrahospitalarias, si se tiene éxito en dicho ámbito, y visto desde un punto de vista epidemiológico, habremos solucionado parte del problema, ya que al reducir el número de infecciones también es posible que se genere un impacto en el fenómeno de la resistencia antimicrobiana, y la eliminación por estos medios físicos ayudarán a eliminar las condiciones para la generación de nuevas cepas multirresistentes.

Conocer los mecanismos de defensa de los microorganismos ante un ambiente hostil generado por las técnicas de desinfección basadas en métodos físicos (corriente eléctrica y luz UV-C) es importante, ya que el comprender dicho comportamiento nos ayudará a mejorar o diseñar técnicas de desinfección para su aplicación en el ambiente hospitalario, lo cual nos ayudará a hacer frente a un problema que cada vez gana mayor relevancia a nivel mundial, como lo es la elevada tasa de infecciones intrahospitalarias generada por microorganismos resistentes y multirresistentes a drogas.

5. HIPÓTESIS

La exposición de la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 a combinaciones de tratamientos con corriente eléctrica (50V) y con radiación UV-C (λ 254nm por 5 minutos) en medio acuoso tendrá un efecto sobre la viabilidad, producción de biopelícula, morfología celular y susceptibilidad a Anfotericina B.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general



Analizar el comportamiento de factores de virulencia en *C. albicans*, por medio de la viabilidad, producción de biopelícula, susceptibilidad y morfología celular al exponerla a corriente eléctrica y UV-C.

6.2 Objetivos específicos

1. Comparar la eficacia de factores de virulencia de *C. albicans* antes y después de exponerla a los tratamientos (con corriente eléctrica y UV-C en medio acuoso), por medio de la viabilidad celular, producción de biopelícula y susceptibilidad a antimicótico(s).
2. Caracterizar los cambios morfológicos y/o daños estructurales de *C. albicans*, después de ser expuesta a los tratamientos, mediante microscopía electrónica.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño

El presente estudio se categoriza dentro de los siguientes tipos: experimental, descriptivo y analítico. Es un ensayo de laboratorio, comparativo, de diseño transversal con cronología prospectiva.

7.2 Cálculo del tamaño de la muestra

Para este tipo de estudios no es posible realizar un cálculo de muestra, algunos autores [39–41] mencionan que es más importante la cantidad de repeticiones de cada tratamiento o intervención para asegurar que los resultados sean consecuencia de la intervención y que no influya el manejo de las muestras por parte del investigador.

Debido a la naturaleza del experimento no se espera mucha variación en los resultados por lo que se consideran tres repeticiones como se reporta en varios artículos [28,42,43],



sin embargo, si los valores del error estándar de la media y de la desviación estándar son elevados se considerará realizar 4 o 5 repeticiones como sugiere Díaz, 2009. [44]

7.3 Definición del grupo control

Se tomó como grupo control la misma cepa de trabajo (*Candida albicans* ATCC 10231) la cual no se expuso a ningún tratamiento.

7.4 Definición de variables y unidades de medida

Tabla 1 Variable independiente para estudio

Variable	Definición para el estudio	Dimensiones	Indicadores	Naturaleza	Nivel y escala de medición	Forma de medir la variable
Tratamiento	Intervenciones a las cuales se verá sometida <i>C. albicans</i>	Luz UV	254 nanómetros (nm)	Cuantitativa, discreta	De razón	Se utilizará una lámpara de UV calibrada a 254nm
		Corriente eléctrica	Voltaje 50V	Cuantitativa, continua	De razón	Se ajustará el voltaje utilizando una fuente de poder
		Luz UV + Corriente eléctrica	254nm 50V	Cuantitativa, discreta continua	De razón	Se utilizará una lámpara de UV-C calibrada a 254nm al mismo tiempo que Se ajustará el voltaje utilizando una fuente de poder

	Corriente eléctrica luego Luz UV	50V 254nm	Cuantitativa, discreta continua	De razón	Se ajustará el voltaje utilizando una fuente de poder después se utilizará una lámpara de UV-C calibrada a 254nm
	Luz UV luego Corriente eléctrica	254nm 50V	Cuantitativa, discreta continua	De razón	Se utilizará una lámpara de UV-C calibrada a 254nm después se ajustará el voltaje utilizando una fuente de poder

Tabla 2 Variables dependientes para estudio

Variable	Definición para el estudio	Indicadores	Naturaleza	Nivel y escala de medición	Forma de medir la variable
<i>Formación de Biopelícula</i>	Capacidad de <i>C. albicans</i> para producir una matriz extracelular que la ayude a colonizar y mantenerse presente en superficies	Cuantificación en microplaca	Cuantitativa, continua	De razón	Diferencia en absorbancias por medio del software del equipo
<i>Viabilidad</i>	Cantidad de células sanas de <i>C. albicans</i> después de estar expuestas a los tratamientos	Cuantificación con MTT en microplaca	Cuantitativa, continua	De razón	Diferencia en absorbancias por medio del software del equipo

<i>Susceptibilidad a antimicóticos</i>	Cambios en la turbidez antes y después de tratamientos en <i>Candida</i>	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en microplaca	Cuantitativa, continua	De razón	Diferencia en absorbancias por medio del software del equipo
<i>Daño en morfología celular</i>	Cambios apreciables en la pared celular de <i>C. albicans</i> como efecto de los tratamientos	Presencia o ausencia de daño en pared celular	Cualitativa, dicotómica	Nominal: Presenta daño No presenta daño	Observación directa por medio de microscopía electrónica

7.5 Técnicas y procedimientos

7.5.1 Tratamientos con radiación UV-C y corriente eléctrica

El cultivo original de *C. albicans* (ATCC 10231) fue proporcionado por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH. La cepa se cultivó durante 24 horas a 37°C en medio agar dextrosa Sabouraud antes de ser entregada. La cepa original se mantuvo refrigerada a 4°C para su conservación.

Para estudiar los efectos de la luz ultravioleta y la corriente eléctrica sobre *Candida albicans*, se incubó una cepa ATCC 10231 en agar dextrosa Sabouraud (MCDLAB) durante 24 horas a 37 °C. A continuación, se inocularon 70 mL de caldo de dextrosa Sabouraud (BD Bioxon) hasta alcanzar una turbidez de 0,08-0,1 Absorbancia a 530nm, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (solución de trabajo), se estableció un control, se



separaron 3 alícuotas (2mL), en cajas Petri de vidrio, para cada uno de los cinco tratamientos (15 alícuotas en total más el control) y bajo condiciones estériles se aplicaron los siguientes tratamientos:

Corriente Eléctrica (50V): Con tubos de grafito esterilizados, aplicando la corriente eléctrica de 50 voltios utilizando una fuente de poder (PowerEase® 90W), durante 5 minutos.

Radiación UV-C (254nm): Las cajas Petri abiertas se expusieron a luz UV-C en una cámara de desinfección EsteriUV (American Medical Systems), durante 5 minutos.

Corriente Eléctrica (50V) + Radiación UV-C (254nm): Los dos tratamientos anteriores se combinaron simultáneamente durante 5 minutos.

Corriente Eléctrica (50V) seguida de Radiación UV-C (254nm): Primero se aplicó corriente eléctrica y luego radiación UV-C, cada uno durante 5 minutos.

Radiación UV-C (254nm) seguida de Corriente Eléctrica (50V): Se invirtió el orden del tratamiento anterior, aplicando primero UV-C y luego corriente eléctrica, cada uno durante 5 minutos.

Conteo directo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC): En este punto se tomaron muestras de 10 ml de cada uno de los tratamientos y se colocaron en hemocitómetros (Marien-Feld Neubauer chamber, Visionären, Lauda-Königshofen, Germany) para realizar el conteo de UFC/ml en un microscopio óptico utilizando el objetivo 40X. Esto se realizó con el propósito de analizar el impacto de los diferentes tratamientos en el número de levaduras presentes en los medios de cultivo.

Análisis del impacto de los tratamientos en los factores de virulencia de *C. albicans*: Posterior a la aplicación de los tratamientos se tomó 1mL de cada alícuota para inocular 15 mL de caldo Sabouraud, se incubó durante 24 horas a 37°C, se prepararon



las soluciones de trabajo [$1,5 \times 10^8$ UFC/mL] por cada alícuota y se aplicaron los tratamientos cada 24 horas durante 10 días consecutivos. NOTA: a cada grupo de células tratadas se les denominó con la palabra “generación” seguida del número correspondiente a la cantidad de tratamientos aplicados.

En las células control y la generación 1 los mililitros restantes de cada alícuota se mezclaron por tratamiento y se aplicó la técnica (7.5.5) de preparación de muestra para SEM.

Para las células control y generación 1, 5 y 10 se prepararon soluciones de trabajo [$1,5 \times 10^8$ UFC/mL] y se realizaron las técnicas descritas a continuación.

7.5.2 Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en microplaca

El experimento se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por (Rodríguez-Tudela et al. 2003) que comienza utilizando 200 μ L de un stock de anfotericina B refrigerada (GIBCO) a 4°C, colocados en el pocillo A1 de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Los pocillos A2 a A10 se llenaron con 100 μ L de dimetilsulfóxido, DMSO (MEYER) y se realizaron diluciones seriadas de los pocillos A1 a A10. Se descartaron los últimos 100 μ L del pocillo A10. A continuación, se llenaron 10 tubos con 9,9 mL de caldo Sabouraud y se transfirieron 100 μ L de cada pocillo a estos tubos, lo que dio como resultado una concentración de DMSO del 1%. Cada columna de la placa de microtitulación se llenó con 100 μ L de cada tubo en orden descendente de concentración. Las columnas 11 y 12 se llenaron con 100 μ L de medio. Cada pocillo se inoculó con 100 μ L de una suspensión de levadura, incluidos los pocillos de control de crecimiento (columna 11) que contenían



100 μL de medio estéril libre de fármacos. La columna 12 sirvió como control de esterilidad, llena con 100 μL de agua destilada estéril. [45]

7.5.3 Análisis de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT en microplaca

Se incubó un cultivo de *Candida* en caldo a 37°C durante 24 horas y se ajustó a la escala de McFarland 0,5. Esta solución (100 μL) se inoculó en una microplaca estéril y se incubó durante 2 horas a 37 °C. A continuación, se sustituyó el medio de cultivo por 100 μL de medio nuevo no inoculado o PBS 1X. Cada solución recibió 10 μL de solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio MTT (invitrogen) [12 mM] y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Después de la incubación, se añadieron 50 μL de DMSO a cada pocillo para solubilizar el formazano producido por la reacción MTT. Después de una incubación de 10 minutos a 37 °C y una agitación minuciosa, se midió la absorbancia a 540 nm. [46]

7.5.4 Cuantificación de Biopelícula en microplaca

La cepa se incubó durante 24 horas a 37°C en caldo, ajustada al nefelómetro McFarland 0,5, y se añadieron 100 μL de esta solución a una microplaca estéril. Después de una incubación de 2 horas a 37 °C, la placa se lavó con PBS 1X y se llenó con 100 μL de medio nuevo no inoculado. Después de una incubación de 24 horas a 37 °C, se retiró el medio, se lavó la placa dos veces con PBS 1X y se agregaron 100 μL de Cristal Violeta (HYCEL) (1% en agua). Después de una incubación de 20 minutos a 37 °C, se retiró el cristal violeta, se agregaron 150 μL de etanol al 95% y 100 μL de cada pocillo se transfirieron a una nueva placa para la medición de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. La técnica utilizada fue una modificación de la descrita por Fritsch et al. 2021 y Sadanandan et al. 2022.[47,48]

7.5.5 Preparación de muestra para microscopía electrónica de barrido



La preparación de las muestras se realizó con la técnica descrita por (Carlos et al. 2017) con algunas modificaciones. Se centrifugaron y decantaron para formar un botón celular, se trataron con glutaraldehído al 2,5% (JT BAKER) durante una hora y luego se enjuagaron con PBS 1X. Las muestras se sometieron a deshidratación en concentraciones crecientes de etanol (70%, 85%, 95% y alcohol absoluto), seguido de centrifugación. A continuación, se secaron durante 24 horas en una cámara de vacío (JEOL EMDSC-U10A) y se colocaron en porta muestras adhesivos. Las muestras se analizaron utilizando un microscopio electrónico JEOL JSM-7401f en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados en Chihuahua, con imágenes capturadas a tres aumentos diferentes (3,000X, 5,000X, 10,000X) para su comparación.[49]

7.6 Diseño y plan de análisis de datos

El análisis estadístico que se aplicó a los datos obtenidos fue un ANOVA de Medidas Repetidas que se realizó en el programa jamovi 2.5.4.[50,51] Diferencias de $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

8. RESULTADOS

8.1 Ensayos de inhibición

8.1.1 Tratamientos con luz UV y corriente eléctrica

8.1.1.1 Cambios en la morfología de las células levaduriformes

Los tratamientos con luz UV-C y corriente eléctrica arrojaron resultados con respecto a la viabilidad de las levaduras, así como de cambios morfológicos que fueron evidentes desde el análisis por microscopía óptica. Como puede observarse en la figura 1, los cambios más evidentes consisten en la formación de pseudohifas, tamaño de las levaduras, forma de las levaduras, presencia de vacuolas y aglomeración.

El tratamiento de 50V en medio acuoso dio como resultado que las células levaduriformes presentó principalmente disminuciones de tamaño y formación de vacuolas, sin embargo,



también se nota aglomeración de las células; los tratamientos con luz UV-C son numerosos los grupos de células aglomeradas y células de un tamaño muy por debajo de lo normal. Las combinaciones de luz UV-C y electricidad, en especial cuando se administran al mismo tiempo se observan células agigantadas, aglomeraciones numerosas y una gran cantidad de restos celulares. La presencia de pseudohifas es más numerosa en las muestras expuestas a corriente eléctrica sola, o previa a la exposición a luz UV-C.

TRATAMIENTO	CAMBIOS MORFOLÓGICOS				IMAGEN REPRESENTATIVA
CONTROL		SI	NO	POCOS	OBSERVACIONES
	Pseudohifas	X			Conforme avanzan las generaciones
	Aglomeraciones			X	Conforme avanzan las generaciones
	Cambios de Tamaño		X		
	Vacuolizaciones		X		
	Restos celulares		X		
ELECTRICIDAD	Deformaciones celulares		X		
		SI	NO	POCOS	OBSERVACIONES
	Pseudohifas	X			Con terminación fusiforme
	Aglomeraciones	X			
	Cambios de Tamaño	X			Más pequeñas
	Vacuolizaciones	X			
ELECTRICIDAD/UV	Restos celulares	X			
	Deformaciones celulares			X	Ovaladas
		SI	NO	POCOS	OBSERVACIONES
	Pseudohifas			X	Y cortas
	Aglomeraciones	X			
	Cambios de Tamaño	X			Más pequeñas
UV/ELECTRICIDAD	Vacuolizaciones		X		
	Restos celulares	X			
	Deformaciones celulares		X		
	Pseudohifas		X		
	Aglomeraciones			X	
	Cambios de Tamaño	X			Más grandes y más pequeñas
UV	Vacuolizaciones		X		
	Restos celulares	X			
	Deformaciones celulares			X	Ovaladas
		SI	NO	POCOS	OBSERVACIONES
	Pseudohifas		X		
	Aglomeraciones	X			
ELECTRICIDAD+UV	Cambios de Tamaño	X			Más grandes y más pequeñas
	Vacuolizaciones		X		
	Restos celulares	X			
	Deformaciones celulares			X	Ovaladas
	Pseudohifas			X	Y cortas
	Aglomeraciones	X			

Figura 1: Cambios de morfología y tamaño de *C. albicans* expuestas a los diferentes tratamientos en una solución acuosa. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio óptico (OPTIKA) a 40X.

8.1.1.2 Conteo de UFC/ml en células levaduriformes expuestas a los tratamientos de UV-C y corriente eléctrica

Los conteos de células en cámara de Neubauer, los cuales se realizaron inmediatamente después de los tratamientos con corriente eléctrica y luz UV-C nos muestran que el número de células se ve dramáticamente disminuido (Figura 2).

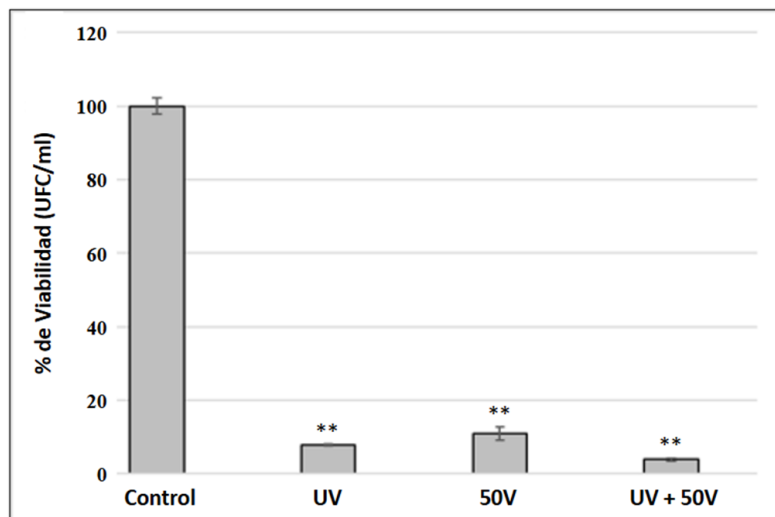


Figura 2: Efecto de los tratamientos de UV-C y electricidad en el número de células levaduriformes de *C. albicans* en medio de cultivo Dextrosa-Sabouraud. (** $p < 0.001$).

En el caso de los tratamientos de 5 minutos con luz UV-C se alcanzó una disminución del 92% de los UFC/ml en comparación con el control sin exposición; el exponer a las levaduras a 50V durante 5 minutos logró que la disminución fuera del 98%; finalmente, el tratamiento más efectivo resultó ser la combinación de ambos tratamientos, UV-C y 50V durante 5 minutos, logrando una disminución de UFC/ml del 96% (Figura 2).

8.2 Ensayos de formación de biopelículas y sensibilidad a antimicóticos

Si bien la exposición directa de todos los tratamientos redujo el número de células presentes, al permitirles reproducirse en condiciones óptimas durante un período de 24

horas, vuelven a alcanzar los números de UFC observados en la muestra control sin tratamiento. En el caso de la medición de biopelículas, posterior a los tratamientos con luz UV-C y corriente eléctrica, solos o combinados, no se pudieron observar cambios que tuvieran significancia estadística al compararlos con el control. En el caso de la sensibilidad a antimicrobianos, sí aumenta en la primera generación, sin embargo, este efecto desaparece en las siguientes resiembras (Tabla 3).

Tabla 3 Comparación de viabilidad entre las diferentes generaciones expuestas a los tratamientos de UV-C y corriente eléctrica.[50]

GENERACIÓN	TRATAMIENTO	VIABILIDAD CELULAR (Absorbancia, longitud de onda)	PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA (Absorbancia, longitud de onda)	SUSCEPTIBILIDAD ($\mu\text{g/mL}$)
1	Control	0.27 $\pm$ 0.0725	0.0698 $\pm$ 0.00474	0.938 $\pm$ 0.469
	Electricidad	0.28 $\pm$ 0.114	0.0681 $\pm$ 0.0131	0.972 $\pm$ 0.329
	Luz UV-C	0.371 $\pm$ 0.115	0.0652 $\pm$ 0.018	0.833 $\pm$ 0.313
	Electricidad/UV-C	0.404 $\pm$ 0.12	0.0654 $\pm$ 0.0197	0.625 $\pm$ 0
	UV/Electricidad	0.377 $\pm$ 0.068	0.067 $\pm$ 0.0172	0.625 $\pm$ 0
	Electricidad+UV-C	0.32 $\pm$ 0.0684	0.0842 $\pm$ 0.0338	0.694 $\pm$ 0.208
5	Control	0.429 $\pm$ 0.136	0.0594 $\pm$ 0.00235	0.625 $\pm$ 0
	Electricidad	0.398 $\pm$ 0.0768	0.0614 $\pm$ 0.0169	0.833 $\pm$ 0.313
	Luz UV-C	0.493 $\pm$ 0.0581	0.0834 $\pm$ 0.0445	0.66 $\pm$ 0.244
	Electricidad/UV-C	0.503 $\pm$ 0.0978	0.0676 $\pm$ 0.0315	0.59 $\pm$ 0.104
	UV/Electricidad	0.483 $\pm$ 0.072	0.0649 $\pm$ 0.0303	0.573 $\pm$ 0.156
	Electricidad+UV-C	0.447 $\pm$ 0.0422	0.0543 $\pm$ 0.0136	0.573 $\pm$ 0.156
10	Control	0.506 $\pm$ 0.0551	0.0636 $\pm$ 0.00773	0.625 $\pm$ 0
	Electricidad	0.472 $\pm$ 0.0492	0.0583 $\pm$ 0.0145	0.625 $\pm$ 0
	Luz UV-C	0.514 $\pm$ 0.0687	0.0516 $\pm$ 0.00445	0.59 $\pm$ 0.104
	Electricidad/UV-C	0.527 $\pm$ 0.0789	0.0534 $\pm$ 0.009	0.625 $\pm$ 0
	UV-C/Electricidad	0.496 $\pm$ 0.0757	0.0533 $\pm$ 0.0102	0.521 $\pm$ 0.156

Electricidad+UV-C	0.422±0.087	0.0596±0.0164	0.694±0.208
-------------------	-------------	---------------	-------------

Viabilidad celular, producción de biopelícula y susceptibilidad en diferentes generaciones y tratamientos utilizando luz UV-C y electricidad. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar para las medidas de absorbancia en viabilidad celular y producción de biopelícula, así como la concentración mínima inhibitoria en microgramos por mililitro para la susceptibilidad.

La electricidad, por sí sola parece aumentar ligeramente la resistencia a Anfotericina B, sin embargo, su combinación con UV-C lograron aumentar la sensibilidad al antimicótico por parte de la cepa estudiada. A largo plazo, la exposición a ambos tratamientos aumenta ligeramente la tasa de crecimiento del microorganismo (Tabla 4).

Tabla 4 Resultados generales de los tratamientos de UV-C y electricidad, promediando todas las muestras analizadas independientemente del número de generación.[50]

TRATAMIENTO	VIABILIDAD CELULAR (Absorbancia, longitud de onda)	PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA (Absorbancia, longitud de onda)	SUSCEPTIBILIDAD ($\mu\text{g/mL}$)
Control	0.4017±0.0879 [*]	0.0643±0.0049	0.7293±0.1563
Electricidad	0.383±0.080 ^δ	0.0626±0.0148	0.81±0.214 [§]
Luz UV-C	0.4593±0.0806 ^δ	0.0667±0.0223	0.6943±0.2203
Electricidad/UV-C	0.478±0.0989 ^{* δ ¶}	0.0621±0.0201	0.6133±0.0347 [§]
UV/Electricidad	0.452±0.0719 ^δ	0.0617±0.0192	0.573±0.104 [§]
Electricidad+UV-C	0.3963±0.0659 [¶]	0.066±0.0213	0.6537±0.1907

Valores promediados de los efectos de los tratamientos combinados de corriente eléctrica y radiación UV-C en *Candida albicans* ATCC 10231. Los datos reflejan la media de tres repeticiones realizadas en tres ocasiones distintas, mostrando la viabilidad celular, la susceptibilidad a Anfotericina-B, la producción de biopelícula y la morfología. Los símbolos (*, δ , ¶) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

Al comparar la evolución de la cepa conforme avanza el número de resiembras, es decir, conforme aumenta el número de generaciones, se refleja una disminución en la viabilidad de las levaduras, la cual es debida al envejecimiento de la cepa. Así mismo, la producción de biopelícula disminuye y la susceptibilidad a antimicóticos aumenta ligeramente (Tabla 5).

Tabla 5 Resultados Agrupados por Generaciones: Impacto de Tratamientos Combinados de Corriente Eléctrica y Radiación UV-C en la Viabilidad Celular de Candida albicans ATCC 10231.[50]

GENERACIÓN	VIABILIDAD CELULAR	PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA	SUSCEPTIBILIDAD
	(Absorbancia, longitud de onda)	(Absorbancia, longitud de onda)	($\mu\text{g/mL}$)
1	$0.337 \pm 0.093^*$	$0.07 \pm 0.0178^{\S}$	$0.7812 \pm 0.2198^{\Re}$
5	$0.4588 \pm 0.0805^*$	0.0652 ± 0.0232	$0.6423 \pm 0.1622^{\Re}$
10	$0.4895 \pm 0.0691^*$	$0.0566 \pm 0.0104^{\S}$	$0.6133 \pm 0.078^{\Re}$

Efectos promedios de los tratamientos combinados de corriente eléctrica y radiación UV-C en Candida albicans ATCC 10231, agrupados por generaciones. Los datos reflejan la media de tres repeticiones realizadas en tres experimentos distintos, evaluando la viabilidad celular, la susceptibilidad a Anfotericina-B, la producción de biopelícula y la morfología. Los símbolos (, δ , $\Re$) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos.*

8.3 Morfología

Las imágenes derivadas de los equipos SEM ilustran las diversas transformaciones morfológicas experimentadas por las células de *Candida albicans* después de los tratamientos. La Fig. 1A representa la muestra control de *C. albicans*, que no fue sometida a ningún tratamiento, presentando por lo tanto una morfología normal. En la Fig. 1B se

muestran celdas que fueron sometidas a una corriente eléctrica (50V), revelando ligeras alteraciones morfológicas; Algunas celdas tienen colapso de la pared. La Fig. 1C muestra células de levadura expuestas a UV-C, mostrando formas irregulares de la levadura y colapso celular. Las células que se muestran en la Fig. 1D se trataron con corriente eléctrica (50V) seguida inmediatamente de UV-C, se observaron paredes celulares rotas, restos celulares y pseudohifas. En el caso de la Fig. 1E, donde las células se trataron primero con UV-C seguido de corriente eléctrica (50 V), el daño a la pared celular, los restos celulares y las pseudohifas es menor. La Fig. 1F exhibe características similares a las Fig. 1B y 1C, pero también incluye paredes celulares rotas y desechos celulares en la muestra.

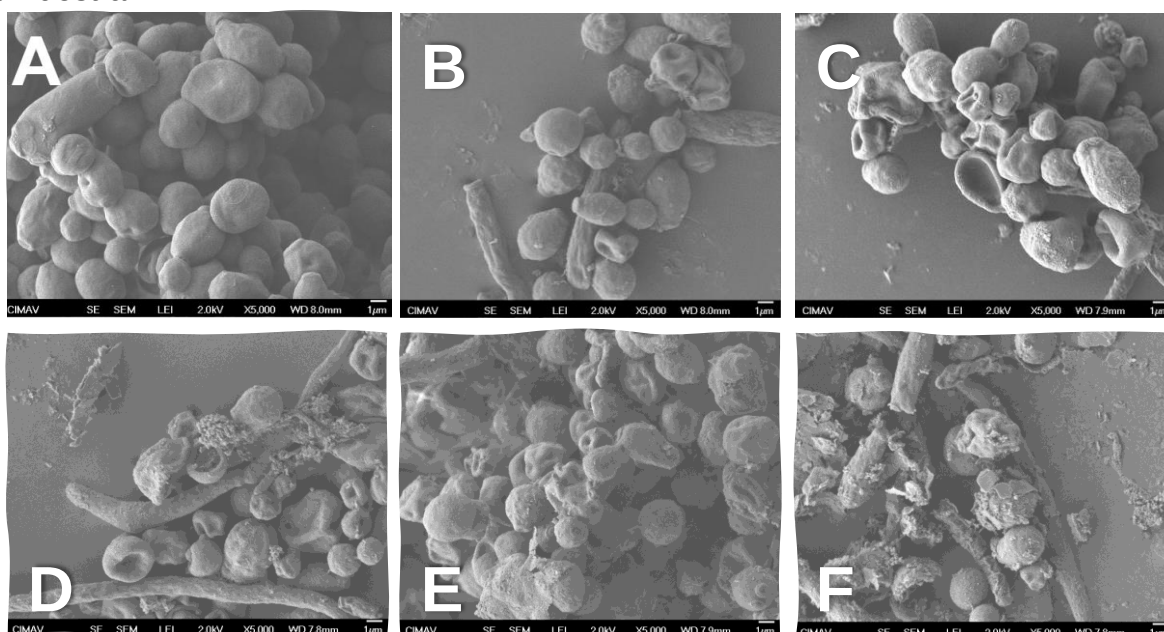


Figura 3 Cambios morfológicos observados en *C. albicans* después de la aplicación de los tratamientos.

A) Morfología de *C. albicans*, muestra testigo. B) Muestra de *C. albicans* expuesta a 5 minutos de corriente de 50V. C) Muestras irradiadas con UV-C durante 5 minutos. D) Muestras de *C. albicans* expuestas a 5 minutos de corriente de 50V seguidas de irradiación con UV-C durante 5 minutos. E) Muestras irradiadas con UV-C durante 5 minutos y luego expuestas a 5 minutos de corriente de 50V F) *C. albicans* expuestos a 5 minutos de UV-C y 50V de corriente eléctrica.

9. DISCUSIÓN

Hasta donde sabemos, es el primer estudio que analiza los efectos del uso de corriente eléctrica y UV-C combinados y su aplicación en secuencia. Encontramos que es una estrategia que influye directamente en la morfología de *Candida albicans* sin causar cambios significativos en su viabilidad, producción de biopelículas y resistencia a la anfotericina B.

Al exponer las células de *Candida albicans* a tratamientos de electricidad y UV-C pudimos notar que un análisis en una cámara de Neubauer en el microscopio óptico mostraba un número de células muy inferior a las que se podían observar en el control sin tratamiento, llegando a contar UFC por debajo del 92% en el caso de la corriente eléctrica, 96% en el caso de la luz UV, y también fue posible observar un sinergismo entre los dos tratamientos, logrando un número de UFC 98% menor. Considerando que el voltaje utilizado fue bajo (50 V) y el tiempo de exposición muy corto la inhibición fue mayor a la esperada, mientras que en el caso de la luz UV ya se han reportado inhibiciones del 100% en períodos menores a 30 minutos [55], sin embargo, para que esta condición se cumpla, la humedad presente debe de ser muy baja, ya que el mismo medio de cultivo líquido puede proteger a las células de la radiación UV-C debido a la alta turbidez de la muestra [56]. Por otro lado, el sinergismo de ambos tratamientos era un resultado esperado, ya que al combinar los mecanismos de inhibición de la luz UV (estrés oxidativo, generación de ozono, degradación de biomoléculas) con el de la corriente eléctrica (hipertermia, electroporación) [57] generó restos celulares muy visibles incluso por medio de la microscopía óptica (Figura 1).

Aún al permitir que las células se reprodujeran en un ambiente favorable, con los nutrientes ideales y la temperatura adecuada, se esperaba que el número de las UFC presentes en el control fuera mayor al de los tratamientos, ya que el número inicial de células era mucho menor en las muestras expuestas a UV-C y corriente eléctrica,



como se explicó en el párrafo anterior, sin embargo esto no fue así, el número de células siempre fue mayor, sin importar el tipo de tratamiento o el orden en que se presentaron al de las células no expuestas. Esto podría deberse a que las células al ser expuestas a un ambiente hostil hayan acelerado su ciclo de vida, sin embargo, esto solamente podrá comprobarse en futuros estudios en los cuales se analice la expresión de los genes involucrados en dicho proceso.

Siguiendo con la lógica expuesta en el párrafo anterior, la formación de biopelículas también puede deberse a un estímulo hostil presente en el medio ambiente [58], sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la formación de biopelícula no se vio afectado de manera significativa y no es hasta la décima generación en que se puede notar una disminución en su producción bajo el efecto de la luz UV-C. De manera que para entender este proceso sería necesario analizar la expresión de genes relacionados a la formación de biopelículas, ya que esta falta de respuesta, opuesta al aumento de viabilidad, podría deberse a la inhibición específica de dichos genes.

La sensibilidad a los compuestos antimicrobianos puede aumentar al exponer a los microorganismos a tratamientos de corriente eléctrica [59], por lo que el resultado obtenido en la primera regeneración podía anticiparse; dos de los tratamientos que involucraron corriente eléctrica mostraron que estadísticamente hablando existe un aumento de sensibilidad en comparación con el control sin tratamiento. Los reportes que hablan de un aumento en la sensibilidad manejan voltajes muy elevados o tiempos de exposición prolongados, por lo que podría ser el motivo por el cual en este estudio no se vieron diferencias en los tratamientos que solamente involucra exposición a corriente eléctrica. No existen reportes concluyentes que hablen de un aumento en la sensibilidad provocado por la luz UV, por lo que no sorprende que no haya generado un cambio, sin embargo, en la primera generación, los únicos tratamientos relevantes involucran a ambos tratamientos de manera secuencial, a pesar de que la combinación de electricidad y UV tampoco generaron un cambio



perceptible. En este caso se recomienda aumentar el tiempo de exposición de corriente eléctrica para buscar un aumento de sensibilidad a los antimicóticos.

En cuanto a los resultados de viabilidad, producción de biofilm y resistencia antifúngica observados tras la aplicación de los tratamientos separados, no se encontraron diferencias significativas en nuestro estudio. No podemos hacer una comparación directa de nuestros resultados con otros estudios como los de Li et al. 2010, Shim et al. 2011, Parry-Nweye et al. 2019, Tapia-Guerrero et al. 2020, Lee et al. 2021, o Santos y de Castro en 2020 porque todos estos estudios aplican tratamientos de corriente eléctrica o de radiación UV con el objetivo de una esterilización completa, midiendo la eficacia posteriormente [28,29]. Nuestra metodología utiliza siempre tratamientos subletales para analizar la respuesta de las células supervivientes.

Con respecto a los resultados obtenidos por medio de la microscopía SEM, podemos observar que los cambios en la morfología y el daño estructural observados tras la aplicación del tratamiento de corriente eléctrica por separado son similares a los identificados por Parry-Nweye [28], aunque los voltajes en este estudio son menores y los tiempos son más largos que los utilizados en nuestro trabajo. Un caso similar ocurrió con los resultados de Li y colaboradores en 2010 sobre el daño celular causado después de la aplicación de UV-LED. Si bien, hay reportes de que la luz UV tiende a deshidratar a las células levaduriformes [57], hay pocos reportes con respecto a los efectos de la corriente eléctrica en la morfología de *C. albicans*; los resultados obtenidos muestran una tendencia a generar un exudado extracelular, y también se ve un número mayor de pseudohifas, lo cual sería consistente con la función de dicha estructura, ya que además de estar relacionada con la formación de biopelículas, también se pueden observar en situaciones en las cuales las células se ven expuestas a situaciones adversas [60]. Desde las primeras etapas del estudio, en las que se analizaron las muestras por microscopía óptica de campo claro, se observó que las muestras expuestas a ambos tratamientos al mismo tiempo tienden



a generar una gran cantidad de restos celulares, lo cual se confirmó por medio de la microscopía electrónica, la sinergia obtenida al mezclar ambos tratamientos es tan agresiva que destruye a las levaduras sin darles tiempo a degradarse paulatinamente, por lo que son visibles estructuras que podrían ser restos de la paredes celulares.

Las expectativas para futuros estudios se centran en dar continuidad a la explicación de los mecanismos de respuesta celular por medio de la medición de la expresión génica que involucra a los factores de virulencia relacionados a la generación de biopelículas y de resistencia a antimicrobianos; sin embargo, también podría ser esclarecedor estudiar los genes relacionados a la regulación del ciclo celular. También se recomienda prolongar la exposición de las células a corriente eléctrica para poder medir cambios en la sensibilidad a antimicóticos, así como aumentar la variedad de compuestos a probar.

10. CONCLUSIONES

Desde nuestra perspectiva, nuestro estudio proporciona evidencia convincente de que la aplicación de corriente eléctrica y luz UV-C puede inducir cambios morfológicos en *Candida albicans*. Curiosamente, estas alteraciones no afectan significativamente la viabilidad del organismo, la capacidad de formar biopelículas o la resistencia a los agentes antifúngicos. Esto sugiere que, si bien el tratamiento puede modificar las características físicas de la levadura, no afecta negativamente su supervivencia o sus capacidades defensivas en el corto plazo. Si bien, se lograron porcentajes de inhibición importantes, es importante tener en consideración que siempre existe la posibilidad de que un número de células pueden sobrevivir a los tratamientos, por lo que es importante analizar las respuestas de adaptación del microorganismo, por lo que se considera positivo el hecho de que no se hayan detectado cambios abruptos que pudieran sugerir que *Candida albicans* se esté adaptando a los tratamientos utilizados. Este hallazgo podría tener implicaciones



importantes para futuras investigaciones y estrategias de tratamiento dirigidas a *Candida albicans*.

11. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

Este trabajo se deriva de un proyecto general con el título “**PELÍCULAS DELGADAS SEMICONDUCTORAS Y FOTOCATALÍTICAS COMO RECUBRIMIENTO DESINFECTANTE DE AMPLIO ESPECTRO ACTIVADO POR CORRIENTE ELÉCTRICA Y POR RADIACIÓN UV**” registrado ante secretaría de investigación y posgrado de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua con el número interno **CI-062-19**.

El presente protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas con número de registro **CI-044-22**

El manejo adecuado de las cepas resistentes con las que se trabajaron se apega a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 sobre la protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y especificaciones de manejo.



12. ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

12.1 Programa de trabajo

La Tabla 6 presentada a continuación muestra el plan de trabajo y el semestre durante el cual está programado la realización de cada actividad.

Tabla 6 Cronograma

ACTIVIDAD	1ER SEM AGO- DIC 2022	2DO SEM ENE- JUN 2023	3ER SEM AGO- DIC 2023	4TO SEM ENE- JUN 2024
PROPUESTA DE ANTEPROYECTO				
ANÁLISIS DE LA LITERATURA ACTUAL				
ENSAYOS DE VIABILIDAD DE CELULAS <i>C. albicans</i> CONTRA CORRIENTE ELÉCTRICA Y LUZ UV-C				
PRUEBAS DE PRODUCCIÓN DE BIOPELICULA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICÓTICOS				
ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS				
ANÁLISIS DE RESULTADOS				
REDACCIÓN DE TESIS				

12.2 Recursos humanos

Este proyecto fue realizado por Q.B.P. Venecia Jazmín Ruelas Casas, bajo la dirección del Doctor en Ciencias Carlos Arzate Quintana, en colaboración con el siguiente comité:

Directora Externa: D.C. Claudia Adriana Ramírez Valdespino (CIMAV)

Asesora: D.C. Alva Rocío Castillo González



Asesora: D.C. Susana Aidée González Chávez

Asesora Externa: D.C. Diana Caballero Hernández (UANL)

12.3 Recursos materiales

- Agar y caldo Sabouraud
- Agua destilada
- MTT
- DMSO
- PBS 1X
- Cristal violeta 1%
- Etanol (70%, 80%, 85%, 95%, absoluto)
- Glutaraldehído 2.5%
- Tubos de Grafito #2
- Cajas Petri de vidrio
- Cajas Petri de plástico
- Tubos de vidrio de cultivo con tapa
- Tubos de vidrio de cultivo sin tapa
- Placas de 96 pozos
- Micropipetas 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L
- Puntillas 10 μ L, 100 μ L, 1000 μ L
- Tubos eppendorf 1.5mL
- Parafilm
- Papel filtro
- Incubadora (FE-132; FELISA)
- Lector de microplacas (BIO-RAD iMark)
- Campana de bioseguridad nivel 2 (Purifier Biological Safety Cabinet; LABCONCO Logic)
- Centrífuga (accuSpin Micro 17; Fisher Scientific)
- Microscopio óptico (OPTIKA)
- Equipo de desinfección UV (EsteriUV modelo CO1013)
- Espectrofotómetro (JUNIOR Model 35; PERKIN ELMER)
- Fuente de poder (PowerEase 90W)

12.4 Fuente de financiamiento

Interna en especie, Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la UACH

12.5 Lugar en donde se realizará la investigación



Lugar: Laboratorio de Biomateriales y laboratorio de Bioingeniería de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la UACH

13. REFERENCIAS

1. Pardi G, Cardozo EI. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal [Internet]. 2002 [citado el 13 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2002/1/art-2/>
2. Jung IY, Jeong SJ, Kim YK, Kim HY, Song YG, Kim JM, et al. A multicenter retrospective analysis of the antifungal susceptibility patterns of *Candida* species and the predictive factors of mortality in South Korean patients with candidemia. *Medicine* (Baltimore). marzo de 2020;99(11):e19494.
3. López-Ávila K, Dzúl-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Bioméd* [Internet]. el 5 de septiembre de 2016 [citado el 11 de septiembre de 2022];27(3). Disponible en: <http://revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/541>
4. Rojas AE, Pérez JE, Hernández JS, Zapata Y. Análisis cuantitativo de la expresión de genes de resistencia a fluconazol en cepas de *Candida albicans* aisladas al ingreso de adultos mayores a una unidad de cuidados intensivos de Manizales, Colombia. *Biomédica*. el 1 de marzo de 2020;40(1):153–65.
5. El Khoury P, Awad A, Wex B, Khalaf RA. Proteomic analysis of a *Candida albicans* pir32 null strain reveals proteins involved in adhesion, filamentation and virulence. *Bahn* YS, editor. *PLOS ONE*. el 19 de marzo de 2018;13(3):e0194403.



6. Jalal M, Ansari MA, Alzohairy MA, Ali SG, Khan HM, Almatroudi A, et al. AntiCandidal activity of biosynthesized silver nanoparticles: effect on growth, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida* species. Int J Nanomedicine. junio de 2019;Volume 14:4667–79.
7. Guzmán GM, Ramírez LC, Andrade FS, García AAM, Roldán EIC. Análisis morfológico de biopelículas de *Candida albicans* producidas en diferentes condiciones de pH y temperatura analizadas por microscopía óptica y de fuerza atómica. 2011;5.
8. Del Pozo JL, Cantón E. Candidiasis asociada a biopelículas. Rev Iberoam Micol. julio de 2016;33(3):176–83.
9. Mba IE, Nweze EI. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. octubre de 2020;39(10):1797–819.
10. Shi C, Liu J, Li W, Zhao Y, Meng L, Xiang M. Expression of fluconazole resistance-associated genes in biofilm from 23 clinical isolates of *Candida albicans*. Braz J Microbiol. enero de 2019;50(1):157–63.
11. Bassetti M, Poulakou G, Ruppe E, Bouza E, Van Hal SJ, Brink A. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. Intensive Care Med. octubre de 2017;43(10):1464–75.
12. Koehler P, Stecher M, Cornely OA, Koehler D, Vehreschild MJGT, Bohlius J, et al. Morbidity and mortality of *Candidaemia* in Europe: an epidemiologic meta-analysis. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. octubre de 2019;25(10):1200–12.
13. Jenks JD, Cornely OA, Chen SC -A., Thompson GR, Hoenigl M. Breakthrough invasive fungal infections: Who is at risk? Mycoses. octubre de 2020;63(10):1021–32.



14. Mora S, Giacobbe DR, Russo C, Diana E, Signori A, Carmisciano L, et al. A Wide Database for Future Studies Aimed at Improving Early Recognition of Candidemia. *Stud Health Technol Inform.* el 27 de mayo de 2021;281:1081–2.
15. Shekatkar M, Kheur S, Gupta AA, Arora A, Raj AT, Patil S, et al. Oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients under highly active antiretroviral therapy. *Dis Mon.* septiembre de 2021;67(9):101169.
16. Pavlova A, Sharafutdinov I. Recognition of *Candida albicans* and Role of Innate Type 17 Immunity in Oral Candidiasis. *Microorganisms.* el 2 de septiembre de 2020;8(9):E1340.
17. Wiederhold NP. Emerging Fungal Infections: New Species, New Names, and Antifungal Resistance. *Clin Chem.* el 30 de diciembre de 2021;68(1):83–90.
18. Banerjee A, Pata J, Sharma S, Monk BC, Falson P, Prasad R. Directed Mutational Strategies Reveal Drug Binding and Transport by the MDR Transporters of *Candida albicans*. *J Fungi Basel Switz.* el 20 de enero de 2021;7(2):68.
19. Coşkun AS, Durmaz ŞÖ. Fungal Infections in COVID-19 Intensive Care Patients. *Pol J Microbiol.* septiembre de 2021;70(3):395–400.
20. Ahmad M, Khan AU. Global economic impact of antibiotic resistance: A review. *J Glob Antimicrob Resist.* diciembre de 2019;19:313–6.
21. Serra-Burriel M, Keys M, Campillo-Artero C, Agodi A, Barchitta M, Gikas A, et al. Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis. *PloS One.* 2020;15(1):e0227139.



22. Calbo E, Boix-Palop L, Garau J. Clinical and economic impact of bacterial resistance: an approach to infection control and antimicrobial stewardship solutions. *Curr Opin Infect Dis.* diciembre de 2020;33(6):458–63.
23. Garcia-Carpintero EE, Cárdena-Arranz M, Sanchez-Gomez LM. Revisión bibliográfica sobre eficacia y seguridad de la luz ultravioleta y ozono para la desinfección de superficies. 2020 [citado el 14 de septiembre de 2022]; Disponible en: <https://repisalud.isciii.es/handle/20.500.12105/10618>
24. Briones Cando NA. Luz ultravioleta para desinfección en áreas de salud, frente al covid-19. revisión de literatura. *Odontol Act Rev Científica.* el 2 de septiembre de 2020;5(3):111–8.
25. Lecam MS. Análisis del uso de desinfección con luz UV-C para reutilización de elementos de protección respiratoria. 2020;12.
26. Correa M, Mera S, Guacho F, Villarreal E, Valencia S. Desinfección mediante el uso de luz UV-C germicida en diferentes medios como estrategia preventiva ante la COVID-19. *Minerva.* el 9 de agosto de 2020;1(2):46–53.
27. Saldaña G, Álvarez I, Condón S, Raso J. Microbiological Aspects Related to the Feasibility of PEF Technology for Food Pasteurization. *Crit Rev Food Sci Nutr.* el 2 de noviembre de 2014;54(11):1415–26.
28. Parry-Nweye E, Onukwugha NE, Balmuri SR, Shane JL, Kim D, Koo H, et al. Electrochemical Strategy for Eradicating Fluconazole-Tolerant *Candida albicans* Using Implantable Titanium. *ACS Appl Mater Interfaces.* el 6 de noviembre de 2019;11(44):40997–1008.



29. Lee MH, Jeong H, Koo M, Seon GM, Hong SH, Park YJ, et al. Sterilization of sealed PVDF pouches containing decellularized scaffold by electrical stimulation. *Biotechnol J.* noviembre de 2021;16(11):2100156.
30. Batista Napotnik T, Reberšek M, Vernier PT, Mali B, Miklavčič D. Effects of high voltage nanosecond electric pulses on eukaryotic cells (in vitro): A systematic review. *Bioelectrochemistry.* agosto de 2016;110:1–12.
31. Morotomi-Yano K, Akiyama H, Yano K ichi. Different involvement of extracellular calcium in two modes of cell death induced by nanosecond pulsed electric fields. *Arch Biochem Biophys.* agosto de 2014;555–556:47–54.
32. Shim S, Hong SH, Tak Y, Yoon J. Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion by electric currents. *Biofouling.* el 27 de enero de 2011;27(2):217–24.
33. Tapia-Guerrero YS, Del Prado-Audelo ML, Borbolla-Jiménez FV, Gomez DMG, García-Aguirre I, Colín-Castro CA, et al. Effect of UV and Gamma Irradiation Sterilization Processes in the Properties of Different Polymeric Nanoparticles for Biomedical Applications. *Mater Basel Switz.* el 1 de marzo de 2020;13(5):E1090.
34. Bassetti M, Poulakou G, Ruppe E, Bouza E, Van Hal SJ, Brink A. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. *Intensive Care Med.* octubre de 2017;43(10):1464–75.
35. Olaechea PM, Insausti J, Blanco A, Luque P. Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. *Med Intensiva.* mayo de 2010;34(4):256–67.
36. Singh SB, Young K, Silver LL. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochem Pharmacol.* el 1 de junio de 2017;133:63–73.



37. Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 1995;39(9):2128–31.
38. Jain SK, Lamichhane G, Nimmagadda S, Pomper MG, Bishai WR. Antibiotic treatment of tuberculosis: Old problems, new solutions. *Microbe.* junio de 2008;3(6):285–92.
39. M. H. Badii, Rodríguez MC, Wong A, Villalpando P. Diseños experimentales e investigación científica. *Innovaciones Negocios [Internet].* 2007 [citado el 24 de octubre de 2022];4(8). Disponible en: <https://revistainnovaciones.uanl.mx/index.php/revin/article/view/190>
40. Casler MD. Fundamentals of Experimental Design: Guidelines for Designing Successful Experiments. *Agron J.* marzo de 2015;107(2):692–705.
41. Gabriel J, Castro C, Valverde A, Indacochea B. Diseños experimentales: Teoría y práctica para experimentos agropecuarios. 1era ed. Jipijapa, Ecuador: Grupo Compás; 2017. 146 p.
42. Ibarra-Trujillo C, Villar-Vidal M, Gaitán-Cepeda LA, Pozos-Guillen A, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas LO. Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Rev Iberoam Micol.* el 1 de octubre de 2012;29(4):214–22.
43. Jafarian H, Gharaghani M, Seyedian SS, Mahmoudabadi AZ. Genotyping, antifungal susceptibility, enzymatic activity, and phenotypic variation in *Candida albicans* from esophageal candidiasis. *J Clin Lab Anal.* julio de 2021;35(7):e23826.
44. Díaz A. Diseño estadístico de experimentos 2a Ed. Universidad de Antioquia; 2009. 300 p.



45. Rodríguez-Tudela JL, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Denning D, et al. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Clin Microbiol Infect. agosto de 2003;9(8):i–viii.
46. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harb Protoc. junio de 2018;2018(6):pdb.prot095505.
47. Fritsch LN, Dias ALT, Silva NC, Fernandes GJM, Ribeiro FB de AO. Comparative analysis of biofilm formation by *Candida albicans* and *Candida krusei* in different types of contact lenses. Arq Bras Oftalmol. el 10 de septiembre de 2021;85:235–9.
48. Sadanandan B, Vaniyamparambath V, Lokesh KN, Shetty K, Joglekar AP, Ashrit P, et al. *Candida albicans* biofilm formation and growth optimization for functional studies using response surface methodology. J Appl Microbiol. el 1 de abril de 2022;132(4):3277–92.
49. Carlos AQ, Blanca SR, Rocío IR, Amelia PCH, Lorena MFS, Alberto DM, et al. Toxicity Effects in Pathogen Microorganisms Exposed to Silver Nanoparticles. Nanosci Nanotechnol Lett. el 1 de febrero de 2017;9(2):165–73.
50. The jamovi project [Internet]. 2024. Disponible en: <https://www.jamovi.org>
51. The jamovi Project; 2024. *jamovi*. (Version 2.5) [Computer Software Disponible en: <https://www.jamovi.org>.
52. R Core Team; 2023. *R: A Language and environment for statistical computing*. (Version 4.3) [Computer software]. Disponible en: <https://cran.r-project.org>. (R packages retrieved from CRAN snapshot 2024-01-09).



53. Singmann, H.; 2023. *afex: Analysis of Factorial Experiments*. [R package]. Disponible en: <https://cran.r-project.org/package=afex>.
54. Lenth, R.; 2023. *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means*. [R package]. Disponible en: <https://cran.r-project.org/package=emmeans>.
55. Schleusener J, Lohan SB, Busch L, Ghoreschi K, Ploch NL, May S, Vogel S, Eberle J, Meinke MC. 2023. Treatment of the Candida subspecies Candida albicans and Candida parapsilosis with two far-UV-C sources to minimise mycoses in clinical practice. *Mycoses*, Volume66, Issue1. pp 25-28. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/myc.13521>
56. Rossel-Bernedo LJ, Rossel-Bernedo LA, Ferro-Mayhua FP, Ferro-Gonzales A & Zapana-Quispe RR. 2020. Radiación ultravioleta-c para desinfección bacteriana (coliformes totales y termotolerantes) en el tratamiento de agua potable. *Journal of High Andean Research*, 2020; 22(1): 68-77 VOL 22 Nº 1, pp 68-77. Disponible en <https://huajsapata.unap.edu.pe/index.php/ria/article/view/67/53>
57. Alejandro Faudoa-Arzate, Javier Camarillo-Cisneros, Alva Rocío Castillo-González, María Alejandra Favila-Pérez, Renee Joselin Sáenz-Hernández, Paula Rebeca Realyvazquez-Guevara, and Carlos Arzate-Quintana. 2021. Disinfection mechanism of the photocatalytic activity of SnO₂ thin films against Candida albicans, proposed from experimental and simulated perspectives. *Canadian Journal of Microbiology*. 67(9): 667-676. Disponible en <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0559>
58. Abrantes P, Behardien K and Africa CWJ. 2022. Real-time Assessment of Interspecies Candida Biofilm Formation. *The Open Microbiology Journal*, 2022, Volume 16. Disponible en <https://openmicrobiologyjournal.com/VOLUME/16/ELOCATOR/e187428582211230/>
59. del Pozo JLRouse MSMandrekar JN, Sampedro MFSteckelberg JM, Patel R 2009. Effect of Electrical Current on the Activities of Antimicrobial Agents against



Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. Antimicrob Agents Chemother 53. Disponible en <https://doi.org/10.1128/aac.00237-08>

60. Arkowitz RA and Bassilana M. Recent advances in understanding *Candida albicans* hyphal growth [version 1; peer review: 4 approved]. F1000Research 2019, 8(F1000 Faculty Rev):700. Disponible en <https://doi.org/10.12688/f1000research.18546.1>