

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

EFFECTO DEL TRATAMIENTO FOTODINÁMICO CON AZUL DE TOLUIDINA  
O EN BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE  
PACIENTES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO  
“ANTONIO PATRICIO DE ALCALÁ”  
(Modalidad: Tesis de Grado)

MARÍA VICTORIA FIGUERAS BELMONTE

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2012

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN .....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	10
Población y muestra .....	10
Viabilidad y Confirmación de las cepas .....	10
Preparación de los inóculos.....	10
Determinación de la presencia de exopolisacárido en la formación de biopelícula a través de la adherencia al rojo Congo.....	11
Formación de biopelícula en microplaca.....	11
Aplicación del tratamiento fotodinámico de las biopelículas formadas en la microplaca .....	12
Observación de las biopelículas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	14
Análisis estadístico .....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	15
CONCLUSIONES.....	41
RECOMENDACIONES .....	42
BIBLIOGRAFÍA .....	43
APÉNDICE .....	53
HOJA DE METADATOS.....	54

## DEDICATORIA

A

Dios todopoderoso, espíritu divino que me ha guiado todos los días de mi vida y me ha permitido lograr mis metas.

Toda mi familia...

Mis padres Benilde y Antonio por todo lo que han hecho por mí, por todo su amor y apoyo sin la cual jamás habría podido terminar este trabajo.

Mis hermanos: Gabriela, Tony, tíos: Berthalina, William y Avelina por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

Mis abuelos Florvidea, María y Sabás, tías Cándida y Ligia, quienes descansan en la paz del Señor, y a mi abuelo Roberto Moreno a quien el Señor decidió llevárselo tan inesperadamente de nuestro lado. Sé que desde el cielo me ayudan y guían en el camino de la vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A

La profesora Dina Antón por tomarse el tiempo de brindarme su asesoría con gran cariño e interés.

El profesor Marcos De Donato por su gran aporte y colaboración en este trabajo.

Los TSU José Luís Prin y Milagros Moreno por su valiosísima ayuda y cooperación en la realización de la parte experimental de este trabajo.

El profesor Erghys Franco por su disposición y gran amabilidad que me permitió culminar esta investigación.

Mis compañeras del laboratorio Samía Small, Aura Nazareth, Olymar Marchán, Johana Mosquera y Edith Alfonzo con quienes compartí gratos momentos en su compañía.

A todos muchas gracias!

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fenotipos de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes hospitalizados obtenidos a partir de la siembra en agar tripticasa de soja suplementado con 0,02% de rojo Congo. ....	16
Tabla 2. Significancia estadística de las biopelículas sometidas a radiación láser.....	23
Tabla 3. Significancia estadística de las biopelículas sometidas a concentraciones de azul de toluidina O. ....	25
Tabla 4. Significancia estadística de las biopelículas sometidas a tratamiento fotodinámico con 2 y 4 min de radiación. ....	27

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Producción de exopolisacárido en cepas de *P. aeruginosa* cultivadas en agar tripticasa de soja suplementado con 0,02% de rojo Congo. A) Cepa Pa14 productora de exopolisacárido. B) Cepa Pa1 no productora de exopolisacárido. .... 15
- Figura 2. Estimación de la biomasa celular en base a las densidades ópticas de las cepas de *P. aeruginosa* cultivadas en la microplaca de poliestireno durante 24 h a 37°C. C: control negativo. DOC= 0,08. Las barras representan el valor promedio de las tres lecturas de DO546 que se obtuvieron para cada cepa. .... 19
- Figura 3. Estimación de la formación de biopelículas por cepas de *P. aeruginosa* cultivadas en microplaca de poliestireno por 24 h a 37°C coloreadas con cristal violeta. C: control negativo. DOC= 0,08. Productora débil de biopelícula:  $DO \leq 0,16$ , moderada:  $0,16 < DO \leq 0,32$  y fuerte:  $DO > 0,32$ . Las barras representan el valor promedio de las tres lecturas de DOCV546 que se obtuvieron para cada cepa. .... 20
- 10 ..... 22
- Figura 4. Efecto de la radiación láser durante 2 y 4 min en la cuenta de viables de las cepas correspondientes a las biopelículas de *P. aeruginosa* con respecto a sus controles. UFC: unidades formadoras de colonias. .... 22
- Figura 5. Efecto de las concentraciones de azul de toluidina O en la cuenta de viables de las cepas correspondientes a las biopelículas de *P. aeruginosa* con respecto a sus controles. UFC: unidades formadoras de colonias..... 24
- Figura 6. Efecto del tratamiento fotodinámico con las concentraciones de azul de toluidina O en combinación con radiación láser durante 2 y 4 min

en la cuenta de viables de las cepas correspondientes a las biopelículas de *P. aeruginosa*. A) Pa21. B) Pa22. C) Pa23. D) Pa24. UFC: unidades formadoras de colonias..... 26

Figura 7. Efecto del tratamiento fotodinámico con las concentraciones de azul de toluidina O en combinación con radiación láser durante 2 y 4 min en la cuenta de viables de la cepa Pa20 correspondiente a la biopelícula de *P. aeruginosa*. UFC: unidades formadoras de colonias..... 28

Figura 8. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de las biopelículas de *P. aeruginosa* formadas por la cepa Pa24 sin tratamiento fotodinámico. A) imagen a 2,5  $\mu\text{m}$ . B) imagen a 1  $\mu\text{m}$ . ( ): microcolonias, ( ): exopolisacárido, ( ): bacilos. .... 30

Figura 9. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de las biopelículas de *P. aeruginosa* formadas por la cepa Pa24 tratadas con radiación. A y A1) control experimental a 2 min. B y B1) control experimental a 4 min. ( ): microcolonias, ( ): exopolisacárido, ( ): bacilos. .... 31

Figura 10. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de las biopelículas de *P. aeruginosa* formadas por la cepa Pa24 tratadas con azul de toluidina O. A y A1) 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. B y B1) 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. C y C1) 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. D y D1) 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. ( ): microcolonias, ( ): exopolisacárido, ( ): bacilos, ( ): pili..... 32

Figura 11. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de las biopelículas de *P. aeruginosa* formadas por la cepa Pa24 con tratamiento fotodinámico correspondiente a las concentraciones de azul de toluidina O en combinación con radiación láser durante 2 min. A y A1) 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. B y B1) 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. C y C1) 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. D y D1) 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. ( ): microcolonias, ( ): exopolisacárido, ( ): bacilos, ( ): pili..... 34

Figura 12. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de las biopelículas de *P. aeruginosa* formadas por la cepa Pa24 con tratamiento fotodinámico correspondiente a las concentraciones de azul de toluidina O en combinación con radiación láser durante 4 min. A y A1) 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. B y B1) 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. C y C1) 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. D y D1) 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. ( ): microcolonias, ( ): exopolisacárido, ( ): bacilos. .... 35



## RESUMEN

Se evaluó el efecto del tratamiento fotodinámico (TFD) en cepas de *P. aeruginosa* formadoras de biopelículas. A 26 aislados de *P. aeruginosa* provenientes de muestras clínicas se les determinó la presencia de exopolisacárido para la formación de estas comunidades microbianas a través de la siembra en agar tripticasa de soja suplementado con 0,02% del indicador rojo Congo y la formación de biopelículas se determinó mediante la prueba cuantitativa de microplaca. Las cepas con mayor capacidad de formar biopelículas se sometieron a diferentes concentraciones de azul de toluidina O (25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y a radiación con un láser de Helio-Neón en tiempos de 2 y 4 min. El TFD se aplicó en las biopelículas usando las diversas concentraciones del colorante en combinación con el láser en los dos tiempos señalados. El efecto del tratamiento se evaluó a través del conteo de unidades formadoras de colonias y con microscopía electrónica de barrido (MEB) para visualizar alguna alteración en la morfología de las biopelículas. A través del método de rojo Congo se obtuvieron 18 cepas (69,23%) productoras de exopolisacárido (fenotipo colonias blanco-rosadas) y 8 (30,77%) no productoras de exopolisacárido (fenotipo colonias rojas). En la prueba de microplaca todas las cepas formaron biopelículas fuertes, evidenciada por la presencia de anillos adheridos a las paredes de los pocillos teñidos con cristal violeta. El uso de la radiación láser y las concentraciones del colorante de manera independiente no tuvieron un efecto marcado sobre la disminución de la viabilidad de las bacterias. El TFD en las biopelículas fue más efectivo a medida que se incrementaron las concentraciones del colorante y los tiempos de radiación. El tratamiento más eficaz fue la combinación de las diferentes concentraciones de azul de toluidina O con un tiempo de radiación de 4 min, donde se obtuvo una mayor reducción en los contajes de células con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) en 4 de las 5 cepas tratadas. El estudio con MEB mostró la presencia de biopelículas con abundante exopolisacárido rodeando las microcolonias, bacilos aislados y agregados y pilis. Se evidenció que las micrografías de MEB correspondientes a las biopelículas tratadas con radiación y con las concentraciones del colorante no presentaron alteraciones, mientras que con la concentración de 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  del fotosensibilizador con 4 min de radiación las biopelículas presentaron alteraciones tales como disgregación de exopolisacárido y reducción de la formación de las microcolonias. Estos resultados demuestran que el TFD podría representar en un futuro una opción viable adicional al tratamiento con antimicrobianos para combatir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*.

## INTRODUCCIÓN

Las biopelículas son comunidades de microorganismos irreversiblemente adheridas a una superficie que producen una matriz de exopolisacárido y exhiben un estado metabólico alterado en comparación al crecimiento planctónico correspondiente, principalmente con respecto a la transcripción y las interacciones entre las células (Lindsay y Holy, 2006). Particularmente, la interfase aire-líquido proporciona un entorno ideal para la fijación y crecimiento de microorganismos (Sanderson *et al.*, 2006). Éstas constituyen una forma de crecimiento protegida que permite la supervivencia de las bacterias en un medio adverso (Costerton *et al.*, 1999). Aunque la composición de la biopelícula es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97,00% del contenido total. Presenta también microcanales por los cuales circulan agua y nutrientes, además la matriz de la biopelícula es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos (Sutherland, 2001). En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN) y diversos productos procedentes de la lisis de las bacterias (Branda *et al.*, 2005).

La capacidad de formar biopelículas no parece restringirse a ningún grupo específico de microorganismos y, en la actualidad, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas la inmensa mayoría de las bacterias, independientemente de la especie, puede existir dentro de biopelículas (Anderl *et al.*, 2000; Chole y Faddis, 2003; Post *et al.*, 2004; Thomas y Nakaishi, 2006). Entre las bacterias capaces de formar biopelículas, se encuentran: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*,

*Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Streptococcus mutans* (Mandell *et al.*, 2000; O'Toole *et al.*, 2000; Koneman *et al.*, 2008).

El crecimiento sésil depende de la interacción entre varios factores de la superficie bacteriana y el sustrato, además del medio ambiente que los rodea. Generalmente las superficies son acondicionadas con una fina película de moléculas orgánicas que pueden ser atractivas a los sistemas quimiotáctiles bacterianos y permitir el desarrollo de la biopelícula (Reisner *et al.*, 2005; Vila *et al.*, 2008).

Tras el acondicionamiento de la superficie ocurre la deposición y adhesión reversible de las células bacterianas. Ese fenómeno ocurre pasivamente por movimiento browniano y simple sedimentación o por movimiento activo de bacterias flageladas lo que permite el establecimiento de interacciones físicas y electrostáticas entre la superficie bacteriana y el sustrato (Lindsay y Holy, 2006; Tenke *et al.*, 2006). Conviene resaltar que la interacción inicial entre las bacterias y superficies inertes, como material protésico, puede ocurrir tanto sobre material virgen como sobre material recubierto con macromoléculas derivadas del hospedador (Vila *et al.*, 2008). Sin embargo, macromoléculas de los fluidos corporales se adsorben extremadamente rápido sobre los materiales implantados en el cuerpo formando la película condicionante (Gorman y Jones, 2003; Tenke *et al.*, 2006).

La etapa siguiente consiste en la adhesión irreversible, las células se dividen y colonizan la superficie y las bacterias adheridas crecen formando microcolonias que son consideradas las unidades fundamentales de una biopelícula (Lindsay y Holy, 2006). Al alcanzar una densidad de población determinada, se induce la síntesis de metabolitos secundarios que conlleva a

la producción del exopolisacárido hasta lograr la maduración de la biopelícula, que corresponde al crecimiento tridimensional y definición de una arquitectura por las interacciones entre las bacterias adheridas (Beloín *et al.*, 2008). Después, tiene lugar la dispersión de células a otras regiones, lo cual permite la formación de una nueva colonia o su eliminación. Inicialmente se pensó que este proceso era pasivo y dependiente de las fuerzas de arrastre del medio, sin embargo, Lindsay y Holy (2006) sugieren que la dispersión es un proceso activo y estrictamente regulado por las células adheridas.

Las biopelículas han sido ampliamente estudiadas durante la última década y *P. aeruginosa* tiene un interés especial como modelo en el desarrollo de éstas, por ser un microorganismo muy versátil, capaz de persistir en ambientes distintos (Lee *et al.*, 2005). Estas biopelículas además han sido reconocidas por su importancia en infecciones humanas persistentes entre las que se mencionan: otitis externa, queratitis infecciosa, pulmonía, fibrosis quística e infecciones oportunistas (Lyczak *et al.*, 2000; Nielsen y Osguthorpe, 2006; Gómez y Prince, 2007; Thomas y Geraldine, 2007; Wood y Swanson, 2007).

Las biopelículas de *P. aeruginosa* pueden ser de considerable grosor y su formación está regulada por un proceso de *quorum-sensing* (QS), a través de la secreción de moléculas específicas denominadas “autoinductores”, además pueden producir grandes cantidades de exopolisacárido, logrando presentar una resistencia hasta mil veces mayor que sus correspondientes bacterias planctónicas, de este modo la característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biopelículas de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos con antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antimicrobiano, las infecciones por biopelículas no consiguen ser completamente eliminadas y

producen episodios recurrentes (Stewart y Costerton, 2001; Donlan y Costerton, 2002; Costerton *et al.*, 2007).

Entre las hipótesis mencionadas para explicar la resistencia de las bacterias por el desarrollo de las biopelículas se ha planteado en primer lugar, la dificultad en la penetración de los antibióticos, pues éstos pueden difundir a través de la matriz de la biopelícula e inactivar células atrapadas, sin embargo, el exopolisacárido se comporta como una barrera física para estas moléculas modificando su transporte al interior lo que ocasiona resistencia hacia los antimicrobianos. Por otra parte, los exopolisacáridos son generalmente aniónicos y pueden reaccionar o absorber los antibióticos de carga positiva, este hecho se ha descrito en biopelículas de *P. aeruginosa*, donde las fluoroquinolonas penetran rápidamente y los aminoglucósidos de carga catiónica lentamente, ya que se unen a polímeros aniónicos como el alginato (Mah y O'Toole, 2001; Walters *et al.*, 2003).

La resistencia también está asociada al lento crecimiento de las bacterias en las biopelículas debido a la limitación de nutrientes, en especial aquellas situadas en el interior, con lo cual dejan de ser susceptibles a los antimicrobianos, pues muchos son activos sobre células en crecimiento. La penicilina y ampicilina no atacan células que no estén en división, otros antibióticos como las cefalosporinas y aminoglucósidos atacan células en fase estacionaria, pero son más activos en células en división. Se ha determinado también resistencia a tobramicina y piperacilina en *P. aeruginosa*, asociada con la disminución en su velocidad de crecimiento (Post *et al.*, 2004; Castrillón *et al.*, 2010).

Otro factor que contribuye a la resistencia es la activación de respuestas de estrés que producirían modificaciones en la fisiología de las

bacterias en biopelículas y la aparición de fenotipos específicos, producto de cambios genéticos, que potenciarían mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos entre ellos la expresión de enzimas como la  $\beta$ -galactosidasa que se activa con imipenem y piperacilina en biopelículas de *P. aeruginosa* (Sanclement *et al.*, 2005; Thomas y Nakaishi, 2006).

El tratamiento de las infecciones bacterianas ha tenido, sin embargo, un progreso considerable a pesar de que el incremento de la resistencia continúa siendo una preocupación. Por lo que hay una necesidad significativa de investigar nuevas técnicas antimicrobianas, sobre todo para el tratamiento de las biopelículas (Dougherty, 2002).

El tratamiento fotodinámico (TFD) está basado en el concepto de que un fotosensibilizador (FS), localizado en la bacteria, principalmente en la membrana celular, y no en tejidos circundantes, puede ser activado por bajas dosis de luz de una longitud de onda apropiada para generar radicales libres y oxígeno singlete capaces de producir el efecto bactericida (Maisch, 2007; Caminos y Durantini, 2006).

El TFD se ha propuesto como una terapia alternativa para combatir el incremento de la resistencia a los antibióticos entre microorganismos patógenos (Hamblin y Hasan, 2004). Las primeras observaciones de procesos fotodinámicos referidos a la inactivación de microorganismos fueron hechas por Raab (1900) quién relató el efecto mortal de la naranja de acridina y la luz visible sobre especies de *Paramecium caudatum*. A pesar de este hallazgo, la terapia ha sido desarrollada principalmente como un tratamiento para el cáncer (Dolmans *et al.*, 2003) y la degeneración macular relacionada con la edad (Brown y Mellish, 2001).

El mecanismo de inactivación fotodinámica en la bacteria por la radiación de luz se lleva a cabo de la siguiente manera: después de la absorción de luz por el FS, éste pasa del estado basal ( $^1S$ ) a su primer estado excitado ( $^1S^*$ ), del cual puede volver nuevamente a su estado  $^1S$  por reacciones de fluorescencia, o puede pasar al estado triple excitado  $^3S^*$  (cruce de intersistema), del cual podría retornar también al estado  $^1S$  por fosforescencia, no obstante, el FS en estado  $^3S^*$  es extremadamente reactivo debido a su largo tiempo de vida ( $10^{-3} - 10^0$  s), por lo que puede reaccionar con otras moléculas. El tiempo de vida del estado  $^1S^*$  es más corto ( $10^{-9} - 10^{-7}$  s) de manera que no pueden reaccionar con otras moléculas, antes de retornar al estado basal (Calin y Parasca, 2008).

Los mecanismos por los cuales el estado  $^3S^*$  del FS puede reaccionar con el medio biológico, en este caso en la bacteria, son: reacción tipo I, donde el estado  $^3S^*$  puede reaccionar directamente con las biomoléculas y producir radicales libres y/o iones radicales y la reacción tipo II, donde el estado  $^3S^*$  puede reaccionar con el oxígeno molecular y producir oxígeno singlete ( $^1O_2^*$ ) considerado la principal especie responsable de la inactivación bacteriana ya que reacciona con una variedad de blancos en la célula: ácidos grasos insaturados en las membranas, enzimas que conducen a la inhibición de la glicogenólisis e hipoxia celular, inhibición de la síntesis de proteínas y la alteración del ADN que cambia la transcripción del material genético durante la replicación (efecto mutagénico) que podría ser mortal para la bacteria (Durantini, 2006; Maisch, 2007; Calin y Parasca, 2008).

Tanto para la reacción tipo I como para la tipo II el FS es un elemento clave. Se conocen más de 400 compuestos con propiedades de fotosensibilización. La mayoría son colorantes, medicinas y sustancias naturales. Aunque muchos de estos colorantes pueden tener efectos

antibacterianos inherentes, es generalmente durante la irradiación cuando se observa el efecto fotodinámico bactericida (Meisel y Kocher, 2005).

Una clase de FS antimicrobiano empleada con frecuencia son los colorantes, conocidos como sales de fenotiazina, entre ellos azul de toluidina y azul de metileno (Gad *et al.*, 2004; Demidova y Hamblin, 2005). Las sales de fenotiazina son moléculas anfipáticas planas que poseen un átomo de nitrógeno cuaternario intrínseco y han tenido eficacia fototóxica en microorganismos como *E. coli*, *S. aureus*, estreptococos, *Listeria monocytogenes* y *Vibrio vulnificus* (O'Neil *et al.*, 2003; Phoenix *et al.*, 2003; Romanova *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2005).

Entre las fuentes de luz usadas para activar el FS se encuentran: láser de colorante pulsado KTP (Potasio, Titanio, Fosfato), de Neomidio (Nd/YAG) y el de Helio-Neón (He-Ne) (Kübler *et al.*, 2005; Pieslinger *et al.*, 2006). Hasta ahora, los dos sistemas de láser principalmente usados para la inactivación fotodinámica de las bacterias son el láser de He-Ne y el láser de diodo. El primero ha sido usado para la inactivación fotodinámica de *S. aureus* y *P. aeruginosa* usando azul de toluidina como FS con resultados satisfactorios (DeSimone *et al.*, 1999; Komerik *et al.*, 2000).

El TFD es conocido por su eficacia en la eliminación de virus, bacterias y hongos por lo que se ha propuesto como una terapia para infecciones microbianas localizadas (Hamblin y Hasan, 2004). Aún no se conoce el desarrollo de resistencia al TFD y al parecer es poco probable que se pueda desarrollar, ya que la actividad bactericida del TFD se debe al oxígeno singlete y otras especies reactivas como los radicales hidroxilos que afectan múltiples blancos en la célula bacteriana (Bhatti *et al.*, 1998; Lauro *et al.*, 2002).



Los trabajos sobre la inactivación fotodinámica de las bacterias se iniciaron a mediados de 1960. Macmillan *et al.* (1966) emplearon azul de toluidina O para eliminar bacterias, algas y levaduras, donde reportaron un 99,00% de erradicación de las bacterias ensayadas, después de 30 min de exposición a un láser de gas. Posteriormente, Bellin *et al.* (1969) sugirieron que este colorante actúa como FS sobre la membrana celular y Decraene *et al.* (2006) señalaron que el mismo incrementa la permeabilidad de la membrana y afecta el ADN bacteriano.

Las cargas positivas de los FS parecen promover una interacción electrostática con las cargas negativas de la membrana de la bacteria Gram negativa aumentando la eficacia de los procesos de fotoinactivación (Hamblin y Hasan, 2004). En este sentido, los FS catiónicos como azul de toluidina O y azul de metileno, han demostrado ser fototóxicos en biopelículas y suspensiones de *P. aeruginosa*, así como de otros bacilos Gram negativos con radiaciones de luz roja (Komerik y Wilson, 2002; El-Adly, 2008; Street *et al.*, 2009). Además el TFD usando azul de toluidina O en combinación con un láser de He-Ne ha reducido la virulencia de las proteasas de *P. aeruginosa* (Komerik *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005).

Según la revisión hecha, en Latinoamérica no se hallaron estudios en los cuales se aplique el TFD en el área de microbiología, no obstante en algunas investigaciones se han empleado otras técnicas alternas a la utilización de antibióticos para eliminar la formación de biopelículas (Rodríguez *et al.*, 2005; Damas, 2007).

En Venezuela, investigaciones realizadas por Ponce (2010) en Cumaná reportó la formación de biopelículas por cepas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* de origen intrahospitalario. Barreto *et al.* (2009) en la ciudad de

Mérida indicaron que cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes recluidos en el Hospital Universitario de Los Andes, formaron biopelículas independientemente de sus patrones de susceptibilidad antimicrobiana, esto demuestra entonces la necesidad de aplicar nuevas técnicas que permitan la eliminación de estas comunidades microbianas que promueven la persistencia de las infecciones en los pacientes.

En la búsqueda de estas nuevas opciones en la terapia antimicrobiana, el TFD podría ser una alternativa, ya que ofrece ventajas en cuanto a un corto tiempo de incubación con el FS, efecto rápido de eliminación de los microorganismos, atenuación de factores de virulencia, alto margen de seguridad terapéutica, y costo relativamente bajo. Es por eso que en este trabajo se evaluó el efecto del TFD con azul de toluidina O sobre la formación *in vitro* de biopelículas por *P. aeruginosa*, lo que permitiría contribuir como una nueva alternativa en el tratamiento de infecciones microbianas.

## METODOLOGÍA

### **Población y muestra**

En este estudio se analizaron 26 cepas identificadas como *P. aeruginosa* (Cabeza, 2010) mediante pruebas bioquímicas, provenientes de muestras clínicas de pacientes atendidos en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA) de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, suministradas por el “Laboratorio de Investigación Bacteriológica del Departamento de Bioanálisis” de la Universidad de Oriente.

### **Viabilidad y Confirmación de las cepas**

La pureza y viabilidad de las cepas se verificó mediante su reactivación en caldo tripticasa de soja (CTS) y posteriormente la siembra en agar tripticasa de soja (ATS) y agar Mac Conkey, incubadas por 24 h a 37°C. La confirmación de las cepas de *P. aeruginosa* se llevó a cabo a través de la realización de pruebas bioquímicas: kligler para verificar el carácter no fermentador de azúcares, oxidasa y crecimiento a 42 °C.

### **Preparación de los inóculos**

A partir de las colonias crecidas en ATS, se realizaron cultivos de las mismas en CTS y se dejaron crecer a 37°C por 24 h. Posteriormente, se realizaron diluciones en un CTS estéril para estandarizar los inóculos hasta contener entre  $5 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  células · ml<sup>-1</sup> y se leyeron sus densidades ópticas a 546 nm (DO<sub>546</sub>). A partir de las suspensiones estandarizadas, se realizaron nuevamente diluciones 1:100 de cada cepa en CTS para llevar a cabo los ensayos posteriores (Passerini *et al.*, 2007).

## **Determinación de la presencia de exopolisacárido en la formación de biopelícula a través de la adherencia al rojo Congo**

Se tomaron 100 µl de la dilución 1:100 de cada inóculo estandarizado y se sembraron por rastrilleo con espátula de vidrio en placas de ATS con 0,02% del indicador rojo Congo que se incubaron por 18 h a 37°C. Se tomaron como cepas productoras de exopolisacárido alginato aquellas que presentaron colonias blanquecinas o rosadas y como no productoras las observadas de color rojo (Bravo *et al.*, 2005).

## **Formación de biopelícula en microplaca**

Para este ensayo, se tomaron 200 µl de la dilución 1:100 de los inóculos estandarizados y se trasvasaron a los pocillos de una microplaca que se incubó durante 24 h a 37°C. Se estimó el total de biomasa celular midiendo la  $DO_{546}$  con un lector de microplacas modelo Elx 800. Posteriormente, las suspensiones bacterianas se decantaron y los pocillos se lavaron con agua destilada a fin de eliminar las células no adheridas. Luego, se añadieron 200 µl de cristal violeta al 1,00% a los pocillos y se dejaron durante 30 min. La biopelícula teñida se aclaró con agua destilada y se disolvió con 200 µl de etanol al 95,00%. La cantidad de biopelícula se cuantificó por la medición de la  $DO_{546}$  de la suspensión coloreada con cristal violeta. Cada cepa se analizó por triplicado. Se utilizaron controles negativos (DOC). El corte se definió como tres desviaciones estándar por encima de la media de DOC. Cada cepa se clasificó de la siguiente manera: (Passerini *et al.*, 2007).

Productor débil de biopelícula	$DO \leq 2xDOC$
Productor moderado de biopelícula	$2xDOC < DO \leq 4xDOC$
Productor fuerte de biopelícula	$DO > 4xDOC$

## **Aplicación del tratamiento fotodinámico de las biopelículas formadas en la microplaca**

Para determinar el efecto del TFD en las biopelículas de *P. aeruginosa* se utilizó el método descrito por Sharma *et al.* (2008), para tal efecto se empleó un fotosensibilizador y una fuente de emisión de luz.

### Preparación del fotosensibilizador

El agente fotosensibilizador que se usó para este estudio fue el azul de toluidina O, el cual se preparó como una solución stock de  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de agua destilada. Se almacenó en la oscuridad y a temperatura ambiente. Se realizaron diluciones a partir de la solución stock en buffer fosfato salino (BFS) para obtener concentraciones de 25, 50, 100 y  $200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### Fuente de luz

Como fuente de luz se utilizó un sistema de láser de gas de Helio-Neón (He-Ne) modelo de serie 1108P cuya longitud de onda fue 633 nm, la cual se encuentra dentro del rango de máximo nivel de absorción del agente fotosensibilizador escogido (620-638 nm). La potencia del láser fue 5 mw.

### Procedimiento de la técnica

La técnica se aplicó sólo a aquellas cepas que presentaron los niveles más altos de DO de la biopelículas disueltas y coloradas con cristal violeta. Se cultivó cada cepa bacteriana en 3 hileras de 5 pocillos de una microplaca por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , a fin de visualizar las biopelículas. Esta prueba se realizó en dos microplacas, donde en una de ellas se colocó en el fondo de cada pocillo un papel de filtro con el fin de observar el efecto del tratamiento fotodinámico en las biopelículas mediante microscopía electrónica de barrido.

Para la primera microplaca se procedió de la siguiente manera: el primer pocillo de la primera hilera se tomó como control experimental número 1 (sin luz, ni colorante) y se le agregó 100  $\mu$ l de BFS, el primer pocillo de la segunda y tercera hilera se tomaron como controles experimentales número 2 y 3, respectivamente y se les agregaron también 100  $\mu$ l BFS y radiación de luz (por un tiempo de 2 y 4 min, respectivamente). Se añadieron a continuación 100  $\mu$ l de azul de toluidina O de las concentraciones respectivas en los pocillos restantes de las tres hileras y se incubó la microplaca durante 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Luego, se irradió la segunda hilera de pocillos con el láser de He-Ne a una longitud de onda de 633 nm por 2 min y la tercera hilera se irradió por 4 min, posteriormente, se removió el azul de toluidina O cuidadosamente. Todos los pocillos coloreados se lavaron una vez con 200  $\mu$ l BFS. Se removieron las biopelículas suavemente de las paredes de los pocillos con un palillo de madera (previamente esterilizado en autoclave) y luego se agitó levemente la microplaca por 20 s para homogeneizar las biopelículas. Se realizaron diluciones seriadas de las mismas en BFS desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , las cuales se sembraron en placas con ATS y se incubaron por 24 h a 37°C para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC).

En la segunda microplaca, se siguió el mismo protocolo para la aplicación del TFD, solo que después de los períodos de radiación, se retiró el papel de filtro que contenía la biopelícula de cada uno de los pocillos para el procesamiento por microscopía electrónica de barrido.

## **Observación de las biopelículas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)**

Una vez retirado el papel de filtro de la microplaca, éste se fijó con 2,50% de glutaraldehído por 1 h a 4°C. Luego de retirar el glutaraldehído, se realizaron tres lavados continuos de 5 min con buffer cacodilato a un pH de 7,4. Posteriormente, se post-fijaron las muestras con tetróxido de osmio al 1,00% por 2 h. Después, se realizaron nuevamente 3 lavados continuos de 5 min con agua destilada. A continuación, las muestras se deshidrataron usando concentraciones crecientes de etanol (50,00; 70,00; 80,00; 90,00; 95,00 y 100,00%) durante 15 min, se deshidrataron en el secador de punto crítico y se colocaron sobre una base. Finalmente, los especímenes se cubrieron con Cromo y se examinarán con un MEB HITACHI modelo S-800-FE. La interpretación de las observaciones se realizaron por la visualización del efecto del TFD entre las muestras tratadas y sus respectivos controles experimentales (Ong *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008).

## **Análisis estadístico**

Para evaluar las diferencias entre las muestras tratadas y sus respectivos controles experimentales se aplicó una prueba no paramétrica o Kruskal Wallis (Siegel y Castellán, 1995), con el uso del programa *Statgraphics plus* versión 4.1. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo de biopelículas en *P. aeruginosa* ha sido estudiado por algunos autores mediante la técnica de tinción específica con rojo Congo debido a que este colorante induce una morfología colonial característica en las cepas según produzcan o no exopolisacárido. Además, el rojo Congo ha sido reconocido también, por la capacidad de unirse a otros componentes de la matriz extracelular, lo cual ha permitido a varios investigadores evaluar de igual manera la formación de biopelículas en las bacterias.

De las 26 cepas sembradas en agar tripticasa de soja con rojo Congo, a las 18 h se observó que 18 (69,23%) fueron productoras de exopolisacárido, caracterizadas por tener colonias rosadas, lisas y mucosas (fenotipo A) y 8 (30,77%) no produjeron exopolisacárido, presentando colonias rugosas, rojas y brillantes (fenotipo B) (Figura 1).

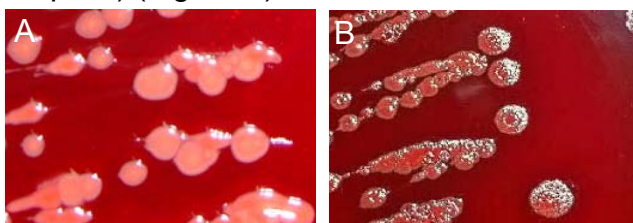


Figura 1. Producción de exopolisacárido en cepas de *P. aeruginosa* cultivadas en agar tripticasa de soja suplementado con 0,02% de rojo Congo. A) Cepa Pa14 productora de exopolisacárido. B) Cepa Pa1 no productora de exopolisacárido.

En la Tabla 1 se muestran los fenotipos obtenidos de las cepas según la procedencia de las muestras, donde se observó que las cepas que presentaron fenotipo liso procedían de áreas como Observación adulta y pediátrica, sin embargo las cepas de fenotipo rugoso procedían de las Unidades de cuidados intensivos (UCI), Retén y Hospitalización pediátrica



(HP), en las cuales el paciente generalmente cursa con un largo período de hospitalización y amerita tratamientos estrictos.

Tabla 1. Fenotipos de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes hospitalizados obtenidos a partir de la siembra en agar tripticasa de soja suplementado con 0,02% de rojo Congo.

Cepas	Procedencia	Fenotipo
Pa1	UCI-P	B
Pa2	UCI-P	B
Pa3	Retén	B
Pa4	UCI	B
Pa5	OP	A
Pa6	OA	A
Pa7	MED-C	A
Pa8	OP	A
Pa9	OA	A
Pa10	OP	A
Pa11	OA	A
Pa12	HP	B
Pa13	UCI	B
Pa14	OA	A
Pa15	OA	A
Pa16	OA	A
Pa17	OP	A
Pa18	OA	A
Pa19	OA	A
Pa20	DIÁLISIS	A
Pa21	AMBULATORIO	A
Pa22	MED-C	A
Pa23	MED-C	A
Pa24	OA	A
Pa25	UCI	B
Pa26	UCI	B

A: Fenotipo liso. B: Fenotipo rugoso. HP: Hospitalización pediátrica. MED-C: Medicina-C. OA: Observación adulta. Observación pediátrica. UCI: Unidad de Cuidados Intensivos. UCI-P: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátrico.

Callicó *et al.* (2004) en un estudio realizado con 18 cepas de *P. aeruginosa*, procedentes de muestras clínicas de pacientes atendidos en tres hospitales de la ciudad de la Habana, Cuba, por el método de rojo Congo, reportaron un 72,00% de colonias productoras de exopolisacárido, resultados similares al obtenido en este estudio. Rakhimova *et al.* (2008) en un estudio realizado en una cepa de *P. aeruginosa* denominada TBCF10839 causante de fibrosis quística, sembrada en agar luria–bertani con rojo Congo observaron características fenotípicas similares a lo obtenido en esta investigación, donde reportaron la presencia de colonias lisas y rosadas (fenotipo A).

La incapacidad del colorante para unirse con el exopolisacárido se debe a que este último es un copolímero lineal negativamente cargado y el rojo Congo es un colorante aniónico, por lo que se genera una repulsión entre las cargas negativas y origina que las colonias productoras de exopolisacárido no absorban el colorante (May y Chakrabarty, 1994; Callicó *et al.*, 2004).

El alginato es generalmente referido como un componente importante de la matriz de biopelículas de cepas mucoides de *P. aeruginosa* principalmente de aquellas formadas durante la infección con fibrosis quística, ya que parece proteger a esta bacteria de las consecuencias de la inflamación, dado que neutraliza los radicales libres liberados por los macrófagos y proporciona también protección contra la fagocitosis, probablemente debido a que constituye una barrera física y química a la bacteria, por lo que la producción de alginato se considera un importante factor de virulencia en *P. aeruginosa* (Govan y Deretic, 1996; Pier, 1998; Callicó *et al.*, 2004).

Plata *et al.* (2004) y Ryder *et al.* (2007) sugieren que independientemente de la expresión de alginato, otros componentes en la matriz podrían ser necesarios para la formación de biopelículas *in vitro* por cepas no mucoides de *P. aeruginosa*. Al respecto en este estudio, se obtuvieron colonias rugosas y rojas que no correspondieron a cepas productoras de alginato sino probablemente a la presencia de otros componentes presentes en la matriz.

Friedman y Kolter (2004a) sugieren que polisacáridos ricos en glucosa son codificados por un grupo de genes denominados *pel* (nombre que deriva de *pellican*, biopelícula formada por *Pseudomonas* en la interfase agua-aire) y serían los principales componentes de la matriz, responsables además de inducir la rugosidad en las colonias. También señalan en otro estudio (Friedman y Kolter, 2004b) que otros monosacáridos presentes en la matriz de *P. aeruginosa* no mucoides como son mannososa, galactosa y trazas de xilosa son codificados por los genes *psl* (*polysaccharide synthesis locus*) y están vinculados también con la observación de nuevos fenotipos en *Pseudomonas*.

La variación fenotípica reportada en esta investigación (fenotipo A y B), probablemente se deba a diferencias genéticas entre las cepas de *P. aeruginosa* como se ha visto en las investigaciones de Friedman y Kolter (2004a; b) producto de mutaciones espontáneas o mediadas por transposones (D'Argenio *et al.*, 2002), que le permiten adaptarse rápidamente y sobrevivir cuando el medio ambiente cambia de condiciones, por lo que la población bacteriana puede variar fenotípicamente como por ejemplo, al encontrarse en condiciones de limitación de nutrientes y aumento del estrés oxidativo que son factores causantes del cambio a un fenotipo

rugoso en colonias de *P. aeruginosa* presentes en pacientes con fibrosis quística (Hausler *et al.*, 2003).

La capacidad de las cepas de *P. aeruginosa* de formar biopelículas se determinó mediante el ensayo en microplaca de poliestireno. Sin embargo para evaluar si el grado de turbidez en el crecimiento de la bacteria (biomasa) está relacionado con la formación de biopelículas, se determinó previo al tratamiento con cristal violeta las densidades ópticas de los cultivos. Como el tamaño de las células microbianas en un cultivo puro es casi constante, el grado de dispersión es directamente proporcional a la biomasa presente e indirectamente relacionado con el número de células (Prescott *et al.*, 2004). En la Figura 2 se aprecia el total de biomasa celular antes de la tinción con cristal violeta. La biomasa celular se determinó por el crecimiento a una densidad óptica a 546 nm ( $DO_{546}$ ).

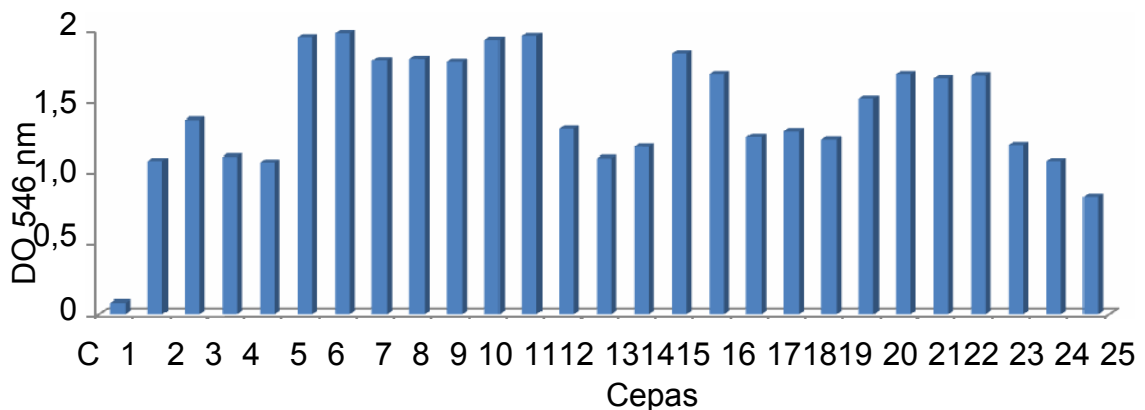


Figura 2. Estimación de la biomasa celular en base a las densidades ópticas de las cepas de *P. aeruginosa* cultivadas en la microplaca de poliestireno durante 24 h a 37°C. C: control negativo. DOC= 0,08. Las barras representan el valor promedio de las tres lecturas de  $DO_{546}$  que se obtuvieron para cada cepa.

Las densidades ópticas obtenidas para las cepas correspondieron a los respectivos niveles de biomasa celular de cada una de ellas. Las lecturas

obtenidas mostraron que las cepas Pa5, Pa6, Pa7, Pa8, Pa9, Pa10, Pa11, Pa15 y Pa16 tuvieron las mayores cantidades de biomasa, cercanas a una DO= 2,00, mientras que las más bajas fueron para las cepas Pa1, Pa3, Pa4, Pa13, Pa25 y Pa26, con DO= 1,00 aproximadamente. Puede observarse también que las cepas con altas lecturas pertenecieron al fenotipo A (liso) y las cepas con menor biomasa correspondieron al fenotipo B (rugoso). Estas elevadas lecturas pudieron deberse, tal vez, a que estas cepas presentaron mayor turbidez y mucosidad, asociado a la presencia de gran cantidad alginato, lo cual probablemente pudo influir y elevar el valor en sus biomásas.

Para cuantificar la formación de biopelícula adherida a los pocillos de la microplaca se realizó la coloración con cristal violeta, luego se disolvió la biopelícula coloreada y se midió su DO a 546 nm (Figura 3).

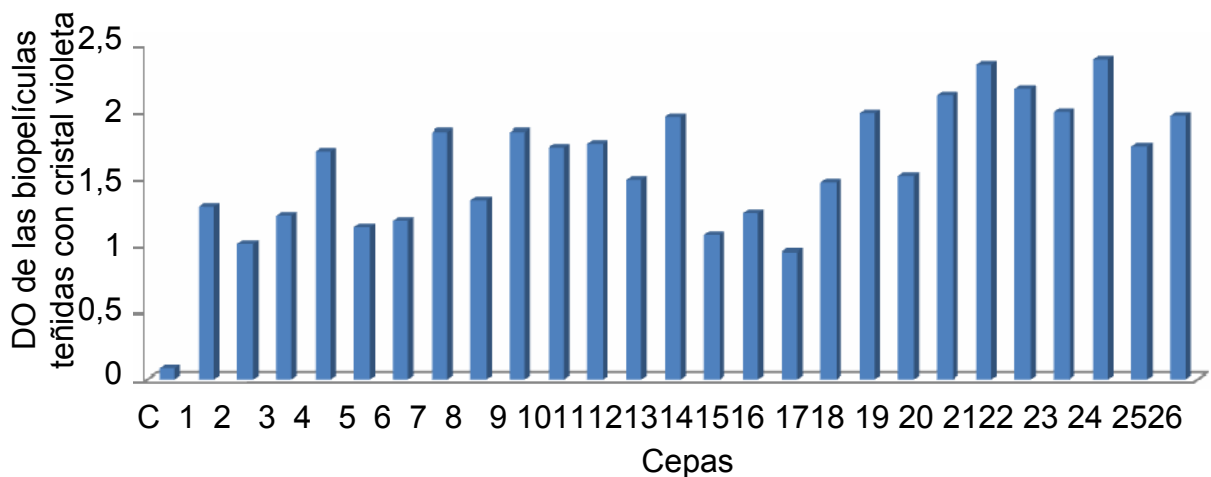


Figura 3. Estimación de la formación de biopelículas por cepas de *P. aeruginosa* cultivadas en microplaca de poliestireno por 24 h a 37°C coloreadas con cristal violeta. C: control negativo. DOC= 0,08. Productora débil de biopelícula:  $DO \leq 0,16$ , moderada:  $0,16 < DO \leq 0,32$  y fuerte:  $DO > 0,32$ . Las barras representan el valor promedio de las tres lecturas de DOCV546 que se obtuvieron para cada cepa.

Los resultados obtenidos de las lecturas de las densidades ópticas mostraron que todas las cepas de estudio fueron productoras de biopelículas

fuerzas, con lecturas de  $DO > 0,32$  (0,95–2,39). La formación de biopelículas se evidenció también por la presencia de anillos teñidos con cristal violeta en los pocillos de la microplaca (Apéndice A). Cabe destacar que 6 cepas (Pa5, Pa6, Pa8, Pa10, Pa11, Pa15 y P16) que presentaron los índices más altos de biomasa o DO en sus lecturas iniciales, al realizar la medición de sus densidades ópticas de las biopelículas formadas y coloreadas con cristal violeta, se encontró que sus niveles de DO eran menores que las lecturas iniciales, sin embargo cepas que mostraron niveles más bajos de DO inicialmente (Pa1, Pa3, Pa4, Pa13, Pa25 y Pa26) presentaron valores más altos después de la tinción con cristal violeta. Los resultados obtenidos en esta etapa del estudio podrían sugerir que la capacidad de formar biopelículas no fue directamente proporcional a la biomasa celular.

La formación de biopelículas *in vitro* por *P. aeruginosa* fue demostrada también por O'Toole y Kolter (1998) quienes reportaron que las estructuras como pili y flagelos eran importantes para los primeros estadios de formación de biopelículas, ya que la motilidad, otorgada por los flagelos, ayudaría a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de adhesión (Nazar, 2007), además la unión de las bacterias a una superficie ocurre más fácilmente en aquellas que son hidrofóbicas como plásticos y teflón, que en superficies hidrofílicas como vidrios y metales, lo cual podría explicar la habilidad de *P. aeruginosa* para formar biopelículas en la microplaca de poliestireno.

Por otro lado, la capacidad de formar biopelículas en los pocillos de la microplaca por las cepas que no produjeron alginato, se relaciona con lo reportado por Nivens *et al.* (2001) quienes informaron que ciertas cepas de *P. aeruginosa* no productoras de alginato eran capaces de formar

biopelículas *in vitro*. Así mismo, Plata *et al.* (2004) en un estudio informaron que aunque el alginato es un componente importante en las biopelículas de *P. aeruginosa*, su producción no es esencial para la formación de éstas. Así, todos los resultados obtenidos para esta prueba en esta investigación, se relacionan con lo reportado en el método de rojo Congo, ya que tanto las cepas productoras de alginato como las no productoras formaron biopelículas en los pocillos de la microplaca.

Para la aplicación del TFD se seleccionaron 5 cepas de *P. aeruginosa* (Pa20, Pa21, Pa22, Pa23 y Pa24), las cuales presentaron los niveles más altos de tinción con cristal violeta. En la Figura 4 se muestra el efecto de la radiación láser a los 2 y 4 min de exposición sobre el conteo de UFC de cada cepa con respecto a sus controles.

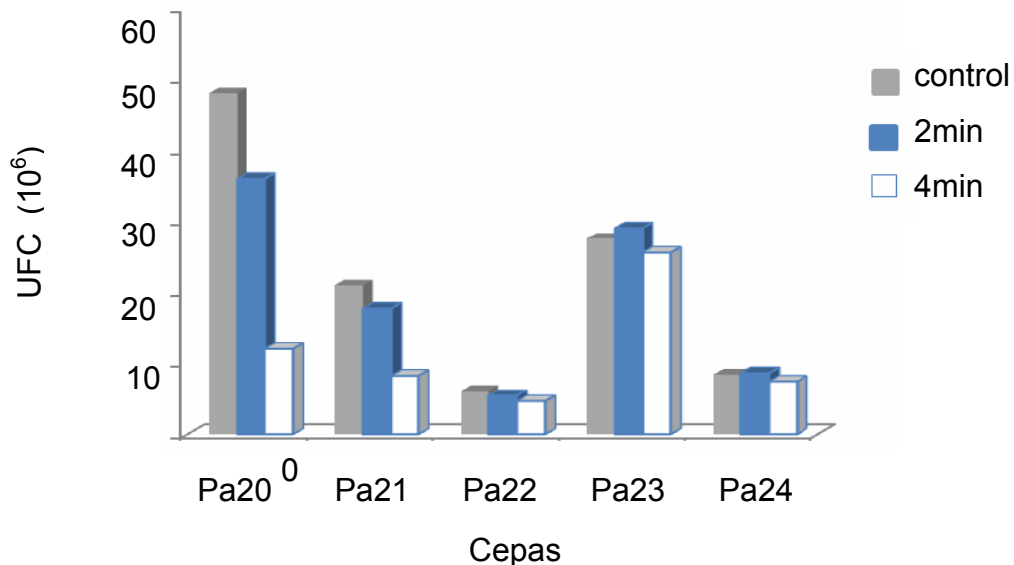


Figura 4. Efecto de la radiación láser durante 2 y 4 min en la cuenta de viables de las cepas correspondientes a las biopelículas de *P. aeruginosa* con respecto a sus controles. UFC: unidades formadoras de colonias.

Se observó que las cepas ensayadas presentaron contajes por encima de  $61 \cdot 10^5$  UFC  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. Para Pa20 y Pa21 se observaron reducciones en la cuenta con respecto a sus controles, en los 2 tiempos señalados, dicha reducción se acentuó más a los 4 min de radiación en estas dos cepas, mientras que en el contaje de las cepas Pa22–Pa24 no se evidenciaron disminuciones marcadas en la viabilidad al comparar los contajes con sus respectivos controles en los dos tiempos de radiación, sin embargo al aplicar la prueba de Kruskal Wallis se apreció que aunque las cepas Pa20 y Pa21 mostraron reducciones, éstas solo fueron estadísticamente significativas para Pa21 con respecto a su control (Tabla 2), por lo que la radiación fue más efectiva en la reducción de la viabilidad de esta cepa en comparación con las demás, esto significa que la radiación por sí sola no tuvo un efecto eficiente en la disminución del crecimiento ya que éste no fue constante, debido a que no fue eficaz en la reducción del contaje de viables de todas las cepas tratadas en los dos tiempos de radiación.

Tabla 2. Significancia estadística de las biopelículas sometidas a radiación láser.

Cepas	KW	Valor de P
Pa20	4,71	0,09
Pa21	5,60	0,04*
Pa22	6,25	0,06
Pa23	0,21	0,89
Pa24	2,22	0,32

KW: Contraste de Kruskal Wallis utilizada para los cálculos estadísticos. (\*): diferencia estadísticamente significativa.

La disminución en la viabilidad, obtenida para las biopelículas tratadas con radiación puede relacionarse con la producción y secreción de piocianina, pigmento producido por *P. aeruginosa*, que tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 680–690 nm y ha demostrado tener



propiedades de fotosensibilizador cuyo rango de longitud de onda es cercano al emitido por el láser de He–Ne usado en este estudio (633 nm), por lo que se consideró que este pigmento pudo haber actuado como un fotosensibilizador que al ser excitado por el láser generaron las reacciones que inactivaron las biopelículas de *P. aeruginosa* con la reducción de la cuenta viable, lo cual ha sido reportado anteriormente por Wainwrihgt *et al.* (2002) y Street *et al.* (2009) en biopelículas de esta bacteria en conjunto con la radiación láser.

Al aplicar las diferentes concentraciones de azul de toluidina O en las biopelículas se observó que se presentaron variaciones en el conteo de UFC (Figura 5).

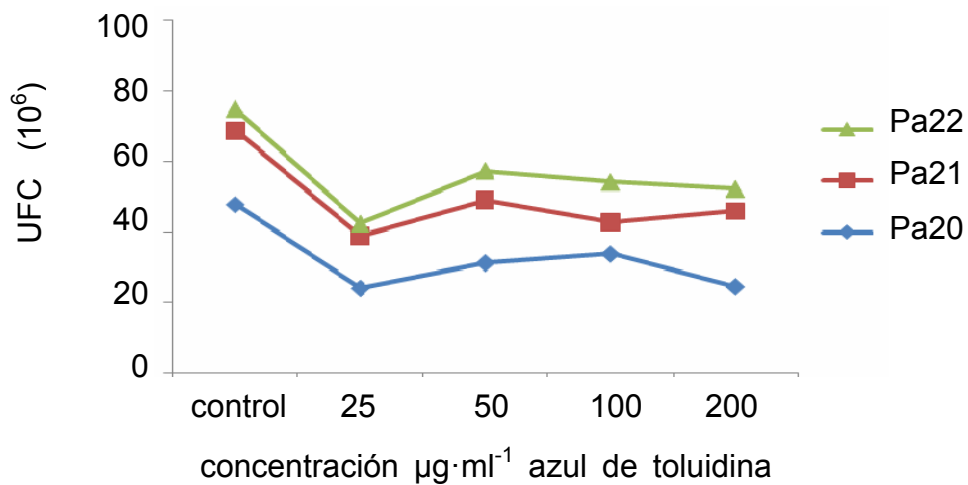


Figura 5. Efecto de las concentraciones de azul de toluidina O en la cuenta de viables de las cepas correspondientes a las biopelículas de *P. aeruginosa* con respecto a sus controles. UFC: unidades formadoras de colonias.

El efecto de las concentraciones de azul de toluidina O en las biopelículas de *P. aeruginosa* se probó en las cepas Pa20, Pa21 y Pa22. Se observó que a partir de sus controles el recuento disminuyó con la concentración de  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O y aumentó ligeramente

con 50 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , con 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  nuevamente se presentó una reducción principalmente para la cepa Pa20, sin embargo a pesar de las reducciones obtenidas, éstas no fueron estadísticamente significativas (Tabla 3) lo cual significa que este colorante por sí solo a pesar de reducir la viabilidad en las concentraciones probadas en este estudio, aún no puede considerarse un eficaz agente antibacteriano, sin embargo, al obtenerse cierto grado de reducción en la viabilidad, esto podría sugerir que tal vez con el empleo de concentraciones mayores se obtendrían mejores niveles de reducción.

Tabla 3. Significancia estadística de las biopelículas sometidas a concentraciones de azul de toluidina O.

Cepa	KW	Valor de P
Pa20	8,21	0,08
Pa21	1,11	0,50
Pa22	2,34	0,80

KW: Contraste de Kruskal Wallis utilizada para los cálculos estadísticos.

En un estudio realizado con azul de toluidina O, Wong *et al.* (2005) reportaron inhibición de crecimiento bacteriano cuando aplicaron concentraciones de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  del colorante en heridas de ratones infectadas con *Vibrio vulnificus* después de 2 h de incubación con el mismo sin la exposición de luz. Sin embargo, en este estudio la incubación del azul de toluidina O en las biopelículas fue por 30 min, lo cual tal vez pudo haber influenciado de alguna forma en la acción eficaz de éste. La incapacidad de otro colorante perteneciente a la misma familia que el azul de toluidina O, el azul de metileno, para actuar como un agente fotosensibilizador antimicrobiano por sí mismo fue reportada por Chan y Lai (2003) quienes emplearon 0,01% de azul de metileno y no informaron efecto alguno de este fotosensibilizador en los microorganismos que ensayaron.

Al aplicar el TFD con 2 y 4 min de radiación conjuntamente con las diferentes concentraciones del colorante, se obtuvieron disminuciones en los contajes de UFC de las cepas estudiadas (Figura 6).

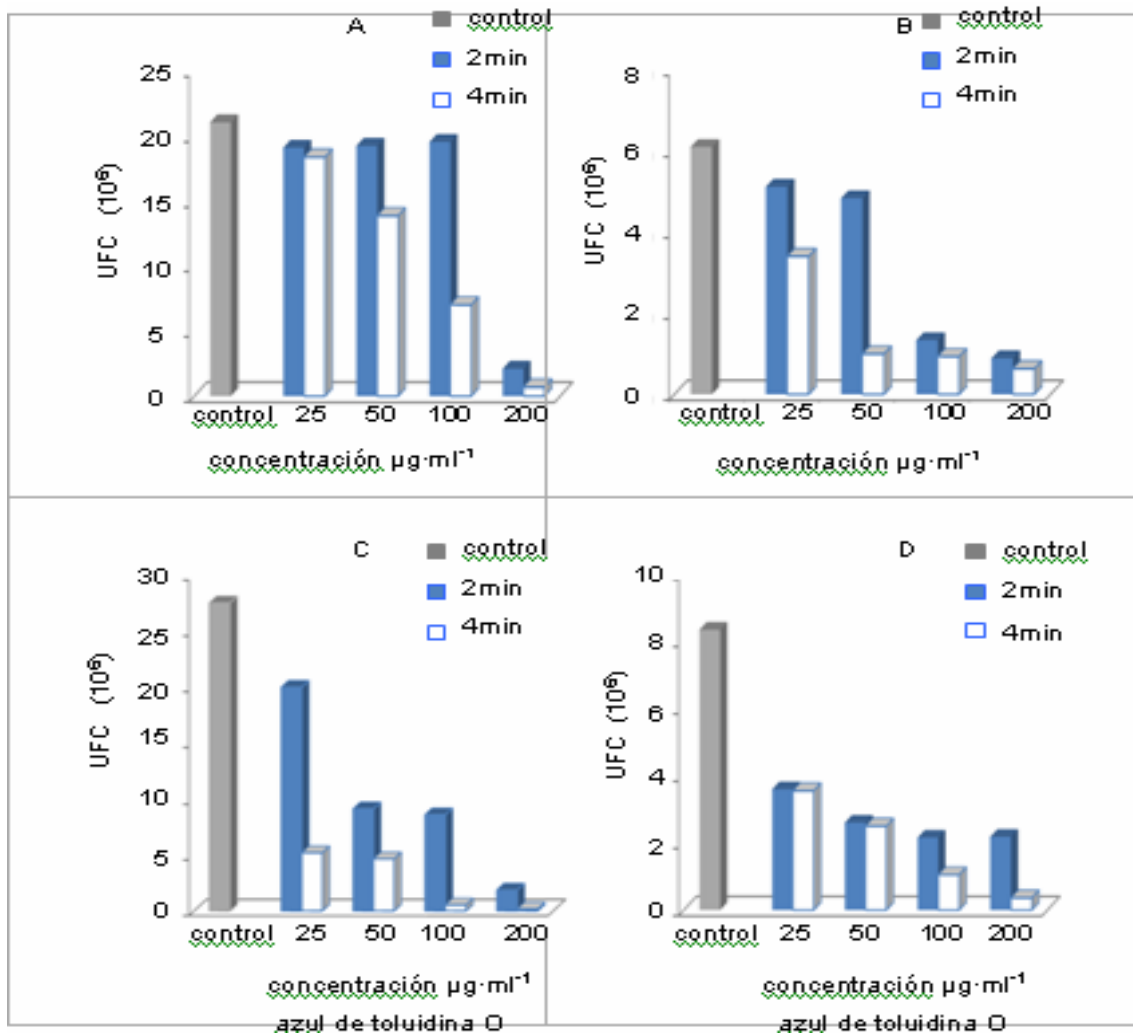


Figura 6. Efecto del tratamiento fotodinámico con las concentraciones de azul de toluidina O en combinación con radiación láser durante 2 y 4 min en la cuenta de viables de las cepas correspondientes a las biopelículas de *P. aeruginosa*. A) Pa21. B) Pa22. C) Pa23. D) Pa24. UFC: unidades formadoras de colonias.

Para la cepa Pa21 se observó que la concentración de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  fue la más eficiente en la reducción de la cuenta viable, mientras que las menos efectivas fueron 25, 50 y  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para 2 min de exposición al láser, no obstante estas concentraciones redujeron el conteo de forma inversamente proporcional a los 4 min de radiación. En la cepa Pa22 se evidenció que con 100 y  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (en ambos tiempos) disminuyó la viabilidad de la biopelícula y con  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  se redujo el conteo marcadamente a los 4 min, mientras que a la misma concentración pero con 2 min no hubo una mayor reducción. La concentración de  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  fue la menos efectiva nuevamente. Las cepas Pa23 y Pa24 con 100 y  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  fueron las concentraciones más eficaces para reducir la cuenta de viables con respecto a sus controles. Mientras que con 25 y 50 de  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  no se produjeron mayores declives en la viabilidad. Como se observó el TFD con 2 min para las cepas Pa21–Pa24 presentó reducciones en los conteos, sin embargo el TFD para los 4 min de radiación reportó mayores reducciones y diferencias estadísticamente significativas en las cuatro cepas (Tabla 4) por lo que se consideró el tratamiento más efectivo.

Tabla 4. Significancia estadística de las biopelículas sometidas a tratamiento fotodinámico con 2 y 4 min de radiación.

Tratamiento Fotodinámico (2 min)			Tratamiento Fotodinámico (4 min)		
Cepas	KW	Valor de P	Cepas	KW	Valor de P
Pa21	6,54	0,08	Pa21	7,70	0,04*
Pa22	2,98	0,40	Pa22	9,72	0,02*
Pa23	3,56	0,31	Pa23	10,45	0,02*
Pa24	0,96	0,81	Pa24	9,05	0,03*

KW: Contraste de Kruskal Wallis utilizada para cálculos estadísticos. (\*): diferencias estadísticamente significativas.

El efecto del TFD fue dependiente de las concentraciones del colorante y de los tiempos de radiación, ya que a medida que se incrementaron estos dos parámetros se produjo una mayor disminución de la cuenta de viables de las biopelículas tratadas. Esto es consistente con lo reportado por Street *et al.* (2009) quienes redujeron la viabilidad de biopelículas de *P. aeruginosa* de 24 h en un 99,00% con una exposición a un láser de diodo de 670 nm por 30 s y azul de metileno como fotosensibilizador ( $0,1 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), después la reducción fue de un 99,99% con la segunda exposición al láser (1 min). En ese mismo estudio redujeron la viabilidad de biopelículas de *Pseudomonas* de 48 h más del 99,99% tanto con un tiempo de radiación (30 s) así como al duplicar dicho tiempo. En cultivos planctónicos de *P. aeruginosa*, Tseng *et al.* (2009) informaron que al aumentar las concentraciones de azul de toluidina O ( $0,5\text{--}50 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y la exposición a un láser de diodo por un tiempo constante de 30 min lograron la erradicación de tres cepas multirresistentes y de una susceptible a antibióticos.

Para la cepa Pa20 también se observaron reducciones en la viabilidad con el TFD (Figura 7).

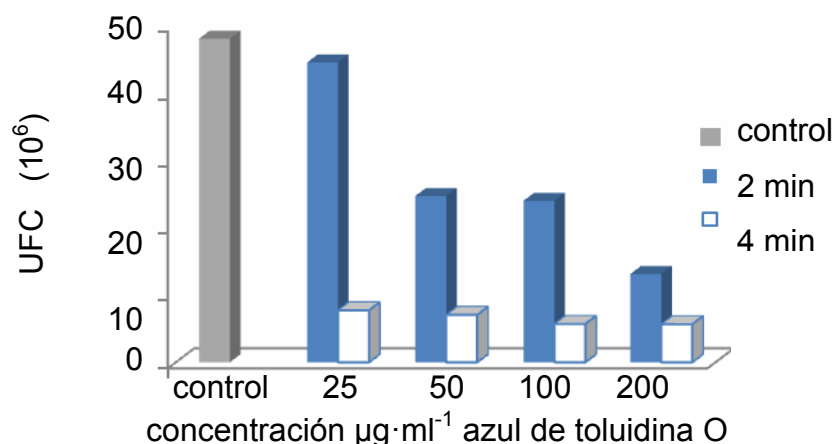


Figura 7. Efecto del tratamiento fotodinámico con las concentraciones de azul de toluidina O en combinación con radiación láser durante 2 y 4 min en la cuenta de viables de la cepa Pa20 correspondiente a la biopelícula de *P. aeruginosa*. UFC: unidades formadoras de colonias.

En la cepa Pa20, aunque se observaron reducciones en el contejo después del TFD, el comportamiento de ésta presentó variaciones con respecto a las cepas Pa21–Pa24 sometidas al mismo tratamiento, razón por la cual se presenta su resultado aparte. El TFD para los 2 min de radiación en la cepa Pa20 mostró una reducción en la concentración de  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O, con respecto al contejo de su control, con  $50$  y  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  también se observaron disminuciones, similares entre ambos recuentos y en  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  se redujo aún más el contejo. Para el TFD con 4 min no se presentaron mayores variaciones en los contejos de las cuatro concentraciones del fotosensibilizador (lo cual no se observó en las cepas Pa21–Pa24), no obstante, se distingue una clara diferencia en la cuenta de viables entre ambos tratamientos, sin embargo, a pesar de haberse obtenido estas reducciones con el TFD en 2 y 4 min de radiación junto con las concentraciones del colorante, estadísticamente no se observaron variaciones significativas ( $P > 0,05$ ) en cuanto al efecto del TFD en las diferentes concentraciones, sin embargo no se puede decir que el tratamiento no fue efectivo.

En este caso, para lograr una mayor reducción en la viabilidad, Sharma *et al.* (2008) reportaron que el efecto del TFD podría mejorarse utilizando un agente que aumente la permeabilidad y favorezca la penetración del fotosensibilizador en la biopelícula. Así, demostraron que la utilización de quelantes como etilendiamino tetracético (EDTA) mejoró en gran medida el efecto del TFD en biopelículas de estafilocos con azul de toluidina O. Esto se debe a que EDTA causa pérdida de la viabilidad y mejora la sensibilidad de las bacterias, a ciertos agentes antimicrobianos posiblemente por alteración de su estructura (Percival *et al.*, 2005; Banin *et al.*, 2006). Por lo que EDTA puede ser de igual modo utilizado para aumentar la permeabilidad de los fotosensibilizadores en bacterias Gram negativas.

Para determinar si después del TFD se presentaron alteraciones en la morfología de las biopelículas de las cepas de *P. aeruginosa* seleccionadas, se realizó un estudio con microscopía electrónica de barrido (MEB). De las 5 cepas que presentaron las lecturas más altas de tinción con cristal violeta (Pa20–Pa24), se escogió la cepa Pa24 para aplicarle técnica de MEB por ser la que mostró el nivel más alto de tinción con el colorante.

En la Figura 8 se observa la estructura típica de la biopelícula formada por la cepa Pa24 de *P. aeruginosa* sin tratamiento fotodinámico (control experimental 1) donde se distinguen los componentes característicos de una biopelícula: acúmulos bacterianos (microcolonias), el exopolisacárido que las recubre, además de bacilos agregados. Cabe resaltar que, la presencia de exopolisacárido observado en las micrografías 8A y 8B confirma los resultados obtenidos mediante la técnica de rojo Congo, donde se evidenció la producción de exopolisacárido en esta cepa (Fenotipo liso).

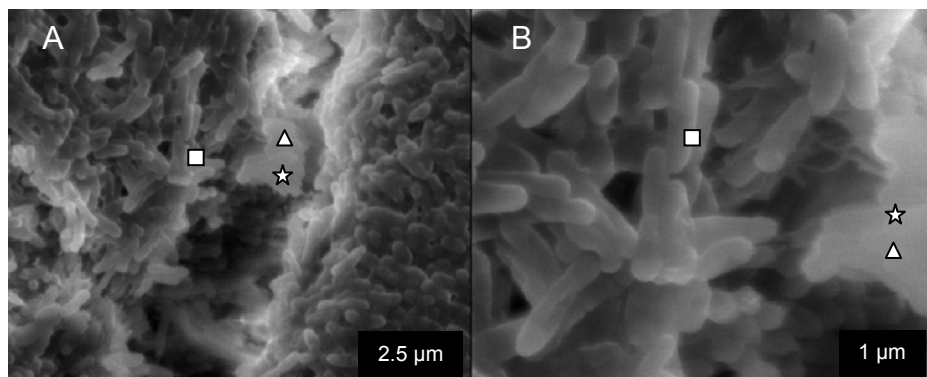


Figura 8. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de las biopelículas de *P. aeruginosa* formadas por la cepa Pa24 sin tratamiento fotodinámico. A) imagen a 2,5  $\mu\text{m}$ . B) imagen a 1  $\mu\text{m}$ . (  $\square$  ): microcolonias, (  $\Delta$  ): exopolisacárido, (  $\star$  ): bacilos.

A través de la técnica de MEB, Abdi–Ali *et al.* (2006) observaron la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* en superficies de catéteres,

evidenciando la gran capacidad de esta bacteria para formar comunidades microbianas sobre superficies de plástico.

En la Figura 9 se muestran las micrografías de las biopelículas formadas por la cepa Pa24 de *P. aeruginosa* tratadas con radiación por 2 min (control experimental 2) y 4 min (control experimental 3). En estas micrografías se evidencia la presencia de microcolonias cubiertas por exopolisacárido en ambos controles experimentales, así como bacilos aislados y agregados, al igual que lo observado en el control experimental 1 (Figuras 8A y 8B). Cuando se aplicó la radiación láser por si sola sobre la biopelícula, no se obtuvo una gran reducción en la viabilidad de esta cepa. Y mediante MEB no se visualizaron alteraciones de ningún tipo en estas biopelículas, lo cual es reflejo de los resultados obtenidos para la viabilidad.

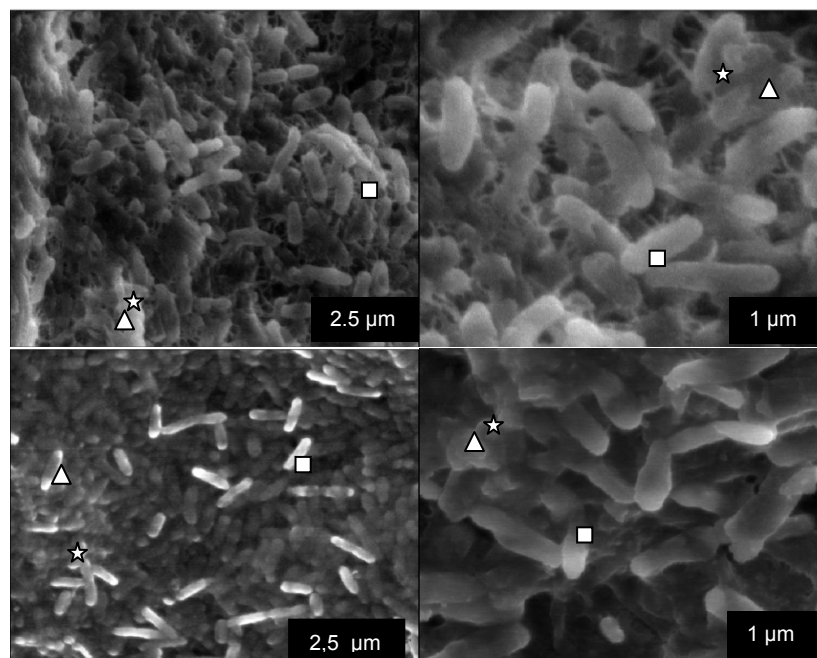


Figura 9. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de las biopelículas de *P. aeruginosa* formadas por la cepa Pa24 tratadas con radiación. A y A1) control experimental a 2 min. B y B1) control experimental a 4 min. (Δ): microcolonias, (□): exopolisacárido, (☆): bacilos.



En la Figura 10 se observan las micrografías correspondientes a las biopelículas de *P. aeruginosa* de la cepa Pa24 tratadas con cuatro concentraciones del colorante.

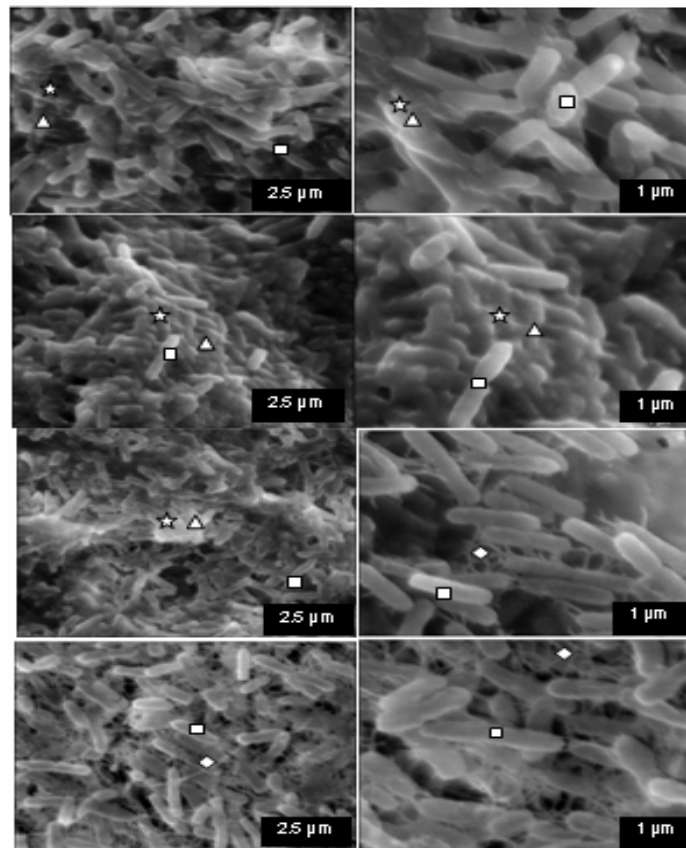


Figura 10. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de las biopelículas de *P. aeruginosa* formadas por la cepa Pa24 tratadas con azul de toluidina O. A y A1) 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. B y B1) 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. C y C1) 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. D y D1) 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. (☆): microcolonias, (□): exopolisacárido, (△): bacilos, (◇): pili.

Las biopelículas tratadas con colorante no presentaron alteraciones morfológicas en cuanto a su estructura y agregación, al compararlas con el control experimental 1. Sin embargo se pudo evidenciar claramente, microcolonias cubiertas por abundante cantidad de exopolisacárido

principalmente en las biopelículas tratadas con  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O, así como bacilos aislados. Además en las Figuras 10C1 y 10D1 se observó la aparición de nuevas estructuras identificadas como *pili*.

En relación a la presencia de *pili*, Donlan (2002) señala que este apéndice participa en la adhesión irreversible de la bacteria a un sustrato, además O'Toole y Kolter (1998) han reportado que estructuras como *pili* tipo IV han sido necesarias para la adhesión y desarrollo de biopelículas de *P. aeruginosa*, ya que probablemente participa en la estabilización de las interacciones entre la bacteria con la superficie abiótica y/o en las interacciones célula – a – célula requeridas para formar las microcolonias.

La ausencia de efecto de las concentraciones de azul de toluidina O en las biopelículas observado a través de las micrografías de MEB es comparable con un estudio realizado por Sharma *et al.* (2008) quienes emplearon la técnica de MEB en biopelículas de estafilococos tratadas con azul de toluidina O y no reportaron alteraciones morfológicas significativas.

En la figura 11 se muestra el efecto del TFD correspondiente a la combinación de las concentraciones del colorante con el tiempo de radiación de 2 min en las biopelículas formadas por la cepa Pa24 de *P. aeruginosa*. Cuando se utilizaron 25, y  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O y radiación por dos minutos (Figuras 11A y A1 y 11B y B1), no se produjeron alteraciones, se observa la presencia de microcolonias bacterianas cubiertas con exopolisacárido y bacilos aislados. Para la concentración de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Figuras 11C y 11C1), además de microcolonias, exopolisacárido y bacilos, se observan nuevamente las estructuras denominadas *pili* (Figura 11C1). En  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Figuras 11D y 11D1) aún se observan microcolonias, indicando que todavía la estructura de la biopelícula no se ve alterada.

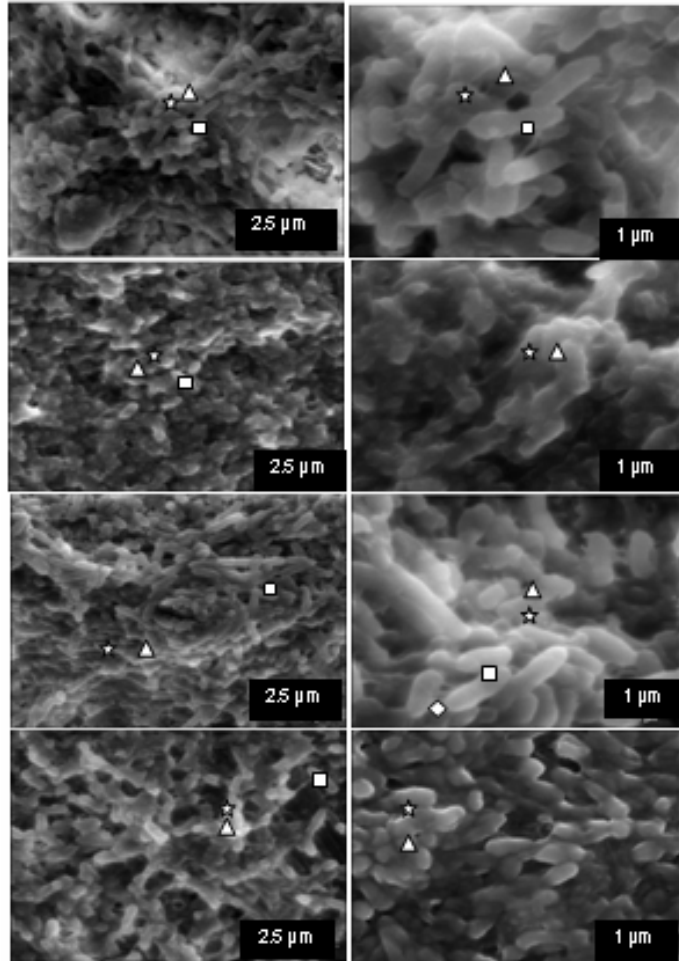


Figura 11. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de las biopelículas de *P. aeruginosa* formadas por la cepa Pa24 con tratamiento fotodinámico correspondiente a las concentraciones de azul de toluidina O en combinación con radiación láser durante 2 min. A y A1) 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. B y B1) 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. C y C1) 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. D y D1) 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. (  $\square$  ): microcolonias, (  $\triangle$  ): exopolisacárido, (  $\star$  ): bacilos, (  $\diamond$  ): pili.

El efecto del TFD con 4 min de radiación y las diferentes concentraciones del fotosensibilizador se muestran en la Figura 12.

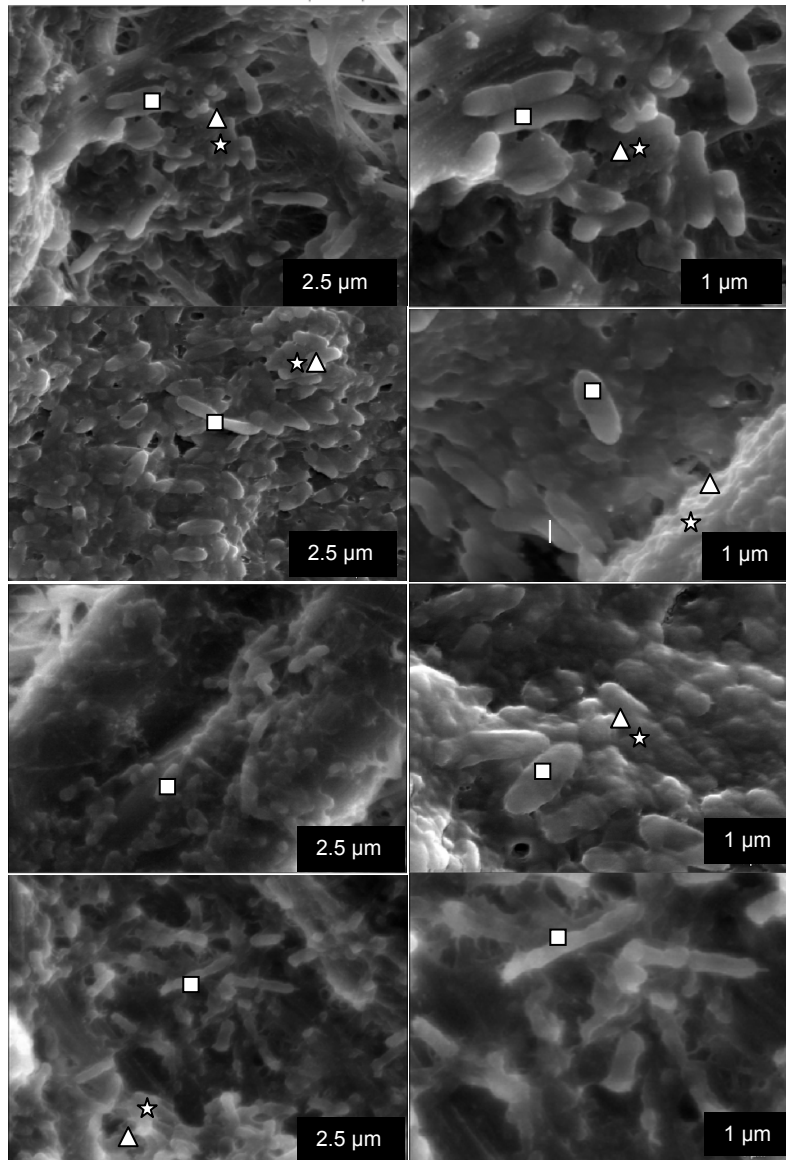


Figura 12. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de las biopelículas de *P. aeruginosa* formadas por la cepa Pa24 con tratamiento fotodinámico correspondiente a las concentraciones de azul de toluidina O en combinación con radiación láser durante 4 min. A y A1) 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. B y B1) 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. C y C1) 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. D y D1) 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de azul de toluidina O. (  $\square$  ): microcolonias, (  $\Delta$  ): exopolisacárido, (  $\star$  ): bacilos.

Para las biopelículas tratadas con colorante e irradiadas por 4 min aunque se observaron los elementos característicos de estas comunidades microbianas como microcolonias y exopolisacárido, se apreció menor cantidad de estos componentes con respecto al TFD con 2 minutos de radiación. En las biopelículas tratadas con  $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  y  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  del colorante (Figuras 12A y A1 y Figuras 12B y B1), se observó que estas concentraciones no tuvieron mayor efecto en la estructura de la biopelícula ya que se evidencian microcolonias con exopolisacárido y bacilos aislados y una estructura poco alterada de la biopelícula. Al evaluar el TFD con  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Figura 12C y 12C1) se observaron alteraciones en la estructura de la biopelícula, como disminución de la presencia de exopolisacárido, éste se encuentra solo en zonas localizadas de estas micrografías (Figuras 12C) y no en toda la biopelícula como se observó en figuras anteriores. El efecto del TFD se hace más marcado cuando se utilizó  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  del colorante (Figuras 12D y 12D1) donde se evidenció deformaciones en los bacilos, observándose muy alargados, no se visualizaron agregados o formaciones de microcolonias cubiertas de exopolisacárido, sólo se observaron bacilos aislados no agregados y con escaso exopolisacárido.

Los resultados del TFD visualizados mediante el procesamiento por MEB puede relacionarse de igual modo con el conteo de viables, ya que la concentración de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en combinación con una radiación de 4 min, fue el tratamiento más efectivo para las biopelículas formadas por la cepa Pa24, a través del cual se observaron alteraciones en la morfología, que indicaron que el TFD afectó la arquitectura de las mismas.

Es importante destacar que las alteraciones visualizadas con la técnica de MEB son superficiales, sólo pudo determinarse disgregación de exopolisacárido y ausencia de microcolonias, por lo que no proporciona

información sobre las modificaciones producidas en el interior de las biopelículas, así una prometedora investigación sería aplicar la técnica de Microscopía electrónica de transmisión para determinar las alteraciones producidas en la biopelícula ultraestructuralmente luego de aplicado el TFD.

El TFD aplicado en biopelículas podría representar una opción viable, principalmente porque el mecanismo de acción fotodinámico actúa en varios blancos simultáneamente en la bacteria (membrana celular, síntesis de proteínas, replicación de ADN) a diferencia de los antibióticos que actúan cada uno en una estructura específica y *P. aeruginosa* forma biopelículas excepcionalmente resistentes compuestas por polisacáridos, entre ellos, alginato, por lo que el TFD será efectivo mientras el fotosensibilizador sea capaz de difundir en la matriz de la biopelícula y la radiación sea capaz de penetrar en ella para irradiarlo, producir la excitación del mismo y que pueda ocurrir de esta manera una serie de transferencias moleculares de energía que conducen a la liberación de oxígeno singlete, lo que producirá la muerte de la célula bacteriana (Pervaiz, 2001). En esta investigación, por tanto, se observó que la concentración más alta del fotosensibilizador en combinación con el tiempo de radiación más largo fue el tratamiento más efectivo para disminuir la viabilidad de las 5 cepas de *P. aeruginosa*.

Es importante resaltar que el grado de eficacia del TFD se atribuye a la intensidad de luz, el tiempo de exposición, la longitud de onda emitida por la fuente de luz y el espectro de absorción del fotosensibilizador, ya que, para alcanzar alguna efectividad este último tiene que ser sensibilizado adecuadamente por la fuente luminosa, pues la toxicidad en la bacteria sólo se producirá cuando la banda de absorción del fotosensibilizador es similar a la longitud de onda de la fuente de luz utilizada (Nowis *et al.*, 2005; Araujo *et al.*, 2007). En este trabajo, por tanto, se pudo contar con un láser de He-Ne,

cuya longitud de onda (633 nm), dentro del rango de absorción del azul de toluidina O, permitió la excitación de las moléculas del colorante que produjeron los procesos fotoquímicos necesarios para la inactivación de las biopelículas.

Entre las características favorables del TFD que podrían convertir esta nueva modalidad terapéutica en una opción clínica se encuentran: desarrollo de protocolos eficientes que actúen en la mayoría de los patógenos microbianos, incluyendo levaduras, hongos y parásitos; alta susceptibilidad al TFD de cepas resistentes a antibióticos sin la selección de cepas fotorresistentes incluso después de múltiples tratamientos por su selectividad en la eliminación de células microbianas en comparación con los constituyentes del tejido hospedador, bajo riesgo de efectos mutagénicos y el empleo de fuentes de luz de bajo costo y seguridad (Hamblin y Hasan, 2004; Jori y Brown, 2004; Durantini, 2006; Jori y Coppellotti, 2007).

En relación con las fuentes de luz Street *et al.* (2009), señalaron la importancia de utilizar tiempos de radiación cortos y bajas concentraciones del fotosensibilizador, ya que son más adecuados para aplicaciones clínicas. Así, condiciones experimentales leves como las empleadas en la presente investigación, permitieron que con sólo 4 min de radiación con el láser de He-Ne se redujera significativamente la viabilidad de las cepas de *P. aeruginosa* ensayadas. Estudios similares, han permitido sugerir que el TFD pueda ser aplicado en la desinfección de biopelículas que crecen, por ejemplo, en catéteres o prótesis externas, así como para inactivar bacterias que crecen *in vivo* como focos de infección localizada, sobre la piel, como por ejemplo infecciones relacionadas con *Pseudomonas* como otitis externa, en la cual la radiación puede ser aplicada en la zona de interés (Hamblin y Hasan, 2004).

Este nuevo acercamiento de visualizar el TFD para infecciones localizadas permite que el fotosensibilizador sea aplicado directamente en el área infectada por métodos como el tópico, instilación, inyección intersticial o en forma de aerosol evitando entrar en contacto con células del hospedador. Por otro lado la estructura del fotosensibilizador (carga catiónica y la estructura macromolecular) significa que se une rápidamente a los microorganismos y es absorbido lentamente por las células del hospedador, así los principales constituyentes de los tejidos humanos, tales como fibroblastos y keratinocitos no son perjudicados, dando una selectividad temporal a los microorganismos. De ahí que si la radiación es aplicada poco después de la administración del fotosensibilizador, el daño en el tejido del hospedador es reducido (Demidova y Hamblim, 2004; Jori *et al.*, 2006).

En este trabajo se utilizó un modelo de formación *in vitro* de biopelículas con un tiempo de incubación con azul de toluidina O de 30 min. Este fotosensibilizador ha proporcionado un alto margen de seguridad en el empleo clínico y en modelos *in vivo* en los cuales, ha sido eficaz en el tratamiento de infecciones de heridas causadas por *Vibrio vulnificus* (Wong *et al.*, 2005) por lo que podría también emplearse en infecciones de heridas causadas por *P. aeruginosa* la cual puede colonizar y dañar tejidos, causando infecciones diseminadas como bacteremia y shock séptico (Church *et al.*, 2006). Por lo tanto, es considerable la importancia del TFD en la infección de heridas causadas por *Pseudomonas* y su tiempo de aplicación.

La aplicación del TFD en infecciones localizadas con fotosensibilizadores como el azul de toluidina O pueden resultar particularmente útiles ya que poseen bandas de absorción en la región del espectro rojo ( $\lambda > 600$  nm) y la penetración de la luz en la mayoría de los



tejidos biológicos aumenta con el incremento de la longitud de onda, al menos en el rango de 400–700 nm (Maisch, 2007).

Es de suma importancia tomar en cuenta que el TFD para infecciones microbianas es una técnica aún en investigación, y sólo se ha aplicado en modelos *in vitro* e *in vivo* (modelos animales). Su traslado al campo clínico aún depende de la optimización de los parámetros del tratamiento, lo cual podría permitir el empleo de esta terapia como una opción adicional al tratamiento con antimicrobianos, ya que una vez que se forma la biopelícula se requieren grandes dosis de antibióticos para lograr la erradicación de ésta lo que incrementa entonces la resistencia, de este modo la necesidad de continuar con esta investigación sería de gran relevancia sobre todo para los pacientes hospitalizados que frecuentemente son colonizados por microorganismos formadores de biopelículas.

## CONCLUSIONES

- Se demostró el desarrollo de varios fenotipos de *P. aeruginosa* relacionados con la formación de biopelículas a través del método de rojo Congo.
- El 100,00% de las cepas de *P. aeruginosa* formaron biopelículas mientras que el 69, 23% de ellas resultaron ser productoras de exopolisacárido
- La prueba de microplaca puede considerarse una técnica de referencia ya que demostró la gran capacidad de *P. aeruginosa* para formar biopelículas en materiales de plástico.
- La radiación por sí sola no tuvo un efecto negativo en la viabilidad de todas las cepas de *P. aeruginosa* ensayadas y a través de la técnica de microscopía electrónica de barrido tampoco se observaron alteraciones morfológicas.
- Las concentraciones de azul de toluidina O por sí solas no causaron reducciones en la viabilidad de las cepas de *P. aeruginosa*, ni alteraron su estructura.
- El efecto del tratamiento fotodinámico en las biopelículas de *P. aeruginosa* fue dependiente tanto de las concentraciones del fotosensibilizador, como de los tiempos de radiación. El TFD tuvo mejor efecto cuando se utilizó la concentración de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  y un tiempo de radiación de 4 minutos.

## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios acerca de la presencia de genes en *P. aeruginosa* causantes de la diversidad fenotípica, así como su relación con la capacidad de formar biopelículas por esta bacteria.
- La técnica de microscopía electrónica de barrido aunque proporciona información en cuanto a la morfología de las biopelículas, requiere la preparación previa de las muestras que consisten en varios pasos que pudieran distorsionar la estructura normal de una biopelícula, por lo que se necesita sumo cuidado a fin de no alterar las muestras para así garantizar los resultados obtenidos.
- Para poder visualizar que tipo de alteraciones se producen internamente en las biopelículas se recomienda aplicar la técnica de microscopía electrónica de transmisión.
- En lo que respecta la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención o disminución de la colonización por microorganismos el tratamiento fotodinámico aplicado en las biopelículas de *P. aeruginosa* podría sugerirse como una nueva opción terapéutica ya que no utiliza antibióticos, eliminando la probabilidad de incrementar la resistencia a éstos, por lo que sería un gran avance en la terapia de las infecciones microbianas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdi-Ali, A.; Mohammadi-Mehr, M. y Agha, Y. 2006. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27: 196–200.
- Anderl, J.; Franklin, M. y Stewart, P. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 1818–1824.
- Araujo, R.; Massayoshi, A.; Suzuki, L.; Eiko, M.; Cai, S.; Gouw-Soares, S.; Gomes, L. y Simoes, M. 2007. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 86: 70–76.
- Banin, E.; Brady, K. y Greenberg, E. 2006. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2064–2069.
- Barreto, S.; Zambrano, M. y Araque, M. 2009. Variaciones fenotípicas de susceptibilidad en cepas de *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial y su asociación con la formación de biopelículas. *Investigación Clínica*, 50(2): 221–229.
- Bellin, J.; Lutwick, L. y Jonas, B. 1969. Effects of photodynamic action on *E. coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 132(1): 157–164.
- Beloin, C.; Roux, A. y Ghigo, J. 2008. *Escherichia coli* biofilms. En: *Bacterial biofilms*. Romeo, T. (ed). Springer Publishers, Florida. Págs. 249–289.
- Bhatti, M.; MacRobert, A.; Meghji, S.; Henderson, B. y Wilson, M. 1998. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochemistry and Photobiology*, 68: 370–376.
- Branda, S.; Vik, S.; Friedman, L. y Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13: 20–26.
- Bravo, L.; Salazar, D.; Arce, M.; García, H.; Ramírez, M.; Cabrera, E.; Fernández, A. y Castañeda, N. 2005. Estudio de factores de virulencia

- en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de animales domésticos y afectivos. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 6(10): 1–12.
- Brown, S. y Mellish, K. 2001. Verteporfin: a milestone in ophthalmology and photodynamic therapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2: 351–361.
- Cabeza, R. 2010. Susceptibilidad antimicrobiana y aislamiento de plásmidos en bacilos Gram negativos no fermentadores aislados de muestras clínicas. Trabajo de grado. Escuela de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Calin, M. y Parasca, S. 2008. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Laser in Medical Science*, 24: 453–460.
- Callicó, A.; Cedré, B.; Sifontes, S.; Torres, V.; Pino, Y.; Callís, A. y Esnard, S. 2004. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *VacciMonitor*, 13(7): 1–9.
- Caminos, D. y Durantini, E. 2006. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 4253–4259.
- Castrillón, L.; Palma, A. y Padilla, M. 2010. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Revista Mexicana*, 54(1): 14–24.
- Chan, Y. y Lai, C. 2003. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Laser in Medical Science*, 18: 51–55.
- Chole, R. y Faddis, B. 2003. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Archives Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 129: 634–636.
- Church, D.; Elsayed, S.; Reid, O.; Winston, B. y Lindsay, R. 2006. Burn wound infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 403–434.
- Costerton, J.; Montanaro, L. y Arciola, C. 2007. Bacterial communications in implant infections: a target for an intelligence war. [The International Journal of Artificial Organs](#), 30: 757–763.
- Costerton, J.; Stewart, P. y Greenberg, E. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318–1322.

- Damas, R. 2007. Influencia de la N-Acetilcisteína en la prevención de la formación y remoción de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*. Trabajo de grado. Departamento Académico de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- D'Argenio, D.; Calfee, M.; Rainey, P. y Pesci, E. 2002. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *Journal of Bacteriology*, 184(12): 6481–6489.
- Decraene, V.; Pratten, J. y Wilson, M. 2006. Cellulose acetate containing toluidine blue and rose bengal is an effective antimicrobial coating when exposed to white light. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6): 4436–4439.
- Demidova, T. y Hamblin, M. 2005. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 2329–2335.
- Demidova, T. y Hamblin, M. 2004. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 17(3): 245–254.
- DeSimone, N.; Christiansen, C. y Dore, D. 1999. Bactericidal effect of 0.95 mW Helium-Neon and 5-mW Indium-Gallium-Aluminium-Phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Physical Therapy*, 79(9): 839–846.
- Dolmans, D.; Fukumura, D. y Jain, R. 2003. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cáncer*, 3: 380–387.
- Donlan, R. y Costerton, J. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 5: 167–193.
- Dougherty, T. 2002. An update on photodynamic therapy applications. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 20: 3–7.
- Durantini, E. 2006. Photodynamic inactivation of bacteria. *Current Bioactive Compounds*, 2: 127–142.

- Friedman, L. y Kolter, R. 2004a. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, 51(3): 675–690.
- Friedman, L. y Kolter, R. 2004b. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of Bacteriology*, 186(7): 4457–4465.
- Gad, F.; Zahra, T.; Hasan, T. y Hamblin, M. 2004. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of Gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 2173–2178.
- Gómez, M. y Prince, A. 2007. Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. [Current Opinion in Pharmacology](#), 7(3): 244–251.
- Gorman, S. y Jones, D. 2003. Biofilm complications of urinary tract devices. En: *Medical Implications of Biofilms*. Wilson, M. y Devine, D. (eds). Cambridge University Press, Cambridge. Págs. 136–170.
- Govan, J. y Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60: 539–574.
- Hamblin, M. y Hasan, T. 2004. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3: 436–450.
- Hausler, S.; Ziegler, I.; Lottel, A.; Gotz, F.; Rohde, M.; Wehmhohner, D.; Saravanamuthu, S.; Tummler, B. y Steinmetz, I. (2003). Highly adherent small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Journal of Medical Microbiology*, 52: 295–301.
- Jori, G.; Fabris, C.; Soncin, M.; Ferro, S.; Coppellotti, O.; Dei, D.; Fantetti, L.; Chiti, G. y Roncucci, G. 2006. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38: 468–481.
- Jori, G. y Brown, S. 2004. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 5: 403–405.
- Jori, G. y Coppellotti, O. 2007. Inactivation of pathogenic microorganisms by photodynamic techniques: mechanistic aspects and perspective applications. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 6: 119–131.

- Komerik, N.; Wilson, M. y Poole, S. 2000. The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gram-negative bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 72: 676–680.
- Komerik, N. y Wilson, M. 2002. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 618–623.
- Koneman, E.; Allen, S.; Dowell, V.; Janda, W.; Schereckenberger, P.; Winn, W.; Procop, G. y Wood, G. 2008. *Diagnóstico microbiológico*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Kübler, A.; Niziol, C.; Sidhu, M.; Dunne, A. y Werner, J. 2005. Cost-effectivity analysis of photodynamic therapy with Foscan (R) (Foscan (R)-PDT) compared with a palliative chemotherapy in patients with advanced head and neck tumors in Germany. *Laryngo- rhino- otologie*, 84: 725–732.
- Lauro, F.; Pretto, L.; Covolo, G. y Bertoloni, G. 2002. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1: 468–470.
- Lee, B.; Haagensen, J.; Ciofu, O.; Andersen, J.; Hoiby, N. y Molin, S. 2005. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10): 5247– 5255.
- Lindsay, D. y Holy, A. 2006. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *The Journal of Hospital Infection*, 64: 313–325.
- Lyczak, J.; Cannon, C. y Pier, G. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection—lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 2(9): 1051–1060.
- Macmillan, J.; Maxwell, W. y Chichester, C. 1966. Lethal photosensitization of microorganisms with light from a continuous-wave gas laser. *Photochemistry and Photobiology*, 5(7): 555–565.
- Mah, T. y O'Toole, G. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9: 34–39.



- Maisch, T. 2007. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?. *Laser in Medical Science*, 22(2): 83–91.
- Mandell, G.; Bennett, J. y Dolin, R. 2000. Principles and practice of infectious diseases. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Estados Unidos.
- May, T. y Chakrabarty, A. 1994. Pseudomonas aeruginosa: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends in Microbiology*, 2: 151–157.
- Meisel, P. y Kocher, T. 2005. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 79: 159–170.
- Nazar, J. 2007. Biofilms bacterianos. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 67: 61–72.
- Nielsen, D. y Osguthorpe, J. 2006. Otitis externa: review and clinical update. *American Family Physician*, 74(9): 1510–1516.
- Nivens, D.; Ohman, D.; Williams, J. y Franklin, M. 2001. Role of alginate and its O acetylation in formation of Pseudomonas aeruginosa microcolonies and biofilms. *Journal of Bacteriology*, 183: 1047–1057.
- Nowis, D.; Makowski, M.; Stoklosa, T.; Legat, M.; Issat, T. y Golab, J. 2005. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica*, 52: 339–352.
- O'Neill, J.; Wilson, M. y Wainwright, M. 2003. Comparative antistreptococcal activity of photobactericidal agents. *The Journal of Chemotherapy*, 15: 329–334.
- Ong, C.; Ulett, G.; Mabbett, A.; Beatson, S.; Webb, R.; Monaghan, W.; Nimmo, G.; Looke, D.; MacEwan, A. y Schembri, M. 2008. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic Escherichia coli reveals a role in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 190(3): 1054–1063.
- O'Toole, G.; Kaplan, H. y Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54: 50–68.
- O'Toole, G. y Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2): 295–304.

- Passerini, B.; Calenda, M.; Vay, C. y Franco, M. 2007. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from device-associated nosocomial infections. *Revista Argentina de Microbiología*, 39: 204–212.
- Percival, S.; Kite, P.; Eastwood, C.; Murga, R.; Carr, J.; Arduino, M. y Donlan, R. 2005. Tetrasodium EDTA as a novel central venous catheter lock solution against biofilm. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 26: 515–519.
- Pervaiz, S. 2001. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents. *The FASEB Journal*, 15: 612–617.
- Phoenix, D.; Sayed, A.; Hussain, S.; Harris, F. y Wainwright, M. 2003. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology*, 39: 17–22.
- Pier, B. 1998. *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis. [The Journal American Society for Microbiology News](#), 6: 339–347.
- Pieslinger, A.; Plaetzer, K.; Oberdanner, C.; Berlanda, J.; Mair, H. y Krammer, B. 2006. Characterization of a simple and homogenous irradiation device based on light-emitting diodes: a possible low-cost supplement to conventional light sources for photodynamic treatment. *Medical Laser Application*, 21: 277–283.
- Plata, A.; Narasimhan, G.; Ohman, D.; Barakat, J.; Hentzer, M.; Molin, S.; Kharazmi, A.; Hoiby, N. y Mathee, K. 2004. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 679–690.
- Ponce, Y. 2010. Evaluación de métodos cualitativos y cuantitativos para la detección de biopelículas en aislados de *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas* sp. de muestras provenientes de centros hospitalarios. Trabajo presentado como requisito para optar al título de Magister Scientiarum en Biología Aplicada Mención Microbiología aplicada. Postgrado de Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Post, J.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L. y Ehrlich, G. 2004. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 12: 185–190.

- Prescott, L.; Harley, J. y Klein, D. 2004. Microbiología. Quinta edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid.
- Raab, O. 1900. Über die wirkung fluorizierender stoffe auf infusorien. Zeitschrift für Biologie, 39: 524–546.
- Rakhimova, E.; Munder, A.; Wiehlmann, L.; Bredenbruch, F. y Burkhard, T. 2008. Fitness of isogenic colony morphology variants of *Pseudomonas aeruginosa* in murine airway infection. PLoS ONE, 3: 1–16.
- Reisner, A.; Toiby, N.; Tolker-Nielsen, T. y Molin, S. 2005. Microbial pathogenesis and biofilm development. En: Concepts in bacterial virulence. Russel, W. y Herwald, H, (eds). [Karger Medical and Scientific Publishers, Basel. Págs. 114–131.](#)
- Rodríguez, D.; Vázquez, L. y Ramos, G. 2005. Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. Revista Latinoamericana de Microbiología, 47:102–111.
- Romanova, N.; Brovko, L.; Moore, L.; Pometun, E.; Savitsky, A.; Ugarova, N. y Griffiths, M. 2003. Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP bioluminescence. Applied and Environmental Microbiology, 69: 6393–6398.
- Ryder, C.; Byrd, M. y Wozniak, D. 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Current Opinion in Microbiology, 10(6): 644–648.
- Sanclement, J.; Webster, P.; Thomas, J. y Ramadan, H. 2005. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. Laryngoscope, 115: 578–582.
- Sanderson, A.; Leid, J. y Hunsaker, D. 2006. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. Laryngoscope, 116: 1121–1126.
- Sharma, M.; Bansal, H. y Gupta, P. 2005. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* cells surviving photodynamic treatment with toluidine blue. Current Microbiology, 50: 277–280.
- Sharma, M.; Visai, L.; Bragheri, F.; Cristiani, I.; Gupta, P. y Speziale, P. 2008. Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52: 299–305.
- Siegel, S. y Castellán, N. 1995. Estadística no paramétrica. Cuarta edición. Editorial Trillas. México.

- Stewart, P. y Costerton, J. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358: 135–138.
- Street, C.; Gibbs, A.; Pedigo, L.; Andersen, D. y Loebel, N. 2009. In vitro photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture. *Photochemistry and Photobiology*, 85: 137–143.
- Sutherland, I. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 14(7): 3–9.
- Tenke, P.; Kovacs, B.; Jackel, M. y Nagy, E. 2006. The role of biofilm infection in urology. *World Journal of Urology*, 24: 13–20.
- Thomas, J. y Nakaishi, L. 2006. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *The Journal of the American Dental Association*, 137: 10–15.
- Thomas, P. y Geraldine, P. 2007. Infectious keratitis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20(2): 129–141.
- Tseng, S.; Teng, L.; Chen, C.; Lo, T.; Hung, W.; Chen, H.; Hsueh, P. y Tsai, J. 2009. Toluidine blue O photodynamic inactivation on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers in Surgery and Medicine*, 41: 391–397.
- Vila, J.; Soriano, A. y Mensa, J. 2008. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26: 48–55.
- Wainwright, M.; Phoenix, D.; Nickson, P. y Morton, G. 2002. The use of new methylene blue in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm destruction. *Biofouling*, 18(4): 247–249.
- Walters, M.; Roe, F.; Bugnicourt, A.; Franklin, M. y Stewart, P. 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 317–323.
- Wong, T.; Wang, Y.; Sheu, H. y Chuang, Y. 2005. Bactericidal effects of toluidine blue-mediated photodynamic action on *Vibrio vulnificus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 895–902.

Wood, J. y Swanson, J. 2007. Aerosolized antibacterials for the prevention and treatment of hospital acquired pneumonia. *Drugs*, 67(6): 903–914.

Zogaj, X.; Nimtz, M.; Rohde, M.; Bokranz, W. y Römling, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39: 1452–1463.

## APÉNDICE

Apéndice 1. Formación de biopelículas por las cepas de *P. aeruginosa* en los pocillos de la microplaca.



## HOJA DE METADATOS

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

<b>Título</b>	<b>EFFECTO DEL TRATAMIENTO FOTODINÀMICO CON AZUL DE TOLUIDINA O EN BIOPELÌCULAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AISLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO "ANTONIO PATRICIO DE ALCALÀ"</b>
<b>Subtítulo</b>	

### Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
<b>FIGUERAS BELMONTE, MARÌA VICTORIA</b>	<b>CVLAC</b>	<b>16.996.423</b>
	e-mail	<b>mvfigueras@gmail.com</b>
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

### Palabras o frases claves:

<b>Exopoliscàrido</b>
<b>Microplaca</b>
<b>Nosocomiales</b>
<b>Tratamiento Fotodinàmico</b>



# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

## Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

## Resumen (abstract):

Se evaluó el efecto del tratamiento fotodinámico (TFD) en cepas de *P. aeruginosa* formadoras de biopelículas. A 26 aislados de *P. aeruginosa* provenientes de muestras clínicas se les determinó la presencia de exopolisacárido para la formación de estas comunidades microbianas a través de la siembra en agar tripticasa de soja suplementado con 0,02% del indicador rojo Congo y la formación de biopelículas se determinó mediante la prueba cuantitativa de microplaca. Las cepas con mayor capacidad de formar biopelículas se sometieron a diferentes concentraciones de azul de toluidina O (25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y a radiación con un láser de Helio-Neón en tiempos de 2 y 4 min. El TFD se aplicó en las biopelículas usando las diversas concentraciones del colorante en combinación con el láser en los dos tiempos señalados. El efecto del tratamiento se evaluó a través del conteo de unidades formadoras de colonias y con microscopía electrónica de barrido (MEB) para visualizar alguna alteración en la morfología de las biopelículas. A través del método de rojo Congo se obtuvieron 18 cepas (69,23%) productoras de exopolisacárido (fenotipo colonias blanco-rosadas) y 8 (30,77%) no productoras de exopolisacárido (fenotipo colonias rojas). En la prueba de microplaca todas las cepas formaron biopelículas fuertes, evidenciada por la presencia de anillos adheridos a las paredes de los pocillos teñidos con cristal violeta. El uso de la radiación láser y las concentraciones del colorante de manera independiente no tuvieron un efecto marcado sobre la disminución de la viabilidad de las bacterias. El TFD en las biopelículas fue más efectivo a medida que se incrementaron las concentraciones del colorante y los tiempos de radiación. El tratamiento más eficaz fue la combinación de las diferentes concentraciones de azul de toluidina O con un tiempo de radiación de 4 min, donde se obtuvo una mayor reducción en los conteos de células con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) en 4 de las 5 cepas tratadas. El estudio con MEB mostró la presencia de biopelículas con abundante exopolisacárido rodeando las microcolonias, bacilos aislados y agregados y pilis. Se evidenció que las micrografías de MEB correspondientes a las biopelículas tratadas con radiación y con las concentraciones del colorante no presentaron alteraciones, mientras que con la concentración de 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  del fotosensibilizador con 4 min de radiación las biopelículas presentaron alteraciones tales como disgregación de exopolisacárido y reducción de la formación de las microcolonias. Estos resultados demuestran que el TFD podría representar en un futuro una opción viable adicional al tratamiento con antimicrobianos para combatir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*.

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
ANTÓN DINA	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8647499
	e-mail	dinacar@hotmail.com
	e-mail	
ARAQUE YASMINA	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
GUZMÁN MILITZA	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2012	02	08
------	----	----

Lenguaje: SPA

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_FiguerasM.doc	Application/word

**Alcance:**

**Espacial :** \_\_\_\_\_ (Opcional)

**Temporal:** \_\_\_\_\_ (Opcional)

**Título o Grado asociado con el trabajo:** Licenciada en Bioanálisis

---

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciada

---

**Área de Estudio:** Bioanálisis

---

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:**  
Universidad de Oriente

---

---

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CUN°0975

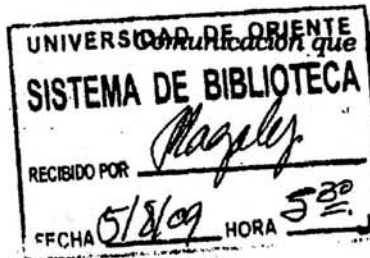
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

*[Handwritten Signature]*  
**JUAN A. BOLANOS CUNVELO**  
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009):** “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



---

**MARIA V. FIGUERAS B.**

**AUTOR**