



TESIS DOCTORAL

**FACTORES DE PATOGENICIDAD EN
*CANDIDA TROPICALIS***

MARÍA DE LOS ÁNGELES GALÁN LADERO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

2014



TESIS DOCTORAL

**FACTORES DE PATOGENICIDAD EN
*CANDIDA TROPICALIS***

MARÍA DE LOS ÁNGELES GALÁN LADERO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

CONFORMIDAD DE LOS DIRECTORES:

FDO. D^a M^a TERESA BLANCO ROCA

FDO. D. CIRO PÉREZ GIRALDO

**D^a. MARIA TERESA BLANCO ROCA, CATEDRÁTICA DE MICROBIOLOGÍA Y
D. CIRO PÉREZ GIRALDO, PROFESOR TITULAR DE MICROBIOLOGÍA,
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA,**

CERTIFICAN

Que **D^a. MARÍA DE LOS ÁNGELES GALÁN LADERO** ha realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Microbiología) el trabajo de TESIS DOCTORAL titulado: “**FACTORES DE PATOGENICIDAD EN CANDIDA TROPICALIS**” y que el mismo reúne, a nuestro juicio, méritos suficientes para poder optar al grado de Doctor en Medicina por esta Universidad, por lo que damos la oportuna autorización para su presentación, con el V^oB^o del Director del Departamento.

Y para que así conste, firmamos el presente CERTIFICADO, en Badajoz, a 23 de marzo de 2014.

Fdo.: Dra. María Teresa Blanco Roca

Fdo.: Dr. Ciro Pérez Giraldo

V^oB^o

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

Fdo.: Dr. Guillermo Sánchez Salgado

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida por parte de:

El proyecto de Investigación PRI09A021 (2009-2011) de la Consejería de Economía, Comercio e Innovación de la Junta de Extremadura “Estudio del papel de la formación de biocapa como mecanismo de resistencia de *Candida* spp. a antimicrobianos”.

Las ayudas a grupo GR10031 de la Junta de Extremadura y FEDER.

La concesión de una beca predoctoral de 2009 de formación de Personal Investigador, vinculada al proyecto de investigación CTS008 de la Junta de Extremadura.

La concesión de una beca de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica para estancias cortas en centros extranjeros.

A mi familia

Tras finalizar esta tesis doctoral, quisiera manifestar en las siguientes líneas mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han hecho posible la realización de este trabajo.

De manera expresa, me gustaría dar las gracias a las siguientes personas:

En primer lugar a mis directores de tesis, la Dra. María Teresa Blanco Roca y el Dr. Ciro Pérez Giraldo, ya que sin su disponibilidad y ayuda, la realización de esta tesis no hubiera sido posible. A la Dra. Blanco por su paciencia, amabilidad y acertados consejos, y al Dr. Pérez por sus continuos ánimos e incondicional apoyo.

Al Dr. Antonio Cándido Gómez García, ya que gracias a sus clases magistrales de Microbiología Clínica en mis primeros años en la Facultad de Medicina de Badajoz inició mi interés por esta especialidad, por su posterior ayuda, así como por su revisión exhaustiva de la tesis y los comentarios realizados, muy oportunos y constructivos.

Al resto de compañeros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Badajoz, por haberme hecho sentir integrada en su grupo, resultando además una experiencia muy positiva tanto a nivel personal como profesional.

Al Dr. Javier Blanco Palenciano, por su cercanía y apoyo durante mi etapa de residente en el Hospital “Infanta Cristina” de Badajoz, así como al resto de mis compañeros de los servicios de Microbiología (Dr. Miguel Fajardo Olivares, Dr. Eugenio Garduño Eseverri, Dra. Rosa Sánchez Silos y Dra. Paloma Martín Cordero) y Análisis Clínicos de este hospital, en especial a la Dra. Beatriz Sacristán Enciso, por todos los conocimientos que me transmitieron y lo mucho que aprendí de ellos.

Al Dr. Jaime Correa Bordes, del Departamento de Microbiología, a la Dra. Amparo Gallardo Moreno, del Departamento de Física Aplicada, de la Facultad de Ciencias, y al equipo de los Servicios de Apoyo a la Investigación, de la Universidad de Extremadura, por su ayuda con los estudios de configuración genética y de hidrofobicidad de superficie celular.

Al Dr. Álvaro Pascual Hernández y al Dr. Felipe Fernández Cuenca, del Hospital “Virgen Macarena” y del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla, por facilitarme la rotación externa durante la residencia en este hospital y la estancia de investigación en la Universidad de Sevilla, así como por ayudarme en los inicios de mi carrera profesional.

A la Dra. Rosário Oliveira, del Departamento de Ingeniería Biológica de la Universidade do Minho (Braga, Portugal), por permitirme realizar una estancia de investigación allí y poder ampliar el marco teórico de la tesis, y por facilitarme material y documentos de trabajo con las últimas tendencias en este campo.

A las Dras. María Teresa Gil Ruiz y Soledad Martínez Huedo por darme la oportunidad de trabajar en mi especialidad, así como por su apoyo diario en el desarrollo de mi profesión. A las Dras. Alicia Beteta López y Lorena Vega Prado, y a mis compañeros del Hospital “Nuestra Sra. del Prado”, por haberme aportado tantos buenos momentos. También a mis compañeros de los hospitales “La Mancha Centro”, “Tomelloso”, “Campo Arañuelo” y “La Inmaculada”.

A mis amigos, por su entusiasmo y apoyo a lo largo de todo este tiempo.

Y por supuesto, a mi familia,

“Agradece a la llama su luz,
pero no olvides el pie
del candil que constante
y paciente la sostiene
en la sombra”.

Rabindranath Tagore

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	pág1
1.1. Factores epidemiológicos de las infecciones causadas por <i>Candida tropicalis</i>. Incidencia y prevalencia	pág3
1.2. Características de <i>C. tropicalis</i>	pág8
1.2.1. Características macroscópicas.....	pág11
1.2.2. Características microscópicas.....	pág11
1.2.3. Características bioquímicas.....	pág12
1.2.4. Características estructurales.....	pág14
1.2.5. Otras características.....	pág16
1.3. Determinantes de patogenicidad de <i>C. tropicalis</i>	pág18
1.3.1. Factores dependientes del hospedador.....	pág18
1.3.2. Factores dependientes del microorganismo.....	pág22
1.3.2.1. Secreción de enzimas-hidrolasas.....	pág23
a. Proteinasas ácidas (aspartil-proteasas).....	pág25
b. Fosfolipasas.....	pág27
c. Esterasas.....	pág30
d. Factor hemolítico.....	pág31
e. Otras enzimas.....	pág33
1.3.2.2. Adherencia a diferentes superficies.....	pág34
a. Adherencia inespecífica. Hidrofobicidad de superficie celular.....	pág34
b. Adherencia específica. Unión ligando-receptor. Adhesinas.....	pág38

1.3.2.3. Formación de biofilm.....	pág46
1.3.2.4. Cambios morfológicos y capacidad de conjugación.....	pág52
a. Dimorfismo.....	pág52
b. Cambios fenotípicos (“switching”) en la morfología de las colonias, y capacidad de conjugación (“mating”).....	pág59
1.3.2.5. Otros factores.....	pág65
2. OBJETIVOS.....	pág68
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	pág74
3.1. Material y equipos. Reactivos.....	pág76
3.2. Medios de cultivo.....	pág82
3.3. Microorganismos.....	pág83
3.4. Estudio de actividad enzimática.....	pág85
3.4.1. Estudio de actividad aspartil-proteasa en medio sólido.....	pág85
3.4.2. Estudio de actividad fosfolipasa en medio sólido.....	pág88
3.4.3. Estudio de actividad esterásica en medio sólido.....	pág91
3.4.4. Estudio de actividad hemolítica en medio sólido.....	pág95

3.5. Estudio de la adherencia a material plástico (poliestireno).....	pág98
3.5.1. Estudio de la adherencia inmediata y tardía.....	pág98
3.5.2. Estudio de la adherencia inespecífica. HSC.....	pág102
3.5.3. Estudio de la adherencia específica. Cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en células planctónicas y sésiles.....	pág105
3.6. Determinación de la capacidad de formación de biofilm.....	pág110
3.6.1. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre placas de poliestireno utilizando como medio de cultivo medio RPMI-1640.....	pág110
3.6.2. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre placas de poliestireno utilizando como medio de cultivo orina artificial.....	pág115
3.6.3. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre catéter Foley bajo condiciones de flujo continuo de orina artificial y su determinación por unidades formadoras de colonias (UFC).....	pág119
3.7. Estudios morfológicos.....	pág121
3.7.1. Estudio de la capacidad de filamentación y crecimiento en función del tiempo y de la temperatura.....	pág121
3.7.2. Estudio de la capacidad de producción de cambios fenotípicos (“switching”).....	pág123
3.8. Estudios de conjugación. Configuración genotípica del locus <i>MTLt</i>.....	pág126
3.9. Estudio estadístico.....	pág130

4. RESULTADOS	pág133
4.1. Aislamiento e identificación	pág135
4.2. Estudio de la actividad enzimática	pág141
4.2.1. Estudio de actividad aspartil-proteasa en medio sólido.....	pág141
4.2.2. Estudio de actividad fosfolipasa en medio sólido.....	pág147
4.2.3. Estudio de actividad esterásica en medio sólido.....	pág153
4.2.4. Estudio de actividad hemolítica en medio sólido.....	pág159
4.2.5. Estudio global de los diferentes perfiles enzimáticos.....	pág165
4.2.6. Comparación de los perfiles enzimáticos de cepas urinarias frente a las no urinarias.....	pág169
4.2.7. Estudio comparativo de la actividad enzimática en función de la temperatura de incubación.....	pág171
4.3. Estudio de la adherencia a material plástico (poliestireno) ...	pág177
4.3.1. Estudio de la adherencia inmediata y tardía.....	pág177
4.3.2. Comparación de la adherencia de cepas urinarias frente a las no urinarias.....	pág185
4.3.3. Estudio de la adherencia inespecífica. HSC.....	pág187
4.3.4. Comparación de la HSC de cepas urinarias frente a las no urinarias.....	pág191
4.3.5. Estudio de la adherencia específica. Cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en células planctónicas.....	pág195

4.4. Estudio de la capacidad de formación de biofilm	pág197
4.4.1. Determinación del crecimiento de <i>C. tropicalis</i>	pág197
4.4.2. Estudio de la capacidad de formación de biofilm.....	pág201
4.4.2.1. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre placas de poliestireno utilizando como medio de cultivo RPMI- 1640.....	pág201
4.4.2.2. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre placas de poliestireno utilizando como medio de cultivo orina artificial.....	pág227
4.4.2.3. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre catéter Foley bajo condiciones de flujo continuo de orina artificial y su determinación por UFC/ml.....	pág231
4.4.2.4. Comparación de la capacidad de formación de biofilm de aislamientos de <i>C. tropicalis</i> de origen urinario en catéteres Foley y en placas de poliestireno.....	pág233
4.4.3. Estudio de la adherencia específica. Cuantificación de la expresión de la proteína Alst-1 en células sésiles.....	pág235
4.4.3.1. Comparación de la expresión de la proteína Alst-1 en células planctónicas y en células sésiles.....	pág237
4.5. Cambios morfológicos y capacidad de conjugación	pág239
4.5.1. Dimorfismo. Capacidad de filamentación.....	pág239
4.5.2. Determinación de la capacidad de “switching”.....	pág242
4.6. Estudios de conjugación. Configuración genotípica del locus MTLt	pág249

4.7. Estudios de correlación entre los diferentes factores de patogenicidad estudiados	pág251
4.7.1. Relación entre la HSC y la adherencia inmediata y tardía a material plástico.....	pág251
4.7.2. Relación entre la HSC y la capacidad de formación de biofilm.....	pág255
4.7.3. Relación entre la adherencia y la formación de biofilm.....	pág255
4.7.4. Relación entre la actividad enzimática y la HSC, la adherencia y la formación de biofilm.....	pág258
4.7.5. Relación entre la capacidad de filamentación y los otros factores de patogenicidad estudiados.....	pág262
4.7.6. Relación entre el crecimiento y la formación de biofilm, y la capacidad de filamentación.....	pág264
4.7.7. Relación entre la capacidad de conjugación y los otros factores de patogenicidad estudiados.....	pág265
5. DISCUSIÓN	pág271
6. CONCLUSIONES	pág326
7. BIBLIOGRAFÍA	pág333

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las principales especies de *Candida* de interés médico.....pág10

Tabla 2. Pruebas de asimilación de *C. tropicalis*.....pág13

Tabla 3. Reacciones de fermentación de *C. tropicalis*.....pág13

Tabla 4. Primers utilizados en el estudio de la cuantificación de la expresión de la proteína ALSt1 en *C. tropicalis*.....pág109

Tabla 5. Primers utilizados en el estudio de la configuración del locus *MTLt* de *C. tropicalis*.....pág129

Tabla 6. Cepas de *C. tropicalis* incluidas en el estudio (n=29). Tipo de muestra, servicio de procedencia de las mismas y patología concomitante con la infección por *Candida*.....pág136

Tabla 7. Actividad aspartil-proteasa a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C. Representación de la media y desviación estándar del índice Pz.....pág142

Tabla 8. Distribución de las cepas según su actividad proteolítica (índice Pz) a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y a 22°C en medio YCB-BSA.....pág144

Tabla 9. Actividad fosfolipasa a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C. Representación de la media y desviación estándar del índice Pz.....pág148

Tabla 10. Distribución de las cepas según su actividad fosfolipasa (índice Pz) a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C en medio SEA.....pág150

Tabla 11. Actividad esterásica a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C. Representación de la media y desviación estándar del índice Pz.....pág154

Tabla 12. Distribución de las cepas según su actividad esterásica (índice Pz) a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y a 22°C en medio Tween-80.....pág156

Tabla 13. Actividad hemolítica a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C. Representación de la media y desviación estándar del índice Pz.....pág160

Tabla 14. Distribución de las cepas según su actividad hemolítica (índice Pz) a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C en agar sangre.....pág162

Tabla 15. Representación del número de aislamientos con (positivos) o sin (negativos) actividad enzimática a las 24, 48 y 72 horas a 37°C y 22°C según el tipo de enzima.....pág166

Tabla 16. Diferentes actividades enzimáticas de las cepas de *C. tropicalis* del estudio en función de su origen urinario o no urinario a las 72 horas de estudio. Valores estadísticos.....pág169

Tabla 17. Medida de la adherencia inmediata (15 minutos) y tardía (24 horas), 37°C y 22°C.....pág178

Tabla 18. Adherencia de cepas de origen urinario y no urinario a 37°C y 22°C.....pág185

Tabla 19. Proporción de cepas con HSC alta, media y baja a 37°C y 22°C.....pág188

Tabla 20. Medida de la hidrofobicidad de superficie celular a 37°C y 22°C.....pág189

Tabla 21. Proporción de cepas de origen urinario y no urinario con HSC alta, media y baja a 37°C y 22°C.....pág192

Tabla 22. Cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en células planctónicas de *C. tropicalis*.....pág196

Tabla 23. Medida del crecimiento a las 24 horas y 96 horas a 37°C y 22°C.....pág199

Tabla 24. Medida de la formación de biofilm (D.O.) a las 24 horas y 96 horas, a 37°C-22°C.....pág203

Tabla 25. Medida de la formación del biofilm (Índice de Slime) a las 24 horas y 96 horas, a 37°C y 22°C.....pág210

Tabla 26. Medida de la actividad mitocondrial del biofilm (XTT) a las 24 horas y 96 horas, a 37°C y 22°C.....pág216

Tabla 27. Medida de la formación del biofilm (Índice de Slime-XTT) a las 24 horas y 96 horas, a 37°C y 22°C.....pág222

Tabla 28. Crecimiento, formación de biofilm e Índice Slime en placa de poliestireno a las 24 h de incubación en orina artificial y en medio RPMI-1460.....pág228

Tabla 29. Formación de biofilm en catéter Foley a 37°C en orina artificial estéril. Resultados ELISA (Cristal violeta 1%) y recuento de UFC/ml.....pág231

Tabla 30. Cuantificación de la expresión de la proteína Ast1 en células sésiles de distintas cepas de *C. tropicalis*. Valores netos.....pág236

Tabla 31. Expresión de la proteína Alst1 en células sésiles de biofilm con respecto a sus correspondientes planctónicas.....pág238

Tabla 32. Niveles de filamentación a las 24 y 96 horas, a 37°C y 22°C.....pág240

Tabla 33. Clasificación en niveles de la capacidad de filamentación a 37°C y 22°C.....pág241

Tabla 34. Número de fenotipos observados en ausencia o presencia de CO₂, a 25°C.....pág247

Tabla 35. Coeficiente de correlación de Pearson (R²). Relación entre la actividad Aspartil-proteasa y Fosfolipasa a las 24, 48 y 72 horas y la HSC, la adherencia inmediata y tardía y la formación de biofilm a las 24 y 96 horas. Todas las cepas.....pág260

Tabla 36. Coeficiente de correlación de Pearson (R²). Relación entre la actividad esterásica y hemolítica a las 24, 48 y 72 horas y la HSC, la adherencia inmediata y tardía y la formación de biofilm a las 24 y 96 horas. Todas las cepas.....pág261

Tabla 37. Comparación entre la formación de biofilm (DO; IS-DO) y la filamentación entre el grupo de cepas heterocigotas para el locus *MTL* frente a las homocigotas.....pág266

Tabla 38. Principales características de las cepas de *C. tropicalis* homocigotas para el gen *MTL*.....pág267

Tabla 39. Resultados de HSC, adherencia y biofilm de 30 cepas de *C. tropicalis* a 37°C y 22°C.....Anexo I

Tabla 40. Diferentes morfotipos de *C. tropicalis*, a 25°C, sin CO₂. Rango de valores.....Anexo II

Tabla 41. Diferentes morfotipos de *C. tropicalis*, a 25°C, con CO₂. Rango de valores.....Anexo II

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *C. tropicalis* en medio Can ID2 agar.....pág11

Figura 2. Pseudohifas de *C. tropicalis* con presencia de blastoconidias individuales (A) o en muy pequeños grupos (B).....pág11

Figura 3. Estructura básica de la pared de *Candida* spp.pág15

Figuras 4. Representación filogenética de *C. tropicalis*.pág17

Figura 5. Lugares de acción de varias fosfolipasas (a) A1 y A2, PLA₁ y PLA₂, respectivamente; B, PLB; C, PLC; D, PLD. (b) Lyso-PL y Lyso-PL transacilasa.pág28

Figura 6. Manoproteínas de pared celular.....pág35

Figura 7. Adherencia a material plástico (A) y a tejidos del hospedador (B y C).....pág38

Figura 8. Presencia de genes *ALS* en diferentes especies de *Candida*.....pág40

Figura 9. Distribución de *Als1* en *C. albicans*.....pág42

Figura 10. Familias de genes en diferentes especies de *Candida*. Adhesinas Als-like en *C. tropicalis*.....pág45

Figura 11. Biofilm de *C. tropicalis*.....pág46

Figura 12. Formación de biofilm por *C. tropicalis*.....pág48

Figura 13. Dimorfismo en *C. tropicalis* (A, levaduras; B, formas filamentosas).....pág53

Figura 14. “Switching” en *C. tropicalis*.....pág59

Figura 15. Colonia de morfología lisa en *C. tropicalis*.....pág60

Figura 16. Conjugación en *S. cerevisiae* y *C. albicans*.....pág63

Figura 17. “Switching” en *C. albicans* (A) y en *C. tropicalis* (B).....pág63

Figura 18. Representación de locus *MTL* en diferentes especies de *Candida*.....pág64

Figura 19. Lectura de la actividad aspartil-proteasa en el medio YCB-BSA de cuatro cepas de *C. tropicalis* incubadas a 37°C y 22° C.....pág87

Figura 20. Lectura de la actividad fosfolipasa en el medio SEA de las cepas control de *C. tropicalis* y *C. albicans* a 37°C y 22°C.....pág94

Figura 21. Lectura de la actividad esterásica en medio con Tween 80 en dos cepas de *C. tropicalis* incubadas a 37°C y 22° C.....pág94

Figura 22. Lectura de la actividad hemolítica en dos cepas de *C. tropicalis* a 37°C.....pág97

Figura 23. Estudios de adherencia a material plástico (placas Greiner).....pág101

Figura 24. Lectura de la hidrofobicidad de superficie celular en cepas de *C. tropicalis* incubadas en medio RPMI-1640 a 37°C (5) y a 22° C (6).....pág104

Figura 25. Formación de biofilm en placas Greiner.....pág110

Figura 26. Actividad metabólica del biofilm en placas Greiner.....pág113

Figura 27. Formación de biofilm sobre placa Greiner. Medio de cultivo: orina artificial.....pág118

Figura 28. Tinción con cristal violeta (al 1%) del biofilm formado sobre placa Greiner. Medio de cultivo: orina artificial.....pág118

Figura 29. Expresión de “switching” en diferentes cepas de *C. tropicalis*.....pág125

Figura 30. Procedencia de los aislamientos de *C. tropicalis* incluidos en el estudio según su origen intra o extrahospitalario.....pág137

Figura 31. Procedencia de los aislamientos de *C. tropicalis* de origen intrahospitalario según el servicio a partir del cual se obtuvieron las muestras.....pág137

Figura 32. Procedencia de los aislamientos de *C. tropicalis* del estudio según su localización por aparatos y sistemas.....pág139

Figura 33. Proporción de *C. tropicalis* en candidurias. Período 2003-2006; CHUB.....pág139

Figura 34. Evolución de la actividad aspartil-proteasa a las 24, 48 y 72h, 37°C.....pág146

Figura 35. Actividad aspartil-proteasa medida a las 24h y 72h de incubación, 37°C.....pág146

Figura 36. Evolución de la actividad aspartil-proteasa a las 24, 48 y 72h, 22°C.....pág146

Figura 37. Actividad aspartil-proteasa medida a las 24h y 72h de incubación, 37°C.....pág146

Figura 38. Evolución de la actividad fosfolipasa a las 24, 48 y 72h, 37°C.....pág152

Figura 39. Actividad fosfolipasa medida a las 24 y 72h de incubación, 37°C.....pág152

Figura 40. Evolución de la actividad fosfolipasa a las 24, 48 y 72h, 22°C.....pág152

Figura 41. Actividad fosfolipasa medida a las 24 y 72h de incubación, 22°C.....pág152

Figura 42. Evolución de la actividad esterásica a las 24, 48 y 72h, 37°C.....pág158

Figura 43. Actividad esterásica medida a las 24 y 72h de incubación, 37°C.....pág158

Figura 44. Evolución de la actividad esterásica a las 24, 48 y 72h, 22°C.....pág158

Figura 45. Actividad esterásica medida a las 24 y 72h de incubación, 22°C.....pág158

Figura 46. Evolución de la actividad hemolítica las 24, 48 y 72h, 37°C.....pág164

Figura 47. Actividad hemolítica medida a las 24 y 72h de incubación, 37°C.....pág164

Figura 48. Evolución de la actividad hemolítica las 24, 48 y 72h, 22°C.....pág164

Figura 49. Actividad hemolítica medida a las 24 y 72h de incubación, 22°C.....pág164

Figura 50. Representación de la media del índice Pz de actividad aspartil-proteasa, fosfolipasa, esterásica y hemolítica a las 72 horas de estudio, a 37°C.....pág168

Figura 51. Representación de la media del índice Pz de actividad aspartil-proteasa, fosfolipasa, esterásica y hemolítica a las 72 horas de estudio, a 22°C.....pág168

Figura 52. Perfil enzimático (media del índice de actividad Pz a las 72 horas de estudio a 37°C) de las cepas de *C. tropicalis* obtenidas a partir de muestras de orina y las aisladas a partir de otros tipos de muestras.....pág170

Figura 53. Perfil enzimático (media del índice de actividad Pz a las 72 horas de estudio a 22°C) de las cepas de *C. tropicalis* obtenidas a partir de muestras de orina y las aisladas a partir de otros tipos de muestras.....pág170

Figura 54. Estudio comparativo de la actividad aspartil-proteasa (Índice Pz) a 37°C frente a la actividad aspartil-proteasa (Índice Pz) a 22°C a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de estudio.....pág173

Figura 55. Estudio comparativo de la actividad fosfolipasa (Índice Pz) a 37°C frente a la actividad fosfolipasa (Índice Pz) a 22°C a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de estudio.....pág174

Figura 56. Estudio comparativo de la actividad esterásica (Índice Pz) a 37°C frente a la actividad esterásica (Índice Pz) a 22°C a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de estudio.....pág175

Figura 57. Estudio comparativo de la actividad hemolítica (Índice Pz) a 37°C frente a la actividad hemolítica (Índice Pz) a 22°C a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de estudio.....pág176

Figura 58. Adherencia inmediata y tardía a 37°C.....pág180

Figura 59. Comparación adherencia inmediata y tardía, 37°C.....pág180

Figura 60. Adherencia inmediata y tardía a 22°C.....pág180

Figura 61. Comparación adherencia inmediata y tardía, 22°C.....pág180

Figura 62. Adherencia a los 15 minutos, 22°C frente a 37°C.....pág181

Figura 63. Comparación adherencia a los 15 minutos, 37°C frente a 22°C.....pág182

Figura 64. Adherencia a las 24 horas, 22°C frente a 37°C.....pág182

Figura 65. Comparación adherencia a las 24 horas, 37°C frente a 22°C.....pág182

Figura 66. Adherencia a 37°C (A) y 22°C (B). Cepas 442 (1), 444 (2), 446 (3), 448 (4).....pág183

Figura 67. Comparación de la adherencia entre cepas de origen urinario y no urinario.....pág186

Figura 68. HSC a 37°C y a 22°C.....pág190

- Figura 69.** Comparación entre la proporción de la HSC a 37°C y a 22°C.....pág190
- Figura 70.** Comparación de los valores medios de HSC en las cepas de procedencia urinaria frente a las de procedencia no urinaria a 37°C y 22°C.....pág193
- Figura 71.** Comparación de los valores medios de HSC en las cepas de procedencia urinaria frente a las cepas de procedencia no urinaria a 37°C y 22°C, clasificadas por niveles.....pág193
- Figura 72.** Comparación entre la proporción de la HSC a 37°C y a 22°C. Cepas de procedencia urinaria.....pág194
- Figura 73.** Comparación entre la proporción de la HSC a 37°C y a 22°C. Cepas de procedencia no urinaria.....pág194
- Figura 74.** Representación de la expresión de proteína Alst1 en células planctónicas de *C. tropicalis* clasificadas según su grado de producción de biofilm.....pág196
- Figura 75.** Resultados del crecimiento a las 24 y 96 horas a 37°C, corregidos con inóculo inicial.....pág200
- Figura 76.** Resultados del crecimiento a las 24 y 96 horas a 22°C, corregidos con inóculo inicial.....pág200

- Figura 77.** Resultados del crecimiento a las 24 horas, 37°C-22°C, corregidos con inóculo inicial.....pág200
- Figura 78.** Resultados del crecimiento a las 96 horas, 37°C-22°C, corregidos con inóculo inicial.....pág200
- Figura 79.** Formación de biocapa a las 24 y 96 horas a 37°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág204
- Figura 80.** Estudio comparativo de la formación de biocapa a las 24 y 96 horas a 37°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág204
- Figura 81.** Formación de biocapa a las 24 y 96 horas a 22°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág204
- Figura 82.** Estudio comparativo de la formación de biocapa a las 24 y 96 horas a 37°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág204
- Figura 83.** Formación de biocapa a las 24 horas a 37°C-22°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág205
- Figura 84.** Estudio comparativo de la formación de biocapa a las 24 horas 37°C-22°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág205

- Figura 85.** Formación de biocapa a las 96 horas a 37°C-22°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág205
- Figura 86.** Estudio comparativo de la formación de biocapa a las 24 horas 37°C-22°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág205
- Figura 87.** Representación de cepas no productoras de biofilm (1, cepa 432), cepas con producción intermedia (2, cepa 429) y cepas muy productoras de biofilm (3, cepa 434), a 37 (A) y 22°C (B).....pág206
- Figura 88.** Comparación entre la formación de biofilm de cepas de procedencia urinaria frente a las de origen no urinario.....pág207
- Figura 89.** Índice de slime (biofilm corregido con crecimiento) a las 24 y 96 horas a 37°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág211
- Figura 90.** Estudio comparativo de índice de slime a las 24 y 96 horas a 37°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág211
- Figura 91.** Índice de slime (biofilm corregido con crecimiento) a las 24 y 96 horas a 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág211
- Figura 92.** Estudio comparativo de índice de slime a las 24 y 96 horas a 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág211

Figura 93. Índice de slime (biofilm corregido con crecimiento) a las 24 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág212

Figura 94. Estudio comparativo de índice de slime a las 24 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág212

Figura 95. Índice de slime (biofilm corregido con crecimiento) a las 96 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág212

Figura 96. Estudio comparativo de índice de slime a las 96 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág212

Figura 97. Comparación de la formación de biofilm (IS-OD) en cepas de origen urinario en relación con las de origen no urinario a 37°C y 22°C.....pág213

Figura 98. D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 37°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).....pág217

Figura 99. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 37°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág217

Figura 100. D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 22°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).....pág217

Figura 101. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág217

Figura 102. D.O.XTT a las 24 horas a 37°C-22°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).....pág218

Figura 103. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 24 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág218

Figura 104. D.O.XTT a las 96 horas a 37°C-22°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).....pág218

Figura 105. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 96 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág218

Figura 106. Comparación de la actividad del biofilm (XTT) de cepas urinaria y no urinarias a 37°C y 22°C.....pág219

Figura 107. Índice Slime-XTT a las 24 y 96 horas a 37°C. Todas las cepas. (BF+ y BF-).....pág223

Figura 108. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 37°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág223

Figura 109. Índice Slime-XTT a las 24 y 96 horas a 22°C. Todas las cepas. (BF+ y BF-).....pág223

Figura 110. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág223

Figura 111. Índice Slime-XTT a las 24 horas a 37°C-22°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).....pág224

Figura 112. Estudio comparativo de Índice Slime-XTT a las 24 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág224

Figura 113. Índice Slime-XTT a las 96 horas a 37°C-22°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).....pág224

Figura 114. Estudio comparativo de Índice Slime-XTT a las 96 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).....pág224

Figura 115. Comparación de la actividad del biofilm de cepas de origen urinario y no urinario a 37 y 22°C.....pág225

Figura 116. Formación de biofilm e Índice de Slime a las 24 horas de incubación en placas de poliestireno a 37°C incubadas en orina artificial (A y C) y en medio RPMI-1440 (B y D).....pág229

Figura 117. Formación de biofilm utilizando medio de cultivo orina artificial (A) o medio RPMI-1640 (B) a 37°C, 24 horas. Cepas CECT-1440 (1), 368 (2), 441 (3) y 442 (4).....pág230

Figura 118. Formación de biofilm en catéteres Foley a 37°C en orina artificial.....pág 232

- Figura 119.** Recuento de unidades formadoras de colonia por mililitro, catéter Foley.....pág232
- Figura 120.** Formación de biofilm en catéter urinario (BF-Foley) y en placa de microtitulación en orina artificial (BF-OA mp) o en medio RPMI-1640 (BF RPMI-1460).....pág234
- Figura 121.** Representación de la formación de biofilm en catéter urinario (BF-Foley) y en placa de microtitulación en orina artificial (BF-OA mpIS) o en medio RPMI-1640 (BF-RPMI mp IS), en función del índice de Slime.....pág234
- Figura 122.** Cuantificación de la expresión de la proteína Alst-1 en células sésiles de cepas de *C. tropicalis* muy productoras o poco productoras de biofilm.....pág236
- Figura 123.** Expresión de la proteína Alst-1 en células sésiles de biofilm en relación a sus correspondientes planctónicas.....pág238
- Figura 124.** Estudio de filamentación a 37°C (A,C) y 22°C (B,D) a las 24 (A,B) y 96 horas (C,D).....pág241
- Figura 125.** Principales morfotipos de las colonias de *C. tropicalis* estudiadas sin presencia de CO₂.....pág245

Figura 126. Principales morfotipos de las colonias de *C. tropicalis* estudiadas en presencia de CO₂.....pág246

Figura 127. Número de morfotipos de cepas de *C. tropicalis* en ausencia o presencia de CO₂.....pág248

Figura 128. Número de morfotipos de cepas de *C. tropicalis* de origen no urinario en ausencia o presencia de CO₂.....pág248

Figura 129. Número de morfotipos de cepas de *C. tropicalis* de origen urinario en ausencia o presencia de CO₂.....pág248

Figura 130. Detección de los genes *MTLt* en *C. tropicalis*.....pág250

Figura 131. Relación entre la HSC y la adherencia inmediata (A y B) y tardía (C y D) a 37°C (A y C) y 22°C (B y D).....pág253

Figura 132. HSC y adherencia inmediata y tardía a 37°C y 22°C.....pág254

Figura 133. Relación entre la HSC y la formación de biofilm (BF-DO) a las 24 (A y B) y 96 horas (C y D), para 37°C (A,C) y 22°C (B,D).....pág256

Figura 134. Relación entre la adherencia inmediata (A, B) y tardía (C, D) y la formación de biofilm (BF-DO) a las 24 y 96 horas, para 37°C (A, C) y 22°C (B, D).....pág257

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Factores epidemiológicos de las infecciones causadas por *Candida tropicalis*. Incidencia y prevalencia.

Las infecciones debidas a patógenos fúngicos oportunistas se han incrementado considerablemente en los últimos años en relación con el aumento de la tasa de población de pacientes inmunocomprometidos, con alteración de las barreras de protección o sometidos a antibioterapia de amplio espectro (Blumberg *et al.*, 2001; Aktas *et al.*, 2002; Sugita *et al.*, 2002; Diekema y Pfaller, 2004; Kojic y Darouiche, 2004; Fridkin, 2005; Nucci y Marr, 2005; da Silva *et al.*, 2007; Kothavade *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2010; Jayatilake, 2011; Seneviratne *et al.*, 2011). Las especies aisladas más frecuentemente pertenecen al género *Candida* o *Aspergillus* (França *et al.*, 2010; Lamagni *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2011 (a)). Microorganismos que se consideraban contaminantes se confirman actualmente como patógenos en estos pacientes.

En la práctica clínica, aunque la especie del género *Candida* encontrada con más frecuencia es *Candida albicans*, otras especies de *Candida* no *albicans* como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* están emergiendo como patógenos oportunistas (Aktas *et al.*, 2002; Pfaller y Diekema, 2007; Lai *et al.*, 2008; Schelenz, 2008; Galán-Ladero *et al.*, 2010; Kothavade *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012), y su frecuencia se ha visto aumentada proporcionalmente incluso más que la de *C. albicans* (Krcmery y Barnes, 2002; Cheng *et al.*, 2004; Pemán *et al.*, 2005). Así, los índices de aislamiento de *C. tropicalis* en todo el mundo

aumentaron un 2,9% en el periodo de tiempo comprendido entre 1997 y 2003 (Pfaller *et al.*, 2005). Este hecho puede deberse tanto al perfeccionamiento de los métodos diagnósticos de rutina (introducción de medios de cultivo cromógenos con capacidad de diferenciar entre las distintas especies de *Candida* para los aislamientos primarios, utilización de nuevas técnicas de diagnóstico molecular,...) como al uso a amplia escala de los antimicóticos como profilaxis en pacientes inmunodeprimidos, lo cual favorecería la selección de estas especies en presencia de ciertos antifúngicos debido a su mayor nivel de resistencia a los mismos (Roilides *et al.*, 2003; Perfect, 2004; Hsueh *et al.*, 2005; González *et al.*, 2007; Da Costa *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2009). En concreto, en *C. tropicalis* se ha observado un aumento progresivo de la resistencia a fluconazol (Tortorano *et al.*, 2003; Myoken *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004).

C. tropicalis, tradicionalmente considerada un microorganismo oportunista de la microbiota humana normal, es una de las especies emergentes de *Candida* no *albicans* aislada con mayor frecuencia en clínica (Comert *et al.*, 2007; Kliemann *et al.*, 2008; Marol y Yucesoy, 2008; Da Costa *et al.*, 2009; França *et al.*, 2010), siendo descrita por algunos autores como la segunda especie más prevalente del género *Candida* (sola o en asociación con *Candida parapsilosis*) tras *C. albicans* (Kao *et al.*, 1999; Kontoyiannis *et al.*, 2001; Ellis, 2002).

Las diferentes especies de *Candida* en general, representan la cuarta causa más frecuente de septicemia de origen nosocomial en EE.UU. (Wenzel y Pfaller, 1991; Pfaller *et al.*, 1998; Wisplinghoff *et al.*, 2004; Pontón y Ruiz, 2006; Liu y Filler, 2011) tras los estafilococos coagulasa negativos, *Staphylococcus aureus* y enterococos, y la sexta en Europa

(Marchetti *et al.*, 2004; Rodríguez-Creixems *et al.*, 2008). Aunque la especie aislada con mayor frecuencia continúa siendo *C. albicans*, las especies de *Candida* no *albicans* han pasado a causar aproximadamente la mitad de todos los casos de candidemia (Pfaller *et al.*, 2001; Krcmery y Barnes, 2002; Rodríguez *et al.*, 2010), relacionándose con factores tales como trasplantes hematológicos, exposición previa a fluconazol y edad neonatal. Actualmente, *C. tropicalis* ocupa el segundo (Colombo *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012) o tercer puesto (Rodríguez *et al.*, 2010), según estudios, en la producción de candidemia, existiendo amplias variaciones en la prevalencia en función de la localización geográfica. Así, en algunos países como la India y Malasia (en este último caso conjunto con *C. parapsilosis*; Ng *et al.*, 2001) constituye la causa más común de candidemia de origen nosocomial (Verma *et al.*, 2003; Kothari y Sagar, 2009; Giri y Kindo, 2012), incluso por delante de *C. albicans*, y en Brasil hasta un 20% de los episodios de candidemia son causados por *C. tropicalis* (Colombo y Guimarães, 2003; Nucci y Colombo, 2007). En España existen estudios que la sitúan en el tercer (Rodríguez *et al.*, 2010) o cuarto puesto (Muñoz *et al.*, 2011), con una incidencia actualmente en aumento (Muñoz *et al.*, 2011).

Ha sido observada como el agente etiológico más habitualmente productor de candidiasis invasiva en pacientes neutropénicos (sobre todo en los casos de pacientes con leucemias agudas o con trasplante de médula ósea) (Sandford *et al.*, 1980; Kothavade *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010).

Ocupa el tercer puesto tras *C. albicans* y *C. glabrata* en la producción de pericarditis candidiásica (Kothavade *et al.*, 2010), y se asocia

frecuentemente con infecciones del tracto urinario de origen nosocomial (Jang *et al.*, 2005; Kothavade *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2010), probablemente debido a diferentes factores, como el uso previo de instrumentación urológica y la presencia de catéteres urinarios, la administración prolongada de antibioterapia de amplio espectro y la edad avanzada (Jang *et al.*, 2005), registrándose como la tercera especie del género *Candida* aislada con mayor frecuencia a partir de cultivos de orina (Kauffman *et al.*, 2000; Álvarez-Lerma *et al.*, 2003). Otros estudios (Nucci, 2000; Matsumoto *et al.*, 2002; Weinberger *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2007), la sitúan en segundo lugar tras *C. albicans*. La presencia de candiduria puede ser secundaria a la invasión del parénquima renal de origen sistémico, a la propia infección de las vías urinarias bajas o provenir de la colonización del tracto urinario (Jang *et al.*, 2005). Álvarez-Lerma *et al.*, 2003, reconocen la presencia de candiduria con candidemia asociada o con candidiasis invasiva. En infecciones de origen nosocomial en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, el aislamiento de *Candida* en orina resulta más frecuente en función de los días de permanencia en las mismas. Debido a su capacidad de formar bezoares (bolas fúngicas) (Krishnasamy y Liby, 2010; Jiang *et al.*, 2011; Abbass *et al.*, 2012), *C. tropicalis* también ha sido descrita como causa de nefropatía obstructiva.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que muchos de los estudios epidemiológicos realizados no consideran la reclasificación y subdivisión de la especie *C. parapsilosis* en las nuevas especies *methapsilosis*, *orthopsilosis* y *parapsilosis*, valorándolas en global como una única especie, encontrándose de este modo la incidencia real de *C. parapsilosis* en estos estudios sobreestimada, ocupando por tanto otras especies como *C.*

tropicalis un lugar aún más destacado en la clasificación de la frecuencia por especies.

A pesar de que a la mayoría de las infecciones producidas por *C. tropicalis* se les atribuye un origen endógeno (Edwards, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Pontón y Ruiz, 2006) al ser considerada la segunda especie de *Candida* en frecuencia colonizando humanos (Zhang *et al.*, 1997), se han descrito raros brotes de candiduria (Jang *et al.*, 2005) y casos esporádicos relacionados de fungemia (Shin *et al.*, 2004) e infección de herida quirúrgica (Isenberg *et al.*, 1989; Doebbeling *et al.*, 1991) por *C. tropicalis* de origen nosocomial, probablemente debidos a su capacidad de persistir durante periodos prolongados de tiempo en superficies inanimadas, pudiendo posteriormente ser éstas fuente de infección nosocomial (Marcos-Arias *et al.*, 2009 (b)).

En algunos casos, *C. tropicalis* ha llegado a aparecer como una especie incluso más virulenta y con mayor capacidad invasiva que la propia *C. albicans* (Krcmery y Barnes, 2002; Okawa *et al.*, 2008) y que otras especies del género *Candida* (Arendrup *et al.*, 2002, Okawa *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2011), especialmente en pacientes que presentan leucemia o enfermedades malignas linforreticulares, demostrando un alto potencial de diseminación y una elevada mortalidad (Krcmery y Barnes, 2002; Colombo *et al.*, 2007; Okawa *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010). Observaciones clínicas y experimentales sugieren que las tasas de morbi-mortalidad de las infecciones causadas por *C. tropicalis* son mayores que las debidas a *C. albicans* (Wingard *et al.*, 1979; Fromtling *et al.*, 1987; Muñoz *et al.*, 2011), siendo capaz de producir infección sistémica con niveles de inóculo menores que *C. albicans*.

1.2. Características de *C. tropicalis*.

C. tropicalis (Bennet, en 1844; Castellani, en 1910; Berkhout, en 1923) pertenece al género *Candida*, incluida en el orden *Saccharomycetales*, dentro de la división *Ascomycetos*. En la Tabla 1 se representa la clasificación taxonómica de las principales especies de *Candida* de interés médico.

Aldo Castellani (1877-1971) diferenció algunas especies de *Candida* durante su estancia en Ceilán (actual Sri Lanka) en 1910, destacando entre ellas *C. tropicalis*, a la que inicialmente denominó *Oidium tropicalis*. Previamente a su nomenclatura actual, *C. tropicalis* recibió diversos nombres: *Saccharomyces linguae-pilosae*, *Cryptococcus linguae-pilosae*, *Myceloblastanon linguae-pilosae*, *Torulopsis linguae-pilosae*, *Castellania linguae-pilosae*, *Endomyces tropicalis*, *Monilia tropicalis*, *Atelosaccharomyces tropicalis*, *Myceloblastanon tropicale*, *Mycotorula tropicalis*, *Procandida tropicalis*, *Endomyces paratropicalis*, *Monilia paratropicalis*, *Atelosaccharomyces paratropicalis*, *Myceloblastanon paratropicalis*, *Castellania paratropicalis*, *Endomyces bronchialis*, *Monilia burgesii*, *Castellania burgesii*, *Endomyces cruzi*, *Zynonema cruzi*, *Endomyces entericus*, *Monilia enterica*, *Myceloblastanon entericum*, *Candida enterica*, *Castellania enterica*, *Endomyces insolitus*, *Monilia insolita*, *Myceloblastanon insolitum*, *Candida insolita*, *Castellania insolita*, *Endomyces niveus*, *Monilia nivea*, *Myceloblastanon niveus*, *Candida nivea*, *Castellania nivea*, *Endomyces peri*, *Monilia peri*, *Parendomyces peri*,

Endomyces tropicalis, *Antonia tropicalis*, *Monilia metatropicalis*, *Castellania metatropicalis*, *Monilia accraensis*, *Candida accraensis*, *Castellania accraensis*, *Candida vulgaris*, *Geotrichum vulgaris*, *Blastodendrion irritans*, *Parasaccharomyces irritans*, *Blastodendrion kayongosi*, *Monilia kayongosi*, *Cryptococcus kayongosi*, *Monilia argentina*, *Mycotoruloides argentina*, *Monilia aegyptiaca*, *Castellania aegyptiaca*, *Mycotorula dimorpha*, *Syringospora dimorpha*, *Mycotorula trimorpha*, *Mycotoruloides trimorpha*, *Parasaccharomyces talicei*, *Candida benhamiae* (De Hoog *et al.*, 2000), siendo finalmente introducido su nombre actual por Berkhout en 1923.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las principales especies de *Candida* de interés médico.

Reino superior:	<i>Eukariota</i>
Reino:	<i>Fungi (Mycota)</i>
División:	<i>Ascomycetes</i>
Orden:	<i>Saccharomycetales</i>
Género:	<i>Candida</i>
Especies:	<i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> variedad <i>stellatoidea</i> <i>C. catenulata</i> <i>C. ciferrii</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. haemulonii</i> <i>C. kefyr (C. pseudotropicalis)</i> <i>C. krusei</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. lusitaniae</i> <i>C. methapsilosis</i> <i>C. norvegensis</i> <i>C. orthopsilosis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. pulcherrima</i> <i>C. rugosa</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. utilis</i> <i>C. viswanathii</i> <i>C. zeylanoides...</i>

1.2.1. Características macroscópicas.



Fig 1. *C.tropicalis* en medio Can ID2 agar.

Las colonias de *C. tropicalis* presentan un aspecto cremoso, blando, liso, brillante, con borde rugoso, micelios cerca del margen y olor a levadura de pan o cerveza. En medios cromogénicos como *Candida* ID2 agar adquiere una coloración rosada con mezcla de tonos azulados (Figura 1), mientras que en otros como el medio CHROM-agar, el color de las colonias es azul oscuro. Su tasa de crecimiento es rápida.

1.2.2. Características microscópicas.

En cornmeal-Tween 80 agar a 25°C durante 72 horas forma blastoconidas de entre 4-8 x 5-11µm de tamaño individuales o en muy pequeños grupos en cualquier lugar a lo largo de la pseudohifa, y abundantes pseudomicelios, que consisten en elementos largos y pobremente ramificados frecuentemente estrechados en la punta, con conidias laterales (Figura 2).

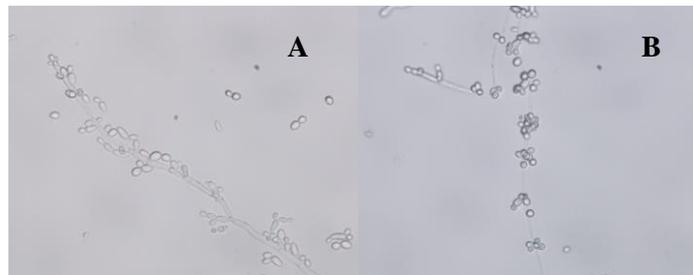


Fig 2. Pseudohifas de *C. tropicalis* con presencia de blastoconidias individuales (A) o en muy pequeños grupos (B).

Diferentes autores refieren que al igual que *C. albicans*, *C. tropicalis* también puede producir tubos germinales (Martin, 1979) y desarrollar hifas verdaderas (Larone, 1995; Sutton *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2011 (b)). Muy raramente puede presentar clamidosporas, generalmente en forma de lágrima, aunque en algunas ocasiones pueden ser pleomórficas (normalmente tras la administración de tratamiento antifúngico).

1.2.3. Características bioquímicas.

Las Tablas 2 y 3 resumen las principales características bioquímicas de *C. tropicalis* (Larone, 1995; Warren y Hazen, 1999; De Hoog *et al.*, 2000).

Se ha aislado a partir de muestras clínicas un organismo muy similar a *C. tropicalis*, denominado inicialmente *C. paratropicalis* (actual *C. kefyri*), que se diferencia muy ligeramente de las formas sacarosa-negativas de *C. tropicalis*, con la diferencia de que *C. paratropicalis* no fermenta la sacarosa ni la melecitosa, y asimila la arabinosa, y tiene capacidad variable para asimilar sacarosa, melecitosa y metil-D-glucósido (Larone, 1995). La asimilación de ramnosa puede ser útil para diferenciar *C. lusitaniae* (ramnosa-positiva) de *C. tropicalis* (ramnosa-negativa). Raras cepas de *C. tropicalis* pueden asimilar celobiosa débilmente y presentar un patrón de asimilación similar al de *C. parapsilosis*. La arabinosa es útil para diferenciarlas, ya que *C. parapsilosis* fácilmente la asimila, mientras que la mayoría de las cepas de *C. tropicalis* no lo hace (Larone, 1995; De Hoog *et al.*, 2000).

Tabla 2. Pruebas de asimilación de *C. tropicalis*.

Glucosa	+	Xilitol	+	α -metil-D-glucósido	v
Maltosa	+	Etanol	+	Citrato	+
Sacarosa	+	Ribitol	+	Succinato	+
Galactosa	+	D-manitol	+	D-glucuronato	-
Celobiosa	+	D-glucitol	+	D-L-lactato	v
Dextrosa	+	Meso-eritritol	-	Nitratos	-
Trealosa	+	L-arabinitol	-	Nitritos	-
D-xilosa	+	Inositol	-	2-ceto-D-gluconato	+
Lactosa	-	Dulcitol	-	5-ceto-D-gluconato	+
L-arabinosa	-	Mioinositol	-	D-gluconato	v
D-arabinosa	-	Metanol	-	Etilamina	+
Melobiosa	-	Glicerol	v	Creatinina	-
Rafinosa	-	Cadaverina	+	Inulina	-
Xilosa	-	D-triptófano	-	Biotina	-
L-ramnosa	-	L-lisina	+	Hexadecano	+
L-sorbosa	v	N- acetil-glucosamina	+	D-Glucosamina	v

Tabla 3. Reacciones de fermentación de *C. tropicalis*.

Glucosa	+	Dextrosa	+	Galactosa	v
Maltosa	+	Trealosa	v	Celobiosa	-
Sacarosa	v	Rafinosa	-	Lactosa	-

1.2.4. Características estructurales.

La pared celular es una estructura de gran complejidad cuyo fin principal es la protección de la célula fúngica, el aporte de rigidez y el mantenimiento de la homeostasis, permitiéndole la interacción con el medio externo a través de adhesinas (proteínas Als (“Agglutinine-like sequences”) y Hwp1 (“Hyphal wall protein”) en *C. albicans*, entre otras) y receptores celulares. En su estructura se han identificado cinco capas variablemente electrón-densas y electrón-lúcidas, característica atribuida a su composición química. Está constituida principalmente por polisacáridos (glucano, quitina, manano) y por proteínas, generalmente asociadas a los polisacáridos en forma de glicoproteínas. El glucano, el polisacárido estructural más importante, llega a representar el 50-60% del peso seco de la pared. La mayoría de los polímeros de glucano muestran uniones β -1,3 y β -1,6 (β -glucanos). A su vez, la quitina constituye el 1-2% del peso seco de la pared (mayor en las hifas que en las levaduras) (Bouza y Muñoz, 2004), y está formada por polímeros de N-acetil-D-glucosamina con enlaces β -1,4. Los mananos y las manoproteínas son potentes inmunomoduladores (Pontón, 2008). Las proteínas equivalen al 30-50% del peso seco de la pared de los hongos levaduriformes. La Figura 3 refleja la estructura de la pared celular de *Candida*.

La pared celular se considera un blanco importante para la actuación de los antifúngicos. Así, las equinocandinas se unen a la β -1,3-D-glucano sintetasa, responsable de la síntesis del β -1,3-D-glucano, presentando un

efecto fungicida sobre *Candida* por rotura de la estructura de la pared, provocando alteración osmótica y lisis celular.

La membrana celular está formada por una bicapa fosfolipídica típica de las células eucariotas.

El citoplasma contiene vacuolas llenas de componentes secretorios, numerosos microtúbulos y microfilamentos. Se han observado estructuras vesiculares similares al aparato de Golgi asociadas al retículo endoplásmico denominadas plasmalemasomas, probablemente involucradas en mecanismos de secreción.

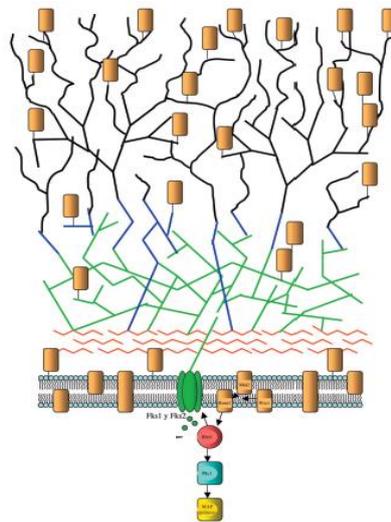


Fig 3. Estructura básica de la pared de *Candida* spp. Tomada de Pontón, 2008.

1.2.5. Otras características.

- Presenta buen crecimiento en Sabouraud Dextrosa Agar a 37°C.

- No crece con cicloheximida a 25°C, aunque esta característica puede presentar variaciones según las cepas.

- Presenta negativa la prueba de la producción de ureasa a 25°C.

- Genéticamente, *C. tropicalis* guarda una elevada similitud con *C. albicans*. Barns *et al.*, 1991 en su estudio de secuenciación del rRNAs celular de las especies patógenas de *Candida* más frecuentemente aisladas en clínica, pudieron observar cómo *C. tropicalis* formaba parte de un grupo altamente interrelacionado con *C. albicans*, con un nivel de similitud entre sus secuencias mayor del 99%, encontrándose por tanto muy próximas en la evolución. Otras publicaciones posteriores, como el estudio filogenético realizado por Fitzpatrick *et al.* en 2006, basado en el estudio del genoma completo de 42 especies fúngicas diferentes mediante un análisis combinado de genes, y otros estudios de secuenciación genómica (Butler *et al.*, 2009), han podido demostrar igualmente este grado de correlación entre las dos especies. Los resultados del estudio de Fitzpatrick *et al.*, 2006 se reflejan en la Figura 4.

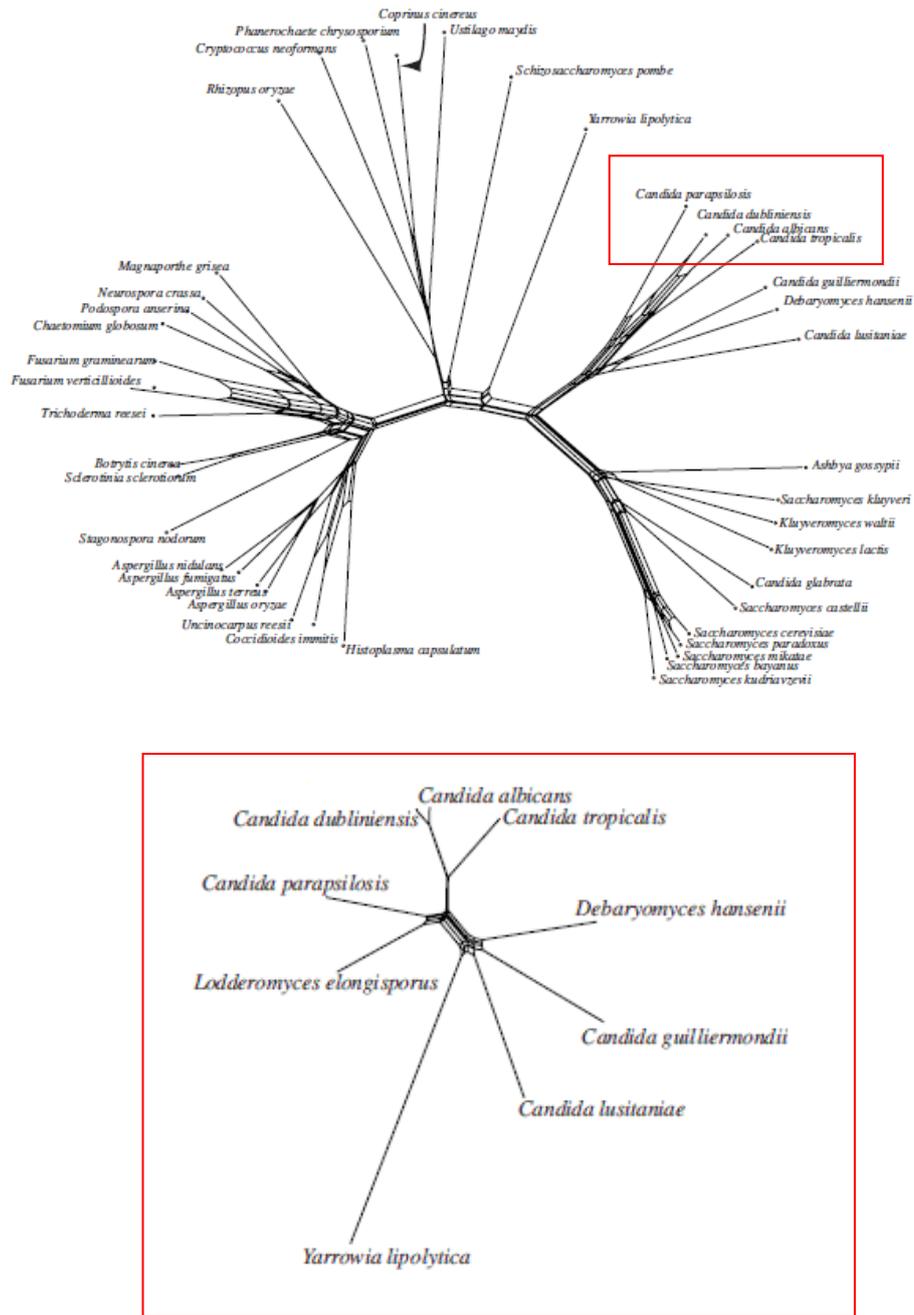


Fig 4. Representación filogenética de *C. tropicalis*. Tomadas de Fitzpatrick *et al.*, 2006.

1.3. Determinantes de patogenicidad de *C. tropicalis*.

Al tratarse de un constituyente de la flora normal, su relación con el hospedador, variable de comensal saprofito a agente patógeno, se debe en gran medida a la propia capacidad del microorganismo para regular sus factores de virulencia bajo diferentes condiciones medioambientales (Colling *et al.*, 2005), así como de la existencia de una disfunción previa del hospedador (Haynes, 2001), teniendo por tanto la mayoría de las infecciones un origen endógeno (Edwards, 1997; Pontón y Ruiz, 2006). Se ha observado cómo la colonización por *Candida* varía según la localización anatómica y aumenta con la hospitalización (Pontón y Ruiz, 2006).

1.3.1. Factores dependientes del hospedador.

El mecanismo de defensa inespecífico que representa la piel intacta es importante para mantener la resistencia a la candidiasis cutánea. Cualquier proceso que cause maceración dejará el sitio involucrado susceptible a la invasión por *Candida*, incluso en individuos sanos. Normalmente, el epitelio responde con cambios como paraqueratosis, acantosis y espongirosis a la infección por *Candida*. Las propias células epiteliales y endoteliales se pueden llegar a comportar como fagocitos para *Candida*, teniendo este hecho gran significancia clínica, ya que estas células pueden conservar en su interior las levaduras sin ser dañadas por los

mecanismos inmunes del hospedador, pudiendo ser importante en las recurrencias de las infecciones o en la resistencia a los antifúngicos (Jayatilake, 2011).

Una vez que el microorganismo invade la dermis y alcanza el torrente circulatorio, los leucocitos polimorfonucleares desempeñan un papel en la defensa debido a que son capaces de dañar las pseudohifas y de fagocitar y destruir las blastosporas. Además de los neutrófilos, los monocitos y los eosinófilos también intervienen en la defensa frente a la infección. In vitro, la muerte producida por los monocitos es más eficaz que la producida por los polimorfonucleares. La mieloperoxidasa, el peróxido de hidrógeno y/o el sistema de aniones superóxido son los principales mecanismos responsables de la muerte intracelular de *Candida*. Los neutrófilos y los monocitos que carecen de mieloperoxidasa o de la capacidad de generar peróxido de hidrógeno o anión superóxido no son capaces de destruir eficazmente estos microorganismos. En el caso de los fagocitos, un mecanismo adicional de destrucción intracelular involucra proteínas catiónicas similares a la quimiotripsina.

La participación de los linfocitos en la defensa contra *Candida* y en el desarrollo de la inmunidad mediada por células inducida por *Candida* es un tema complejo. La respuesta inmunitaria celular sistémica no parece ser importante en la protección frente a la candidosis vulvovaginal, en la que participan los linfocitos T y algunos tipos de anticuerpos. Los pacientes con candidiasis mucocutánea crónica padecen la infección por *Candida* como resultado de la disfunción de su sistema linfocitario (Beers y Berkow, 1999). Los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida son altamente susceptibles a la candidiasis cutánea. Las evidencias experimentales indican

que el manano es el antígeno que influye en las respuestas linfocitarias (Domer y Garner, 1989). Se ha asociado con anormalidades inmunológicas debidas al fallo de los linfocitos T para responder a la estimulación con antígenos de *Candida*. El grupo más importante de los pacientes muestra alteraciones de la inmunidad celular debido a una disgenesia tímica, en la que se incluyen: displasia tímica con agammaglobulinemia, displasia del timo sin agammaglobulinemia (síndrome de Nezelof-Allibone) (Perea, 1991) y ausencia congénita del timo y glándulas paratiroides (síndrome de Digeorge) (Torres-Rodriguez *et al.*, 1994).

Un factor derivado de las plaquetas estimula la formación de tubos germinales, y las fracciones de la pared celular de *Candida* aglutinan plaquetas. El suero y el plasma solos, aún cuando contengan anticuerpos y componentes del complemento, son incapaces de destruir *Candida*. Aunque la respuesta de anticuerpos se ha considerado de poco valor, se han descrito algunos contra antígenos de *Candida* que confieren protección (Pontón y Ruiz, 2006).

Existen numerosas sustancias humorales que ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Candida* (Moors *et al.*, 1992). Así, las proteínas séricas fijadoras de hierro inhiben el crecimiento de *Candida*, presumiblemente fijando el hierro, que es un factor de crecimiento de *Candida*. El complemento es necesario para la opsonización óptima *in vitro*, y los animales con deficiencias en la vía alternativa de activación son más susceptibles a la inoculación de *Candida*. La fracción C3b se une a las blastosporas de *Candida*. El hallazgo de componentes del complemento depositados en la membrana mucocutánea crónica también aporta

evidencias que indican un importante papel del complemento. *Candida* activa tanto la vía clásica como la alternativa (Edwards, 1997).

Dentro de los factores iatrogénicos, los más importantes han sido la introducción de los antibióticos de amplio espectro y el uso extendido de catéteres intravenosos permanentes. Los antibióticos suprimen la flora bacteriana normal y permiten la proliferación de *Candida*, especialmente en el tracto gastrointestinal. Los factores que pueden favorecer una vía de entrada de *Candida* al sistema vascular de los pacientes susceptibles a partir del medio ambiente incluyen el uso de drogas vía parenteral, la nutrición parenteral, los catéteres y otros dispositivos médicos. La cirugía del tracto gastrointestinal es un factor predisponente para la candidiasis diseminada. Es posible que la pérdida de integridad del tracto gastrointestinal debida a enfermedad o a la terapéutica citotóxica cree una puerta de entrada por la cual *Candida* pase de la luz intestinal al torrente circulatorio (traslocación).

Algunos estudios relacionan los casos de fungemia causada por *C. tropicalis* con factores característicos del hospedador, destacando la edad avanzada de los pacientes, la presencia de enfermedad oncológica previa y el origen abdominal como puerta de entrada de la infección. También relacionan algunos factores como neutropenia, tratamiento con corticoides y shock séptico con la presencia de una mayor mortalidad en casos de fungemia por *C. tropicalis* (Muñoz *et al.*, 2011).

1.3.2. Factores dependientes del microorganismo.

La capacidad que presentan los hongos para responder rápidamente a los cambios ambientales les permite poseer una gran ventaja adaptativa sobre el paciente debilitado y facilitar el establecimiento de la enfermedad. Además, las diferentes especies de *Candida* pueden causar enfermedad en muchos lugares anatómicos que varían enormemente con respecto a su medio fisiológico (Hube, 2004). Esta variabilidad se debe al amplio repertorio de expresión génica que le permite crecer en diferentes condiciones (Haynes, 2001).

El género *Candida* presenta una serie de factores de virulencia que facilitan la colonización y la infección en el hospedador (Haynes, 2001; Pontón y Ruiz, 2006; Lim *et al.*, 2012). En su sentido más estricto, un factor de virulencia es aquel que interactúa directamente con las células del hospedador causando algún tipo de daño (Haynes, 2001). Sin embargo, en términos generales, cualquier elemento requerido para llevar a cabo el establecimiento de la enfermedad en el hospedador puede ser considerado un factor de virulencia. Hasta hace relativamente poco tiempo se había prestado escasa atención a estos factores de patogenicidad, y por tanto, su papel en el inicio y la progresión de la infección han sido insuficientemente estudiados. Concretamente en *C. tropicalis*, estos factores aún permanecen poco conocidos.

La secreción de hidrolasas (Schaller *et al.*, 2005) y otras clases de enzimas, la capacidad de formación de biofilm y el dimorfismo (Soll, 1992) entre otros, son reconocidos como posibles factores importantes en la virulencia de *Candida* (Haynes, 2001; Lim *et al.*, 2012). A su vez, la capacidad de ofrecer diferentes respuestas a cambios ambientales supondría también un elemento esencial en la producción de la infección. Estos cambios ambientales son frecuentemente mediados por los receptores de superficie de la célula que inician la cascada de señales de traducción, obteniéndose una alteración en la actividad de los factores de transcripción y la consiguiente modificación de la expresión génica (Calderone y Fonzi, 2001). Así, la capacidad para formar hifas se acepta como un factor de virulencia, facilitando la forma filamentosa la invasión tisular (Silva *et al.*, 2010). Estos factores de transcripción pueden regular la expresión de genes tanto involucrados como no en la morfogénesis, y ejercen efectos pleiotrópicos, siendo los más obvios expresados en su morfogénesis. Muchas otras funciones son reguladas por estos factores de transcripción, los cuales presentan un importante papel en la virulencia (Haynes, 2001).

1.3.2.1 Secreción de enzimas-hidrolasas.

La capacidad de secretar enzimas que pueden destruir barreras y producir invasión tisular se considera un importante factor de virulencia (De Bernardis *et al.*, 2001; Schaller *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2012). De hecho, estas enzimas son probablemente el factor de virulencia más extensamente estudiado en estos hongos, ya que se reconocen como mediadores de la patogenicidad de *Candida*, especialmente porque facilitan la invasión tisular

en la candidiasis diseminada (Schaller *et al.*, 2000). En las especies de *Candida* no *albicans*, estos determinantes de patogenicidad se encuentran aún pobremente determinados (Gokce *et al.*, 2007).

Las proteínas que se aíslan *in vitro* en el medio de cultivo se conocen como proteínas extracelulares o proteínas secretadas. Para algunas proteínas, la clasificación como proteínas de pared o proteínas secretadas depende de las condiciones de crecimiento del organismo. La acción de estas enzimas proporciona acceso a los distintos nutrientes para el organismo (Chaffin *et al.*, 1998). Estas proteínas se asocian transitoriamente a la pared celular durante su paso a través de la misma hasta el medio externo. La distribución de algunas de estas enzimas es variable, y bajo algunas condiciones de crecimiento se asocian primariamente al periplasma y a la pared celular. Algunas se han localizado en la superficie celular, contribuyendo a la adherencia. Cuando la hidrólisis de los sustratos o la acción de las proteínas extracelulares afecta a la función y viabilidad del hospedador, las enzimas se consideran entonces factores de virulencia que contribuyen al establecimiento de la infección (Chaffin *et al.*, 1998). *Candida* presenta la capacidad de producir una gran variedad de enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, fosfatasas,...), que favorecen el acceso a los nutrientes para el microorganismo. Entre ellas destaca la presencia de:

a. Proteinasas ácidas (aspartil-proteasas).

La actividad proteolítica extracelular es una de las actividades enzimáticas descritas en *Candida* spp., y se debe a las enzimas aspartil-proteasas (Saps “Secreted aspartyl proteinases”). Estas enzimas intervienen en la adherencia, en el daño tisular y en la afectación de la respuesta inmune del hospedador (Mohan das y Ballal, 2008). Su actividad proteolítica se ha asociado con la invasión tisular. Son secretadas por las especies patógenas de *Candida* in vivo durante la infección (De Bernardis *et al.*, 1990) e in vitro cuando el organismo se cultiva en presencia de proteínas exógenas (generalmente albúmina de suero bovino) como única fuente de nitrógeno. *C. tropicalis* secreta altos niveles de Saps en presencia de albúmina bovina (Silva *et al.*, 2011 (a)). Estas enzimas tienen una serie de sustratos que varían en función del órgano del hospedador que sea colonizado o infectado, y son activas en el rango de pH comprendido entre 2.0 y 7.0, con pH óptimo de 2.5 a 4.5, dependiendo del sustrato (Douglas, 1988). Cuando las levaduras son fagocitadas, el pH ácido en el interior de la vacuola favorece la activación de estas enzimas (Filler *et al.*, 1995). El pH del medio parece actuar directamente en la síntesis y secreción de las aspartil-proteasas.

Inicialmente se denominaron Cap (“*Candida* aspartyl-proteinases”). Actualmente, las aspartil-proteasas secretadas por *Candida* se denominan Sap (*SAP* gene, Sap protein). Se han secuenciado hasta diez genes *SAP* diferentes (Bramono *et al.*, 2006). *C. tropicalis* posee al menos cuatro genes

que codifican para aspartil-proteasas, designados *SAPT1-4* (Zaugg *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2010). La expresión de estos genes en *C. tropicalis* es dependiente de la cepa estudiada. La producción de proteinasas parece favorecer la colonización y penetración del microorganismo en los tejidos del hospedador, así como la evasión del sistema inmune del mismo por destrucción de un importante número de proteínas de defensa del hospedador, como inmunoglobulinas, factores del complemento, citoquinas (Borst y Fluit, 2003), albúmina, hemoglobina, α -macroglobulina (Seneviratne *et al.*, 2011), colágeno, queratina y mucina (Da Costa *et al.*, 2009). In vitro, se ha demostrado cómo Sap2p tiene como función provocar la hidrólisis de la mucina, lo que contribuye in vivo a la penetración en la barrera gastrointestinal y favorece el acceso de *Candida* a las células subyacentes. Además, son capaces de degradar otras proteínas de la barrera epitelial y mucosa, tales como colágeno y queratina. También se ha sugerido que las proteasas podrían promover la liberación del manano de la pared celular, lo que produciría la estimulación o supresión de la inmunidad celular, así como de las funciones humorales del sistema inmune.

El acceso al interior de las células del hospedador, probablemente sea debido a la combinación de la actividad enzimática unida a la fuerza mecánica (Kumamoto y Vincles, 2005) producida por las levaduras y formas filamentosas. Observaciones ultraestructurales revelan áreas de aclaramiento alrededor de las hifas cuando penetran, apoyando el papel lítico de las enzimas durante la invasión.

Se ha correlacionado la virulencia y los niveles de producción de proteinasas tanto a nivel clínico como de laboratorio, considerándose que desarrollan un papel potencial en la virulencia (Hube, 1996). Así, las cepas

más virulentas de *Candida* se aíslan a partir de pacientes con infección por VIH más que en sujetos normales, y esta característica puede asociarse con una elevada producción de aspartil-proteinasas. Este tipo de enzimas se ha referido como raro o ausente en cepas o especies de *Candida* no patógenas. Cepas mutantes de *C. albicans* que no secretan estas enzimas muestran significativa reducción de la letalidad en ratones. Diversos autores como Naglik *et al.*, 2003, comprobaron cómo la inhibición de la actividad aspartil-proteasa disminuye la invasión tisular. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la expresión de los genes *SAPs* no son requeridos para la invasión y el posterior daño tisular (Lerman y Morschhäuser, 2008; Silva *et al.*, 2010).

b. Fosfolipasas.

Varias especies de *Candida* se han descrito como productoras de actividad lipolítica (Chattaway *et al.*, 1971; Zviagintseva y Pitriuk, 1976; Rudek, 1978; Ghannoun, 2000), y muchas de las especies patógenas de *Candida* secretan enzimas lipolíticas como esterasas (Slifkin, 2000) y fosfolipasas (Ghannoun, 2000).

El término fosfolipasas hace referencia a un grupo heterogéneo de enzimas que presentan la capacidad de hidrolizar una o más uniones ésteres en los glicerofosfolípidos. Aunque todas las fosfolipasas reconocen los fosfolípidos como sustrato, cada enzima tiene la capacidad de romper una unión éster específica (Figura 5) (Ghannoum, 2000).

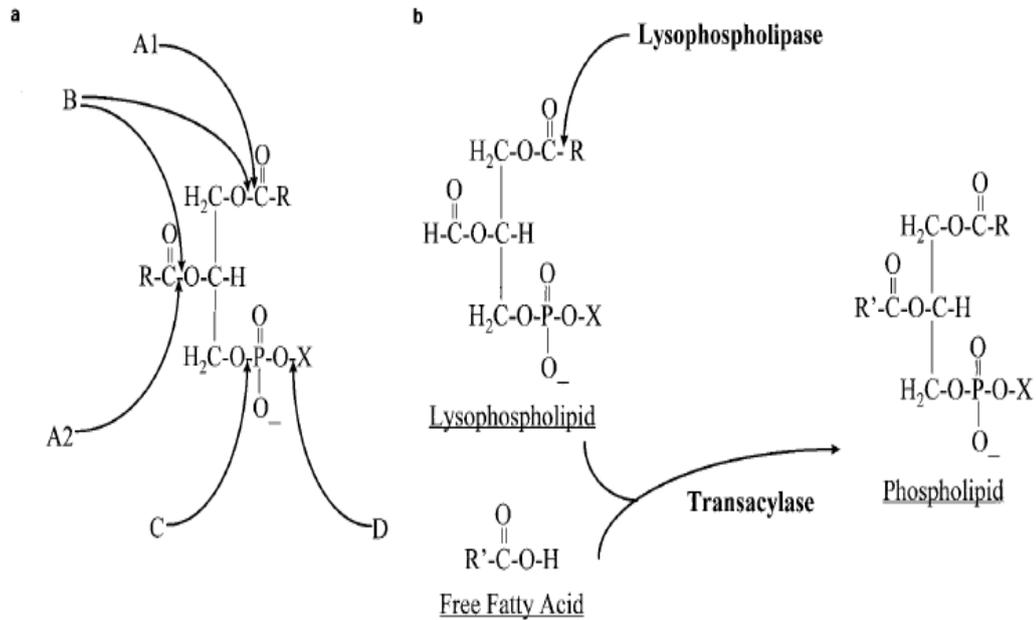


Fig 5. Lugares de acción de varias fosfolipasas (a) A1 y A2, PLA₁ y PLA₂, respectivamente; B, PLB; C, PLC; D, PLD. (b) Lyso-PL y Lyso-PL transacilasa. Tomada de Ghannoum, 2000.

La actividad fosfolipasa extracelular (fosfolipasa secretada) se ha descrito más extensamente para *C. albicans*, e incluye fosfolipasa A y B (lisofosfolipasa o lisofosfolipasa transacetilasa) y C (Price y Cawson, 1977; Banno *et al.*, 1985; Takahashi *et al.*, 1991; Ibrahim *et al.*, 1995). Se han encontrado dos formas de lisofosfolipasa-transacetilasa (Takahashi *et al.*, 1991). Ambas enzimas presentan actividad hidrolasa y transacetilasa, con la actividad hidrolasa más prominente a bajas concentraciones de sustrato y la actividad transacetilasa más prominente a altas concentraciones (Chaffin *et al.*, 1998). Mutantes defectivas en fosfolipasa B1 presentan virulencia atenuada (Ghannoum, 2000), y capacidad de penetración disminuida (Mukherjee *et al.*, 2001). La actividad enzimática se asocia más a las

levaduras más antiguas que a las células más jóvenes. Sin embargo, en términos generales, *C. tropicalis* parece tener una capacidad reducida para producir fosfolipasas extracelulares, aunque este hecho se considera fundamentalmente cepa dependiente (Marcos-Arias *et al.*, 2009 (a); Galán-Ladero *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2010).

La actividad fosfolipasa representa un potencial determinante de virulencia de las especies de *Candida* patógenas (Birinci *et al.*, 2005; Sacristán *et al.*, 2011), ya que desempeñan un importante papel en la invasión de los tejidos del hospedador por rotura de las membranas de las células epiteliales, al degradar los lípidos que la constituyen, permitiendo a las hifas penetrar hasta el citoplasma (Banno *et al.*, 1985; Borst y Fluit, 2003). Mientras los aislamientos orales de voluntarios sanos muestran baja actividad fosfolipasa, los aislamientos clínicos de la cavidad oral de pacientes con candidiasis oral, producen mayor actividad de esta enzima (Ibrahim *et al.*, 1995). Altos niveles de producción de actividad fosfolipasa se han correlacionado con un aumento de la capacidad de adherencia, una mayor mortalidad en modelos animales (Ivanoska, 2003) y daños en las membranas celulares del hospedador (Ghannoum, 2000). En las hifas invasivas, la actividad fosfolipasa está concentrada en el extremo de la hifa (Pugh y Cawson, 1975; Pugh y Cawson, 1977; Ghannoum, 2000).

A su vez, los aislamientos sanguíneos de *Candida* producen mayor actividad fosfolipasa extracelular que las cepas comensales (Ivanoska, 2003), lo que sugiere implicación de la producción de fosfolipasas en la patogenia de la infección hematógena por *Candida*.

Muchos lípidos y productos lipídicos derivados de la acción de las fosfolipasas presentes en las membranas de las células del hospedador están implicados como mediadores y segundos mensajeros en la transducción de señales. Estos productos de la degradación de las membranas inducen la activación de la proteincinasa C, que juega un papel importante en la disregulación de la señalización celular a través de la producción de efectos locales o de un impacto global en la fisiología de la célula del hospedador. La estimulación de las células del hospedador induce la secreción de citocinas en respuesta a factores solubles de origen microbiano. Estas citocinas estimulan a las células epiteliales adyacentes para que produzcan otras interleucinas y otros mediadores de la inflamación.

Las enzimas fosfolipasa A y lisofosfolipasa se han identificado como las enzimas responsables de la hidrólisis de los fosfolípidos de las membranas del hospedador invadidas por *C. albicans*.

c. Esterasas.

La actividad esterásica está presente en los aislamientos clínicos de *Candida*, aunque su significado biológico aún debe ser establecido (Chaffin *et al.*, 1998). Esta actividad se ha demostrado en algunos estudios usando el test de opacidad del Tween 80 (Rudek, 1978; Slifkin, 2000; Aktas *et al.*, 2002), utilizado como única fuente de carbono. Tsuboi *et al.*, 1996, comprobaron cómo *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* presentaban en su estudio mayor actividad esterásica que otras especies de *Candida*.

d. Factor hemolítico.

Existen muchos estudios acerca de algunas de estas enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas, fosfolipasas), mientras que la actividad hemolítica no se conoce en profundidad (Luo *et al.*, 2001), siendo los datos relativos a la producción de un factor hemolítico por *C. tropicalis* escasos (Furlaneto *et al.*, 2008; Rörig *et al.*, 2009; Yigit y Aktas, 2009; França *et al.*, 2010; Galán-Ladero *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2010; Seneviratne *et al.*, 2011).

Las hemolisinas se consideran un factor de virulencia que contribuye a la patogénesis de las infecciones por *Candida* (Favero *et al.*, 2011). La capacidad de los organismos patógenos para adquirir hierro parece de gran importancia en el establecimiento de la infección en el hospedador (Knight *et al.*, 2005), representando una ventaja adaptativa para el microorganismo. Debido a que en los humanos la mayor parte del hierro se encuentra formando complejos, muchos de estos patógenos deben adquirir el hierro indirectamente a partir de compuestos que lo contienen, como la hemoglobina. Algunos microorganismos patógenos secretan factores hemolíticos para obtener hemoglobina o hemo como recursos férricos. Para ello, deben poseer mecanismos que destruyan el grupo hemo y así ser capaces de extraer el hierro desde la hemoglobina liberada de los eritrocitos lisados del hospedador. Las enzimas que median esta actividad se clasifican en términos generales como hemolisinas. La disponibilidad del hierro en el suero humano es un factor limitante para el crecimiento de *Candida*, donde

el hierro está secuestrado por la transferrina. *C. albicans* es capaz de adquirir hierro a partir de la transferrina (Knight *et al.*, 2005). La hemoglobina liberada de los hematíes lisados puede facilitar el crecimiento de *Candida* en el hospedador (Manns *et al.*, 1994). Luo *et al.*, 2001, fueron los primeros en describir esta propiedad en especies de *Candida* no *albicans*, incluida *C. tropicalis*.

C. albicans presenta actividad hemolítica cuando crece en agar sangre enriquecido con glucosa (descrito por primera vez por Manns *et al.*, 1994), una habilidad que es compartida con *C. tropicalis*. La presencia de glucosa en el medio de crecimiento parece ser un factor determinante en la producción de esta actividad hemolítica (Manns *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 2001; Favero *et al.*, 2011). Las hifas presentan mayor actividad que las levaduras (Manns *et al.*, 1994).

En *C. albicans*, este factor hemolítico se identifica como una manoproteína cuya estructura glucídica se corresponde a un manano perteneciente a la pared celular (Watanabe *et al.*, 1999), y provoca la liberación de hemoglobina, que es usada como un recurso de hierro (Tanaka *et al.*, 1997).

C. albicans, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. lusitaniae* presentan actividad hemolítica tanto alfa (lisis parcial de los eritrocitos causados por la reducción de hemoglobina a metahemoglobina) como beta (hemólisis completa) (Luo *et al.*, 2001).

d. Otras enzimas:

- **Glucoamilasa** (α -(1,4)-D-glucano glucohidrolasa). Esta enzima confiere la capacidad de crecer en medios que contienen almidón como única fuente de carbono, siendo secretada de forma eficiente por *Candida* en el hospedador (Chaffin *et al.*, 1998).

- **Fosfatasa ácida** (hidrolasa). No se ha confirmado su papel en la patogénesis de la enfermedad. Se trata de una enzima inducible (Chaffin *et al.*, 1998).

- **Lipasa**. Se ha demostrado actividad lipasa en medios con Tween 80, 60, 40 y 20.

- **Hialuronidasa y condroitín sulfatasa**. *C. albicans* también produce hialuronidasas y condroitín sulfatasas, siendo secretadas al medio (Shimizu *et al.*, 1996). Estas enzimas son producidas por *C. tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. Se consideran importantes factores de virulencia para los patógenos bacterianos bucales, por lo que se cree que también contribuyen a la infección oral por *Candida* (Chaffin *et al.*, 1998). Diferentes estudios (Shimizu *et al.*, 1996) sugieren la importancia de la acción combinada de estas dos enzimas junto con la actividad fosfolipasa y proteinasa ácida.

- **Metalopeptidasa**. También se han descrito altos niveles de metalopeptidasa en *C. albicans*.

1.3.2.2. Adherencia a diferentes superficies.

a. Adherencia inespecífica. Hidrofobicidad de superficie celular.

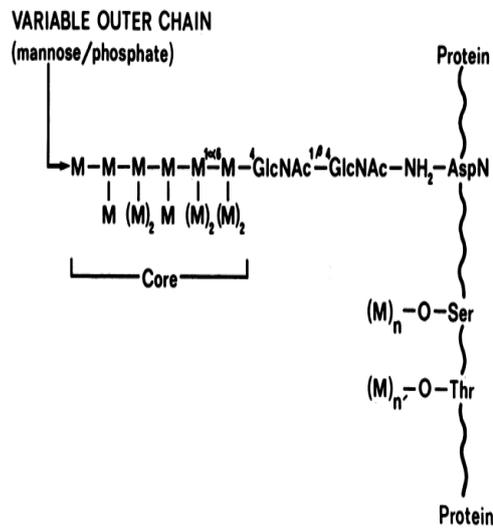
La capacidad para reconocer y adherirse a los tejidos del hospedador así como a los diferentes dispositivos médicos, principalmente determinada por los componentes de la pared celular, constituye un primer paso fundamental en la producción de la infección por *Candida* (Haynes, 2001; Jabra-Rizk *et al.*, 2001; Dowd *et al.*, 2011), siendo necesaria para la posterior progresión de la enfermedad y presentando buena correlación con la patogenicidad (Glee *et al.*, 2001; Okawa *et al.*, 2008).

En el proceso de adherencia se han involucrado tanto uniones de tipo específico ligando-receptor, como uniones de tipo no específicas (Gallardo *et al.*, 2002). Estas uniones no específicas se han atribuido principalmente a fuerzas hidrofóbicas de la superficie celular (Blanco *et al.*, 1997; Jabra-Rizk *et al.*, 2001; Gallardo *et al.*, 2002; Colling *et al.*, 2005). A su vez, estas fuerzas por sí mismas también estarían implicadas en las propias uniones de tipo específico ligando-receptor, ya que facilitarían la aproximación entre las levaduras y las células del hospedador, contribuyendo también de esta manera a la virulencia de *Candida* (De Repentigny *et al.*, 2000; Glee *et al.*, 2001; Hazen *et al.*, 2001; Masuoka y Hazen, 2004).

La hidrofobicidad de superficie celular constituye un determinante fundamental en la adhesión de *Candida*, observándose cómo las formas

filamentosas, generalmente más adherentes que las blastosporas, presentan mayor grado de hidrofobicidad (Hazen y Hazen, 1987). El desarrollo del tubo germinal se asocia a un aumento en la hidrofobicidad de superficie celular, probablemente debido a la diferente composición entre la superficie de las levaduras y la de las hifas. A su vez, las levaduras hidrofóbicas parecen presentar mayor capacidad de adherencia a los tejidos (Glee *et al.*, 2001) que las hidrofílicas.

Las manoproteínas hidrofóbicas de la lámina superficial de la pared celular se consideran las principales responsables de la hidrofobicidad de superficie celular, predominando en la porción más externa de la pared celular (Cassone, 1989). En la Figura 6 se representa la estructura de estas



manoproteínas de pared celular. Distintos autores (Hazen y Hazen, 1992; Masuoka y Hazen, 1997) observaron cómo la capacidad de *C. albicans* de regular la hidrofobicidad de superficie celular aparentemente corresponde a su habilidad para alterar la conformación de estas fibras manoproteicas.

Fig 6. Manoproteínas de pared celular.
Tomada de Calderone y Braun, 1991.

Variaciones en la superficie de la pared celular debidas a cambios fisiológicos y morfológicos (Hazen *et al.*, 2001; Jabra Risk *et al.*, 2001), así como a modificaciones en las condiciones ambientales externas (Masuoka y Hazen, 2004), terminan afectando en gran medida a la hidrofobicidad de superficie celular. De esta manera, la presencia de altas concentraciones de galactosa producen un aumento en la síntesis de la capa fibrilar, elevando la concentración de manoproteínas e incrementando la hidrofobicidad, probablemente contribuyendo de este modo al propio aumento de la adherencia (Hostetter, 1994). A su vez, la variación en la temperatura de crecimiento se considera uno de los principales factores que modifican llamativamente la hidrofobicidad de superficie celular. En *C. albicans*, las células hidrofóbicas producen tubos germinales mucho más precozmente que las levaduras hidrofílicas, lo cual puede ser uno de los motivos por los cuales escapan de los polimorfonucleares, ya que estos parecen ser menos capaces de destruir las levaduras que han crecido a baja temperatura que las crecidas a 37°C (Antley y Hazen, 1988). En esta especie, se observa un aumento del nivel de hidrofobicidad cuando la incubación se realiza a 22°C, presentando un mayor grado de hidrofilia a 37°C (Blanco *et al.*, 1997; Jabra-Rizk *et al.*, 2001; Colling *et al.*, 2005). Esta característica presenta variaciones considerables en función de las diferentes especies de *Candida* estudiadas (Beteta, 2007).

La capacidad para modificar el estado de hidrofobicidad puede alcanzarse por varios mecanismos (Hazen y Glee, 1995; Masuoka y Hazen, 1997; Masuoka y Hazen, 1999):

1. A través de un aumento de la producción y localización de proteínas de pared celular en la superficie.
2. Mediante la alteración en la longitud o densidad de las fibrillas de superficie.
3. Mediante la modificación de los mananos de las fibrillas de superficie para producir un cambio conformacional en las fibrillas, teniendo como consecuencia un aumento en la exposición de los grupos hidrofóbicos de las proteínas hacia la superficie (Hazen *et al.*, 2001). Con respecto a esta última opción, es posible que las fibrillas mantengan la misma longitud, pero que se dispongan de manera más irregular, permitiendo que la superficie hidrofóbica sea expuesta.

La patogenicidad de *C. albicans* se correlaciona bien con la adherencia y la hidrofobicidad (King *et al.*, 1980). A su vez, la adherencia a las superficies de plástico se correlaciona bien con la hidrofobicidad de superficie celular (Klotz *et al.*, 1985; Samaranayake *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1995; El-Azizi y Khardori, 1999; Reynolds y Fink, 2001). Estos mecanismos patogénicos en *C. tropicalis*, sin embargo, aún no han sido completamente clarificados (Okawa *et al.*, 2008).

b. Adherencia específica. Unión ligando-receptor. Adhesinas.

Los componentes de superficie celular de *Candida* involucrados en la adherencia de tipo específico reciben el nombre de adhesinas, e incluyen glicoproteínas (Chaffin, 1998), principalmente manoproteínas (el manano de la superficie celular, frecuentemente unido covalentemente a proteínas, presenta actividad enzimática proteínasa ácida, y funciones de ligando-receptor requeridos para la adherencia a las células endoteliales. También una manoproteína se ha descrito como la adhesina para las células epiteliales (Calderone y Braun, 1991)), polisacáridos (Fukazawa y Kagaya, 1997) y lípidos (Ghannoum, 1986; en: Gaur *et al.*, 1999). En la Figura 7 se representa adherencia de *Candida* tanto a material plástico como a tejidos humanos.

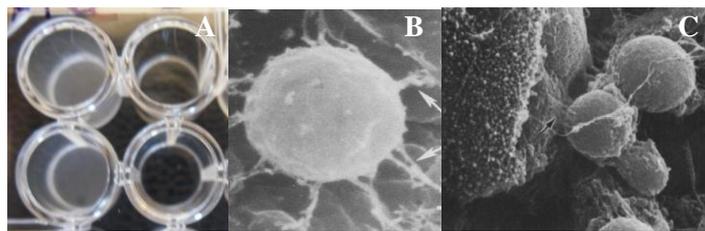


Fig 7. Adherencia a material plástico (A) y a tejidos del hospedador (B y C). B y C: Tomadas de Kennedy *et al.*, 1987 y de Ray y Payne, 1988, respectivamente.

Se han descrito tres categorías de interacciones ligando-receptor:

- 1) Interacciones de tipo proteína-proteína. Incluyen el receptor de la fibronectina (proteínas de superficie de *C. tropicalis* median la adherencia de las levaduras a la fibronectina (Skerl *et al.*, 1984)), análogos de la integrina y la proteína de unión al fibrinógeno.
- 2) Interacciones lectina-like, que incluye manoproteínas de unión a la fucosa o a la N-acetilglucosamina.
- 3) Interacciones aún no completamente definidas, donde se agrupan las aspartil-proteinasas (Hostetter, 1994).

En *Candida*, el principal grupo de adhesinas está constituido por glicoproteínas de superficie celular codificadas por la familia de genes *ALS* (Agglutinin-Like Sequence; *ALA* (Agglutinin-Like adhesin)), descubiertas por Hoyer *et al.*, 1995, llamadas así por la semejanza de los dominios de las proteínas que codifican la α -aglutinina, una glicoproteína de superficie celular involucrada en la adherencia celular en la conjugación en *Saccharomyces cerevisiae*. Las proteínas Als se encuentran unidas a la pared celular a través de uniones al β 1,6-glucano.

Estudios genómicos comparativos han revelado que la mayor parte de las especies patógenas de *Candida*, contienen múltiples ortólogos de los genes *ALS* (Butler *et al.*, 2009), tendiendo su estructura básica a estar conservada, pero presentando las secuencias individuales de los genes poco grado de conservación entre las distintas especies de *Candida* (Hoyer *et al.*, 2001). La presencia de estos ortólogos de proteínas Als en las diferentes especies de *Candida* se representó en la Figura 8, tomada de Jackson *et al.*, 2009.

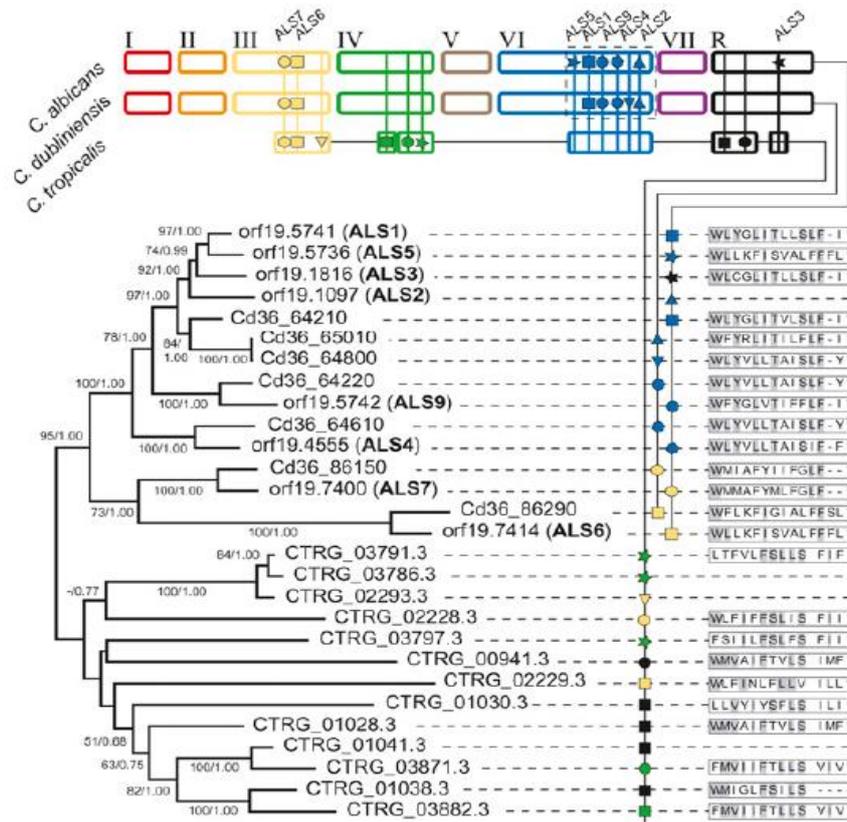


Fig 8. Presencia de genes *ALS* en diferentes especies de *Candida*.
Tomada de Jackson *et al.*, 2009.

Mientras que 8 genes *ALS* se han descrito en *C. albicans*, 16 genes que codifican regiones *ALS*-like han sido identificados en *C. tropicalis* (Moran *et al.*, 2011), denominándose genes *ALST*. La mayoría de los estudios acerca de estos genes han sido realizados en *C. albicans*, existiendo escasa información sobre ellos en las especies de *Candida* no *albicans*.

Los genes que codifican para estas proteínas tienden a estar localizados en cromosomas que también contienen los genes SAPs, principalmente en los cromosomas 3, 6 y R (Monod *et al.*, 1994; Monod *et al.*, 1998). Este dato en *C. tropicalis* fue comprobado por Hoyer *et al.*, 2001. Los genes *ALS* son expresados de forma variable bajo diferentes condiciones, que incluyen cambios morfológicos, composición del medio de crecimiento, fase de crecimiento y cepa (Hoyer *et al.*, 1998 (b)). Estos genes incluyen un dominio conservado 5' de 1299 a 1308 nucleótidos (433 a 436 aminoácidos), un dominio central de longitud variable que consiste en 108 pares de bases repetidas en tandem y un dominio 3' de longitud variable, rico en serina y treonina (Hoyer *et al.*, 1998 (a, b)). Puesto que las repeticiones en tandem son hidrofóbicas, pueden mediar la adherencia a algunos sustratos, como poliestireno (Frank *et al.*, 2010).

La proteína Als1 de *C. albicans* presenta características de proteína expresada en la superficie celular, así, en su extremo carboxilo parece ser un lugar de anclaje para glicosilfosfatidilinositol, mientras que el extremo N-terminal contiene una región que recuerda a un péptido señal. Presenta adicionalmente un alto grado de glicosilación (Fu *et al.*, 1998). Estudios realizados in vitro muestran un llamativo aumento en la expresión cuando se añade medio de crecimiento fresco a un cultivo ya saturado, mientras que los niveles de expresión disminuyen a medida que el crecimiento del cultivo

progresiva (Green *et al.*, 2005; Coleman *et al.*, 2010), observándose una pérdida en la expresión de esta proteína de superficie a lo largo de las continuas divisiones celulares, llegando a negativizarse en las sucesivas generaciones. In vivo, sin embargo, la expresión de Als1 se detecta sin esta disminución temporal, sugiriendo diferencias en la regulación de Als1 in vivo e in vitro.

La distribución de Als1 parece uniforme a lo largo de la superficie de *Candida*, encontrándose ausente en la escara de gemación (Figura 9). En las hifas de *C. albicans*, la expresión se manifiesta a lo largo de toda la hifa, siendo mayor en la zona más proximal a la célula madre, y variando según el medio de cultivo utilizado (mayor en medio Lee o medio con suero y menor con medio RPMI (Coleman *et al.*, 2010)). Secuencias análogas al gen *ALS1* han sido localizadas en *C. tropicalis*.

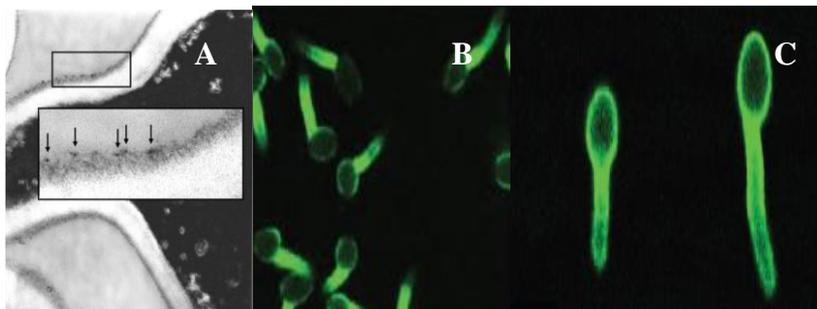


Fig 9. Distribución de *Als1* en *C. albicans*. Tomadas de Coleman *et al.*, 2010.

ALS3 es un gen específicamente expresado por hifas y pseudohifas de *C. albicans*, pero no por levaduras (Hoyer *et al.*, 1998 (a); Argimon *et al.*, 2007). Represores específicos de formación de formas filamentosas como Tup1, Nrg1 y Rfg1, producen una disminución en la transcripción de *ALS3*, mientras que los factores de transcripción Efg1 y Cph1, que inducen formación de hifas producen una sobreexpresión de *ALS3* (Liu y Filler, 2011). Por tanto, *ALS3* desempeña un importante papel a su vez en la formación de biofilm. Mutantes con expresión reducida de Als3 y otras adhesinas son defectivas en la producción de biofilm (Nobile *et al.*, 2006). Otras proteínas como Als1 y Hwp1 contribuyen también a la formación de biofilm.

Las pseudohifas e hifas verdaderas presentan típicamente mayor adhesión que las blastosporas (Samaranayake y MacFarlane, 1981; Kimura y Pearsall, 1978), lo cual sugiere que las adhesinas en las hifas deben ser más numerosas, presentar una mayor avidéz en la unión o presentar alteraciones estructurales que les permiten exhibir un mayor número de lugares de unión (Hostetter, 1994).

La adherencia de *C. albicans* a proteínas y células se caracteriza por dos pasos secuenciales: anclaje, seguido de agregación (interacción célula-célula) (Gaur *et al.*, 1999). El anclaje de las levaduras induce agregación por sobreexpresión de Ala1, y Als1 se comporta de manera similar. Cuando las células no expresan cantidades suficientes de adhesina sólo tiene lugar el anclaje, mientras que si la expresión ocurre en cantidades suficientes, tanto el anclaje como la agregación tienen lugar, siendo fundamental para la formación de biofilm.

La identificación de adhesinas en *Candida* debe completarse con estudios de ligandos en las células del hospedador para confirmar así la especificidad de la interacción. Entre los componentes de la superficie de las células endoteliales, los lisofosfolípidos se han descrito como importantes moléculas receptor-like para ligandos de *C. tropicalis* (Prakobphol *et al.*, 1994). También se ha demostrado que *C. albicans* estimula la expresión de algunas moléculas de adhesión en las células del hospedador al entrar en contacto con ellas (Filler *et al.*, 1995; Filler *et al.*, 1996).

La E-cadherina en células epiteliales y la N-cadherina en células endoteliales han sido identificadas como receptores para Als3. La unión con estos receptores induce la endocitosis. La unión de Als3 con E-cadherina es similar a la interacción entre moléculas de E-cadherina, y así, Als3 actúa imitando a las moléculas de E-cadherina. Otros receptores para Als3 son Her2 y el receptor para el factor de crecimiento epidérmico. Als3 también actúa como un receptor de ferritina, facilitando la capacidad de *C. albicans* para obtener hierro del hospedador (Liu y Filler, 2011).

C. albicans se ha descrito como la más adherente de las especies de *Candida* in vitro para células epiteliales, corneocitos y células intestinales, mientras que *C. tropicalis* ocupa el segundo lugar (King *et al.*, 1980; Klotz *et al.*, 1983; Ray *et al.*, 1984; Bendel y Hostetter, 1993).

Adicionalmente, *C. tropicalis* posee la capacidad de interactuar con otros microorganismos (*Streptococcus gordonii*, *Fusobacterium* spp.,...), proceso denominado coagregación, y así de esta manera facilita su supervivencia en los distintos tejidos del huésped (Jabra-Rizk *et al.*, 1999).

En la Figura 10 se representan las principales familias de genes de las especies de *Candida* aisladas con mayor frecuencia en la práctica clínica, destacando la familia de 16 adhesinas ALS-like halladas en *C. tropicalis*.

No.	Annotation	Pathogen genes	Non-pathogen genes	P val.	Dup.	Loss	Gene rate	C.alb.	C.tro.	C.par.	L.elo.	C.gui.	C.lus.	D.han.	C.glo.	Yeast (ave.)
1	GPI family 18 (Hyr/Iff-like)	56	10	1.4×10^{-16}	52	11	16.2	11	18	17	9	3	7	1	0	0.0
2	Leucine-rich repeat (Ifa/Fgr38-like)	34	0	4.2×10^{-16}	32	5	18.3	33	1	0	0	0	0	0	0	0.0
3	Ferric reductase family	45	10	1.9×10^{-12}	30	25	2.5	12	19	7	7	3	4	2	0	0.1
4	Reductase family	43	11	3.2×10^{-11}	31	30	2.3	7	12	9	6	13	2	4	0	0.1
5	GPI family 17 (Als-like adhesins)	31	5	4.4×10^{-10}	29	4	20.5	8	16	5	4	2	0	1	0	0.0
6	GPI family 13 (Pga30-like)	34	7	5.0×10^{-10}	25	5	14.8	12	14	6	6	1	1	1	0	0.0
7	Unclassified	20	0	9.0×10^{-10}	13	3	15.9	9	9	0	0	2	0	0	0	0.0
8	Cell wall mannoprotein biosynthesis	38	18	7.2×10^{-7}	19	34	2.1	8	7	8	8	11	4	9	0	0.1
9	Major facilitator transporters	25	7	9.2×10^{-7}	14	17	2.0	3	3	7	3	10	2	4	0	0.0
10	Oligopeptide transporters	31	13	2.2×10^{-6}	23	11	6.7	6	9	9	4	4	3	1	0	0.9
11	Unclassified	25	9	6.3×10^{-6}	15	6	11.1	7	9	3	5	3	1	4	2	0.2
12	Amino-acid permeases	27	11	7.7×10^{-6}	11	18	1.7	6	6	6	4	6	3	6	0	0.1
13	Sphingomyelin phosphodiesterases	18	5	3.2×10^{-5}	11	9	7.4	4	5	4	2	3	2	1	0	0.2
14	Fgr6 family (filamentous growth)	12	1	3.3×10^{-5}	7	1	14.5	8	1	1	0	1	1	1	0	0.0
15	Secreted lipases	20	7	4.6×10^{-5}	17	8	9.6	10	5	4	4	1	0	3	0	0.0
16	Cytochrome P450 family	34	21	5.5×10^{-5}	23	22	6.0	6	8	10	7	5	4	6	1	1.0
17	Amino-acid permeases	16	4	5.6×10^{-5}	14	10	1.5	2	3	6	3	2	3	1	0	0.0
18	Zinc-finger transcription factors	31	18	6.2×10^{-5}	17	14	12.3	5	8	7	7	7	4	11	0	0.0
19	Unclassified	13	2	6.3×10^{-5}	8	0	8.1	3	1	6	1	2	1	1	0	0.0
20	Predicted transmembrane family	17	5	7.2×10^{-5}	9	2	7.5	4	4	5	3	3	1	2	0	0.0
21	Unclassified secreted family	20	8	1.1×10^{-4}	7	6	9.3	4	4	6	4	4	2	4	0	0.0

Fig 10. Familias de genes en diferentes especies de *Candida*. Adhesinas Als-like en *C. tropicalis*. Tomada de Butler *et al.*, 2009.

1.3.2.3. Formación de biofilm.

La adherencia, así como la hidrofobicidad, se asocia a la capacidad de formación de biofilm, ya que las levaduras, para formar biofilm, en primer lugar deben anclarse a la superficie colonizada (Shin *et al.*, 2002; Colling *et al.*, 2005; Kumamoto y Vines, 2005; Perumal *et al.*, 2007). Tras la adherencia inmediata tiene lugar la adherencia permanente, seguida de la diferenciación celular a formas filamentadas y de la formación de microcolonias (Krom *et al.*, 2009). El desarrollo de las formas filamentadas se continúa con la secreción de una matriz exopolimérica, resultando en una densa red tridimensional (Baillie y Douglas, 2000; Kumamoto y Vines, 2005) formada por levaduras, hifas (en *C. albicans*) y pseudohifas, con canales de agua ramificados en su interior (Chandra *et al.*, 2001; Andes *et al.*, 2004; Krom *et al.*, 2009) conocida como biofilm (Figura 11). Esta arquitectura típica de micro-colonia-canales de agua representa una disposición espacial óptima para la entrada de los nutrientes, eliminación de los productos de desecho y el establecimiento de micro-nichos a través del biofilm (Watonick y Kolter, 2000).

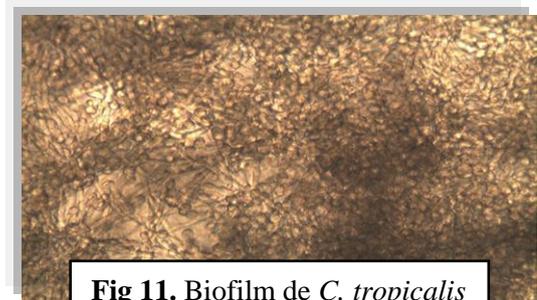


Fig 11. Biofilm de *C. tropicalis*

Las comunidades celulares incluidas en el biofilm son metabólicamente activas en las primeras 8 horas, y ya aparecen envueltas en una sustancia exopolimérica. A medida que el biofilm madura y aumenta en complejidad (24-48 horas), la actividad metabólica alcanza un máximo, pero permanece alto, probablemente reflejando el aumento del número de células

que constituyen el biofilm maduro (Ramage, 2001 (a)). El ensayo de reducción del XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamine) carbonil]-2H-tetrazolium hydroxide) demuestra una excelente correlación entre la densidad celular de la biopelícula y su actividad metabólica (Ramage *et al.*, 2001 (a)). El uso de ensayos colorimétricos, como el XTT o el MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) para determinar la viabilidad celular y por tanto la sensibilidad de las células de *Candida* en los biofilms a antifúngicos está ampliamente aceptada. El MTT es reducido a cristales insolubles de formazán, mientras que el XTT es reducido a formazán soluble en agua.

Las células integrantes del biofilm (sésiles) presentan características fenotípicas únicas que les confieren ventajas de supervivencia sobre sus correspondientes planctónicas (Donlan y Costerton, 2002). La formación de estas estructuras multicelulares debe ayudar a la supervivencia en ambientes con condiciones limitantes de nutrientes, mediante el acceso a los nutrientes que se acumulan en las superficies, o por su obtención a partir de las células lisadas en la población.

En general, las cepas de *C. tropicalis* son proclives a la formación de biofilms (Negri *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011 (b)), y su presencia durante la infección se ha asociado a mayores tasas de mortalidad en comparación con los aislamientos no formadores de biofilm (Kumamoto y Vines, 2005).

La estructura del biofilm de *C. tropicalis* consiste en una densa red de levaduras y evidentes formas filamentosas (Silva *et al.*, 2011 (b)) (Figura 12). A diferencia de los biofilms formados por otras especies de *Candida*,

como *C. parapsilosis* o *C. glabrata*, la composición de la matriz de los biofilms formados por *C. tropicalis* presentan un bajo nivel de carbohidratos (3,3%, incluyendo un 0.5% de glucosa), proteínas (3,3%) y fósforo (0,2%), siendo el principal componente de la misma la hexosamina (27,4%), que parece reemplazar a la glucosa como el principal hidrato de carbono componente de la matriz a diferencia de la de *C. albicans*. También contiene mayor concentración de ácido urónico (1,6%) (Al-Fattani y Douglas, 2006; Silva *et al.*, 2009).

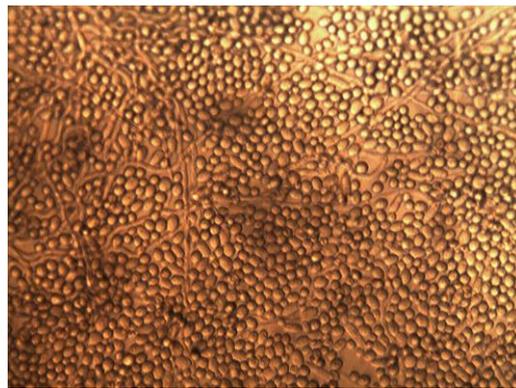


Fig 12. Formación de biofilm por *C. tropicalis*.

La formación del biofilm in vitro se ve influenciada por la agitación (Krom *et al.*, 2009), especialmente la producción de la sustancia polimérica extracelular (Hawser *et al.*, 1998 (a)), pero en términos generales, *C. tropicalis* sintetiza grandes cantidades de material extracelular, incluso incubada bajo condiciones estáticas (Al-Fattani y Douglas, 2006).

Parece claro que de manera similar a las bacterias, muchas de las infecciones producidas por *Candida* son debidas directa o indirectamente a la formación de biofilm (Douglas, 2002; Kojic y Darouiche, 2004).

La principal importancia clínica de los biofilms consiste en su formación sobre las superficies de los dispositivos médicos (catéteres principalmente), ya que las células inmersas en el biofilm presentan una resistencia a los distintos antifúngicos aumentada en comparación con sus contrapartidas planctónicas (Hawser y Douglas, 1994; Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2001 (a); Douglas, 2002; Kuhn *et al.*, 2002; Kumamoto, 2002; Ramage *et al.*, 2002 (a); Cocuauud *et al.*, 2005; Kumamoto y Vinces, 2005; López-Ribot, 2005; Mukherjee *et al.*, 2005; Seneviratne *et al.*, 2008), siendo necesario en la mayor proporción de los casos la retirada del dispositivo (Douglas, 2002; Kumamoto, 2002; Kojic y Darouiche, 2004; Kumamoto y Vinces, 2005; López Ribot, 2005; Mukherjee *et al.*, 2005). Algunas hipótesis han intentado explicar la reducida sensibilidad a antifúngicos (Perumal *et al.*, 2007), siendo una de ellas la expresión de bombas de eflujo (Ramage *et al.*, 2002 (a)) en la que se postula que la expresión de CDR1 y CDR2 y MDR1 se encuentra aumentada durante la formación del biofilm. Otra hipótesis intenta explicar cómo la matriz extracelular del biofilm podría inhibir la penetración de los fármacos dentro del biofilm. Otras hipótesis refieren la presencia de subpoblaciones de levaduras, que después de desprenderse el biofilm, permanecen adheridas a la superficie sobre la cual el biofilm se forma (Harrison *et al.*, 2007), y muestran resistencia incrementada a anfotericina B (Khot *et al.*, 2006; LaFleur *et al.*, 2006) y a clorhexidina (LaFleur *et al.*, 2006). El desarrollo del 1% de células persistentes se ha asociado al anclaje a la superficie abiótica y no al desarrollo de la compleja arquitectura del biofilm (LaFleur

et al., 2006). Perumal *et al.*, 2007, plantean la hipótesis de que la densidad celular contribuye a la resistencia fenotípica del biofilm. La resistencia del biofilm a los antifúngicos parece más una característica fenotípica que genotípica (Seneviratne *et al.*, 2008). A su vez, las levaduras liberadas de los biofilms presentan además una aumentada capacidad de diseminación vascular, y consecuentemente, su posterior evolución a fungemia de origen nosocomial.

Las infecciones que implican la presencia de biofilms de *Candida* representan un problema clínico en aumento, puesto que puede desarrollar biofilms en todos los dispositivos médicos actualmente en uso, incluyendo stents, shunts, prótesis, implantes y varios tipos de catéteres (Ramage *et al.*, 2001 (b); Douglas, 2002; Kumamoto, 2002; Douglas, 2003; Kumamoto y Vines, 2005; López-Ribot, 2005; Mukherjee *et al.*, 2005; Ramage *et al.*, 2006). Así, infecciones como la cistitis producida por *Candida*, aparecen con mayor frecuencia como una complicación relacionada con las sondas Foley permanentes (Beers y Berkow, 1999), y la duración de la exposición a este tipo de dispositivos está directamente relacionada con la incidencia de candiduria (Gentry y Price, 1993). In vivo, los catéteres y otros dispositivos protésicos son rápidamente recubiertos por proteínas del hospedador, como albúmina, fibrina, fibrinógeno, y fibronectina. Algunas de estas proteínas facilitan la adhesión microbiana y la consecuente formación del biofilm (Dougherty, 1988). Con la disponibilidad de un arsenal limitado de terapéutica antifúngica, el futuro para la eliminación de este tipo de infecciones parece ser desfavorable, a menos que el interés en la investigación en esta área continúe con mayor intensidad.

En *C. albicans*, la expresión del gen *HWP1* y de genes pertenecientes a la familia *ALS*, así como genes *SAP*, *LIP* (lipasa) y *PL* (fosfolipasa) se asocian con el crecimiento del biofilm sobre superficies mucosas. *Als1p*, *Als2p*, *Als3p* y *Hwp1* son importantes para el crecimiento del biofilm in vitro e in vivo (Hoyer *et al.*, 2008), y *Als1p/Als3p* y *Hwp1* presentan papeles complementarios en la formación del biofilm. Todos los miembros de las familias *ALS*, *SAP*, *LIP* y *PLB* se expresan en los biofilms (Nailis *et al.*, 2010). Genes que codifican adhesinas e hidrolasas extracelulares se expresan de forma constitutiva en los biofilms sobre superficies mucosas o abióticas in vitro e in vivo. Estudios recientes han demostrado que las células sésiles de *C. albicans* asociadas con superficies abióticas secretan mayor cantidad de aspartil-proteasa que sus correspondientes planctónicas, y a su vez, los genes *LIP* también se encuentran sobreexpresados en los biofilms. Sin embargo, para los genes de *PLB*, Nailis *et al.*, 2010, encontraron que se expresan de manera constitutiva en las células sésiles, pero no a altos niveles, y por tanto, sin sobreexpresión en el biofilm, presentando las células planctónicas mayor producción de fosfolipasas que los biofilms. El papel de las fosfolipasas B en los biofilms crecidos in vivo contribuye al daño tisular, mientras que su papel en el biofilm desarrollado in vitro es más difícil de entender, desempeñando posiblemente una importante función en la adquisición de nutrientes.

1.3.2.4. Cambios morfológicos y capacidad de conjugación.

a. Dimorfismo.

La conversión de blastosporas a formas filamentosas desempeña un importante papel en la virulencia de *Candida*. El bloqueo de la transición puede llevar a la inhibición de su patogenicidad (Hornby *et al.*, 2001), como se ha observado en mutantes no filamentosas de *C. albicans*, frecuentemente avirulentas (Lo *et al.*, 1997). Las formas filamentosas poseen una resistencia incrementada a la fagocitosis comparada con las levaduras (Gow *et al.*, 2002), y a su vez, actúan como un estado invasivo al generar fuerzas físicas y enzimas líticas, siendo capaces de detectar lugares idóneos para la invasión, como microporos y soluciones de continuidad, mediante el tigmotropismo.

A través de la inducción de su propia fagocitosis, *C. albicans* puede invadir células endoteliales y epiteliales. Las hifas de *C. albicans* son endocitadas mejor que las levaduras, sugiriendo que las hifas expresan moléculas de superficie específicas de invasión tisular, que al unirse a los receptores celulares inducen su endocitosis. *ALS3* (Liu y Filler, 2011) y *HWP1* codifican adhesinas específicas de hifas, y la elevada expresión de *SAP4-6* predomina también en las hifas (Naglik *et al.*, 2003).

Se ha observado cómo las blastoconidias de *C. albicans* estimulan los receptores TLR2 y TLR4 de los monocitos, mientras que las hifas sólo son reconocidas por el receptor TLR2. Este hecho apoya la virulencia que representa el cambio morfológico de levadura a hifa en esta especie, ya que mientras que el receptor TLR2 es responsable de la liberación de interleucina 10, el receptor TLR4 se encarga de la producción de interferón γ , siendo éste una parte importante de la respuesta pro-inflamatoria frente a la infección por *Candida*. Por ello, la transición de levadura a hifa conlleva la pérdida de la presencia de interferón γ y consecuentemente, pérdida de la eficacia de la respuesta inmune del hospedador (van der Graaf *et al.*, 2005).

Las diferentes morfologías presentadas por *C. tropicalis* son similares a las mostradas por *C. albicans* (Silva *et al.*, 2011 (b)) (Figura 13). Sin embargo, pocos estudios han observado la importancia de la morfología de *C. tropicalis* en su virulencia. Recientemente, Silva *et al.*, 2011 (a), demostraron que sólo las formas filamentosas de *C. tropicalis* son capaces de invadir el epitelio bucal.

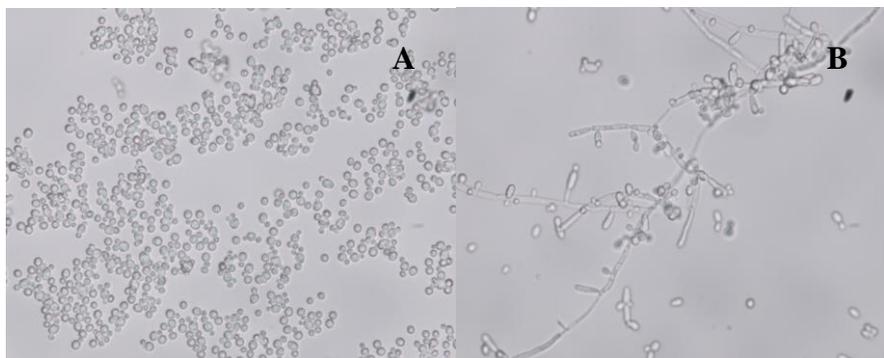


Fig 13. Dimorfismo en *C. tropicalis* (A, levaduras; B, formas filamentosas).

Una de las condiciones que define la transición de levadura a hifa *in vitro* es la dependencia de la densidad celular para determinar la morfogénesis, lo que se conoce como el efecto del inóculo. Se observa cuando las células son diluidas a concentraciones menores de 10^6 levaduras/ml en el medio de cultivo bajo condiciones que predisponen a las células a germinar a la forma de hifa. Cuando las células se inoculan a mayores concentraciones, permanecen predominantemente en fase de levadura. La formación de formas filamentosas es suprimida por una alta densidad celular y también por sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria (Lingappa *et al.*, 1969; Hazen y Cutler, 1979), sugiriendo que la formación de las formas filamentosas es controlada al menos en parte por un factor soluble. Esta sustancia también es secretada por *C. tropicalis* (Hazen y Cutler, 1979; Hazen y Cutler, 1983). La represión de la filamentación en *C. albicans* también ocurre en respuesta a sobrenadantes de *C. tropicalis* (Hazen y Cutler, 1979; Hogan, 2006 (b)). Estos datos refuerzan la idea de que las señales quórum sensing controlan la formación de hifas y pseudohifas, un rasgo asociado a procesos multicelulares, como la formación de biofilms (Reynolds y Fink, 2001).

El crecimiento invasivo o filamentosamente adicionalmente debe representar una estrategia para la ayuda en la adquisición de nutrientes, mediante el crecimiento fuera de la densa colonia microbiana (Gimeno *et al.*, 1992). De forma similar, el crecimiento como pseudohifas debe permitir la invasión de las superficies nutritivas, y este esfuerzo debe requerir la acción coordinada de numerosas células (Gognies *et al.*, 2006). Los microorganismos regulan frecuentemente procesos que requieren la acción coordinada de múltiples células dentro de una población mediante el uso de señales químicas extracelulares (Henke y Bassler, 2004; Visick y Fuqua,

2005; Hogan, 2006 (a, b)). Estas señales generalmente regulan genes en relación con la presencia de una alta densidad celular, denominándose por ello moléculas “quórum sensing”, ya que permiten a las células medir químicamente la densidad de la población que las rodea (Fuqua *et al.*, 1994). Se ha demostrado que las células producen, liberan, detectan y finalmente responden a un nivel umbral de moléculas autoinductoras que coordinan funciones biológicas como la densidad celular, la bioluminiscencia, la expresión de factores de virulencia y el desarrollo de biofilm (Parsek y Greenberg, 2005). Adicionalmente, las redes regulatorias dependientes de la densidad celular en los microorganismos, generalmente controlan procesos que involucran las interacciones célula-célula, la motilidad (Daniels *et al.*, 2004; Kaiser, 2004), la formación de estructuras multicelulares (Parsek y Greenberg, 2005; Suntharalingam y Cvitkovitch, 2005; Visick y Fuqua, 2005), los cambios en la morfogénesis y la captación de DNA extracelular, presumiblemente para mejorar las oportunidades de tomar DNA de cepas estrechamente relacionadas (Hogan, 2006 (b)). Estas moléculas señal son difusibles, suelen ser específicas por especies o cepas y existe un alto grado de diversidad estructural entre ellas (Federle y Bassler, 2003; Henke y Bassler, 2004; Visick y Fuqua, 2005).

En muchos microorganismos de relevancia médica, el desarrollo, mantenimiento y dispersión de los biofilms multicelulares asociados a superficies están en parte controlados por vías regulatorias quórum sensing (Parsek y Greenberg, 2005; Suntharalingam y Cvitkovitch, 2005; Hogan, 2006 (a, b)). Se han encontrado muchos ejemplos de la regulación dependiente de la densidad celular por factores extracelulares. La amplia incidencia de diversos sistemas quórum sensing, sugieren que la regulación de acuerdo con la densidad celular es importante para el éxito de los

microorganismos en muchos ambientes (Henke y Bassler, 2004; Visick y Fuqua, 2005). De este modo, la regulación quórum sensing permite a los microorganismos asociados al hospedador retrasar la detección de los mismos hasta que una población efectiva se ha formado en el nicho apropiado en el hospedador (Hogan, 2006 (b)).

Los hongos, al igual que las bacterias, también usan la regulación del quórum sensing para modificar comportamientos a nivel de población, como la formación de biofilm y la patogénesis (Hogan, 2006 (b); Kruppa, 2009). Así, la formación de los biofilms de *Candida* ocurre de una manera bien organizada (Chandra *et al.*, 2001). La heterogenicidad espacial y la complejidad observada en los biofilms intactos hacen considerar la existencia de comunicación célula-célula (intercelular), así como sistemas de una expresión de genes altamente regulada (Ramage *et al.*, 2001 (b)). El papel del quórum sensing en la formación de los biofilms es complejo y dependiente de las condiciones ambientales (Hogan, 2006 (b)), siendo fundamental para el desarrollo y mantenimiento de los mismos (Parsek y Greenberg, 2005). Cuando una señal se acumula a una concentración lo suficientemente elevada, se activa la respuesta al regulador en la población de células, permitiendo una expresión génica coordinada. Algunas de estas moléculas que actúan como señales extracelulares son alcoholes aromáticos. Los genes involucrados en la síntesis de los aminoácidos aromáticos son autorregulados e inducidos además de la señal exógena, sugiriendo un mecanismo de amplificación de la señal en la población (Chen y Fink, 2006). Mientras que la producción de la señal está aumentada a alta densidad celular, también se afecta por las condiciones ambientales, indicando la naturaleza integrada de estas rutas.

En 2001, Hornby *et al.* identificaron el farnesol [(2E, 6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol] como molécula quórum sensing de *C. albicans*, siendo la primera molécula quórum sensing identificada en un organismo eucariota. Los sobrenadantes de los biofilms maduros aplicados sobre células planctónicas inhiben la formación de biofilms, indicando que el farnesol u otros factores del sobrenadante ayudan a mantener abiertos espacios o canales en el biofilm que hipotéticamente facilitarían el mantenimiento del influjo de nutrientes y el eflujo de productos de desecho del biofilm. Además, el farnesol desempeña un papel importante en la señalización de la transición de fase exponencial a fase estacionaria (Martins *et al.*, 2007) y la regulación de la morfogénesis. Produce inhibición de la filamentación en *C. albicans* sin cambios en la tasa de crecimiento, y posee también capacidad de inhibición de la formación de biofilm (Hornby *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2002 (b); Nickerson *et al.*, 2006). Cuando el farnesol se acumula sobre un nivel umbral, evita el paso de levadura a micelio y las levaduras resultantes son propensas a separarse y diseminarse desde el biofilm para colonizar una nueva superficie, lo cual puede sugerir que la acumulación endógena del farnesol en los biofilms puede servir como señal para la dispersión del biofilm una vez que una densidad celular crítica es alcanzada (Ramage *et al.*, 2002 (b)). Las levaduras gemando en el biofilm maduro no pueden germinar en un medio con altas concentraciones de farnesol.

El farnesol se ha correlacionado con la virulencia en *C. albicans* (Navarhna *et al.*, 2005), pero sus efectos no se restringen a esta especie. Así, en *C. dubliniensis* previene la transición de levadura a pseudohifa (Henriques *et al.*, 2007), pero en *C. parapsilosis* se ha observado que no produce efectos en la morfología (Laffey y Butler, 2005), aunque reduce la

formación de biofilm en ambas especies si se añade en la fase de adherencia (Laffey y Butler, 2005; Jabra-Rizk *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007).

C. albicans produce una segunda molécula autorregulatoria, el tirosol [4-(2-hidroxietil) fenol], que se acumula en el medio extracelular de los cultivos densos (Chen *et al.*, 2004). Estudios con microarrays muestran que el tirosol impide la disminución temporal de la expresión de los genes involucrados en la replicación del DNA, la segregación de los cromosomas y la regulación del ciclo celular. El tiempo entre el paso de levadura a hifa está mediada por la expresión de tirosol, identificado como un promotor del desarrollo de hifas. Los biofilms expresan mayores niveles de tirosol que las células planctónicas. Mientras que concentraciones de farnesol mayores de 1mM pueden reducir la formación del biofilm, el tirosol no presenta efecto inhibitorio (Alem *et al.*, 2006), y por el contrario, el tirosol aumenta la formación de hifas durante los estadios precoces del desarrollo del biofilm (6 primeras horas). La regulación del tirosol es secundaria a la del farnesol en la morfogénesis, y puede considerarse una molécula quórum sensing menor cuya influencia sólo puede verse cuando el farnesol está limitado o ausente en el medio (Kruppa, 2009).

Otras moléculas quórum sensing como el feniletíl-alcohol (2-feniletanol) y el triptofol [2-(1H-indol-3-yl) etanol] parecen actuar también bloqueando la filamentación e inhibiendo el crecimiento celular. A su vez, el ácido farnesoico [(2E, 6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trienoic acid] aislado por Oh *et al.* (2001), inhibe la transición de levadura a hifa en los biofilms.

Debido al importante papel que desarrolla el quórum sensing en la regulación de la formación y el desarrollo de los biofilms sobre la superficie de los dispositivos médicos, existe un particular interés en identificar nuevos agentes químicos que puedan controlar las infecciones asociadas a los biofilms. La regulación quórum sensing es modulada por factores físicos y la disponibilidad de nutrientes (Hogan, 2006 (b)). La disponibilidad de hierro, oxígeno y fuentes de carbono son algunas de las condiciones ambientales que afectan la producción de moléculas quórum sensing (Juhás *et al.*, 2005). De este modo, una de las rutas metabólicas en levaduras guía la filamentación en respuesta a bajas condiciones de nitrógeno.

b. Cambios fenotípicos (“switching”) en la morfología de las colonias y capacidad de conjugación (“mating”).

C. tropicalis, al igual que *C. albicans*, puede de manera reversible y con elevada frecuencia modificar su fenotipo (“switching”) (Soll *et al.*, 1988; Soll, 1992; Jayatilake, 2011) bajo numerosos factores ambientales (Figura 14). Este fenómeno incluye un cambio epigenético en la morfología

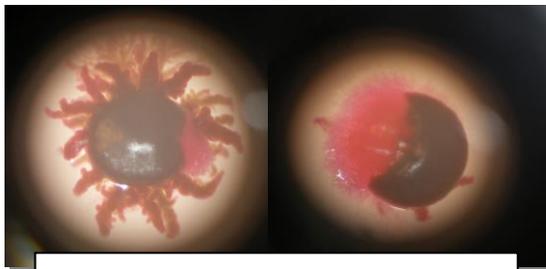


Fig 14. “Switching” en *C. tropicalis*.

de las colonias, y difiere de los cambios morfológicos de transición levadura-hifa/pseudohifa. Conlleva la aparición de variantes antigénicas reversibles entre ellas, pero también pueden suponer cambios en la

fisiología y la morfología celular, incluyendo modificaciones en los factores de virulencia, viéndose ampliamente afectada la transcripción génica. En la transición levadura-hifa, todas las células de una población expresan fenotipos alternativos bajo condiciones ambientales alternativas. En el “switching”, un pequeño número de células de la población expresan un fenotipo diferente bajo un único conjunto de condiciones ambientales. La radiación ultravioleta, la temperatura, las condiciones de hipoxia y la edad de la colonia son factores que parecen influir en el “switching”.

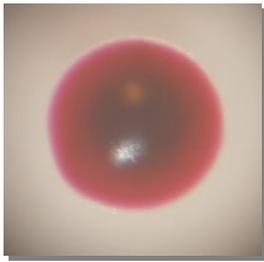


Fig 15. Colonia de morfología lisa en *C. tropicalis*.

C. tropicalis presenta una amplia variedad fenotípica de colonias: colonias con morfología lisa (Figura 15), con borde rugoso irregular, con borde terminado en micelio, colonias mixtas con sectores lisos y sectores con micelios, moteadas, morfología de flor, copo de nieve,... (Soll *et al.*, 1988), siendo el repertorio de la variedad morfológica limitado y específico según cepa.

Slutsky *et al.*, 1985, utilizaron el medio de Lee (Lee *et al.*, 1975), con concentraciones limitantes de zinc (Bedell y Soll, 1979) por primera vez para estudiar el cambio fenotípico de *C. albicans* a 25°C.

En *C. albicans*, los diferentes fenotipos presentan diferente grado de adhesión (Kennedy *et al.*, 1988; Jin *et al.*, 2005), de secreción de aspartil-proteasas (Hube *et al.*, 1994) y de formación de biofilm (Jin *et al.*, 2005).

La capacidad de “switching” en *C. albicans* se estudió ampliamente en la cepa WO-1, aislada de un paciente transplantado de médula ósea en el Hospital Universitario de Iowa en 1985 (Anderson y Soll, 1987). Ésta cepa presenta dos morfotipos predominantes, uno, de colonia blanca suave (“white”) y otro de colonia oscura y opaca (“opaque”), mostrando adicionalmente otros morfotipos menos frecuentes. Las células con morfotipo “opaque” son estables sólo a bajas temperaturas, y revierten a fase “white” a 37°C. Elevados niveles de CO₂ inducen a su vez la transición de fase “white” a “opaque”, estabilizando la fase “opaque” incluso a 37°C. Las células “opaque” muestran un metabolismo oxidativo, mientras que el de las células “white” es fermentativo (Ramírez-Závala *et al.*, 2008). Estos dos tipos de células difieren en su apariencia al microscopio (las células procedente de colonias “opaque” son más alargadas), en su expresión génica, en los tejidos del hospedador que invaden, así como en su capacidad de conjugación.

Hasta hace relativamente poco tiempo se creía que *C. albicans* y las especies de *Candida* no *albicans* relacionadas no poseían ciclo de reproducción sexual. Sin embargo, ahora se conoce que la conjugación entre individuos del género *Candida* es posible (Hull *et al.*, 2000). La presencia de genes localizados en el mismo cromosoma pero con diferentes historias evolutivas, como ocurre con las familias de genes *SAP* y *ALS* (estos últimos de aparición más reciente), representa una evidencia indirecta de la capacidad de conjugación de *Candida* en algún momento de su evolución.

Actualmente se reconoce que *C. albicans* tiene un ciclo parasexual, con conjugación de células diploides seguida de mitosis, y pérdida cromosómica en lugar de meiosis (Noble y Jonson, 2007).

La configuración genotípica o tipo conjugativo (“mating type”) viene determinada por los genes localizados en el locus *MTL* (“Mating Type-Like”), análogos al locus *MAT* en *S. cerevisiae*. En *C. albicans*, hay dos idiomorfismos *MTLa1* y *MTLa2*, y *MTLa1* y *MTLa2*. Bajo determinadas condiciones, células con dos copias de *MTLa* (a/a) o hemicigotas para *MTLa* (a/0) pueden conjugarse con cepas con dos copias de *MTLa* (α/α) o hemicigotas para *MTLa* ($\alpha/0$), pero no cuando presentan heterocigocidad (a/ α) (Figura 16).

Entre las distintas especies de *Candida* existe una enorme variabilidad en el contenido de los genes *MTL*. Así, mientras que *MTLa1* en *C. parapsilosis* es un pseudogen, en *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae* se perdió el gen *MTLa2*. *C. tropicalis* presenta los mismos idiomorfismos que *C. albicans*.

En *C. albicans*, la capacidad para la conjugación se encuentra íntimamente relacionada con los fenotipos “white-opaque”. Así, sólo los homocigotos *MTLa* y los homocigotos *MTLa* presentan capacidad de “switching” “white-opaque”, y cuando las células homocigotas están en fase “opaque”, la eficacia de la conjugación se encuentra aumentada (Miller y Jonson, 2002). Para que la conjugación tenga lugar, una célula a en fase “opaque” (homocigota para a), tiene que encontrar otra célula también en fase “opaque”, pero homocigota para el tipo α . La mayoría de las cepas clínicas de *C. albicans* aisladas son *MTLa/a*, pero pueden volverse homocigotas por pérdida de un homólogo y duplicación del otro, o por recombinación mitótica.

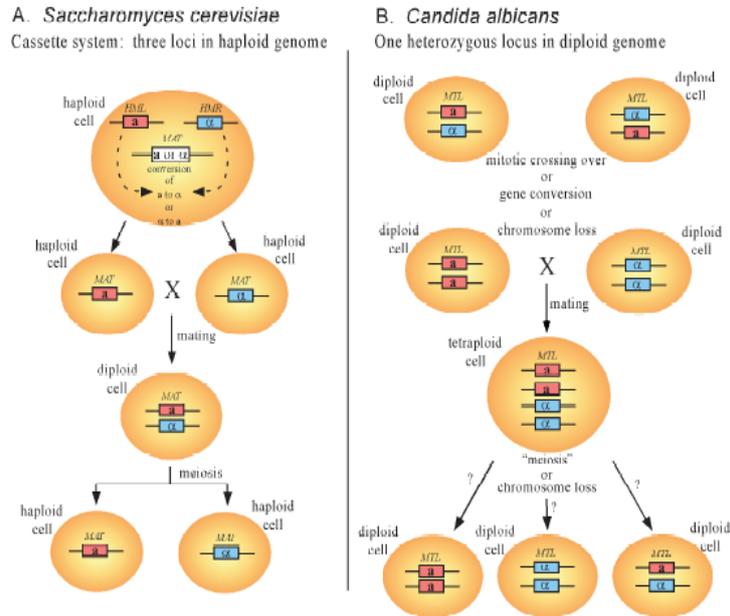


Fig 16. Conjugación en *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Tomada de Soll, 2003.

La capacidad de conjugación en *C. tropicalis* fue descrita por Porman *et al.*, a finales de 2011, presentando un mecanismo similar al de *C. albicans*, con la diferencia fundamental de la eficacia de la conjugación de *C. tropicalis* a 37°C, sugiriendo que la recombinación sexual en esta especie puede ocurrir durante la colonización e infección en el hospedador. En la Figura 17 se muestran las diferentes formas conjugativas tanto de *C. albicans* (A) como de *C. tropicalis* (B).

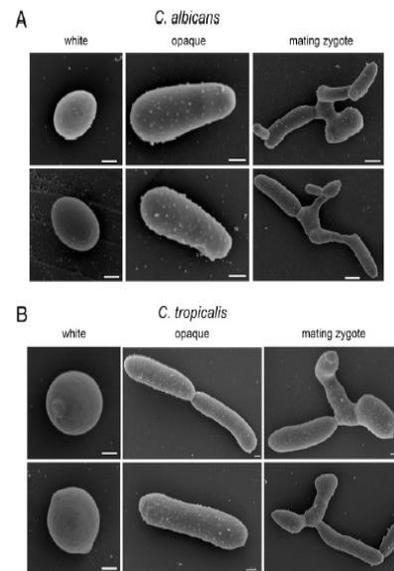


Fig 17. "Switching" en *C. albicans* (A) y en *C. tropicalis* (B). Tomada de Porman, 2011.

En la Figura 18 se representan los genes *MTL* en las diferentes especies de *Candida*.

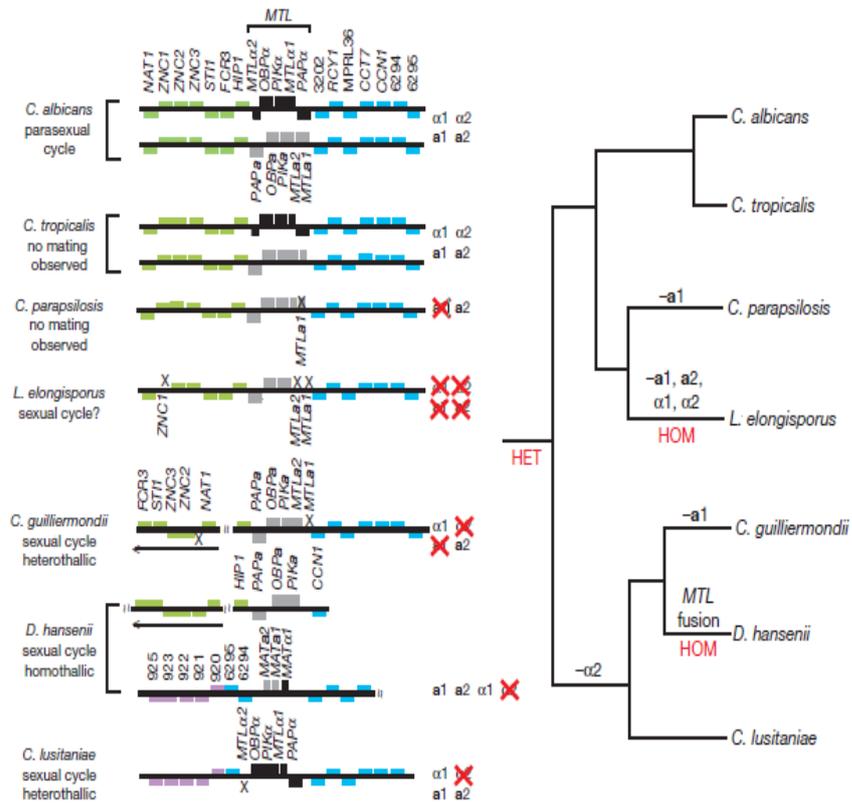


Fig 18. Representación del locus *MTL* en diferentes especies de *Candida*.

Tomada de Butler *et al.*, 2009.

Las moléculas quórum sensing pueden tener actividades más allá de su papel como señales en las poblaciones microbianas. En algunos casos, median interacciones interespecies. En *C. albicans*, las feromonas inducen la expresión de genes involucrados en la conjugación, la formación de hifas

y la producción de factores de virulencia (Bennett *et al.*, 2003). Se ha observado cómo las células crecidas en condiciones aerobias producen farnesol, mientras que las crecidas en anaerobiosis no (Dumitru *et al.*, 2007).

La presencia de farnesol destruye células con fenotipo “opaque” bajo condiciones aeróbicas, lo cual puede contribuir a la reducción de la eficiencia de la conjugación. Los lugares con condiciones de anaerobiosis como microambientes en el interior del biofilm pueden servir de nichos para la conjugación de *C. albicans* (Martins *et al.*, 2007).

1.3.2.5. Otros factores.

- El tigmotropismo o crecimiento filamentosos guiado por la topografía del terreno, que permite encontrar discontinuidades entre las células y penetrar en los tejidos (Pontón y Ruiz, 2006; Jayatilake, 2011) es considerado otro de los factores de virulencia en *Candida*.

- Las bombas de eflujo pueden mediar la resistencia a algunos antifúngicos. *C. glabrata* tiene al menos dos genes transportadores que median la alta resistencia a los azoles, especialmente a fluconazol, y *C. krusei* posee también al menos dos genes de transportadores inducibles. *C. tropicalis* posee ambos tipos (*CDR1*, y *ABC*-“transportator gene”, y un complejo mayor facilitador MDR1) que son inducidos en presencia de fluconazol.

- La producción de toxinas y sustancias inmunosupresoras.

Al intentar establecer correlaciones entre los diferentes factores de virulencia, se ha observado cómo las alteraciones en la superficie celular pueden conllevar una reducción de la adherencia, y consecuentemente, una reducción en el desarrollo del biofilm (Kumamoto y Vines, 2005). Una explicación al hecho de que las glicoproteínas de superficie se expresen durante la filamentación puede ser porque confieren hidrofobicidad y promueven el biofilm y la formación de agregados (Reynolds y Fink, 2001). Desde que la adhesión inicial es importante en términos de la capacidad del farnesol de inhibir la formación del biofilm, debe existir una correlación entre la concentración de farnesol y la hidrofobicidad de superficie celular. Así, Cao *et al.* (2005) encontraron una correlación negativa entre la concentración de farnesol y la hidrofobicidad de superficie celular. Es posible, por tanto, que una disminución en la hidrofobicidad de superficie celular contribuya a la inhibición de la formación del biofilm. Barrett-Bee *et al.*, 1985, encontraron correlación entre la actividad fosfolipasa, la adherencia y la patogenicidad en cepas de *C. albicans*. Los aislamientos que mostraron mayor adherencia a las células epiteliales y eran más patógenas en ratones presentaron también la mayor actividad fosfolipasa, mientras que las que no se adherían y no causaban mortalidad en ratones presentaron menor actividad fosfolipasa. Por consiguiente, se puede afirmar que la patogenicidad que presentan las distintas especies de *Candida* no debe ser atribuida a un único factor, sino a la combinación de varios de estos agentes (Mohan das y Ballal, 2008), ya que parecen existir amplias correlaciones entre los mismos. Futuras investigaciones sobre la virulencia de las diferentes especies de *Candida* deben ir dirigidas a esclarecer la cascada de patogenicidad que ocurre in vivo, y a establecer las asociaciones existentes entre los diversos eventos patogénicos que tienen lugar durante la infección.

2. OBJETIVOS

Debido al significativo aumento de las infecciones causadas por los patógenos fúngicos oportunistas observado en los últimos treinta años (Lass-Flörl, 2009; Silva *et al.*, 2012), y en concreto al cambio producido en la incidencia de las especies de *Candida* no *albicans* aisladas en clínica en las dos últimas décadas (Kauffman *et al.*, 2000; Ruan y Hsueh, 2009), el interés por el estudio de los diferentes factores de patogenicidad que favorecen la capacidad de colonización e invasión del hospedador susceptible presentados por estas especies ha cobrado gran relevancia. La capacidad de virulencia de *C. tropicalis*, a pesar de ser una de las especies emergentes de *Candida* no *albicans* aislada con mayor frecuencia en clínica (Comert *et al.*, 2007; Kliemann *et al.*, 2008; Marol y Yücesoy, 2008; Da Costa *et al.*, 2009; França *et al.*, 2010), permanece aún poco esclarecida, siendo necesario por tanto la realización de estudios enfocados a dilucidar los diferentes factores implicados en la patogenicidad de esta especie.

Por todo ello, los objetivos de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Realizar el aislamiento y la identificación de levaduras del género *Candida*, especie *tropicalis*, a partir de muestras obtenidas de pacientes intra y extrahospitalarios del Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz.
2. Proceder a la determinación de los factores de patogenicidad que se refieren a continuación de estos aislados clínicos de *C. tropicalis*:

2.1. Actividad enzimática. Para su valoración se estudió la capacidad de producción extracelular de actividad:

2.1.1 Aspartil-proteasa.

2.1.2 Fosfolipasa.

2.1.3 Esterásica.

2.1.4 Hemolítica.

2.2. Adherencia a material plástico (poliestireno). Para su valoración se procedió al estudio de los siguientes apartados:

2.2.1 Capacidad de adherencia inmediata y tardía.

2.2.2 Adherencia inespecífica. Determinación de la hidrofobicidad de superficie celular.

2.2.3 Adherencia específica. Adhesinas. Cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en células planctónicas y sésiles. Diferencias entre ambas.

2.3. Formación de biofilm. Para su valoración se estudió la capacidad de:

2.3.1 Formación de biofilm sobre material plástico.

2.3.2 Formación de biofilm en catéteres urinarios de látex bajo flujo continuo de orina artificial utilizada como medio de cultivo.

2.3.3 Comparación entre ambos métodos.

2.4. Cambios morfológicos. Para su valoración se determinaron los siguientes puntos:

2.4.1 Dimorfismo.

2.4.2 Cambios fenotípicos (“switching”). Cambios macroscópicos en la morfología de las colonias.

2.5. Conjugación (“mating”). Determinación específica del locus *MTLt*. Estudios de homocigocidad o heterocigocidad para este gen.

3. Establecer la relación existente entre los diferentes factores de patogenicidad estudiados en el apartado anterior.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material y equipos. Reactivos.

Material y equipos.

1. Agitador manual convencional (Heidolph. Reax top. Germany).
2. Autoclave Autester (modelo 437G) (Selecta, Madrid, España).
3. Balanzas analíticas de precisión (modelos 1106-2842) (Sartorius, Goettingen, Alemania) y Precisa modelo 600-C (Goettingen, Alemania).
4. Cámara hematocitométrica Neubauer (Blau Brand, Alemania).
5. Cámara fotográfica digital (Fujifilm, Finepix F650).
6. Centrífuga Centronic (modelo S-577) (Selecta, Madrid, España) y Sorvall modelo TC6 (Dupont, Newtown, USA).
7. Electrodo de pH (Hanna instruments. pH H187 11E).
8. Electrodo de pH (MicropH2001) (Grison SA., Barcelona, España).
9. Equipo Riboliser (Hybaid Ltd, Teddington, Inglaterra).
10. Espectrofotómetro (modelo Spectronic-20) (Bauch & Lomb, Nueva York, USA, Heλios ε ThermoSpectronic, Rochester N.Y., USA).
11. Estufa de 22°C (modelo Refrigerador incubator FOC-22SE) (Velp Scientifica).
12. Estufa de 37°C, 5% CO₂ (modelo GMBH) (Binder, 9140.0012).

13. Estufa de 37°C (modelo G25-Incubator SOC) (New Brunswick Scientific, Edison, USA).
14. Estufa refrigerada (Revco Scientific modelo RI-23-1060) (Ashville, USA).
15. Estufa de 37°C (WTC binder).
16. Enviromental shaker incubator, 37°C. 120 r.p.m. (Biosan. ES-20/60).
17. Estufa de 76°C (Mettler).
18. Estufa de 37°C (Selecta Rotabil).
19. Filtros estériles de 0.22 μ de diámetro de poro (Millipore, Madrid, España).
20. Filtros estériles de 0.45 μ de diámetro de poro (Millipore, Madrid, España).
21. iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green (BioRad).
22. Kit Illustra RNAs isolation (GE Healthcare).
23. Lector multicanal de densidades ópticas Anthos 2020 (Anthos Labtec Instrument, Wals, Austria), acoplado a un software ADAP plus.
24. Lector ELISA. Tecan Sunrise (Firmware). Programa Magullan CE. Tecan Calc CE. Dynamic Link Library. CV-570 nm.
25. Micropipetas Eppendorf.
26. Microscopios ópticos (modelo Reichter Diavar) (Leica, Wetzlar, Alemania).
27. Microscopio óptico (modelo Leica. ATC. 2000) (Buffalo NY14240.USA).

28. Orbital incubator 5150 (Bibby. Stuart Scientific).
29. Perlas de vidrio de 0,4 mm (Sigma, St. Louis, USA).
30. Placas de Petri de 90 mm.
31. Placas estériles de microtitulación de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Greiner, Frickenhausen, Alemania).
32. Placas estériles de microtitulación de poliestireno de fondo plano de 12 y 96 pocillos. Cultivo de tejidos (Orange Scientific).
33. Portafiltros de 13 mm para filtros de éster de celulosa (Millipore Ibérica, Madrid, España) de 10 μ m de diámetro de poro.
34. Programa para fotografías NIS-Elements F.3.0.
35. Sangre de cordero desfibrinada (Biocult laboratorios, Madrid, España).
36. Sistemas API 32C (BioMèrieux, Marcy Létoile, Francia) para la identificación de levaduras.
37. Sonda Foley estéril de látex con cubierta de silicona. Diámetro: 0.5 cm. Longitud: 26 cm. (The Kendall Company. Mansfield, MA 02048. USA. Curity®).
38. Termociclador convencional PCR Sping (Hybond, Amersham, Inglaterra).
39. Tubos estériles de centrifuga de 15 y 50 ml (Orange Scientific).
40. Ultrasonic processor. Cole Parmer (Selecta).
41. Viales de criocongelación Protect (STC, Heywood Lancashire, Inglaterra).

Reactivos.

1. Ácido clorhídrico (Panreac, Barcelona, España).
2. Ácido acético glacial 33% (Panreac, Barcelona, España).
3. Albúmina bovina (Sigma, Madrid, España).
4. Cebadores:
ALSt1-Forward: 5'-AGGTGATACGTTCACTTTGATCATG-3'
ALSt1-Reverse: 5'-CCATTGGCAGTCAAATCAACA-3'
MTLta2-Forward: 5'-GATTTGGTATGAAAAGAGGAACTCTAAC-3'
MTLta2-Reverse: 5'-CTACTAATTTTGAAACCATTTGGAGTCT-3'
MTLta2-Forward: 5'-TAAAACATTAAGCATAGAGGACAAAGAA-3'
MTLta2-Reverse: 5'-AACTTCAAATGCAAAATGTAAAACATAC-3'
5. Citrato sódico (Merck, Madrid, España).
6. Cloruro amónico (Panreac, Barcelona, España).
7. Cloruro cálcico 0,005 M Codex (Farmitalia Carbo Erma, Milán, Italia).
8. Cloruro magnésico (Merck, Madrid, España).
9. Cloruro sódico 1 M (Panreac, Barcelona, España).
10. Cloruro potásico (Prolabo, París, France).
11. Creatinina (Panreac, Barcelona, España).
12. Cristal violeta (Panreac, Barcelona, España).

13. D (+) -Glucosa-monohidrato (Merck, Madrid, España).
14. Dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac, Barcelona, España).
15. Fenol-cloroformo (Sigma, St. Louis, USA).
16. Fosfato potásico anhidro (Merck, Darmstadt, Alemania).
17. Fosfato potásico dihidratado (Merck, Madrid, España).
18. Hidróxido sódico (Panreac, Barcelona, España).
19. L – Alanina (Panreac, Barcelona, España).
20. L – Arginina (Panreac, Barcelona, España).
21. L – Fenilalanina (Panreac, Barcelona, España).
22. L – Leucina (Panreac, Barcelona, España).
23. L – Lisina (Panreac, Barcelona, España).
24. L – Metionina (Panreac, Barcelona, España).
25. L – Ornitina (Panreac, Barcelona, España).
26. L – Prolina (Panreac, Barcelona, España).
27. L – Treonina (Panreac, Barcelona, España).
28. Menadiona (Sigma, St. Louis.MO. USA).
29. Metanol (Panreac, Barcelona, España).
30. Oxalato sódico (Panreac, Barcelona, España).
31. Phloxine B (Panreac, Barcelona, España).
32. Suero fisiológico Grifols.
33. Sulfato amónico (Panreac, Barcelona, España).
34. Sulfato de cobre (Panreac, Barcelona, España).

35. Sulfato de sodio anhidro (Panreac, Barcelona, España).
36. Sulfato magnésico heptahidratado (Merck, Darmstadt, Alemania).
37. Tampón fosfato PBS 0,15M pH7 (1,19g/l K_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Alemania); 0,29g/l KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Alemania) y 4,93g/l NaCl (Panreac, Barcelona, España).
38. Tampón MOPS 3-[N-morpholino]-propanesulfonic acid (Sigma, St Louis, USA).
39. Taq ADN polimerasa (Biotools).
40. Urea (Panreac, Barcelona, España).
41. Xilol (Panreac, Barcelona, España).
42. XTT (2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamine) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide).
43. Yema de huevo (Oxoid, Madrid, España).
44. Zinc (Panreac, Barcelona, España).

3.2. Medios de cultivo.

1. Agar bacteriológico tipo europeo (Panreac, Barcelona, España).
2. Candida ID2 agar (BioMérieux, Marcy L'etoile, Francia).
3. Malt Extract Agar (Oxoid, Madrid, España) enriquecido con egg yolk emulsion (Oxoid, Madrid, España).
4. Medio de opacidad del Tween 80 (ver composición en página 92).
5. Medio de Lee (ver composición en página 124).
6. Orina artificial (ver composición en página 116).
7. RPMI-1640 Medium (Izasa, Barcelona, España).
8. Sabouraud dextrosa agar (BioMérieux, Marcy L'etoile, Francia) enriquecido con con egg yolk emulsion: SEA.
9. Sabouraud dextrosa agar (BioMérieux, Marcy L'etoile, Francia) enriquecido con sangre de cordero desfibrinada.
10. Sabouraud dextrosa agar 3% (BioMérieux, Marcy L'etoile, Francia).
11. Sabouraud dextrosa broth (BioMérieux, Marcy L'etoile, Francia).
12. Yeast Carbon Base (Difco, Madrid, España) enriquecido con glucosa (Merck, Madrid, España), yeast Extract (Difco, Madrid, España) y albúmina bovina (Sigma, Madrid, España): YCB-BSA.
13. Yeast Extract (Difco, Madrid, España).

3.3. Microorganismos.

La realización del estudio se llevó a cabo mediante la utilización de cepas de *C. tropicalis* aisladas a partir de muestras procedentes de pacientes tanto intra como extrahospitalarios remitidas al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Infanta Cristina de Badajoz durante el período de tiempo comprendido entre los años 2003 y 2007. Las cepas control *C. tropicalis* CECT 1440 (Colección Española de Cultivos Tipo. Burjasot, Valencia) y *C. albicans* ATCC 10231 (American Type Culture Collection) fueron incluidas también en el estudio.

La identificación microbiológica de cada cepa se realizó de manera preliminar a través de la siembra en medios específicos (selectivos y diferenciales):

- Cultivo en medio para levaduras (Sabouraud dextrosa agar).
- Mediante la técnica de identificación rápida de filamentación en suero equino se descartó la posibilidad de *C. albicans*.
- Cultivo en el medio cromógeno *Cándida* ID 2 agar.

Posteriormente, se confirmó la identificación de las cepas de *C. tropicalis* con el sistema API 32C para identificación de levaduras.

Una vez identificadas, las cepas se almacenaron a una temperatura de -80°C en viales de criocongelación, realizándose resiembras en placas de Sabouraud para la realización de cada estudio.

3.4. Estudio de actividad enzimática.

3.4.1. Estudio de la actividad aspartil-proteasa en medio sólido.

Para la determinación de la actividad aspartil-proteínasa de las cepas de *C. tropicalis* del estudio se utilizó como medio de cultivo Yeast Carbon Base Agar con albúmina bovina (YCB-BSA) como única fuente de nitrógeno, usado por Cassone *et al.* 1987, con el fin de estimular la producción de aspartil-proteasas, necesarias para la utilización de la albúmina como fuente de nitrógeno.

Composición del medio YCB-BSA para 100 ml:

El medio YCB-BSA se elaboró con 1,17 g de Yeast Carbon Base, 0,01 g de Yeast Extract y 0,2 g de albúmina (YCB-BSA), disueltos en 10 ml de agua destilada, esterilizándose por filtración. Posteriormente se añadieron a un matraz que contenía 1,5 g de agar noble disuelto en 90 ml de agua destilada esterilizados mediante autoclavado a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. El medio resultante se repartió en placas de Petri dispensando 10 ml por placa de 9 cm de diámetro y se dejó solidificar.

Método:

Las cepas de *C. tropicalis* obtenidas a partir de los viales de criocongelación se descongelaron y sembraron por duplicado en placas de Sabouraud dextrosa agar, incubándose cada cepa a dos temperaturas diferentes (37°C y 22°C) durante 72 horas.

Una vez crecidas las cepas, se preparó una suspensión de cada una de ellas en suero fisiológico de manera que medida dicha suspensión en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm se obtuviera una absorbancia de 0.7.

Se inocularon las placas con el medio YCB-BSA con una gota de 10 µl (equivalente a 10⁷ ufc/ml) de cada una de las suspensiones de las levaduras y un máximo de tres gotas por placa. Las placas se dejaron incubar a 37°C y 22°C en función de la procedencia de las cepas (las que crecieron a 37°C en Sabouraud fueron incubadas en YCB-BSA también a 37°C y las que crecieron a 22°C en Sabouraud, se incubaron a 22°C en YCB-BSA).

La producción de aspartil-proteasas se evaluó calculando el índice de actividad enzimática (Índice Pz (“Precipitation zone”)) con la fórmula de Williamson et al (1986).

Se realizaron lecturas de las placas a las 48 y a las 72 horas, midiendo el halo de lisis alrededor de la colonia (Figura 19), obteniéndose una proporción, resultado de la división del diámetro de la colonia entre el diámetro del halo de lisis:

$$\text{Índice Pz} = \frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro de la colonia} + \text{zona de precipitación}}$$

Se establecieron los siguientes rangos de actividad: alta ($Pz \leq 0.40$); media ($Pz 0.41-0.60$), baja ($Pz 0.61-0.99$) y nula ($Pz = 1$).

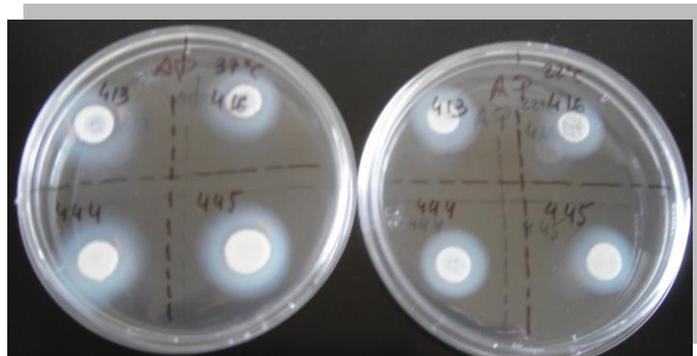


Fig 19. Lectura de la actividad aspartil-proteasa en el medio YCB-BSA de cuatro cepas de *C. tropicalis* incubadas a 37°C y 22° C.

3.4.2. Estudio de la actividad fosfolipasa en medio sólido.

Para la determinación de la actividad fosfolipasa de las cepas de *C. tropicalis* del estudio se utilizaron dos medios de cultivo diferentes desarrollados por Price y Cawson, 1977, Sabouraud Egg-Yolk Agar (SEA) y Malt Egg-Yolk Agar (MEA).

Debido a la acción de las enzimas fosfolipasas secretadas al medio se produce la hidrólisis de los sustratos lipídicos presentes en el mismo, liberándose ácidos grasos, que al unirse a los iones de calcio del medio forman complejos insolubles que precipitan en el agar, formando un característico halo alrededor de la colonia cuya medida sería un reflejo de la actividad fosfolipasa de la cepa estudiada.

Este método no detecta actividad fosfolipasa en levaduras que producen muy bajos niveles de esta enzima (Ghannoum, 2000).

Composición del medio SEA para 100 ml:

El medio SEA se preparó con 6,5 g de Sabouraud agar al 3% de glucosa, 5,84 g de NaCl 1 M y 0,055 g de Cl_2Ca 0,005 M, disueltos en 100 ml de agua destilada, esterilizándose mediante autoclavado a 121°C de

temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. Posteriormente se añadió yema de huevo al 2%. El medio resultante se repartió en placas de Petri dispensando 10 ml por placa de 9 cm de diámetro y se dejó solidificar.

Composición del medio MEA para 100 ml:

El medio MEA se preparó con 5 g de Malt extract agar al 3% de glucosa, 5,84 g de NaCl 1 M y 0,055 g de Cl_2Ca 5 mM, disueltos en 100 ml de agua destilada, esterilizándose mediante autoclavado a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. Posteriormente se añadió yema de huevo estéril al 2%. El medio resultante se repartió en placas de Petri dispensando 10 ml por placa de 9 cm de diámetro y se dejó solidificar.

Método:

Las cepas de *C. tropicalis* obtenidas a partir de los viales de criocongelación se descongelaron y sembraron por duplicado en medio Sabouraud dextrosa agar, incubándose cada cepa a dos temperaturas diferentes (37°C y 22°C) durante 72 horas.

Una vez crecidas las cepas, se preparó una suspensión de cada una de ellas en suero salino de manera que medida dicha suspensión en el

espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm se obtuviera una absorbancia de 0.7.

Se inocularon 10 µl de cada una de las suspensiones (equivalente a 10^7 ufc/ml) en las placas con el medio SDA suplementado con NaCl 1 M, Cl_2Ca 5 mM y 2% yema de huevo estéril y se dejaron incubar a 37°C y a 22°C en función de la procedencia de las cepas (las que crecieron a 37°C en Sabouraud se incubaron en SEA también a 37°C y las que crecieron a 22°C en Sabouraud, se incubaron a 22°C en SEA).

La medida de la actividad fosfolipasa se evaluó calculando el índice de actividad enzimática (Pz) con la fórmula de Williamson *et al.*, 1986.

Se realizaron lecturas de las placas a las 48 y a las 72 horas, midiendo el diámetro de las colonias y el diámetro del halo de lisis alrededor de la colonia (Figura 20), obteniéndose una proporción, resultado de la división del diámetro de la colonia entre el diámetro del halo de lisis:

$$\text{Índice Pz} = \frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro de la colonia} + \text{zona de precipitación}}$$

Se establecieron los siguientes rangos de actividad: alta (Pz ≤ 0.40); media (Pz 0.41-0.60), baja (Pz 0.61-0.99) y nula (Pz = 1).

3.4.3. Estudio de la actividad esterásica en medio sólido.

Para la evaluación de la actividad esterásica de las cepas de *C. tropicalis* del estudio se utilizó el test de opacidad del Tween 80, descrito por Rudek, 1978, y usado con posterioridad por múltiples autores (Slifkin, 2000; Aktas *et al.*, 2002), prueba bioquímica utilizada principalmente para diferenciar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

La hidrólisis del Tween 80 está mediada por enzimas lipolíticas elaboradas por las especies de *Candida*. Como consecuencia de su actividad, se liberan ácidos grasos que al unirse al calcio incorporado en el medio forman complejos insolubles (Slifkin, 2000). Estos complejos producen el característico halo de precipitación alrededor de la colonia. Para la inducción de la actividad esterásica extracelular, la falta de una fuente de carbohidratos, combinada con Tween 80 como único recurso de carbono, resulta fundamental. El medio Tween 80 (mezcla de compuestos de polyoxyethylensorbitan) incorpora como ácidos grasos de cadena larga el ácido oleico (C₁₈). La actividad extracelular producida se considera esterásica en el sentido estricto de la palabra, ya que produce actividad hidrolítica con respecto a monoésteres solubles en agua con ácidos grasos de cadena larga (Tsuboi *et al.*, 1996).

Composición del medio Tween 80 para 1000 ml:

El medio de opacidad del Tween 80 se preparó con 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 0,1 g CaCl₂, 15 g agar y 1000 ml de agua destilada, ajustado a un pH de 6,8. El medio se autoclavó a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. Se dejó enfriar hasta 50°C, mezclándolo entonces con 5 ml de Tween 80 previamente autoclavado y enfriado. El medio resultante se repartió en placas de Petri dispensando 25 ml de agar por placa de 9 cm de diámetro y se dejó solidificar.

Método:

Las cepas de *C. tropicalis* obtenidas a partir de los viales de criocongelación se descongelaron y sembraron por duplicado en medio Sabouraud dextrosa agar, incubándose cada cepa a dos temperaturas diferentes (37°C y 22°C) durante 72 horas.

Una vez crecidas las cepas, se preparó una suspensión de cada una de ellas en suero fisiológico de manera que medida dicha suspensión en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm se obtuviera una absorbancia de 0.7.

Se sembraron 10 µl (equivalente a 10⁷ ufc/ml) de cada una de las suspensiones en las placas con el medio Tween 80 y se dejaron incubar a 37°C y 22°C en función de la procedencia de las cepas (las que crecieron a 37°C en Sabouraud se incubaron en Tween 80 también a 37°C y las que crecieron a 22°C en Sabouraud, se incubaron a 22°C en Tween 80).

La producción de actividad esterásica se evaluó calculando el índice de actividad enzimática (Pz) con la fórmula de Williamson *et al.*, 1986.

Se realizaron lecturas de las placas a las 48 y a las 72 horas, midiendo el halo de precipitación alrededor del inóculo (Figura 21), obteniéndose una proporción, resultado de la división del diámetro de la colonia entre el diámetro del halo de precipitación:

$$\text{Índice Pz} = \frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro de la colonia} + \text{zona de precipitación}}$$

Se establecieron los siguientes rangos de actividad: alta (Pz ≤ 0.40); media (Pz 0.41-0.60), baja (Pz 0.61-0.99) y nula (Pz = 1).



Fig 20. Lectura de la actividad fosfolipasa en el medio SEA de las cepas control de *C. tropicalis* y *C. albicans* a 37°C y 22°C.

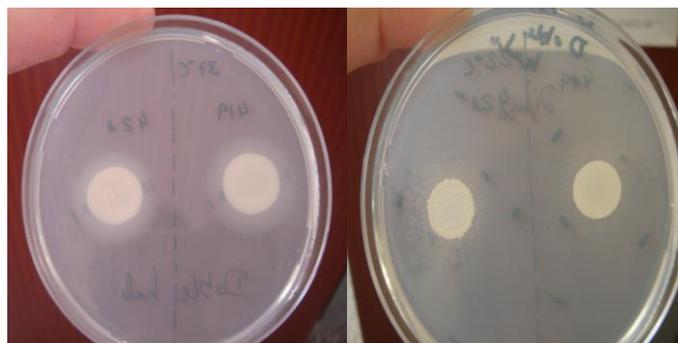


Fig 21. Lectura de la actividad esterásica en medio con Tween 80 en dos cepas de *C. tropicalis* incubadas a 37°C y 22° C.

3.4.4. Estudio de la actividad hemolítica en medio sólido.

Para la evaluación de la actividad hemolítica de las cepas de *C. tropicalis* del estudio se utilizó una modificación del ensayo en placa descrito por Manns *et al.*, 1994, para *C. albicans*. Se usó agar Sabouraud, suplementado con glucosa al 3%, al que se añadió sangre de cordero desfibrinada para determinar si las cepas de *C. tropicalis* producían algún factor hemolítico que lisara los hematíes.

Composición del medio:

El medio para la valoración de la actividad hemolítica se preparó con Sabouraud agar glucosado al 3%, y se autoclavó a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron 7 ml de sangre de cordero desfibrinada por cada 100 ml. El medio resultante se repartió en placas de Petri dispensando 10 ml de agar por placa de 9 cm de diámetro y se dejó solidificar.

Método:

Las cepas de *C. tropicalis* obtenidas a partir de los viales de criocongelación se descongelaron y sembraron por duplicado en medio Sabouraud dextrosa agar, incubándose cada cepa a dos temperaturas diferentes (37°C y 22°C) durante 72 horas.

Una vez crecidas las cepas, se preparó una suspensión de cada una de ellas en suero fisiológico estéril de manera que medida dicha suspensión en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm se obtuviera una absorbancia de 0.7.

Se inocularon las placas con una gota de 10 µl (equivalente a 10⁷ ufc/ml) de cada una de las suspensiones de las levaduras y un máximo de tres gotas por placa. Se incubaron a 37°C y 22°C con 5% de CO₂ en función de la procedencia de las cepas (las que crecieron a 37°C en Sabouraud se incubaron también a 37°C y las que crecieron a 22°C en Sabouraud, se incubaron a 22°C).

Se realizaron lecturas de las placas a las 48 y a las 72 horas. La presencia de un halo de lisis alrededor de la colonia formada se consideró indicativo de actividad hemolítica (Figura 22).

La producción de hemolisinas se evaluó calculando el índice de actividad enzimática (Pz) con la fórmula de Williamson *et al.*, 1986, resultado de la división del diámetro de la colonia entre el diámetro del halo de lisis:

$$\text{Índice Pz} = \frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro de la colonia} + \text{zona de precipitación}}$$

Se establecieron los siguientes rangos de actividad: alta ($Pz \leq 0.40$); media ($Pz 0.41-0.60$), baja ($Pz 0.61-0.99$) y nula ($Pz = 1$).



Fig 22. Lectura de la actividad hemolítica en dos cepas de *C. tropicalis* a 37°C.

3.5. Estudio de la adherencia a material plástico (poliestireno).

3.5.1. Estudio de la capacidad de adherencia inmediata y tardía.

Para la evaluación de la capacidad de adherencia a material plástico (placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano Greiner) (Figura 23) de las cepas de *C. tropicalis* del estudio se utilizó el método descrito por Christensen *et al.*, 1985, con modificaciones posteriores de Blanco *et al.*, 1997.

En el proceso de adherencia microbiana se han involucrados múltiples factores, entre los cuales figuran tanto determinantes de tipo inespecífico, implicados principalmente en las primeras fases de la adherencia (adherencia inmediata) como determinantes de tipo específico (ligando-receptor), participantes en procesos posteriores (adherencia tardía) (Kennedy *et al.*, 1988; Gallardo-Moreno *et al.*, 2002). Las principales fuerzas no específicas que actúan durante los estadios iniciales del proceso de adhesión poseen una naturaleza termodinámica, principalmente relacionadas con la HSC (Gallardo-Moreno *et al.*, 2002).

Composición del medio para 100 ml:

El medio RPMI-1640 se preparó previamente a cada ensayo como un concentrado de 1,04 g de medio RPMI-1640, 2 g de D(+)-Glucosa monohidrato, 3,45 g de tampón MOPS, en 10 ml de agua destilada, añadiéndose posteriormente a 90 ml de agua destilada esterilizada por autoclavado a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. Se ajustó a un pH de 7 y se esterilizó por filtración (mediante filtros estériles de 0,45 μ de diámetro de poro). El medio resultante se repartió en tubos estériles de 10 ml, a razón de 5 ml por tubo, y se almacenaron a 5°C.

Método:

Las cepas de *C. tropicalis* obtenidas a partir de los viales de criocongelación se descongelaron y sembraron por duplicado en medio Sabouraud dextrosa agar suplementado al 3% de glucosa, y se incubaron a 37°C durante 48 horas (fase estacionaria), antes de ser utilizadas en cada ensayo.

Cada cepa fue sembrada por duplicado en 5 ml de medio RPMI-1640, e incubadas en agitación (75 r.p.m) a 37°C y 22°C, respectivamente. Después de 24 horas, 500 µl de estas suspensiones se resembraron en 4,5 ml de RPMI-1640 fresco durante otras 24 horas.

Las levaduras se recuperaron por centrifugación (3000 r.p.m; 5 minutos), y los pellets se lavaron tres veces con tampón salino 0,15 M (phosphate-buffered saline PBS) a pH7.

Se prepararon suspensiones de 0.4 ± 0.02 a 492 nm de D.O. en 4 ml de PBS, y se reservaron 3 ml para los estudios de hidrofobicidad de superficie celular. El mililitro restante se utilizó para los estudios de adherencia.

Adherencia inmediata.

Se distribuyeron 500 µl de esta suspensión en placas de microtitulación de 96-pocillos de poliestireno (250 µl/pocillo), se realizó la lectura de la D.O._{492nm} (lectura inicial), y se incubaron estáticamente a 37°C y 22°C, respectivamente, en atmósfera humedecida.

Transcurridos 15 minutos, se aspiraron los contenidos de los pocillos, y se lavaron 3 veces con PBS 0,15 M frío, con el fin de eliminar las

levaduras no adheridas. Se realizó la lectura de la D.O._{492nm} de los pocillos para establecer los valores de adherencia inmediata.

Adherencia tardía.

Los 500 µl restantes se inocularon en placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno (250 µl/pocillo), se realizó la lectura de la D.O._{492nm} (lectura inicial), se incubaron estáticamente a 37°C y 22°C, respectivamente, en atmósfera humedecida.

Tras 24 horas, se aspiraron los contenidos de los pocillos, y se lavaron tres veces con PBS 0,15 M frío, con el fin de eliminar las levaduras no adheridas. Se realizó la lectura de la D.O._{492nm} de los pocillos para establecer los valores de adherencia tardía.

Los estudios de adherencia se completaron con observaciones al microscopio óptico, y se realizaron al menos por triplicado.

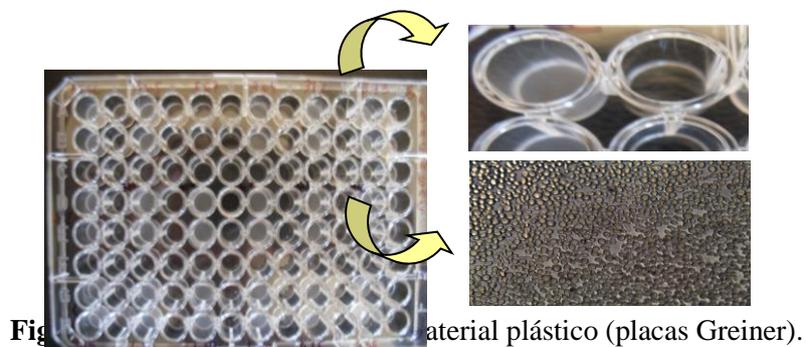


Fig. 1. Material plástico (placas Greiner).

3.5.2. Estudio de la adherencia inespecífica. HSC.

La determinación de la hidrofobicidad de superficie celular se llevó a cabo según el método de adhesión microbiana a hidrocarburos (MATH) descrito por Rosenberg *et al.*, 1980, con modificaciones de Van Loosdrecht *et al.*, 1987, para la adherencia a hidrocarburos líquidos (n-hexadecano o xylol) y de Blanco *et al.*, 2007 (Figura 24).

El método MATH se basa en las propiedades hidrofóbicas de las superficies celulares de los microorganismos y de su capacidad de adherencia a diferentes hidrocarburos debido a ellas.

Composición del medio para 100 ml:

El medio RPMI-1640 se preparó previamente a cada ensayo como un concentrado de 1,04 g de medio RPMI-1640, 2 g de D(+)-Glucosa monohidrato, 3,45 g de tampón MOPS, en 10 ml de agua destilada, añadiéndose posteriormente a 90 ml de agua destilada esterilizada por autoclavado a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. Se ajustó a un pH de 7, y se esterilizó por filtración (mediante filtros estériles de 0,45 μ de diámetro de poro). El medio resultante se

repartió en tubos estériles de 10 ml, a razón de 5 ml por tubo, y se almacenaron a 5°C.

Método:

Las cepas de *C. tropicalis* obtenidas a partir de los viales de criocongelación se descongelaron y sembraron por duplicado en medio Sabouraud dextrosa agar suplementado al 3% de glucosa, y se incubaron a 37°C durante 48 horas (fase estacionaria), antes de ser utilizadas en cada ensayo.

Cada cepa fue sembrada por duplicado en 5 ml de medio RPMI-1640, e incubadas en agitación (75 r.p.m) a 37°C y 22°C, respectivamente. Después de 24 horas, 500 µl de estas suspensiones se resembraron en 4,5 ml de RPMI-1640 fresco durante otras 24 horas.

Las levaduras se recuperaron por centrifugación (3000 r.p.m; 5 minutos), y los pellets se lavaron tres veces con tampón salino 0,15 M (phosphate-buffered saline PBS; 1,19 g/l K₂HPO₄; 0,29 g/l KH₂PO₄; 4,93 g/l NaCl), pH 7.

Se prepararon suspensiones de 0.4±0.02 a 492 nm de D.O. en 4 ml de PBS, y se reservó 1 ml para los estudios posteriores de adherencia. A los 3 ml restantes se les añadió 1 ml de xylol. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 minuto, y se dejó reposar durante 5 minutos para facilitar la

separación de las fases acuosa de la oleosa. Tras este proceso, se volvió a realizar la medición de la D.O. Se determinó la HSC como porcentaje (Blanco *et al.*, 2007). Las determinaciones de HSC se realizaron al menos por triplicado.

$$\%HSC = [(D.O \text{ Inicial} - D.O. \text{ Final}) / D.O. \text{ Inicial}] \times 100$$

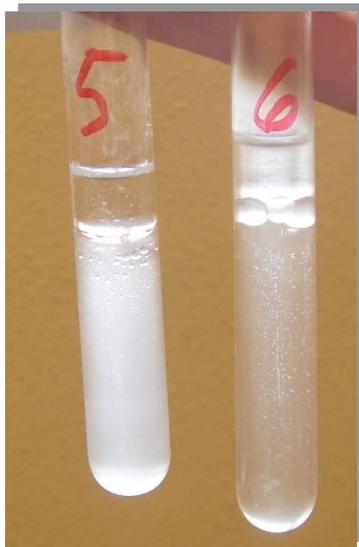


Fig 24. Lectura de la hidrofobicidad de superficie celular en cepas de *C. tropicalis* incubadas en medio RPMI-1640 a 37°C (5) y a 22° C (6).

3.5.3. Estudio de la adherencia específica. Cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en células planctónicas y sésiles.

El estudio de la adherencia específica se realizó en 8 de las 29 cepas de *C. tropicalis* seleccionadas en función de su capacidad de formación de biofilm, siendo 4 de las 8 cepas muy formadoras (cepas 405, 438, 440 y 441) y las otras 4 (cepas 373, 408, 445 y 448) poco formadoras de biofilm. Se estableció la cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 tanto en las variantes planctónicas como en las sésiles de estas 8 cepas. La secuencia del gen Alst1 se obtuvo por homología con el genoma de *C. albicans* en la base de datos <http://www.candidagenome.org/>, siendo posteriormente comprobada con las previamente descritas por Punithavathy y Menon, 2012.

Se procedió al crecimiento de las células planctónicas y a la formación de biofilm sobre placas de microtitulación de 96-pocillos de poliestireno a las 24 de incubación según el método usado por Blanco *et al.*, 2006, método modificado de los modelos de Hawser *et al.*, 1998 (b) y Ramage *et al.*, 2001 (a), en medio RPMI-1640.

Composición del medio:

El medio RPMI-1640 se preparó previamente a cada ensayo como un concentrado de 1,04 g de medio RPMI-1640, 2 g de D(+)-Glucosa monohidrato, 3,45 g de tampón MOPS, en 10 ml de agua destilada, esterilizándose por filtración, añadiéndose posteriormente a 90 ml de agua destilada esterilizada por autoclavado a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. Se ajustó a un pH de 7 y se repartió en tubos estériles de 10 ml, a razón de 5 ml por tubo, que se conservaron a 5°C.

Método:

Las cepas de *C. tropicalis* obtenidas a partir de los viales de criocongelación se descongelaron y sembraron en medio Sabouraud dextrosa agar suplementado al 3% de glucosa, y se incubaron a 37°C durante 48 horas (fase estacionaria), antes de ser utilizadas en cada ensayo. Una vez transcurrido este tiempo, las levaduras se cultivaron en 5 ml de medio RPMI-1640 en agitación (75 r.p.m) a 37°C. Tras las primeras 24 horas se resembraron 500 µl de estos inóculos en 4,5 ml de medio RPMI-1640 fresco, en las mismas condiciones que las usadas previamente, y se dejaron incubar durante 24 horas.

Se transfirieron 50 μ l del inóculo anterior en 4,95 ml de medio RPMI-1640, alcanzando una concentración aproximada de $5 \cdot 10^6$ ufc/ml. Para el estudio de la adherencia específica en las células planctónicas, el cultivo se mantuvo durante 24 horas más a 37°C en agitación (75 r.p.m). Para el estudio de la adherencia específica en las células sésiles se distribuyeron 250 μ l/pocillo en placas de microtitulación de 96-pocillos de poliestireno y se incubaron a 37°C. La incubación se realizó en agitación (75 r.p.m) en atmósfera húmeda durante 24 horas.

Una vez obtenido el cultivo tanto en medio líquido como en placa de microtitulación se procedió a la obtención del RNA celular.

- Aislamiento de RNA de células planctónicas:

Se procedió a la centrifugación del cultivo a 5000 r.p.m durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet resultante con 1 ml de solución de lisis (Sorbitol 1 M, EDTA 100 mM y 100 U de lyticasa). Se incubaron las muestras a 30°C durante 5 horas en agitación (150 r.p.m), y una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 350 μ l de solución Buffer de lisis y 3,5 μ l de mercaptoetanol.

- Aislamiento de RNA de células sésiles:

Se procedió al lavado de los pocillos de la placa de microtitulación con PBS con el fin de eliminar las células planctónicas del cultivo. Se añadió 1 ml de solución de lisis sobre el biofilm formado. Se incubaron las muestras a 30°C durante 5 horas en agitación (150 r.p.m). Se desprendió el biofilm con un raspador y se traspasaron a un tubo de 15 ml. Al igual que se hizo con las células planctónicas, se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 350 µl de solución Buffer de lisis y 3,5 µl de mercaptoetanol.

Una vez obtenido el RNA se determinó su concentración.

- Real time-PCR One-step a partir del RNA aislado de las células planctónicas y sésiles:

Para cada muestra se añadieron las cantidades de tampón, enzima y cebadores (oligo-dT primers) recomendadas por el kit, y 100 ng de RNA. Se llevó a cabo el siguiente protocolo y ciclos de PCR:

1. Síntesis de cDNA: 10 minutos a 50°C.
2. Inactivación de la transcriptasa reversa iScript: 5 minutos a 95°C.
3. 40 ciclos de PCR: 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C.

Como marcadores internos de control de la PCR se utilizaron los genes de actina y de la región 18s de *C. tropicalis*. La cuantificación relativa de la expresión del gen *ALST1* se determinó mediante el método ΔC_T :

$$\Delta C_T = 2^{(\Delta C_t \text{ biofilm} - \Delta C_t \text{ planctónicas})}$$

Las secuencias de los cebadores utilizados en la PCR se recogieron en la Tabla 4.

Tabla 4. Primers utilizados en el estudio de la cuantificación de la expresión de la proteína ALSt1 en *C. tropicalis*.

ALSt1-Forward	5'- AGG TGA TAC GTT CAC TTT GAT CAT G-3'
ALSt1-Reverse	5'- CCA TTG GCA GTC AAA TCA ACA-3'

3.6. Determinación de la capacidad de formación de biofilm.

3.6.1. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre placas de poliestireno utilizando como medio de cultivo medio RPMI-1640.

- Determinación de la biomasa del biofilm:

La capacidad de formación de biofilm sobre placas de microtitulación de 96-pocillos de poliestireno a las 24 y 96 horas de incubación (Figura 25) se realizó según el método usado por Blanco *et al.*, 2006, método modificado de los modelos de Hawser *et al.*, 1998 (b) y Ramage *et al.*, 2001 (a), siendo un modelo rápido, eficiente, fiable y fácilmente reproducible, con alto rendimiento potencial.

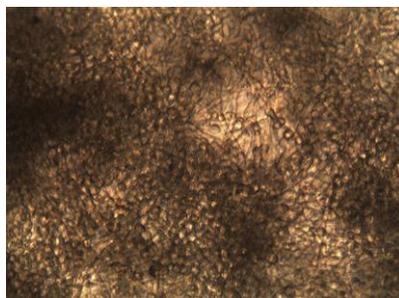


Fig 25. Formación de biofilm en placas Greiner.

Composición del medio:

El medio RPMI-1640 se preparó previamente a cada ensayo como un concentrado de 1,04 g de medio RPMI-1640, 2 g de D(+)-Glucosa monohidrato, 3,45 g de tampón MOPS, en 10 ml de agua destilada, esterilizándose por filtración, añadiéndose posteriormente a 90 ml de agua destilada esterilizada por autoclavado a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. Se ajustó a un pH de 7 y se repartió en tubos estériles de 10 ml, a razón de 5 ml por tubo, que se conservaron a 5°C.

Método:

Al igual que en los estudios de hidrofobicidad y adherencia, cada cepa se sembró en Sabouraud dextrosa agar durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las levaduras se cultivaron por duplicado en 5 ml de medio RPMI-1640 en agitación (75 r.p.m) a 37°C y 22°C. Tras 24 horas, se resembraron 500 µl de estos inóculos en 4,5 ml de medio RPMI-1640 fresco, en las mismas condiciones que las usadas previamente, y se dejaron incubar durante 24 horas.

Se transfirieron 50 μ l del inóculo anterior en 4,95 ml de medio RPMI-1640, alcanzando una concentración aproximada de $5 \cdot 10^6$ ufc/ml, y se distribuyeron 250 μ l/pocillo en placas de microtitulación de 96-pocillos de poliestireno. Se realizó la lectura de la D.O._{492nm} de las placas previa a la incubación. Las placas con el inóculo procedente de levaduras crecidas a 37°C se incubaron a esa temperatura, mientras que las placas con las procedentes de 22°C, se incubaron a 22°C. La incubación se realizó en condiciones estáticas en atmósfera húmeda durante 24 y 96 horas.

A las 24 de incubación, se determinó la D.O._{492nm} para establecer el crecimiento de las distintas cepas como medida de control.

Las levaduras no fijadas en el biofilm se eliminaron por aspiración, y los biofilms formados se lavaron 3 veces con 0,15 M PBS frío. Mediante la medida de la D.O._{492nm} se determinó la biomasa del biofilm.

- Determinación cuantitativa de la actividad metabólica del biofilm:

La determinación cuantitativa de la actividad metabólica del biofilm formado a las 24 y 96 horas de incubación se realizó mediante la utilización del método colorimétrico basado en la reducción mitocondrial del XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-5-[(phhenylamine) carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide SALT] por parte de las levaduras descrito por Ramage *et al.*, 2001 (a), siendo este método ampliamente utilizado con posterioridad por múltiples autores (Jin *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2004; Seneviratne *et al.*, 2008). El XTT se convierte, por la acción de

las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas en un producto de color anaranjado soluble en agua que puede ser medido espectrofotométricamente (Hawser *et al.*, 1998 (b); Tellier *et al.*, 1992) (Figura 26).

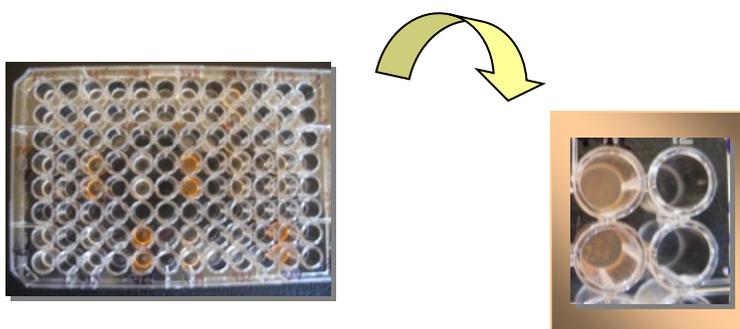


Fig 26. Actividad metabólica del biofilm en placas Greiner.

Preparación de la solución XTT-menadiona:

Se prepararon 0,5 g/l de solución de XTT en PBS pH7. Se esterilizaron por filtración (filtros de 0,22 μm de diámetro) y se almacenaron a -20°C . Antes de cada ensayo, a cada solución de XTT se le añadió menadiona 10 mM disuelta en acetona, a una concentración final de 1 μM .

Método:

Al igual que en los estudios de determinación de biomasa del biofilm, cada cepa se sembró en Sabouraud dextrosa agar durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las levaduras se cultivaron por duplicado en 5 ml de medio RPMI-1640 en agitación (75 r.p.m) a 37°C y 22°C. Tras 24 horas, se resembraron 500 µl de estos inóculos en 4,5 ml de medio RPMI-1640 fresco, en las mismas condiciones que las usadas previamente, y se dejaron incubar durante 24 horas.

Se transfirieron 50 µl del inóculo anterior en 4,95 ml de medio RPMI-1640, alcanzando una concentración aproximada de $5 \cdot 10^6$ ufc/ml, y se distribuyeron 250 µl/pocillo en placas de microtitulación de 96-pocillos de poliestireno. Se realizó la lectura de la D.O._{492nm} de las placas previa a la incubación. Las placas con el inóculo procedente de levaduras crecidas a 37°C se incubaron a esa temperatura, mientras que las placas con las procedentes de 22°C, se incubaron a 22°C. La incubación se realizó en condiciones estáticas en atmósfera húmeda durante 24 y 96 horas.

A las 24 de incubación, se determinó la D.O._{492nm} para establecer el crecimiento de las distintas cepas como medida de control.

Las levaduras no fijadas en el biofilm se eliminaron por aspiración, y los biofilms formados se lavaron 3 veces con 0,15 M PBS frío. Mediante la

medida de la D.O_{492nm} se determinó la biomasa del biofilm. Posteriormente, se dispensaron 100 µl de XTT-menadiona en cada pocillo de la placa de microtitulación, midiéndose la D.O_{492nm} inicial. Tras la incubación de las placas en oscuridad durante un periodo de tiempo de 1 hora, a 37°C y 22°C, respectivamente, se volvió a determinar la D.O_{492nm} del biofilm.

Los estudios de crecimiento, determinación biomasa y actividad mitocondrial del biofilm se realizaron en idénticas condiciones para 96 horas.

Todos estos ensayos se completaron con estudios de microscopía óptica. Las determinaciones crecimiento, biomasa y actividad del biofilm se realizaron al menos por triplicado.

3.6.2. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre placas de poliestireno utilizando como medio de cultivo orina artificial.

- Determinación de la biomasa del biofilm:

La capacidad de formación de biofilm sobre placas de microtitulación de 96-pocillos de poliestireno (Figura 27) se realizó según el método usado por Blanco *et al.*, 2006, método modificado de los modelos de Hawser *et al.*, 1998 (b) y del de Ramage *et al.*, 2001 (a).

Composición de la orina artificial para 1000 ml:

La orina artificial se preparó previamente a cada experimento según la fórmula de Silva *et al.*, 2010, usada previamente por Jain *et al.*, 2007, con 0,65 g de CaCl₂, 0,65 g de MgCl₂, 4,6 g de NaCl, 2,3 g de Na₂SO₄, 0,65 g de citrato sódico, 0,02 g de oxalato sódico, 2,8 g de KH₂PO₄, 1,6 g KCl, 1,0 g NH₄Cl, 25,0 g de urea, 1,1 g de creatinina, y 1000 ml de agua destilada, ajustada a un pH de 5,8. Se esterilizó por filtración, y se almacenó en nevera a 5°C hasta su utilización.

Tinción de cristal violeta para la cuantificación de la biomasa del biofilm:

El biofilm formado en cada pocillo de la placa de microtitulación de 96-pocillos de poliestireno se fijó con 200 µl de metanol durante 15 minutos y se dejó secar. Transcurrido este tiempo se añadieron como colorante 200 µl de cristal violeta al 1% por pocillo que se mantuvieron durante 5 minutos. Después, los pocillos se lavaron con agua ultrapura estéril. Para resuspender el colorante ligado a la matriz del biofilm se añadieron 200 µl de ácido acético al 33% en cada pocillo y se determinó la DO_{570nm}. La absorbancia de la solución de decoloración refleja la cantidad de biomasa del biofilm (Figura 28).

Método:

Cada cepa se sembró en SDA durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las levaduras se cultivaron en 5 ml de medio RPMI-1640 en agitación (75 r.p.m) a 37°C. Tras 24 horas, se resembraron 500 µl en 4,5 ml de medio RPMI-1640 fresco, y se dejaron incubar durante otras 24 horas.

Las levaduras se recuperaron por centrifugación (3000 r.p.m; 5 minutos), y se lavaron dos veces con PBS 0,15 M. Se preparó una concentración de 10^5 ufc/ml en orina artificial, y se distribuyeron 250 µl/pocillo en placas de microtitulación de 96-pocillos de poliestireno. Se realizó la lectura de la D.O._{492nm} de las placas y se incubaron a 37°C en condiciones estáticas y en atmósfera húmeda durante 24 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, las levaduras no ancladas en el biofilm se eliminaron por aspiración, y los biofilms formados se lavaron 3 veces con PBS 0,15 M frío. Se midió la D.O._{492nm} para determinar la biomasa del biofilm.

Posteriormente, los biofilms formados se tiñeron con cristal violeta al 1%, y se determinó su D.O._{492nm}.

Todos estos ensayos se completaron con estudios de microscopía óptica y se realizaron al menos por triplicado.

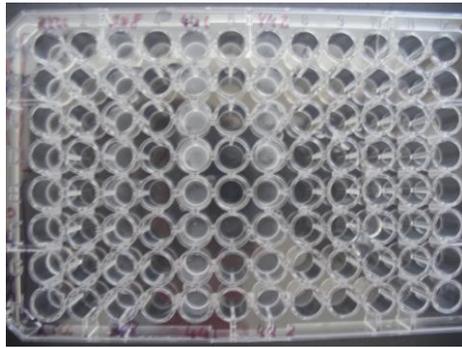


Fig. 27. Formación de biofilm sobre placa Greiner.
Medio de cultivo: orina artificial.

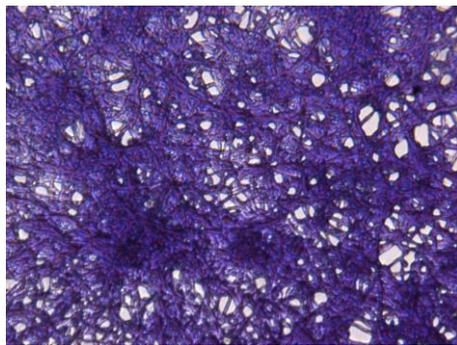


Fig 28. Tinción con cristal violeta (al 1%) del biofilm formado sobre placa Greiner.
Medio de cultivo: orina artificial.

3.6.3. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre catéter Foley bajo condiciones de flujo continuo de orina artificial y su determinación por UFC.

El estudio se desarrolló según el método descrito por Negri *et al.*, 2011, para la formación de biofilm sobre dispositivos biomédicos, concretamente sobre sondas urinarias, bajo un sistema de flujo continuo de orina artificial.

C. tropicalis es una de las especies de *Candida* asociada con mayor frecuencia a la formación de biofilms sobre catéteres. La mayoría de las infecciones del tracto urinario por *Candida* son nosocomiales y ocurren en pacientes con catéteres urinarios. La duración de la exposición al catéter está directamente relacionada con la incidencia de candiduria (Gentry y Price, 1993).

Método:

Las cepas de *C. tropicalis* se sembraron en Sabouraud dextrosa agar y se incubaron durante 24 horas. Una vez transcurrido este periodo de tiempo, se resembraron 1-2 colonias en 30 ml de Sabouraud dextrosa broth, incubándose en agitación a 130 r.p.m y 37°C durante 18 horas.

Las levaduras se recuperaron por centrifugación (8000 r.p.m durante 5 minutos) a 4°C, y se lavaron dos veces con 20 ml de PBS frío. El inóculo se resuspendió con 10 ml de PBS, y se ajustó hasta una concentración de 10^5 levaduras/ml de orina artificial preparada como se describe en el apartado anterior (la concentración de levaduras se obtuvo mediante recuento en cámara de Neubauer).

El catéter de Foley de látex de 26 cm de longitud se dividió en dos partes, siendo cada mitad (13 cm) válida para un experimento. Cada extremidad del catéter se unió a un tubo de silicona para la entrada y salida del medio (orina artificial). La unión se selló con parafilm, para evitar la salida de líquido, y el dispositivo se instaló sobre una bomba de flujo continuo. Durante 2 horas se hizo transcurrir el inóculo a través del catéter a una velocidad constante de 1 ml/minuto, a una temperatura de 37°C. Posteriormente, y hasta completar un tiempo de 24 horas, se hizo pasar orina artificial estéril a la misma velocidad. Transcurridas 24 horas, se liberó el catéter y se dividió éste en dos segmentos. El primer segmento se dividió en varias secciones de 1 cm de longitud que se transfirieron a placas de 24 pocillos donde se les realizó la tinción de cristal violeta (descrita en el apartado anterior) y se les determinó la DO_{570nm} , tras el cambio a pocillos de otra nueva placa. El segundo segmento se introdujo en un tubo Falcon de 50 ml al que se añadieron 2 ml de PBS. Se procedió al raspado del biofilm formado en el interior del catéter y a su sonicación (30%; 45 segundos). Las células recuperadas en el PBS se homogeneizaron durante 30 segundos con agitación en vórtex, y se inocularon 25 μ l/placa para recuento de ufc/ml en 3 placas de Sabouraud dextrosa agar. Después de 24 horas de incubación se procedió al recuento de las colonias.

Todos estos ensayos se completaron con estudios de microscopía óptica y se realizaron al menos por triplicado.

3.7. Estudios morfológicos.

3.7.1. Estudio de la capacidad de filamentación y crecimiento en función del tiempo y de la temperatura.

La capacidad y el grado de filamentación de las diferentes cepas de *C. tropicalis* del estudio se analizaron conjuntamente con la curva de crecimiento en función del tiempo (24 y 96 horas), y la temperatura (37 y 22°C), utilizando placas de microtitulación de 96-pocillos de poliestireno, siguiendo el mismo método que para la formación de biofilm (Ramage *et al.*, 2001 (a); Blanco *et al.*, 2006).

Composición del medio:

El medio RPMI-1640 se preparó previamente a cada ensayo como un concentrado de 1,04 g de medio RPMI-1640, 2 g de D(+)-Glucosa monohidrato, 3,45 g de tampón MOPS, en 10 ml de agua destilada, esterilizándose por filtración, añadiéndose posteriormente a 90 ml de agua

destilada esterilizada por autoclavado a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. El medio se ajustó a un pH de 7 y se repartió en tubos estériles de 10 ml, a razón de 5 ml por tubo, y se conservaron a 5°C.

Método:

Cada cepa se sembró en Sabouraud dextrosa agar durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las levaduras se cultivaron por duplicado en 5 ml de medio RPMI-1640 en agitación (75 r.p.m) a 37°C y 22°C. Tras 24 horas, se resembraron 500 µl de estos inóculos en 4,5 ml de medio RPMI-1640 fresco, en las mismas condiciones que las usadas previamente, y se dejaron incubar durante 24 horas.

Se transfirieron 50 µl del inóculo anterior en 4,95 ml de medio RPMI-1640, alcanzando una concentración aproximada de $5 \cdot 10^6$ ufc/ml, y se distribuyeron 250 µl/pocillo en placas de microtitulación de 96-pocillos de poliestireno. Se realizó la lectura de la D.O._{492nm} de las placas previa a la incubación. Las placas con el inóculo procedente de levaduras crecidas a 37°C se incubaron a esa temperatura, mientras que las placas con las procedentes de 22°C, se incubaron a 22°C. La incubación se realizó en condiciones estáticas en atmósfera húmeda durante 24 y 96 horas.

A las 24 y a las 96 horas de incubación se determinó la D.O_{492nm} para establecer el crecimiento de las distintas cepas. A su vez, se procedió al estudio del grado de filamentación mediante microscopía óptica.

Estos estudios se realizaron al menos por triplicado.

3.7.2. Estudio de la capacidad de producción de cambios fenotípicos (“switching”).

Mediante la capacidad de producir variaciones en su fenotipo (“switching”), los microorganismos pueden generar variantes antigénicas de manera espontánea, siendo estas modificaciones reversibles e interconvertibles entre ellas (Soll, 1992).

La capacidad de “switching” se realizó según el método descrito por Anderson y Soll., 1987, con la utilización del medio descrito por Lee *et al.*, 1975.

La concentración de zinc en el medio resulta fundamental en el estudio del cambio morfológico, ya que variaciones de ésta modifican la frecuencia de un morfotipo característico (Bedell y Soll, 1979). La adición de phloxina B permite teñir diferencialmente de color rojo las células de fase opaca en *C. albicans* (tanto colonias, como sectores de las colonias), dejando las colonias blancas de color blanco (Anderson y Soll, 1987).

Composición del medio para 100 ml:

El medio para la realización del estudio de “switching” (Lee *et al.*, 1975) se preparó utilizando la siguiente composición: 0,5 g de sulfato amónico, 0,02 g de sulfato magnésico heptahidratado, 0,25 g de fosfato potásico anhidro, 0,5 g de cloruro sódico, 1,25 g de D (+) -glucosa-monohidrato, 0,05 g de L-alanina, 0,13 g de L-leucina, 0,1 g de L-lisina, 0,01 g de L-metionina, 0,007 g de L-ornitina, 0,05 g de L-fenilalanina, 0,05 g de L-prolina, 0,05 g de L- treonina, 1,5 g de agar bacteriológico, 0,07 g de arginina, 0,017 g de zinc y sulfato de cobre (máximo 1 mM). Se añadió phloxine B a una concentración de 5 µg/ml, ya que las diferentes morfologías son fácilmente distinguibles al añadir al medio diferentes colorantes, entre ellos, phloxine B (Anderson y Soll, 1987). El medio se esterilizó por autoclavado a 121°C, 20 minutos, y se distribuyó en placas de Petri (10 ml/placa).

Método:

Se descongelaron las 30 cepas y se incubaron en Sabouraud dextrosa agar durante 48 horas a 37°C. Se prepararon diluciones en suero fisiológico hasta alcanzar una concentración equivalente a 10^3 ufc/ml. 50 µl de esta dilución se repartieron en placas de Petri con 10 ml de medio Lee, sembrándose por rotación en toda la placa.

Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C, con y sin la presencia de CO₂ a una concentración de entre el 3 y el 5%, realizándose lecturas a los 10 y 15 días.

El fenómeno de “switching” se estudió con ayuda de una lente de aumento (x40), y se realizaron los recuentos de las diferentes colonias observadas (Figura 29).

Estos estudios se realizaron al menos por triplicado.



Fig 29. Expresión de “switching” en diferentes cepas de *C. tropicalis*.

3.8. Estudios de conjugación. Configuración genotípica del locus *MTLt*.

La configuración genotípica del locus *MTLt* de las cepas de *C. tropicalis* del estudio, se llevó a cabo mediante el examen de los genes *MTLta2* y *MTLtb2* implicados en la capacidad de conjugación de *C. tropicalis* (Butler *et al.*, 2009; Porman *et al.*, 2011), a través de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

- Extracción del ARN cromosómico.

Método:

Se descongelaron las 30 cepas de *C. tropicalis* del estudio y se incubaron en Sabouraud dextrosa agar durante 48 horas a 37°C. Se procedió a realizar un inóculo en Sabouraud líquido a 37°C durante otras 24 horas hasta alcanzar la fase estacionaria. Las levaduras se centrifugaron a 5000g durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 5 ml de una solución de lisis (Sorbitol 1M, EDTA 100 mM y 100 U de lyticasa), incubándose a 30°C durante 5 horas en agitación (150 rpm aproximadamente). Las levaduras se centrifugaron a 5000 g durante 10

minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 350 μ l de Buffer de lisis del Kit Illustra RNAs isolation (GE Healthcare) y 3,5 μ l de mercaptoetanol, siguiendo posteriormente las indicaciones descritas en el manual de dicho kit. Una vez obtenido el RNA se determinó su concentración y pureza.

- **Síntesis de cDNA a partir de RNA.**

Para realizar la síntesis de cDNA a partir de RNA se utilizó el kit iScript cDNA Synthesis (BioRad). Para cada muestra se añadieron las cantidades de tampón y enzima recomendadas por el kit para un volumen final de 20 μ l (4 μ l de buffer y 1 μ l de enzima) y 100 ng de RNA aproximadamente.

La reacción siguió el siguiente protocolo:

5 minutos a 25°C

30 minutos a 42°C

5 minutos a 85°C

- **Amplificación por PCR de los alelos de MTL (A2, α 2)**

Para la reacción de PCR se utilizó el kit iTaq DNA Polymerase de BioRad. La mezcla de reacción está constituida por: iTaq buffer 1x, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP mix 0,2mM de cada uno, iTaq 1,25 U, primer F 200 nM, primer R 200nM y 1 μ l del cDNA sintetizado anteriormente. La reacción siguió el siguiente programa:

-Deshibridacion: 3 minutos a 95°C

-Los ciclos de PCR (35 ciclos):

30 segundos a 95°C

30 segundos a 55°C

45 segundos a 72°C

-Extensión final: 10 minutos a 72°C

Las secuencias amplificadas fueron reveladas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, clasificando las cepas como heterocigotas si incluían ambos locus (a/ α) u homocigotas si poseían un solo locus (a ó α).

Tabla 5. Primers utilizados en el estudio de la configuración del locus

MTLt de *C. tropicalis*.

prBT_74 (a2)	GATTTGGTATGAAAAGAGGAACTCTAAC
prBT_75 (a2)	CTACTAATTTTGAAACCATTGGAGTCT
prBT_70 (alpha2)	TAAACATTAAGCATAGAGGACAAAGAA
prBT_71 (alpha2)	AACTTCAAATGCAAAATGTAAAACATAC

3.9. Estudio estadístico.

Con los resultados obtenidos en los distintos experimentos repetidos al menos por triplicado se desarrolló un estudio estadístico descriptivo en el que se usó como medida de centralización para caracterizar los valores hacia los que tendía la distribución, la media aritmética. Para el estudio de la cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 se utilizó como medida de tendencia central la media geométrica. Como medida de dispersión o variabilidad para informar acerca de la agrupación de los valores obtenidos en torno a la media se utilizaron la desviación estándar (raíz cuadrada de la varianza) y el coeficiente de variación de Pearson (cociente entre la desviación típica y la media de la distribución expresada en forma de porcentaje).

Para la organización y representación gráfica de los datos se utilizaron diagramas de barras y diagramas de sectores circulares.

Posteriormente, se procedió a la realización de un análisis inferencial mediante el análisis de las diferentes variables del estudio. Para establecer la asociación y correlación existente entre las diferentes variables cuantitativas se utilizaron los diagramas de dispersión y la regresión lineal simple, así como el coeficiente de correlación de Pearson. Para comparar las medias de varios grupos independientes (clasificadas las cepas según el origen de

procedencia) se utilizó la prueba del análisis de la variancia (ANOVA). Para comprobar la normalidad de las muestras se utilizaron gráficos de caja y los test de Shapiro-Wilks y Kolmogorov-Smirnov. Para el estudio de la homogeneidad de las varianzas se utilizó la prueba de Levene. La normalidad de las muestras y la homogeneidad de variancias se consideraron cuando p resultó no significativa en estos tests. En caso de no poder utilizarse el análisis de la variancia ANOVA por no cumplir los test previos, se procedió a realizar el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para comparar medias de dos grupos independientes (cepas de origen urinario-no urinario) se realizó la prueba de Student-Fisher (T-test para muestras independientes). Las condiciones de normalidad se verificaron con el test de Shapiro-Wilks, y la homogeneidad de variancias mediante la prueba de Levene. Cuando no se cumplieron los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Estos estudios fueron desarrollados con el programa Microsoft Office Excel 2003-2007-2013 y con el programa SPSS 11.5 para Windows.

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento e identificación.

La totalidad de las cepas de *C. tropicalis* utilizadas en este estudio (n=29) se aislaron a partir de muestras obtenidas de pacientes intra y extrahospitalarios del Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz (CHUB) durante el periodo de tiempo comprendido entre abril de 2003 y diciembre de 2007. Se recogieron datos acerca del tipo de muestra, del servicio de procedencia, así como de la existencia de patología subyacente u otro de tipo de afección concomitante (Tabla 6). La identificación microbiológica hasta llegar al nivel de especie se realizó mediante el uso del sistema de identificación API ID 32 C (Vitek Systems, BioMérieux).

27 de las 29 cepas estudiadas (93,10%) se obtuvieron a partir de pacientes ingresados. Sólo una cepa (3,45%) presentó procedencia extrahospitalaria. El origen de la cepa restante (3,45%) no pudo ser determinado (Figura 30). La procedencia de los aislamientos de *C. tropicalis* se recogió en las Figuras 30 y 31. En la Figura 31 se representaron los servicios de procedencia de las muestras. Así, pudo comprobarse cómo el 21% de las cepas tuvo su origen en muestras de pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), el 21% provino de la Unidad de Patología Infecciosa (UPI), el 24% se aisló a partir de muestras procedentes de servicios quirúrgicos, y hasta el 31% de las mismas se aislaron de otros servicios (concretamente de Reumatología, Neumología, Digestivo, Medicina Interna, Nefrología y de la Unidad de Coronarias). El 3% restante no pudo ser determinado.

Tabla 6. Cepas de *C. tropicalis* incluidas en el estudio (n=29). Tipo de muestra, servicio de procedencia de las mismas y patología concomitante con la infección por *Candida*.

CEPA	ESPECIE	MUESTRA	SERVICIO	PATOLOGÍA
365	<i>C. tropicalis</i>	Aspirado bronquial	UCI	VIH/TBC/ Neumonía
367	<i>C. tropicalis</i>	Frotis lingual	UPI	TBC
368	<i>C. tropicalis</i>	Catéter	Neurocirugía	Postcirugía
372	<i>C. tropicalis</i>	Exudado vaginal	Reumatología	Poliartritis
373	<i>C. tropicalis</i>	Orina	Neumología	Síndrome febril
379	<i>C. tropicalis</i>	Catéter	Cirugía general	Obstrucción intestinal
381	<i>C. tropicalis</i>	Orina	Digestivo	ITU
404	<i>C. tropicalis</i>	Líquido ascítico	UCI	Peritonitis
405	<i>C. tropicalis</i>	Orina	Medicina Interna	ND
408	<i>C. tropicalis</i>	Orina	ND	Sonda uretral/ITU
413	<i>C. tropicalis</i>	Frotis faríngeo	Medicina Interna	Candidiasis orofaríngea
416	<i>C. tropicalis</i>	Orina	Nefrología	Diálisis/Trasplante renal
419	<i>C. tropicalis</i>	Aspirado bronquial	UCI	Nefrectomía radical
421	<i>C. tropicalis</i>	Orina	Neurocirugía	ITU
429	<i>C. tropicalis</i>	Orina	UPI	ITU
432	<i>C. tropicalis</i>	Absceso abdominal	Cirugía general	ND
434	<i>C. tropicalis</i>	Orina	Urología	ND
435	<i>C. tropicalis</i>	Uña	AP	Extrahospitalario
436	<i>C. tropicalis</i>	Orina	Coronarias	Síndrome febril
438	<i>C. tropicalis</i>	Orina	UPI	Infección herida quirúrgica
440	<i>C. tropicalis</i>	Orina	UPI	ITU
441	<i>C. tropicalis</i>	Orina	UCI	Hepatopatía alcohólica
442	<i>C. tropicalis</i>	Orina	Cirugía general	ITU
443	<i>C. tropicalis</i>	Frotis faríngeo	UCI	ND
444	<i>C. tropicalis</i>	Esputo espontáneo	UPI	TBC
445	<i>C. tropicalis</i>	Orina	UCI	Síndrome febril
446	<i>C. tropicalis</i>	Aspirado traqueal	UCI	ND
447	<i>C. tropicalis</i>	Esputo espontáneo	Medicina Interna	ND
448	<i>C. tropicalis</i>	Orina	UPI	ITU/Meningitis bacteriana
CECT-1440	<i>C. tropicalis</i>	Esputo espontáneo		

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana; TBC: Tuberculosis; UPI: Unidad de Patología Infecciosa; ITU: Infección del Tracto Urinario; ND: No Determinado; AP: Atención Primaria.

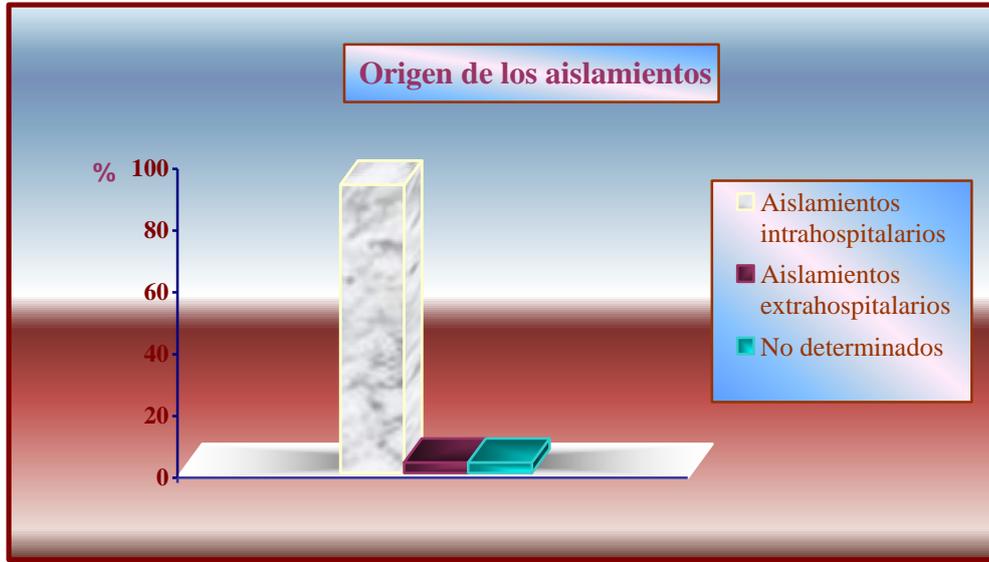


Fig 30. Procedencia de los aislamientos de *C. tropicalis* incluidos en el estudio según su origen intra o extrahospitalario.



Fig 31. Procedencia de los aislamientos de *C. tropicalis* de origen intrahospitalario según el servicio a partir del cual se obtuvieron las muestras.

En la Figura 32 se resumió la procedencia de los aislamientos de las cepas de *C. tropicalis* estudiadas esta vez en función de su origen anatómico por aparatos y sistemas. Se pudo verificar cómo hasta el 51,72% de los mismos (15 de las 29 cepas estudiadas) procedieron de muestras de orina. El 24,14% (7 de las cepas) tuvo origen respiratorio. El 24,14% restante se obtuvo a partir de piel, anejos cutáneos y partes blandas y otros líquidos biológicos.

Durante el periodo de tiempo comprendido entre abril de 2003 y diciembre de 2006 se aislaron un total de 166 cepas de *Candida* spp. procedentes de muestras de orina del CHUB, de las cuales 15 fueron *C. tropicalis* (8,99% del total de candidurias). Todas procedieron de pacientes hospitalizados. Estos resultados se resumieron en la Figura 33.

En función de estos datos, se puede afirmar que en el CHUB durante el período de tiempo estudiado, *C. tropicalis* llegó a ser aislada como segunda especie de *Candida* productora de candiduria tras *C. albicans*, teniendo en cuenta que hasta el 14,35% de las *Candidas* obtenidas en las muestras de orina no se identificaron a nivel de especie.

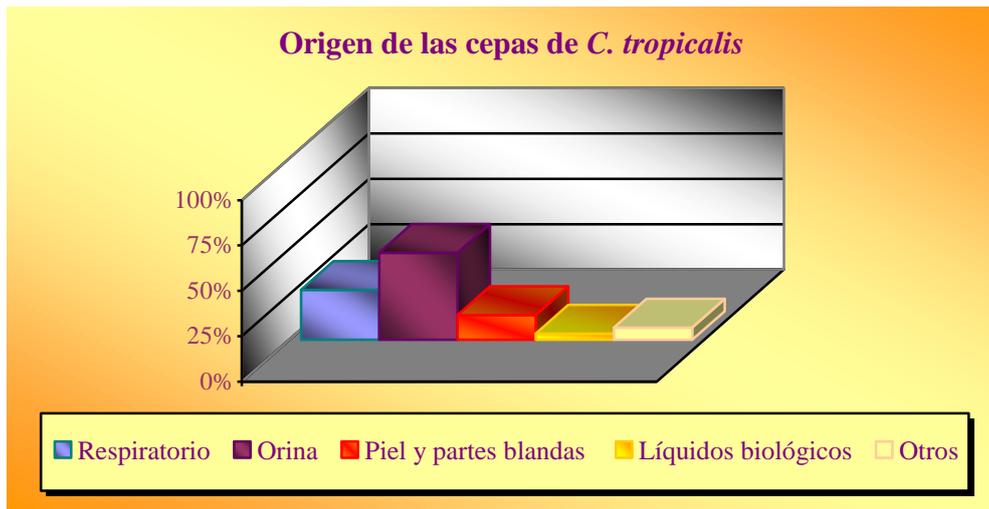


Fig 32. Procedencia de los aislamientos de *C. tropicalis* del estudio según su localización por aparatos y sistemas.

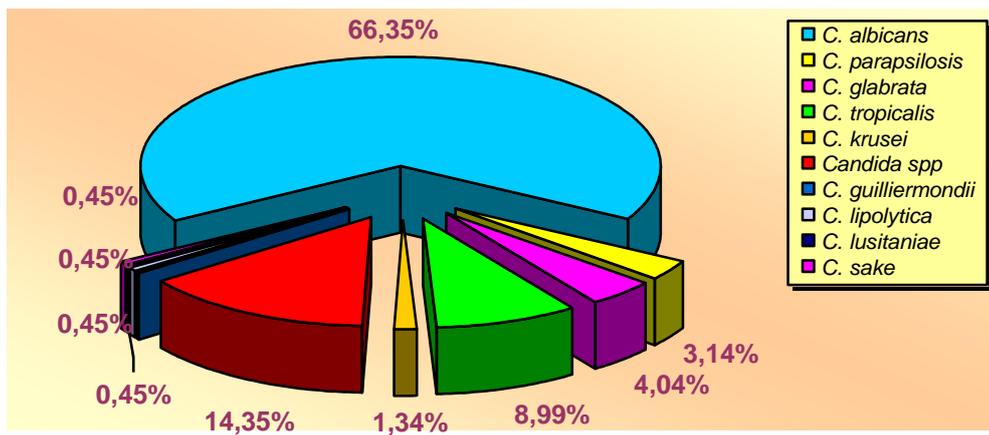


Fig 33. Proporción de *C. tropicalis* en candidurias. Período 2003-2006; CHUB.

4.2. Estudio de la actividad enzimática.

4.2.1. Estudio de actividad aspartil-proteasa en medio sólido.

Se midió la actividad aspartil-proteasa de todas las cepas a dos temperaturas, 37°C y 22°C, en el medio YCB-BSA, según el índice de actividad enzimática (Pz) con la fórmula de Williamson *et al.*, 1986.

Se establecieron los siguientes rangos de actividad: alta (Pz≤0,40), media (Pz 0,41-0,60), baja (Pz 0,61-0,99) y nula (Pz=1).

Se realizaron lecturas de las placas a las 24, 48, 72 horas, midiendo el diámetro de las colonias y el diámetro del halo de lisis alrededor de la misma, obteniéndose una proporción, resultado de la división del diámetro de la colonia entre el diámetro del halo de lisis:

$$Pz = \frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro del halo de lisis}}$$

En la Tabla 7 se expresaron los valores obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 37°C y 22°C, así como las desviaciones estándar correspondientes.

Tabla 7. Actividad aspartil-proteasa a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C. Representación de la media y desviación estándar del índice Pz.

CEPAS	37°C			22°C		
	24h (X±DS)	48h (X±DS)	72h (X±DS)	24h (X±DS)	48h (X±DS)	72h (X±DS)
CECT-1440	0,71 ± 0,25	0,48 ± 0,04	0,53 ± 0,06	0,91 ± 0,16	0,83 ± 0,30	0,62 ± 0,07
365	0,82 ± 0,32	0,46 ± 0,04	0,43 ± 0,02	0,86 ± 0,24	0,83 ± 0,29	0,77 ± 0,34
367	0,85 ± 0,26	0,86 ± 0,25	0,83 ± 0,30	0,87 ± 0,22	0,85 ± 0,26	0,84 ± 0,28
368	0,83 ± 0,29	0,73 ± 0,26	0,52 ± 0,04	1,00 ± 0,01	0,83 ± 0,29	0,82 ± 0,22
372	0,81 ± 0,33	0,81 ± 0,33	0,79 ± 0,37	0,93 ± 0,11	0,82 ± 0,32	0,81 ± 0,33
373	0,85 ± 0,26	0,57 ± 0,04	0,46 ± 0,04	0,96 ± 0,06	0,84 ± 0,27	0,81 ± 0,27
379	0,87 ± 0,22	0,58 ± 0,07	0,48 ± 0,06	1,00 ± 0,01	0,83 ± 0,29	0,79 ± 0,28
381	0,82 ± 0,32	0,81 ± 0,32	0,83 ± 0,30	0,93 ± 0,13	0,87 ± 0,23	0,81 ± 0,33
404	0,81 ± 0,33	0,74 ± 0,26	0,52 ± 0,08	0,92 ± 0,14	0,83 ± 0,30	0,81 ± 0,32
405	0,85 ± 0,26	0,69 ± 0,17	0,54 ± 0,01	0,86 ± 0,25	0,84 ± 0,27	0,78 ± 0,30
408	0,83 ± 0,29	0,83 ± 0,30	0,83 ± 0,29	0,84 ± 0,27	0,83 ± 0,29	0,81 ± 0,33
413	0,83 ± 0,30	0,83 ± 0,29	0,82 ± 0,31	0,89 ± 0,19	0,82 ± 0,32	0,78 ± 0,30
416	0,84 ± 0,27	0,83 ± 0,30	0,61 ± 0,16	1,00 ± 0,01	0,85 ± 0,26	0,83 ± 0,29
419	0,83 ± 0,29	0,72 ± 0,25	0,55 ± 0,18	0,94 ± 0,10	0,86 ± 0,24	0,81 ± 0,18
421	0,83 ± 0,30	0,81 ± 0,33	0,80 ± 0,35	0,91 ± 0,16	0,80 ± 0,35	0,80 ± 0,35
429	0,84 ± 0,27	0,82 ± 0,32	0,81 ± 0,25	1,00 ± 0,01	0,84 ± 0,27	0,82 ± 0,32
432	0,83 ± 0,29	0,53 ± 0,06	0,49 ± 0,09	0,88 ± 0,21	0,83 ± 0,29	0,81 ± 0,25
434	0,85 ± 0,26	0,53 ± 0,02	0,51 ± 0,06	0,92 ± 0,14	0,83 ± 0,34	0,79 ± 0,28
435	0,87 ± 0,23	0,54 ± 0,05	0,48 ± 0,06	0,89 ± 0,19	0,84 ± 0,27	0,85 ± 0,27
436	0,83 ± 0,29	0,81 ± 0,32	0,66 ± 0,14	0,92 ± 0,14	0,81 ± 0,25	0,70 ± 0,27
438	0,82 ± 0,32	0,81 ± 0,32	1,00 ± 0,01	0,88 ± 0,21	0,83 ± 0,29	0,77 ± 0,26
440	0,83 ± 0,30	0,78 ± 0,30	0,71 ± 0,27	0,92 ± 0,14	0,85 ± 0,26	0,85 ± 0,26
441	0,84 ± 0,28	0,64 ± 0,16	0,52 ± 0,01	0,90 ± 0,18	0,85 ± 0,27	0,77 ± 0,25
442	0,82 ± 0,32	0,83 ± 0,30	0,71 ± 0,29	0,93 ± 0,11	0,82 ± 0,32	0,83 ± 0,29
443	0,83 ± 0,29	0,67 ± 0,29	0,48 ± 0,04	1,00 ± 0,01	0,82 ± 0,31	0,77 ± 0,32
444	0,81 ± 0,33	0,76 ± 0,28	0,64 ± 0,10	1,00 ± 0,01	0,83 ± 0,29	0,83 ± 0,30
445	0,82 ± 0,32	0,60 ± 0,09	0,45 ± 0,02	0,93 ± 0,11	0,83 ± 0,29	0,85 ± 0,26
446	0,86 ± 0,24	0,84 ± 0,27	0,82 ± 0,31	0,91 ± 0,16	0,82 ± 0,31	0,80 ± 0,26
447	0,83 ± 0,29	0,81 ± 0,33	0,67 ± 0,15	0,90 ± 0,18	0,83 ± 0,29	0,80 ± 0,35
448	1,00 ± 0,01	0,75 ± 0,14	0,56 ± 0,05	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01
Global	0,83 ± 0,04	0,71 ± 0,12	0,63 ± 0,15	0,93 ± 0,05	0,84 ± 0,03	0,80 ± 0,06

A las 24 horas de incubación a 37°C, el índice Pz comprendió valores entre 0,71 y 1, lo cual demostró cómo la actividad aspartil-proteasa medida en este tiempo resultó muy baja (el 96,67% de las cepas produjo baja actividad). Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó media actividad. Una cepa (3,33%) presentó actividad nula. A 22°C, el 76,67% de las cepas apareció con baja actividad. No se detectó actividad en el 23,33% restante. Ninguna cepa presentó actividad media o alta.

A las 48 horas de incubación a 37°C, el índice Pz permaneció bajo en el 73,33% de las cepas, mientras que el 26,67% comenzó a presentar una actividad intermedia. Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó actividad nula. A 22°C, el índice Pz permaneció alto (el 96,67% de las cepas mostró baja actividad). Ninguna cepa presentó actividad alta. Ninguna cepa presentó actividad media. Una cepa presentó actividad nula (3,3%).

A las 72 horas de incubación, el 46,67% de las cepas continuó con baja actividad, mientras que el 50% tuvo actividad media. Una de las cepas (3,33%) presentó actividad nula. Ninguna cepa presentó alta actividad. A 22°C, el índice Pz se mantuvo en un nivel de actividad bajo para el 96,67% de las cepas. Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó media actividad. Una cepa (3,33%) presentó actividad nula.

En la Tabla 8 se recopilaron los valores del índice Pz obtenido a 37°C y a 22°C. Se confirmó cómo el 100% de las cepas presentó baja o nula actividad aspartil-proteasa a 22°C, mientras que a 37°C la actividad enzimática medida fue mayor, haciéndose más evidente a las 72 horas de incubación.

Tabla 8. Distribución de las cepas según su actividad proteolítica (índice Pz) a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y a 22°C en medio YCB-BSA.

ASPARTIL PROTEASA	37°C				22°C				
	Pz en YCB-BSA*	ALTA	MEDIA	BAJA	NULA	ALTA	MEDIA	BAJA	NULA
24h			96,7%	3,3%		76,7%	23,3%		
48h		26,7%	73,3%			96,7%	3,3%		
72h		50,0%	46,7%	3,3%		96,7%	3,3%		

*alta (Pz≤0,40); media (Pz 0,41-0,60); baja (Pz 0,61-0,99) y nula (Pz=1).

En la Figura 34 se representó la evolución de la actividad aspartil-proteasa detectada a 37°C, reflejando el aumento de actividad de la mayor parte de las cepas a lo largo del tiempo de incubación, con un rango de valor Pz comprendido entre 0,71 y 1 a las 24 horas, y entre 0,43 y 1 a las 72 horas.

En la Figura 35 se estableció la comparación entre la actividad aspartil-proteasa detectada a las 24 horas y la detectada a las 72 horas de incubación a 37°C. La lectura a las 24 horas no permitió discriminar la actividad entre las distintas cepas, ya que el 100% de las cepas presentó baja o nula actividad. A las 72 horas la diferencia entre cepas fue mayor.

En la Figura 36 se representó la evolución de la actividad aspartil-proteasa detectada a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 22°C, reflejando el aumento de actividad de la mayor parte de las cepas conforme transcurrió el tiempo. Así, el índice Pz fluctuó entre 0,84 y 1 (baja y nula actividad) en función de la cepa, a las 24 horas de incubación, mientras que a las 72 horas se mantuvo en el rango comprendido entre 0,62 y 1 (también baja actividad y nula actividad).

En la Figura 37 se estableció la comparación entre la actividad aspartil-proteasa detectada a las 24 horas y la detectada a las 72 horas de incubación a 22°C, permitiendo discriminar la actividad entre las distintas cepas, ya que a pesar de mantenerse baja a las 72 horas, resultó algo mayor que a las 24 horas.

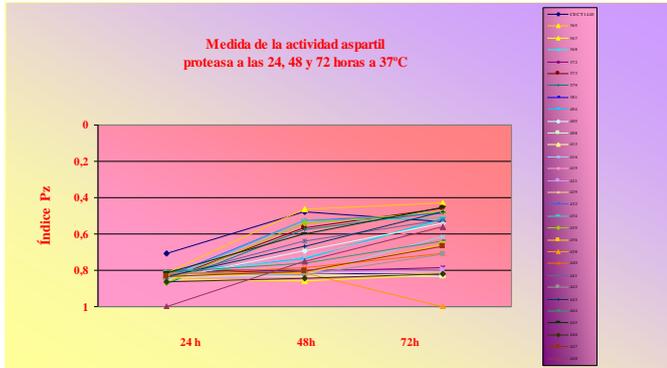


Fig 34. Evolución de la actividad aspartil-proteasa a las 24, 48 y 72h, 37°C.

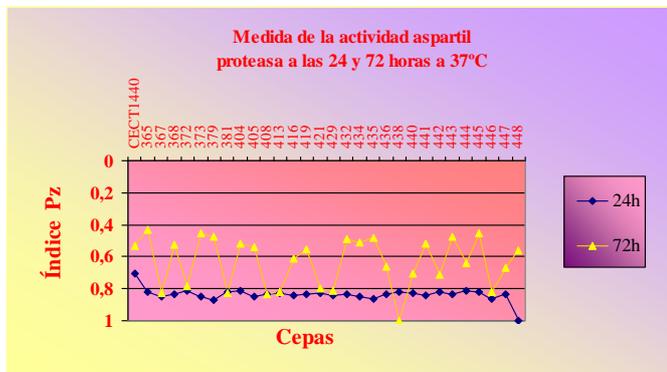


Fig 35. Actividad aspartil-proteasa medida a las 24 y 72h de incubación, 37°C.

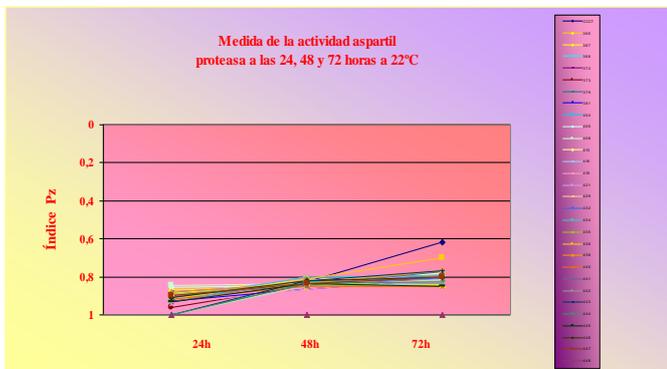


Fig 36. Evolución de la actividad aspartil-proteasa a las 24, 48 y 72h, 22°C.

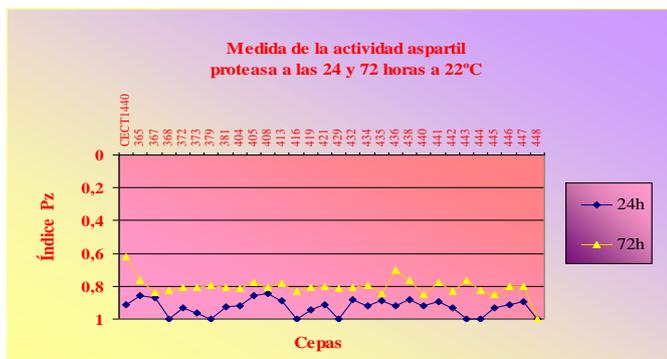


Fig 37. Actividad aspartil-proteasa medida a las 24 y 72h de incubación, 22°C.

4.2.2. Estudio de actividad fosfolipasa en medio sólido.

Se midió la actividad fosfolipasa de todas las cepas a dos temperaturas, 37°C y 22°C, en el medio SEA, según el índice de actividad enzimática (Pz) con la fórmula de Williamson *et al.*, 1986.

Se establecieron los siguientes rangos de actividad: alta (Pz≤0,40), media (Pz 0,41-0,60), baja (Pz 0,61-0,99) y nula (Pz=1).

Se realizaron lecturas de las placas a las 24, 48, 72 horas de incubación, midiendo el diámetro de las colonias y el diámetro del halo de lisis alrededor de la misma, obteniéndose una proporción, resultado de la división del diámetro de la colonia entre el diámetro del halo de lisis:

$$Pz = \frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro del halo de lisis}}$$

En la Tabla 9 se expresaron los valores obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 37°C y 22°C, así como las desviaciones estándar correspondientes.

Tabla 9. Actividad fosfolipasa a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C.
Representación de la media y desviación estándar del índice Pz.

CEPAS	37°C			22°C		
	24h (X±DS)	48h (X±DS)	72h (X±DS)	24h (X±DS)	48h (X±DS)	72h(X±DS)
CECT-1440	0,83 ± 0,16	0,97 ± 0,06	0,97 ± 0,05	1,00 ± 0,01	0,92 ± 0,14	0,74 ± 0,12
365	0,82 ± 0,16	0,93 ± 0,06	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,78 ± 0,09	0,90 ± 0,10
367	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,96 ± 0,07	0,93 ± 0,13
368	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,89 ± 0,11	1,00 ± 0,01
372	0,88 ± 0,11	0,91 ± 0,05	0,91 ± 0,16	1,00 ± 0,01	0,81 ± 0,07	0,78 ± 0,20
373	0,78 ± 0,11	0,93 ± 0,06	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,91 ± 0,16	0,81 ± 0,10
379	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,93 ± 0,13	0,78 ± 0,03
381	0,94 ± 0,10	0,94 ± 0,10	0,92 ± 0,14	1,00 ± 0,01	0,86 ± 0,12	0,79 ± 0,11
404	0,89 ± 0,19	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,84 ± 0,14	0,80 ± 0,04
405	0,92 ± 0,07	0,96 ± 0,06	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,84 ± 0,14	0,85 ± 0,09
408	1,00 ± 0,01	0,96 ± 0,06	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,84 ± 0,14	0,85 ± 0,08
413	0,91 ± 0,16	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,89 ± 0,19	0,85 ± 0,13
416	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,79 ± 0,21	0,84 ± 0,18
419	0,89 ± 0,19	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,92 ± 0,14	0,92 ± 0,14
421	0,86 ± 0,19	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,79 ± 0,18	0,71 ± 0,09
429	0,9 ± 0,18	0,97 ± 0,05	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,93 ± 0,10	0,74 ± 0,06
432	0,89 ± 0,19	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,81 ± 0,17	0,91 ± 0,08
434	0,88 ± 0,10	0,91 ± 0,08	0,92 ± 0,07	1,00 ± 0,01	0,73 ± 0,23	0,65 ± 0,14
435	0,9 ± 0,17	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,75 ± 0,07	0,79 ± 0,19
436	0,89 ± 0,19	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,85 ± 0,13	0,91 ± 0,09
438	0,85 ± 0,13	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,85 ± 0,14	0,87 ± 0,15
440	0,81 ± 0,06	0,94 ± 0,10	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,89 ± 0,10	0,78 ± 0,10
441	0,81 ± 0,16	0,94 ± 0,10	0,90 ± 0,17	1,00 ± 0,01	0,71 ± 0,07	0,70 ± 0,18
442	0,92 ± 0,14	0,94 ± 0,10	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,91 ± 0,07	0,76 ± 0,15
443	0,96 ± 0,07	0,93 ± 0,06	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,87 ± 0,15	0,75 ± 0,08
444	1,00 ± 0,01	0,96 ± 0,07	0,88 ± 0,21	1,00 ± 0,01	0,96 ± 0,07	0,76 ± 0,22
445	0,91 ± 0,16	0,91 ± 0,16	0,92 ± 0,14	1,00 ± 0,01	0,84 ± 0,14	0,75 ± 0,13
446	0,93 ± 0,11	0,96 ± 0,06	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,93 ± 0,13	0,81 ± 0,24
447	1,00 ± 0,01	0,88 ± 0,13	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,83 ± 0,17	0,79 ± 0,06
448	1,00 ± 0,01	0,87 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,75 ± 0,01
Global	0,91 ± 0,07	0,96 ± 0,04	0,98 ± 0,04	1,00 ± 0,01	0,86 ± 0,07	0,81 ± 0,07

A las 24 horas de incubación a 37°C, el índice Pz obtenido comprendió valores entre 0,78 y 1, lo cual demostró cómo la actividad fosfolipasa medida en este tiempo resultó muy baja. El 73,33% de las cepas presentó baja actividad, mientras que en el 26,67% restante la actividad fue nula. Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó actividad media. A 22°C, el índice Pz obtenido fue igual a 1 (actividad nula) para todas las cepas.

A las 48 horas de incubación, el índice Pz permaneció alto. El 60% de las cepas presentó actividad baja. El 40% restante presentó actividad nula. Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó actividad media. A 22°C, el índice Pz permaneció alto, aunque en este momento sólo el 3,33% de las cepas presentó actividad nula. El 96,67% restante presentó baja actividad, siendo el Pz de nueve de las cepas estudiadas (30%) mayor de 0,9. Ninguna cepa presentó actividad alta. Ninguna cepa presentó actividad media.

A las 72 horas de incubación, el 76,67% de las cepas mostró actividad nula, mientras que el 23,33% presentó actividad baja. Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó actividad media. A 22°C, el índice Pz se mantuvo con actividad baja en el 96,67% de las cepas, siendo ahora el de cinco de ellas (16,67%) mayor o igual a 0,9. El 3,33% presentó actividad nula. Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó actividad media.

En la Tabla 10 se estableció una comparación entre el índice Pz de la actividad fosfolipasa obtenido a 37°C y a 22°C. Se confirmó cómo el 100% de las cepas presentó baja o nula actividad fosfolipasa a las dos temperaturas.

Tabla 10. Distribución de las cepas según su actividad fosfolipasa (índice Pz) a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C en medio SEA.

FOSFOLIPASA	37°C				22°C			
	ALTA	MEDIA	BAJA	NULA	ALTA	MEDIA	BAJA	NULA
Pz en SEA *								
24h			73,3%	26,7%				100%
48h			60,0%	40,0%			96,6%	3,3%
72h			23,3%	76,7%			96,6%	3,3%

*alta (Pz≤0,40); media (Pz 0,41-0,60); baja (Pz 0,61-0,99) y nula (Pz=1).

En la Figura 38 se representó la evolución de la actividad fosfolipasa detectada a lo largo del experimento, a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C. A las 24 horas, el índice Pz fluctuó en un rango de valores comprendidos entre 0,78 y 1, mientras que a las 72 horas varió entre 0,88 y 1, reflejando en muchas de las cepas un valor inferior de actividad, dada la disminución que experimentó el halo de lisis inversamente proporcional al aumento del tamaño de la colonia.

En la Figura 39 se estableció la comparación entre la actividad fosfolipasa detectada a las 24 horas y la detectada a las 72 horas de incubación a 37°C.

En la Figura 40 se representó la evolución de la actividad fosfolipasa detectada a lo largo del experimento, a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 22°C. A las 24 horas se pudo comprobar cómo todas las cepas presentaron actividad nula, aumentando muy levemente su actividad a medida que transcurrió el estudio. A las 72 horas el Pz fluctuó entre 0,65 y 1.

En la Figura 41 se estableció la comparación entre la actividad fosfolipasa detectada a las 24 horas y la detectada a las 72 horas, pudiendo discriminar el ligero aumento de actividad producido al tercer día.

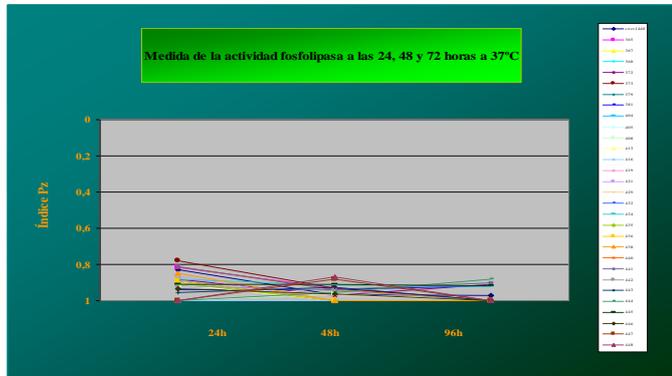


Fig 38. Evolución de la actividad fosfolipasa a las 24, 48 y 72h, 37°C.

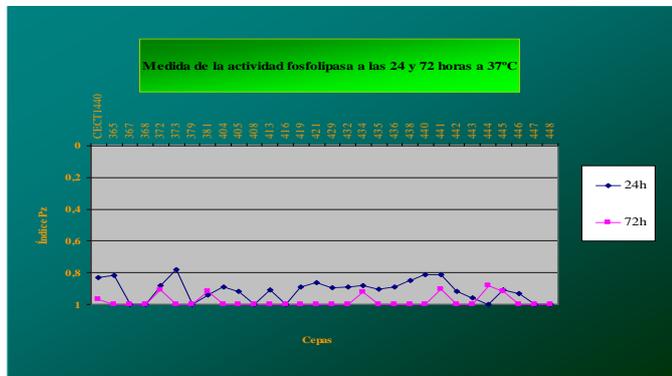


Fig 39. Actividad fosfolipasa medida a las 24 y 72h de incubación, 37°C.

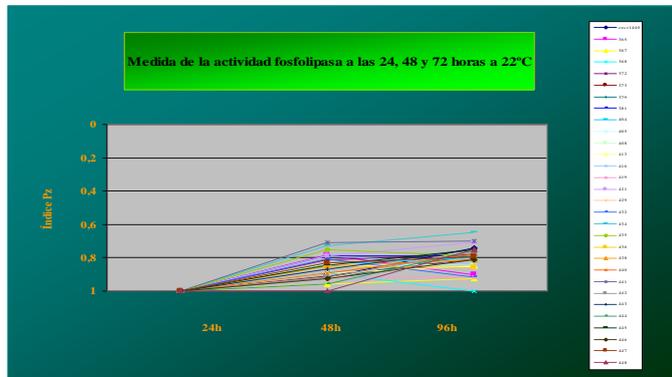


Fig 40. Evolución de la actividad fosfolipasa a las 24, 48 y 72h, 22°C.

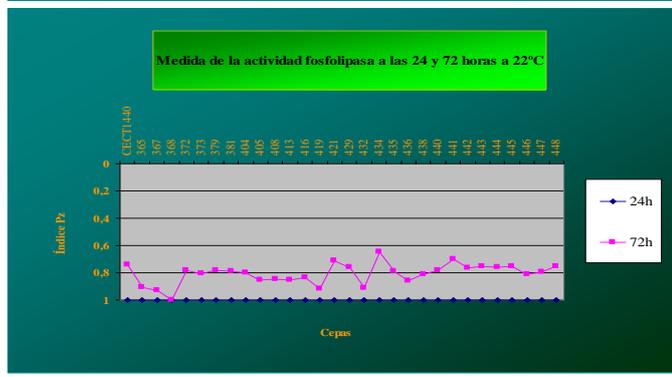


Fig 41. Actividad fosfolipasa medida a las 24 y 72h de incubación, 22°C.

4.2.3. Estudio de actividad esterásica en medio sólido.

Se midió la actividad esterásica de todas las cepas a dos temperaturas, 37°C y 22°C, en el medio Tween 80, según el índice de actividad enzimática (Pz) con la fórmula de Williamson *et al.*, 1986.

Se establecieron los siguientes rangos de actividad: alta (Pz≤0,40), media (Pz 0,41-0,60), baja (Pz 0,61-0,99) y nula (Pz=1).

Se realizaron lecturas de las placas a las 24, 48, 72 horas, midiendo el diámetro de las colonias y el diámetro del halo de lisis alrededor de la colonia, obteniéndose una proporción, resultado de la división del diámetro de la colonia entre el diámetro del halo de lisis:

$$Pz = \frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro del halo de lisis}}$$

En la Tabla 11 se expresaron los valores obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 37°C y 22°C.

Tabla 11. Actividad esterásica a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C. Representación de la media y desviación estándar del índice Pz.

CEPAS	37°C			22°C		
	24h (X±DS)	48h (X±DS)	72h (X±DS)	24h (X±DS)	48h (X±DS)	72h (X±DS)
CECT-1440	0,84 ± 0,14	0,53 ± 0,07	0,36 ± 0,11	1,00 ± 0,01	0,58 ± 0,16	0,36 ± 0,17
365	0,76 ± 0,08	0,57 ± 0,10	0,44 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,70 ± 0,27	0,44 ± 0,05
367	1,00 ± 0,01	0,68 ± 0,01	0,52 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,44 ± 0,08	0,22 ± 0,01
368	0,73 ± 0,24	0,52 ± 0,14	0,39 ± 0,08	1,00 ± 0,01	0,57 ± 0,13	0,40 ± 0,14
372	0,88 ± 0,20	0,58 ± 0,18	0,49 ± 0,11	1,00 ± 0,01	0,56 ± 0,04	0,28 ± 0,01
373	0,77 ± 0,20	0,57 ± 0,13	0,47 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,71 ± 0,25	0,42 ± 0,18
379	0,68 ± 0,17	0,52 ± 0,14	0,38 ± 0,02	0,97 ± 0,05	0,54 ± 0,10	0,32 ± 0,01
381	0,62 ± 0,04	0,44 ± 0,17	0,41 ± 0,16	0,94 ± 0,10	0,52 ± 0,18	0,27 ± 0,03
404	0,72 ± 0,07	0,55 ± 0,27	0,51 ± 0,06	1,00 ± 0,01	0,60 ± 0,37	0,36 ± 0,05
405	0,66 ± 0,06	0,58 ± 0,05	0,50 ± 0,05	1,00 ± 0,01	0,60 ± 0,10	0,34 ± 0,01
408	0,68 ± 0,03	0,51 ± 0,07	0,54 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,56 ± 0,17	0,46 ± 0,03
413	0,71 ± 0,09	0,59 ± 0,02	0,42 ± 0,06	1,00 ± 0,01	0,49 ± 0,19	0,30 ± 0,07
416	0,82 ± 0,18	0,56 ± 0,16	0,50 ± 0,03	1,00 ± 0,01	0,46 ± 0,22	0,30 ± 0,01
419	0,97 ± 0,05	0,64 ± 0,03	0,62 ± 0,18	0,93 ± 0,12	0,42 ± 0,07	0,30 ± 0,05
421	0,96 ± 0,07	0,65 ± 0,03	0,59 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,39 ± 0,12	0,27 ± 0,11
429	0,86 ± 0,13	0,63 ± 0,07	0,49 ± 0,09	1,00 ± 0,01	0,78 ± 0,19	0,44 ± 0,11
432	0,77 ± 0,13	0,63 ± 0,05	0,54 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,53 ± 0,03	0,35 ± 0,07
434	0,70 ± 0,09	0,56 ± 0,03	0,54 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,51 ± 0,05	0,39 ± 0,01
435	0,92 ± 0,14	0,64 ± 0,01	0,53 ± 0,09	1,00 ± 0,01	0,58 ± 0,10	0,39 ± 0,03
436	0,84 ± 0,15	0,67 ± 0,01	0,55 ± 0,05	1,00 ± 0,01	0,74 ± 0,23	0,43 ± 0,01
438	0,66 ± 0,09	0,46 ± 0,14	0,28 ± 0,01	0,94 ± 0,08	0,55 ± 0,01	0,23 ± 0,01
440	0,78 ± 0,12	0,64 ± 0,08	0,54 ± 0,06	1,00 ± 0,01	0,54 ± 0,09	0,38 ± 0,09
441	0,67 ± 0,09	0,54 ± 0,06	0,42 ± 0,03	1,00 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,46 ± 0,05
442	0,64 ± 0,27	0,46 ± 0,05	0,48 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,46 ± 0,22	0,48 ± 0,01
443	0,88 ± 0,16	0,47 ± 0,33	0,30 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,56 ± 0,04	0,42 ± 0,01
444	0,62 ± 0,16	0,42 ± 0,18	0,36 ± 0,09	0,87 ± 0,22	0,38 ± 0,21	0,33 ± 0,15
445	0,64 ± 0,20	0,40 ± 0,17	0,37 ± 0,13	0,71 ± 0,50	0,26 ± 0,17	0,29 ± 0,21
446	0,80 ± 0,02	0,53 ± 0,01	0,42 ± 0,07	1,00 ± 0,01	0,73 ± 0,26	0,48 ± 0,09
447	0,71 ± 0,09	0,56 ± 0,02	0,46 ± 0,11	1,00 ± 0,01	0,82 ± 0,04	0,54 ± 0,04
448	0,67 ± 0,02	0,51 ± 0,05	0,41 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,71 ± 0,10	0,59 ± 0,03
Global	0,76 ± 0,11	0,55 ± 0,07	0,46 ± 0,08	0,98 ± 0,06	0,56 ± 0,13	0,38 ± 0,09

A las 24 horas de incubación a 37°C, el índice Pz obtenido comprendió valores altos, resultando la actividad esterásica medida en este tiempo muy baja. El 96,67% de las cepas presentó Pz con baja actividad. El 3,33% restante mostró actividad nula. Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó media actividad. A 22°C, la actividad esterásica fue igual a 1 (actividad nula) para la gran mayoría de las cepas (80% de las mismas). Sólo el 20% mostró algo de actividad, aunque ésta fue muy baja (Pz comprendido entre 0,71 y 0,97). Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó actividad media

A las 48 horas de incubación, el 26,67% de las cepas continuó presentando baja actividad, mientras que ya el 70% de las cepas apareció con actividad media. Una cepa (3,33%) presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó actividad nula. A 22°C, el 10% de las cepas presentó actividad alta. En el 63,33% se detectó actividad media. Sólo el 26,67% presentó baja actividad. Ninguna cepa presentó actividad nula.

A las 72 horas de incubación, el 73,34% de las cepas permaneció con una actividad intermedia, mientras que el 23,33% apareció con alta actividad. Sólo el 3,33% de las cepas se mantuvo con baja actividad. A 22°C, el 63,33% de las cepas presentó alta actividad, mientras que el 36,67% restante mostró actividad intermedia. Ninguna cepa presentó actividad baja. Ninguna cepa presentó actividad nula.

En la Tabla 12 se estableció una comparación entre el índice Pz obtenido a 37°C y a 22°C. Se confirmó cómo el 100% de las cepas presentó baja o nula actividad tanto a 37°C como a 22°C a las 24 horas, siendo mayor a 37°C. A las 72 horas el 23,33% de las cepas a 37°C presentó alta actividad, frente al 63,33% a 22°C. A 37°C la mayoría de las cepas presentó actividad media (73,34%), mientras que a 22°C sólo el 36,67% de las mismas presentó actividad media. Ninguna cepa presentó actividad nula a las 48 ni a las 72 horas. La tabla reflejó cómo a medida que transcurrió el tiempo, la actividad esterásica se fue haciendo más evidente.

Tabla 12. Distribución de las cepas según su actividad esterásica (índice Pz) a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y a 22°C en medio Tween-80.

ESTERÁSICA Pz en Tween 80	37°				22°			
	ALTA	MEDIA	BAJA	NULA	ALTA	MEDIA	BAJA	NULA
24h			96,7%	3,3%			20,0%	80,0%
48h	3,3%	70,0%	26,7%		10,0%	63,3%	26,7%	
72h	23,3%	73,3%	3,3%		63,3%	36,7%		

*alta (Pz ≤ 0,40); media (Pz 0,41-0,60) y baja (Pz 0,61-1).

En la Figura 42 se representó la evolución de la actividad esterásica a 37°C detectada a lo largo del experimento, a las 24, 48 y 72 horas de incubación. A las 24 horas, el índice Pz fluctuó entre los valores 0,62 y 1. A las 72 horas el Pz estimado estuvo comprendido entre 0,28 y 0,62.

En la Figura 43 se estableció la comparación entre la actividad esterásica detectada a las 24 horas y la detectada a las 72 horas. La lectura a las 72 horas permitió discriminar la actividad existente entre las distintas cepas, ya que resultó mayor la diferencia que a las 24 horas.

En la Figura 44 se representó la evolución de la actividad esterásica a 22°C detectada a lo largo del experimento, a las 24, 48 y 72 horas de incubación. A las 24 horas de incubación, el índice de actividad Pz osciló entre los valores 0,71 y 1; mientras que a las 72 horas la actividad esterásica fue mucho más manifiesta, comprendiendo el índice Pz valores entre 0,22 y 0,59.

En la Figura 45 se estableció la comparación entre la actividad esterásica detectada a las 24 horas y la detectada a las 72 horas, permitiendo discriminar la actividad existente entre las distintas cepas, ya que resultó mayor la diferencia que a las 24 horas.

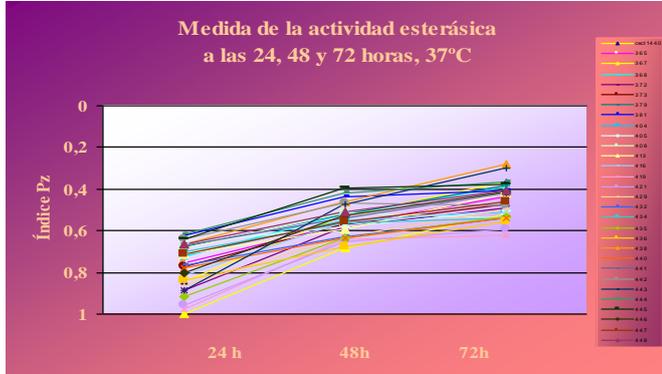


Fig 42. Evolución de la actividad esterásica a las 24, 48 y 72h, 37°C.

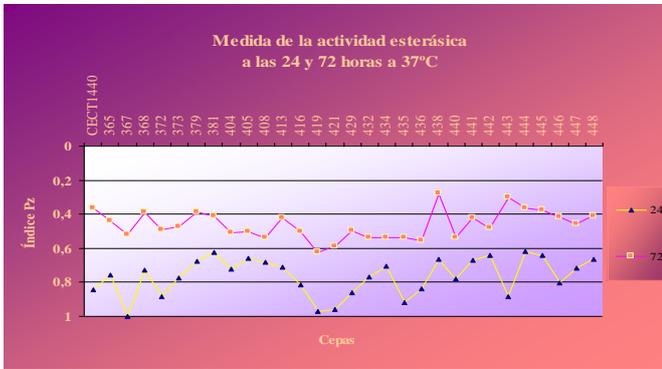


Fig 43. Actividad esterásica medida a las 24 y 72h de incubación, 37°C.

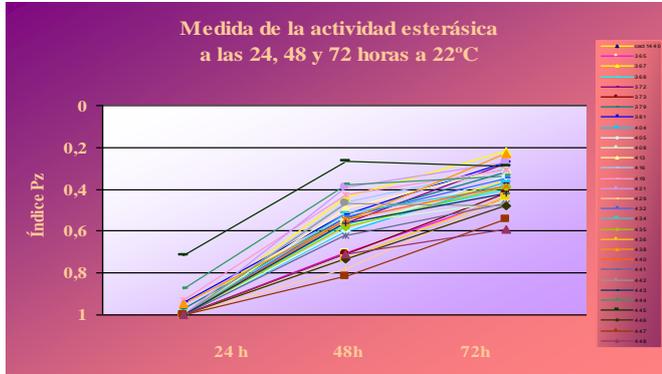


Fig 44. Evolución de la actividad esterásica a las 24, 48 y 72h, 22°C.

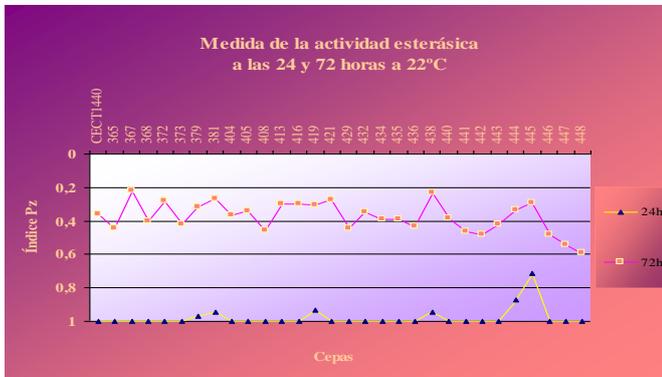


Fig 45. Actividad esterásica medida a las 24 y 72h de incubación, 22°C.

4.2.4. Estudio de actividad hemolítica en medio sólido.

Se determinó la actividad hemolítica de todas las cepas a dos temperaturas, 37°C y 22°C, en el medio agar Sabouraud glucosado enriquecido con sangre de cordero defibrinada, según el índice de actividad enzimática (Pz) con la fórmula de Williamson *et al.*, 1986.

Se establecieron los siguientes rangos de actividad: alta (Pz≤0,40), media (Pz 0,41-0,60), baja (Pz 0,61-0,99) y nula (Pz=1).

Se realizaron lecturas de las placas a las 24, 48 y 72 horas, midiendo el diámetro de las colonias y el diámetro del halo de lisis alrededor de la misma, obteniéndose una proporción, resultado de la división del diámetro de la colonia entre el diámetro del halo de lisis:

$$Pz = \frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro del halo de lisis}}$$

En la Tabla 13 se expresaron los valores obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 37°C y 22°C, así como las desviaciones estándar correspondientes.

Tabla 13. Actividad hemolítica a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C. Representación de la media y desviación estándar del índice Pz.

CEPAS	37°C			22°C		
	24h (X±DS)	48h (X±DS)	72h (X±DS)	24h (X±DS)	48h (X±DS)	72h (X±DS)
CECT-1440	0,57 ± 0,10	0,47 ± 0,10	0,45 ± 0,08	0,93 ± 0,11	0,46 ± 0,06	0,46 ± 0,04
365	0,61 ± 0,18	0,47 ± 0,07	0,47 ± 0,03	0,86 ± 0,17	0,46 ± 0,14	0,44 ± 0,09
367	0,72 ± 0,08	0,65 ± 0,09	0,65 ± 0,12	0,93 ± 0,11	0,59 ± 0,15	0,57 ± 0,11
368	0,55 ± 0,06	0,58 ± 0,09	0,55 ± 0,12	0,79 ± 0,13	0,52 ± 0,09	0,54 ± 0,13
372	0,67 ± 0,22	0,56 ± 0,14	0,47 ± 0,09	0,88 ± 0,21	0,49 ± 0,12	0,42 ± 0,05
373	0,58 ± 0,18	0,46 ± 0,14	0,45 ± 0,07	0,91 ± 0,09	0,60 ± 0,19	0,50 ± 0,02
379	0,52 ± 0,07	0,58 ± 0,09	0,60 ± 0,09	0,82 ± 0,18	0,47 ± 0,08	0,56 ± 0,10
381	0,60 ± 0,14	0,49 ± 0,05	0,50 ± 0,12	0,83 ± 0,08	0,55 ± 0,24	0,51 ± 0,14
404	0,55 ± 0,02	0,49 ± 0,11	0,51 ± 0,07	0,84 ± 0,05	0,54 ± 0,20	0,55 ± 0,11
405	0,54 ± 0,09	0,50 ± 0,10	0,50 ± 0,07	0,67 ± 0,09	0,44 ± 0,06	0,46 ± 0,08
408	0,50 ± 0,12	0,53 ± 0,15	0,43 ± 0,08	0,83 ± 0,06	0,52 ± 0,13	0,45 ± 0,06
413	0,60 ± 0,03	0,54 ± 0,07	0,49 ± 0,01	0,73 ± 0,07	0,51 ± 0,12	0,51 ± 0,10
416	0,60 ± 0,03	0,47 ± 0,07	0,40 ± 0,09	0,86 ± 0,13	0,50 ± 0,15	0,46 ± 0,04
419	0,57 ± 0,12	0,58 ± 0,11	0,52 ± 0,06	0,84 ± 0,10	0,46 ± 0,03	0,40 ± 0,03
421	0,53 ± 0,15	0,48 ± 0,10	0,53 ± 0,08	0,93 ± 0,11	0,48 ± 0,06	0,44 ± 0,04
429	0,49 ± 0,09	0,48 ± 0,11	0,43 ± 0,05	1,00 ± 0,00	0,47 ± 0,06	0,45 ± 0,08
432	0,55 ± 0,05	0,61 ± 0,10	0,53 ± 0,09	0,86 ± 0,12	0,59 ± 0,14	0,48 ± 0,03
434	0,58 ± 0,08	0,55 ± 0,12	0,50 ± 0,06	0,79 ± 0,04	0,49 ± 0,05	0,49 ± 0,09
435	0,58 ± 0,08	0,60 ± 0,06	0,49 ± 0,10	0,75 ± 0,08	0,52 ± 0,17	0,52 ± 0,10
436	0,55 ± 0,08	0,50 ± 0,17	0,49 ± 0,10	0,90 ± 0,10	0,52 ± 0,03	0,54 ± 0,13
438	0,58 ± 0,04	0,50 ± 0,16	0,47 ± 0,03	0,80 ± 0,12	0,51 ± 0,07	0,55 ± 0,08
440	0,59 ± 0,02	0,58 ± 0,14	0,45 ± 0,10	0,74 ± 0,16	0,53 ± 0,16	0,49 ± 0,05
441	0,50 ± 0,06	0,49 ± 0,12	0,42 ± 0,09	0,82 ± 0,07	0,46 ± 0,06	0,43 ± 0,05
442	0,55 ± 0,07	0,58 ± 0,11	0,56 ± 0,17	0,80 ± 0,04	0,44 ± 0,06	0,47 ± 0,09
443	0,50 ± 0,08	0,53 ± 0,08	0,47 ± 0,06	0,85 ± 0,14	0,44 ± 0,07	0,43 ± 0,09
444	0,53 ± 0,10	0,55 ± 0,12	0,43 ± 0,08	1,00 ± 0,01	0,52 ± 0,10	0,52 ± 0,13
445	0,60 ± 0,02	0,57 ± 0,07	0,58 ± 0,13	0,93 ± 0,06	0,56 ± 0,12	0,58 ± 0,13
446	0,50 ± 0,13	0,54 ± 0,21	0,47 ± 0,11	0,90 ± 0,09	0,51 ± 0,10	0,43 ± 0,11
447	0,50 ± 0,12	0,53 ± 0,19	0,44 ± 0,07	0,94 ± 0,10	0,47 ± 0,08	0,37 ± 0,05
448	0,55 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,83 ± 0,16	0,53 ± 0,09	0,44 ± 0,08
Global	0,57 ± 0,05	0,54 ± 0,06	0,49 ± 0,07	0,85 ± 0,08	0,50 ± 0,44	0,48 ± 0,05

A las 24 horas de incubación, el 90% de las cepas presentó un índice Pz correspondiente a actividad media. El 10% restante presentó baja actividad. Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó actividad nula. A 22°C, el 93,33% de las cepas presentó un índice Pz correspondiente a baja actividad. El 6,67% restante presentó actividad nula.

A las 48 horas de incubación, el 90% de las cepas continuó presentando actividad media, aunque mayor que a las 24h. El 10% de las cepas mostró aún baja actividad, siendo las mismas que a las 24 horas presentaron también baja actividad. Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó actividad nula. A 22°C, el 100% de las cepas presentó actividad media. Ninguna cepa presentó alta actividad. Ninguna cepa presentó actividad nula.

A las 72 horas de incubación, el índice Pz se mantuvo intermedio en el 90% de los casos, mientras que el 3,33% de las cepas presentó alta actividad. Sólo el 6,67% mostró ahora baja actividad. La mayor parte de las cepas presentó más actividad hemolítica a las 72 horas que a las 24 y a las 48 horas. Ninguna cepa presentó actividad nula. A 22°C, el índice Pz se mantuvo intermedio en el 93,33% de los casos, mientras que el 6,67% de las cepas presentó alta actividad. La mayor parte de las cepas presentó más actividad hemolítica a las 72 horas que a las 24 y a las 48 horas. Ninguna cepa presentó actividad nula.

En la Tabla 14 se representó el porcentaje de cepas que mostró actividad hemolítica alta, media, baja o nula según su índice Pz a las 24, 48 y 72 horas de estudio para 37°C y 22°C.

Tabla 14. Distribución de las cepas según su actividad hemolítica (índice Pz) a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C y 22°C en agar sangre.

HEMOLISINAS	37°C				22°C				
	Pz en Agar sangre *	ALTA	MEDIA	BAJA	NULA	ALTA	MEDIA	BAJA	NULA
24h		90,0%		10,0%				93,3%	6,7%
48h		90,0%		10,0%				100%	
72h		3,3%	90,0%		6,7%	6,7%		93,3%	

*alta (Pz≤0,40); media (Pz 0,41-0,60); baja (Pz 0,61-1) y nula (Pz=1).

En la Figura 46 se mostró la evolución de la actividad hemolítica a lo largo del tiempo de incubación a 37°C. A las 24 horas, el índice Pz fluctuó entre 0,49 y 0,72. A las 72 horas, se evidenció un aumento de actividad, variando el índice Pz entre 0,40 y 0,71 según la cepa estudiada.

En la Figura 47 se estableció la comparación entre la actividad hemolítica detectada a las 24 horas y la detectada a las 72 horas de incubación. La lectura a las 72 horas permitió discriminar la actividad existente entre las distintas cepas, ya que resultó mayor la diferencia que a las 24 horas de estudio.

En la Figura 48 se mostró la evolución de la actividad hemolítica a lo largo del tiempo de incubación a 22°C. A las 24 horas, el índice Pz fluctuó entre 0,67 y 1. A las 72 horas, se evidenció un aumento de actividad, variando el índice Pz entre 0,37 y 0,58, según la cepa estudiada.

En la Figura 49 se estableció la comparación entre la actividad hemolítica detectada a las 24 horas y la detectada a las 72 horas de incubación. La lectura a las 72 horas permitió discriminar la actividad existente entre las distintas cepas, ya que resultó mayor la diferencia que a las 24 horas de estudio.

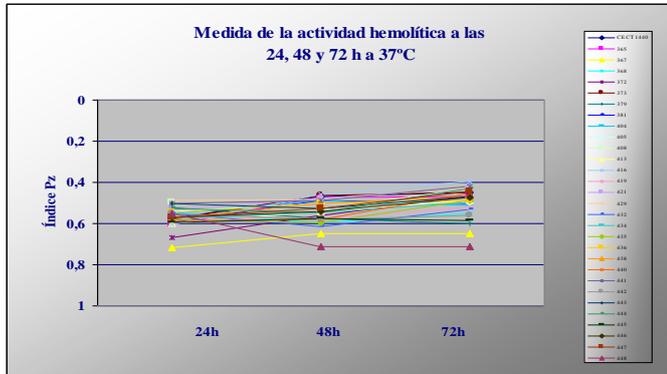


Fig 46. Evolución de la actividad hemolítica las 24, 48 y 72h, 37°C.

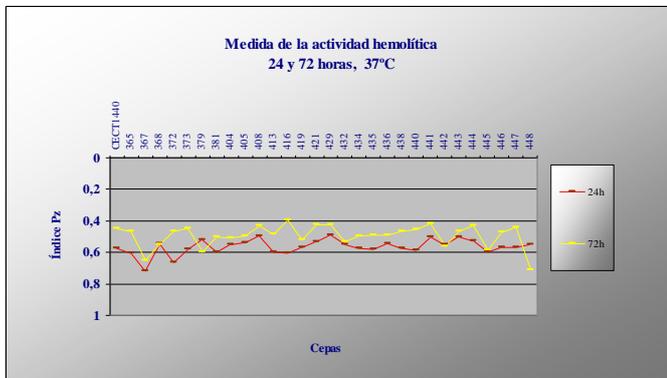


Fig 47. Actividad hemolítica medida a las 24 y 72h de incubación, 37°C.

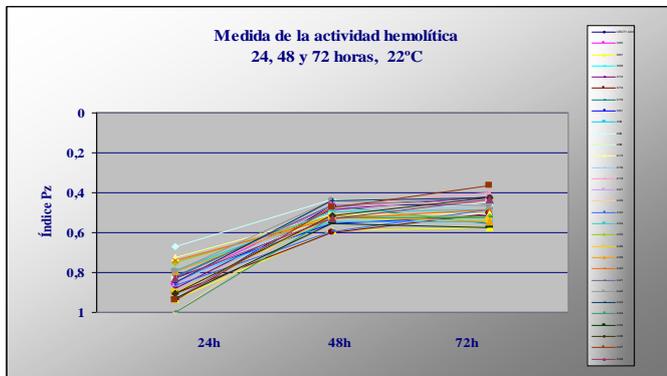


Fig 48. Evolución de la actividad hemolítica las 24, 48 y 72h, 22°C.

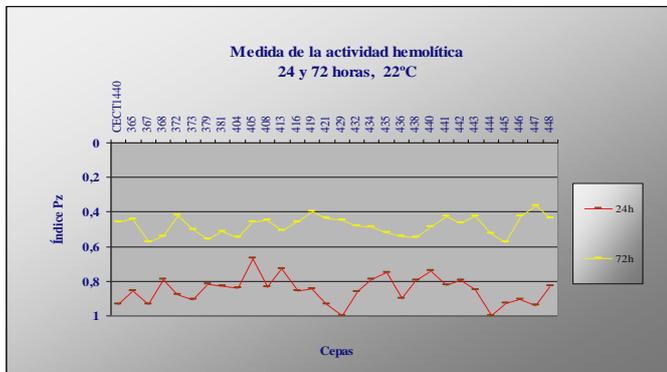
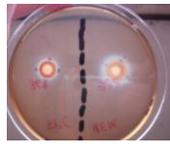


Fig 49. Actividad hemolítica medida a las 24 y 72h de incubación, 22°C.

4.2.5. Estudio global de los diferentes perfiles enzimáticos.

En la Tabla 15 se estableció la representación del número de cepas aisladas que mostraron o no actividad enzimática según el tiempo de incubación (24, 48 y 72 horas) en función del tipo de actividad enzimática estudiada (aspartil-proteasa, fosfolipasa, esterásica y hemolítica, respectivamente) y de la temperatura correspondiente (37°C y 22°C). A 37°C, todas las cepas estudiadas presentaron actividad aspartil-proteasa, la mayoría (96,67%) incluso a las 24 primeras horas, mientras que a 22°C sólo mostraron actividad el 76,67% de las cepas en este tiempo, alcanzando una vez transcurridas las 48 horas el 96,67% de las cepas actividad enzimática. La actividad fosfolipasa resultó variable, puesto que a 37°C a las 72 horas de estudio hasta el 76,67% de los casos presentó actividad enzimática nula. A 22°C el 96,67% de las cepas presentaba actividad a las 72 horas, aunque ésta fue muy baja. A partir de las 48 horas de estudio en todas las cepas se pudo detectar actividad esterásica tanto a 37°C como a 22°C. Se pudo comprobar cómo todos los aislamientos presentaron actividad hemolítica tanto a las 24, como a las 48 y 72 horas a 37°C, mientras que a 22°C, para las primeras 24 horas de incubación, el 6,67% de las cepas presentó actividad nula.

Tabla 15. Representación del número de aislamientos con (positivos) o sin (negativos) actividad enzimática a las 24, 48 y 72 horas a 37°C y 22°C según el tipo de enzima.

	T °C	N° de aislados	Positivos			Negativos		
			24h	48h	72h	24h	48h	72h
 ASPARTIL PROTEASA	37°C	30	29	30	29	1	0	1
	22°C	30	23	29	29	7	1	1
 FOSFOLIPASA	37°C	30	22	18	7	8	12	23
	22°C	30	0	29	29	30	1	1
 ESTERÁSICA	37°C	30	29	30	30	1	0	0
	22°C	30	6	30	30	24	0	0
 HEMOLÍTICA	37°C	30	30	30	30	0	0	0
	22°C	30	28	30	30	2	0	0

En la Figura 50 se representó el índice Pz de actividad enzimática para aspartil-proteasas, fosfolipasas, esterases y hemolisinas de las cepas de *C. tropicalis* estudiadas a 37°C a las 72 horas de incubación, permitiendo establecer las diferencias obtenidas entre las mismas. La figura reflejó cómo el rango de la actividad aspartil-proteasa (representada por el índice de actividad Pz) presentó variación entre 0,43 y 1; el de la actividad fosfolipasa entre 0,88 y 1; el de la actividad esterásica entre 0,28 y 0,62 y el de la actividad hemolítica entre los valores límites 0,40 y 0,71.

En la Figura 51 se representó el índice Pz de actividad enzimática para aspartil-proteasas, fosfolipasas, esterases y hemolisinas de las cepas de *C. tropicalis* estudiadas a 22°C a las 72 horas de incubación, permitiendo establecer las diferencias obtenidas entre las mismas. La figura reflejó cómo el rango de la actividad aspartil-proteasa (representada por el índice de actividad Pz) presentó variación entre los valores límites 0,62 y 1; el de la actividad fosfolipasa entre 0,65 y 1; el de la actividad esterásica entre 0,22 y 0,59 y el de la actividad hemolítica entre los valores límites 0,37 y 0,58.

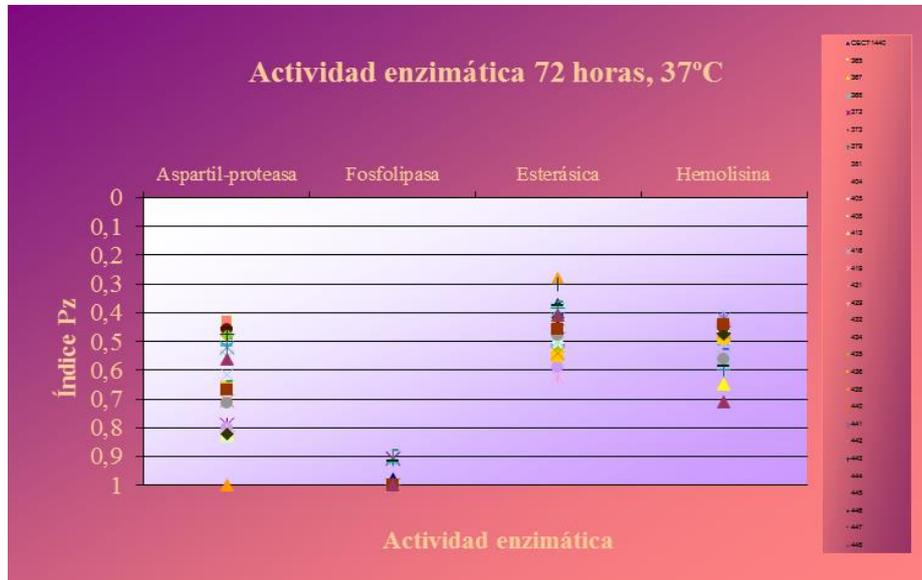


Fig 50. Representación de la media del índice Pz de actividad aspartil-proteasa, fosfolipasa, esterásica y hemolítica a las 72 horas de estudio, a 37°C.

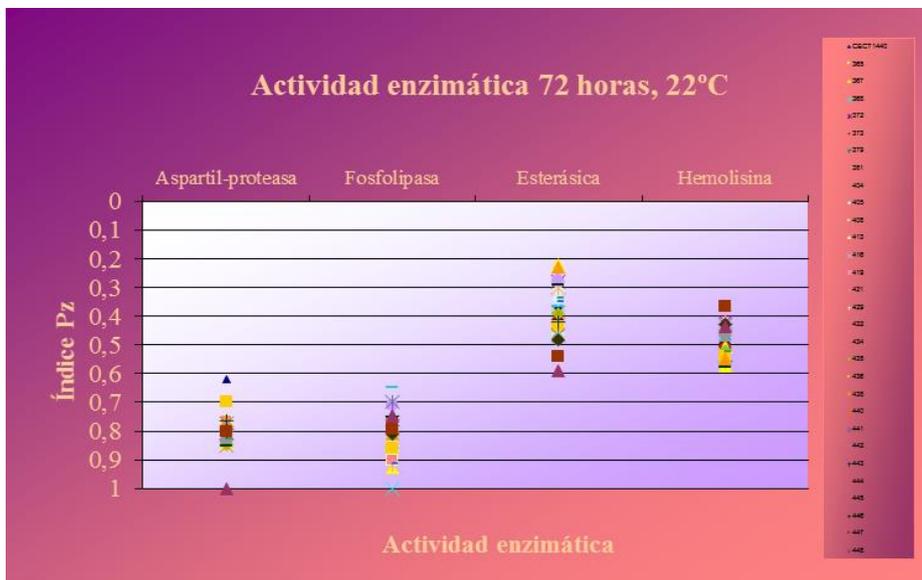


Fig 51. Representación de la media del índice Pz de actividad aspartil-proteasa, fosfolipasa, esterásica y hemolítica a las 72 horas de estudio, a 22°C.

4.2.6. Comparación de los perfiles enzimáticos de cepas urinarias frente a las no urinarias.

En las Figuras 52 y 53 se representaron los perfiles enzimáticos (índice Pz de actividad aspartil-proteasa, esterásica, fosfolipasa y hemolítica) de las distintas cepas de *C. tropicalis* estudiadas procedentes de los aislamientos obtenidos a partir de muestras de orina con respecto al resto de las muestras procedentes de otros aislamientos a las 72 horas de incubación. Los resultados obtenidos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos excepto para la actividad fosfolipasa a 22°C, donde la diferencia sí fue estadísticamente significativa ($p=0,036$). En la Tabla 16 se resumieron estos resultados.

Tabla 16. Diferentes actividades enzimáticas de las cepas de *C. tropicalis* del estudio en función de su origen urinario o no urinario a las 72 horas de estudio. Valores estadísticos.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA		Orina (X±DS)	No orina (X ±DS)	Valor p=
37°C	Aspartil-proteasa	0,67 ±0,16	0,60±0,14	0,263*
	Fosfolipasa	0,98±0,04	0,98±0,04	0,716*
	Esterásica	0,47±0,08	0,45±0,09	0,446**
	Hemolítica	0,49±0,08	0,50±0,06	0,271*
22°C	Aspartil-proteasa	0,81±0,06	0,79±0,05	0,547*
	Fosfolipasa	0,78±0,06	0,83±0,08	0,036**
	Esterásica	0,38±0,10	0,37±0,08	0,601**
	Hemolítica	0,48±0,04	0,48±0,06	0,879**

*Prueba no paramétrica de Mann-Whitney. **Prueba Student-Fisher para muestras independientes.

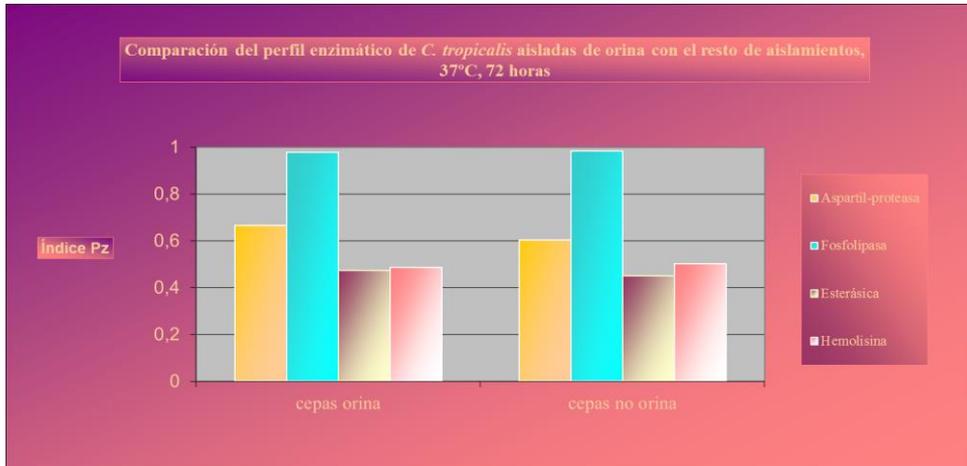


Fig 52. Perfil enzimático (media del índice de actividad Pz a las 72 horas de estudio a 37°C) de las cepas de *C. tropicalis* obtenidas a partir de muestras de orina y las aisladas a partir de otros tipos de muestras.



Fig 53. Perfil enzimático (media del índice de actividad Pz a las 72 horas de estudio a 22°C) de las cepas de *C. tropicalis* obtenidas a partir de muestras de orina y las aisladas a partir de otros tipos de muestras.

4.2.7. Estudio comparativo de la actividad enzimática en función de la temperatura de incubación.

Se establecieron estudios comparativos entre las actividades enzimáticas detectadas a 37°C (eje X) y 22°C (eje Y), tanto a las 24 primeras horas de incubación, como a las siguientes 48 y 72 horas. Se estableció la dispersión entre la actividad enzimática a las dos temperaturas y se halló la recta de regresión correspondiente, así como el coeficiente de correlación de Pearson, para comprobar si existía asociación entre ellas. Para la actividad aspartil-proteasa, en los tres casos se obtuvo escasa fuerza de asociación, con correlación positiva muy débil, siendo mayor a las 24 horas ($R^2=0,068$) que en el resto de los tiempos (Figura 54). Para la actividad fosfolipasa, a las 24 y a las 48 horas de estudio se obtuvo escasa fuerza de asociación, mientras que a las 72 horas el coeficiente de correlación fue algo mayor ($R^2=0,220$) (Figura 55). Para la actividad esterásica, a las 24 y 48 horas de incubación, el coeficiente de correlación fue similar ($R^2=0,093$ a las 24 horas; $R^2=0,064$ a las 48 horas), mientras que a las 72 horas la correlación fue menor (Figura 56). Para la actividad hemolítica, en los tres casos se obtuvo escasa fuerza de asociación, con correlación positiva muy débil, siendo mayor a las 72 horas ($R^2=0,144$) que en el resto de los tiempos (Figura 57).

Se realizaron estudios comparativos entre la actividad aspartil-proteasa y la actividad fosfolipasa y esterásica a 37°C a las 72 horas de incubación, obteniéndose un coeficiente de correlación muy bajo en ambos casos ($R^2=0,002$ para la actividad aspartil-proteasa y actividad fosfolipasa, y

$R^2=5E-07$ para la actividad aspartil-proteasa y actividad esterásica). También se procedió al estudio comparativo entre la actividad fosfolipasa y esterásica a esa misma temperatura y tiempo. Como anteriormente, se calculó la recta de regresión y el coeficiente de correlación, siendo éste mayor que en los casos previos ($R^2=0,058$). Los estudios comparativos entre la actividad hemolítica y el resto de actividades enzimáticas detectadas (aspartil-proteasa, fosfolipasa y esterásica), a 37°C a las 72 horas de incubación mostraron a su vez una fuerza de asociación muy baja en los tres casos, siendo mayor con la actividad aspartil proteasa ($R^2=0,031$ frente a $R^2=0,018$ para la actividad hemolítica y fosfolipasa y $R^2=0,007$ para la actividad hemolítica y esterásica).

Se realizaron estudios comparativos entre la actividad aspartil-proteasa y la actividad fosfolipasa y esterásica a 22°C a las 72 horas de incubación, obteniéndose un coeficiente de correlación muy bajo en ambos casos ($R^2=3E-06$ para la actividad aspartil-proteasa y actividad fosfolipasa, y $R^2=0,042$ para la actividad aspartil-proteasa y actividad esterásica). También se procedió al estudio comparativo entre la actividad fosfolipasa y esterásica a esa misma temperatura y tiempo. Como anteriormente se calculó la recta de regresión y el coeficiente de correlación, siendo igualmente bajo ($R^2=0,027$). Los estudios comparativos entre la actividad hemolítica y el resto de actividades enzimáticas detectadas (aspartil-proteasa, fosfolipasa y esterásica), a 22°C a las 72 horas de incubación mostraron a su vez una fuerza de asociación baja en los tres casos, ($R^2=0,001$ para la actividad hemolítica y aspartil-proteasa, y $R^2=0,036$ para la actividad hemolítica y fosfolipasa), siendo algo mayor con la actividad esterásica ($R^2=0,238$).

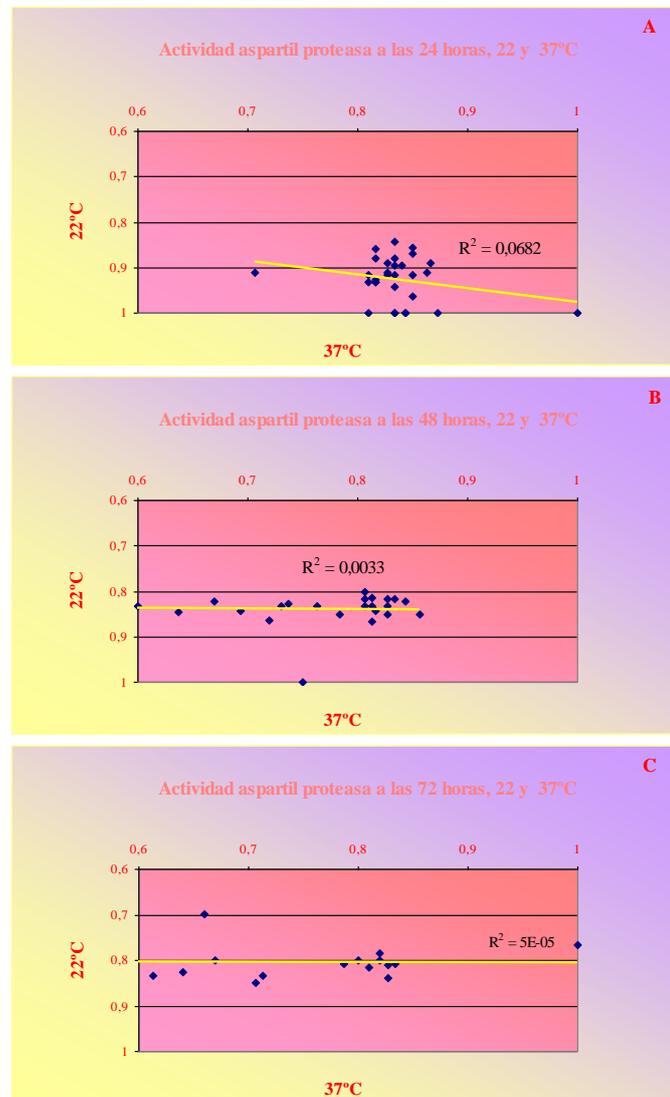


Fig 54. Estudio comparativo de la actividad aspartil-proteasa (Índice Pz) a 37°C frente a la actividad aspartil-proteasa (Índice Pz) a 22°C a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de estudio.

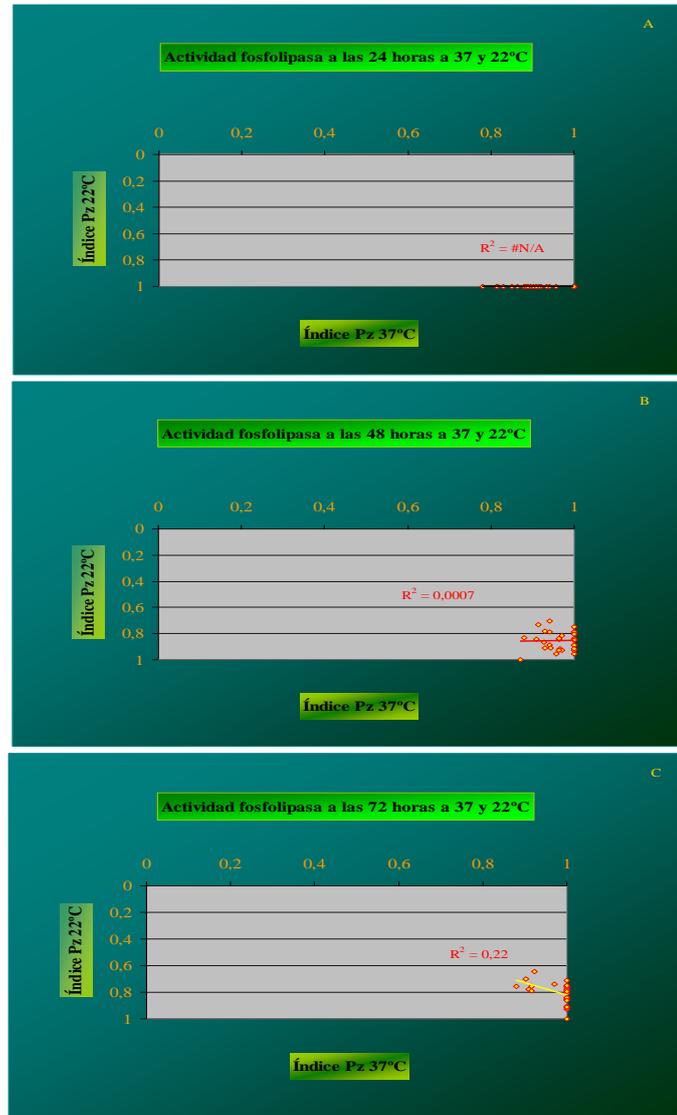


Fig 55. Estudio comparativo de la actividad fosfolipasa (Índice Pz) a 37°C frente a la actividad fosfolipasa (Índice Pz) a 22°C a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de estudio.

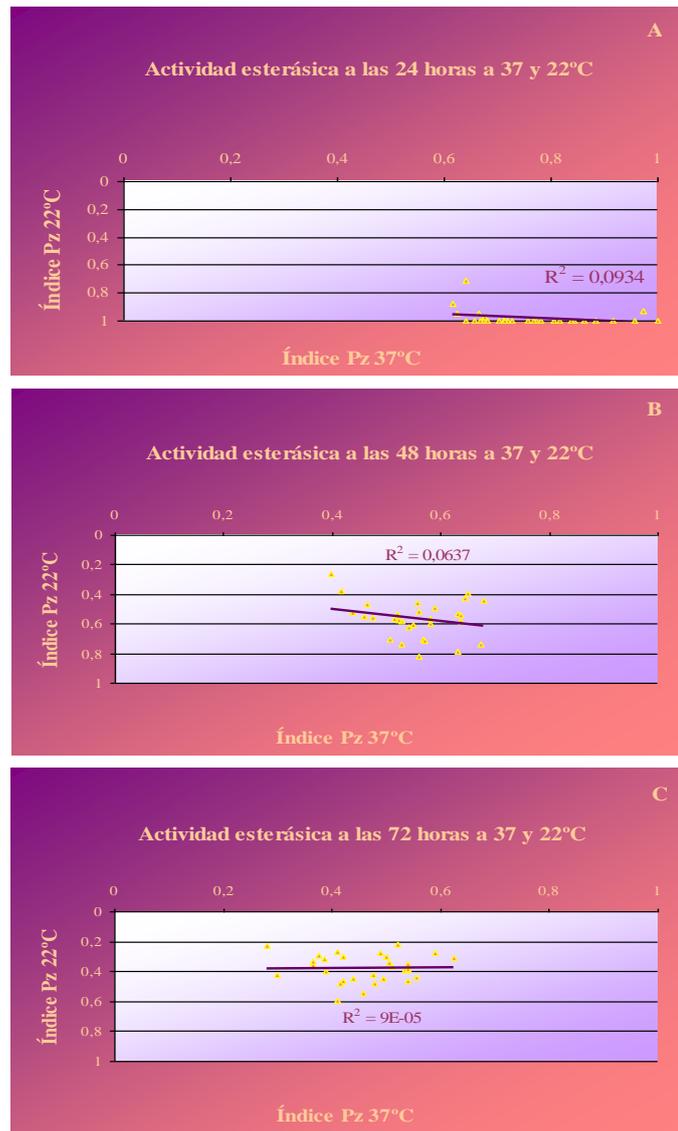


Fig 56. Estudio comparativo de la actividad esterásica (Índice Pz) a 37°C frente a la actividad esterásica (Índice Pz) a 22°C a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de estudio.

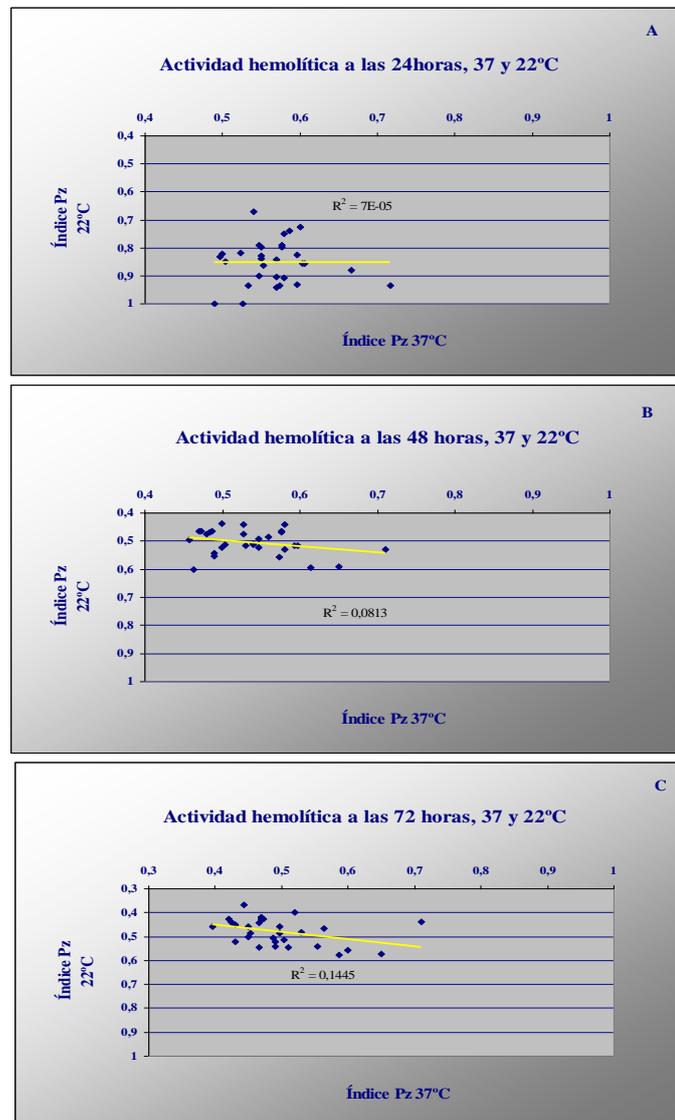


Fig 57. Estudio comparativo de la actividad hemolítica (Índice Pz) a 37°C frente a la actividad hemolítica (Índice Pz) a 22°C a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de estudio.

4.3. Estudio de la adherencia a material plástico (poliestireno).

4.3.1. Estudio de la adherencia inmediata y tardía.

Se determinó la capacidad de adherencia inmediata (a los 15 minutos) y tardía (a las 24 horas de incubación) a material plástico (poliestireno) de todas las cepas del estudio a dos temperaturas, 37°C y 22°C. Los valores de DO₄₉₂ obtenidos >0,05 fueron considerados positivos. Este punto de corte fue tomado de Blanco *et al.*, 2006.

Todas las cepas fueron adherentes para las dos temperaturas. En la Tabla 17 se expresaron los valores de la adherencia inmediata y tardía obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 37°C. Los valores resultantes de la adherencia inmediata estuvieron comprendidos en el intervalo de rangos de 0,06±0,01 a 0,13±0,03, con un valor medio de 0,10±0,02. Los valores resultantes de la adherencia tardía estuvieron comprendidos en el intervalo de rangos de 0,05±0,03 a 0,16±0,04, con un valor medio de 0,10±0,03.

En las Figuras 58 y 59 se representó la comparación entre la adherencia inmediata y la tardía a los 37°C de incubación, observándose cómo los valores resultaron similares en la mayor parte de los casos, presentando una correlación entre ellos igual a $R^2=0,383$.

En la Tabla 17 se expresaron los valores de la adherencia inmediata y tardía obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 22°C. Los valores resultantes de la adherencia inmediata estuvieron comprendidos en el intervalo de rangos de $0,08\pm 0,02$ a $0,15\pm 0,03$, con un valor medio de $0,11\pm 0,02$. Los valores resultantes de la adherencia tardía estuvieron comprendidos en el intervalo de rangos de $0,11\pm 0,04$ a $0,19\pm 0,10$, con un valor medio de $0,15\pm 0,02$.

En las Figuras 60 y 61 se representó la comparación entre la adherencia inmediata y la tardía a los 22°C de incubación. A diferencia de lo ocurrido a 37°C, los niveles de adherencia tardía resultaron superiores a los de adherencia inmediata en el 86,67% de las cepas, siendo similares en dos casos (6,67%). La correlación entre los valores fue igual a $R^2=0,007$.

Tabla 17. Medida de la adherencia inmediata (15 minutos) y tardía (24 horas), 37°C y 22°C

CEPAS	37°C		22°C	
	Adherencia inmediata (15 minutos) (X±DS)	Adherencia tardía (24 horas) (X±DS)	Adherencia inmediata (15 minutos) (X±DS)	Adherencia tardía (24 horas) (X±DS)
CECT-1440	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,04
365	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,10	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,01
367	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01
368	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,06
372	0,08 ± 0,05	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,05
373	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,06
379	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,05	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,04
381	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02
404	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,14 ± 0,03
405	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,14 ± 0,05
408	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,04
413	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,03
416	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,17 ± 0,05
419	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,14 ± 0,04
421	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,08
429	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,18 ± 0,10
432	0,10 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,17 ± 0,05
434	0,12 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,13 ± 0,02
435	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,08
436	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,18 ± 0,10
438	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,19 ± 0,10
440	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,07
441	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,16 ± 0,11
442	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,06
443	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,16 ± 0,06
444	0,13 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0,17 ± 0,09
445	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,18 ± 0,06
446	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,05
447	0,11 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,14 ± 0,06
448	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,05
Global	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,02

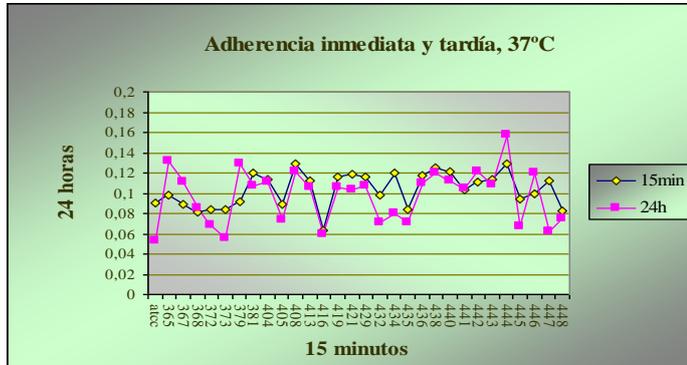


Fig 58. Adherencia inmediata y tardía a 37°C.

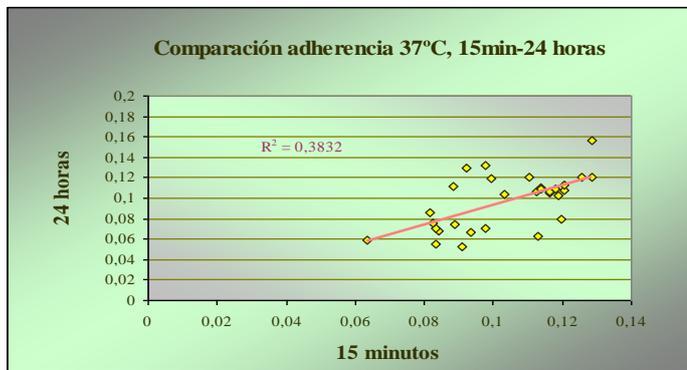


Fig 59. Comparación adherencia inmediata y tardía, 37°C

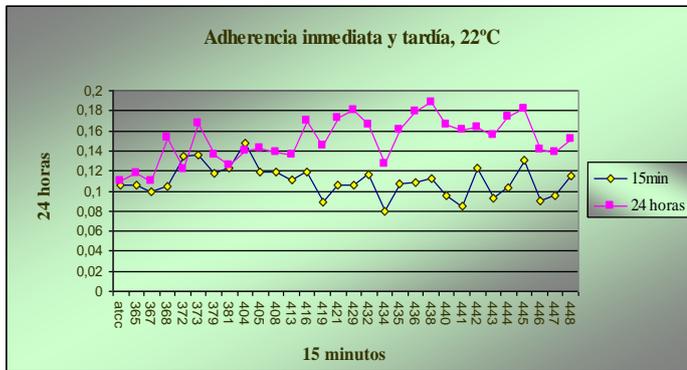


Fig 60. Adherencia inmediata y tardía a 22°C.

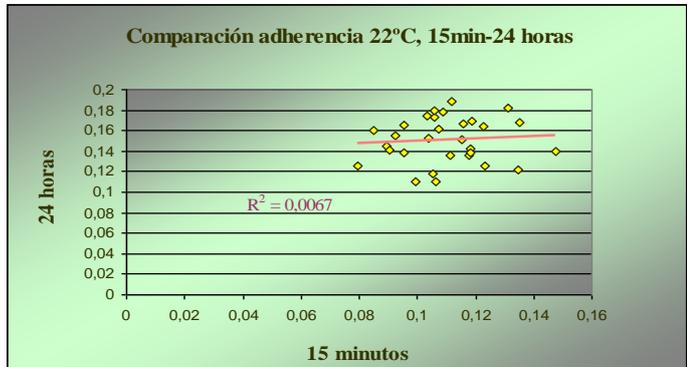


Fig 61. Comparación adherencia inmediata y tardía, 22°C.

En las Figuras 62 y 63 se representó la comparación entre la adherencia inmediata a los 37°C y 22°C de incubación. Ésta resultó similar para el 66,67% de las cepas ($DO-DS \leq 0,02$), y a 37°C fue menor en 8 cepas (26,67%) y mayor para el resto (6,67%), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). La correlación entre los valores fue igual a $R^2 = 0,073$.

En las Figuras 64 y 65 se representó la comparación entre la adherencia tardía a los 37°C y 22°C de incubación. Ésta resultó menor a 37°C para el 90% de las cepas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$), y similar en tres (10%). La correlación entre los valores fue igual a $R^2 = 0,003$. La figura 66 representa la mayor adherencia tardía a 22°C.

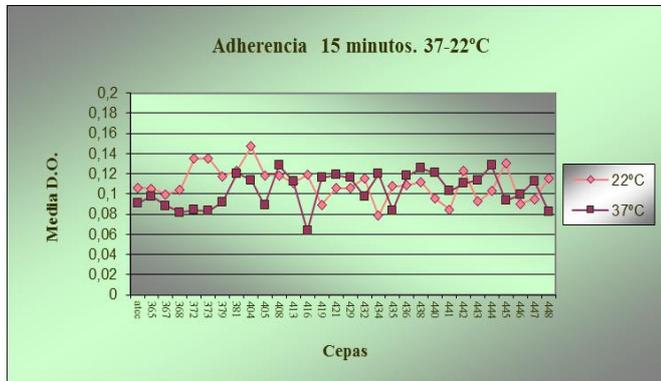


Fig 62. Adherencia a los 15 minutos, 37°C frente a 22°C.

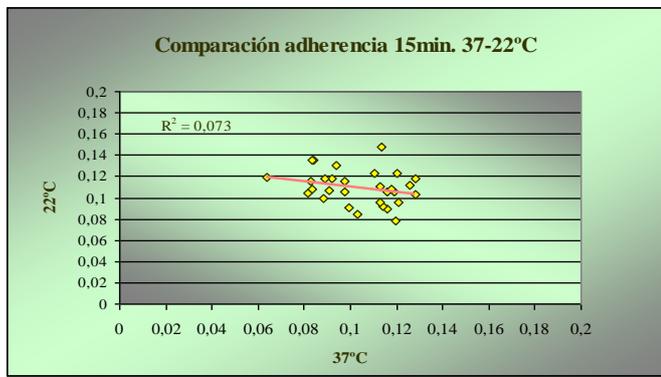


Fig 63. Comparación adherencia a los 15 minutos, 37°C frente a 22°C.

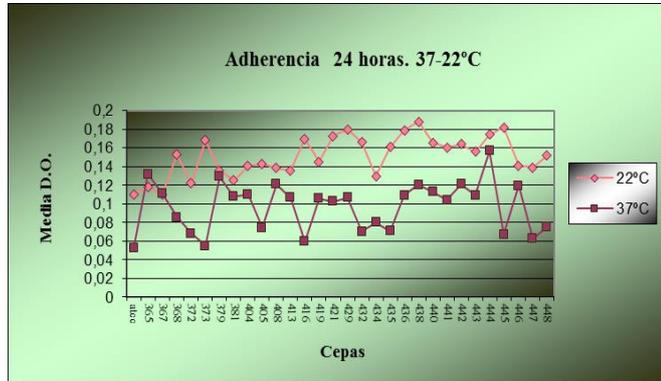


Fig 64. Adherencia a las 24 horas, 37°C frente a 22°C.

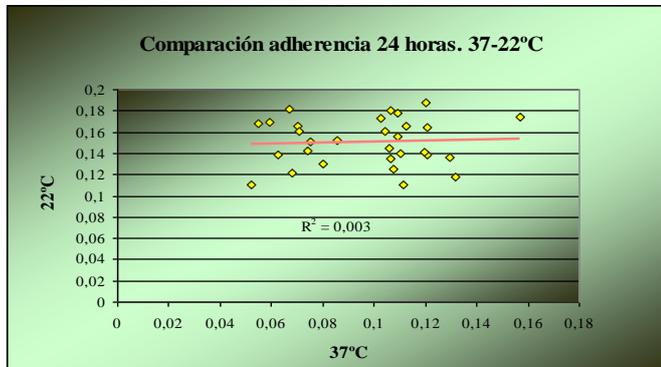


Fig 65. Comparación adherencia a las 24 horas, 37°C frente a 22°C.

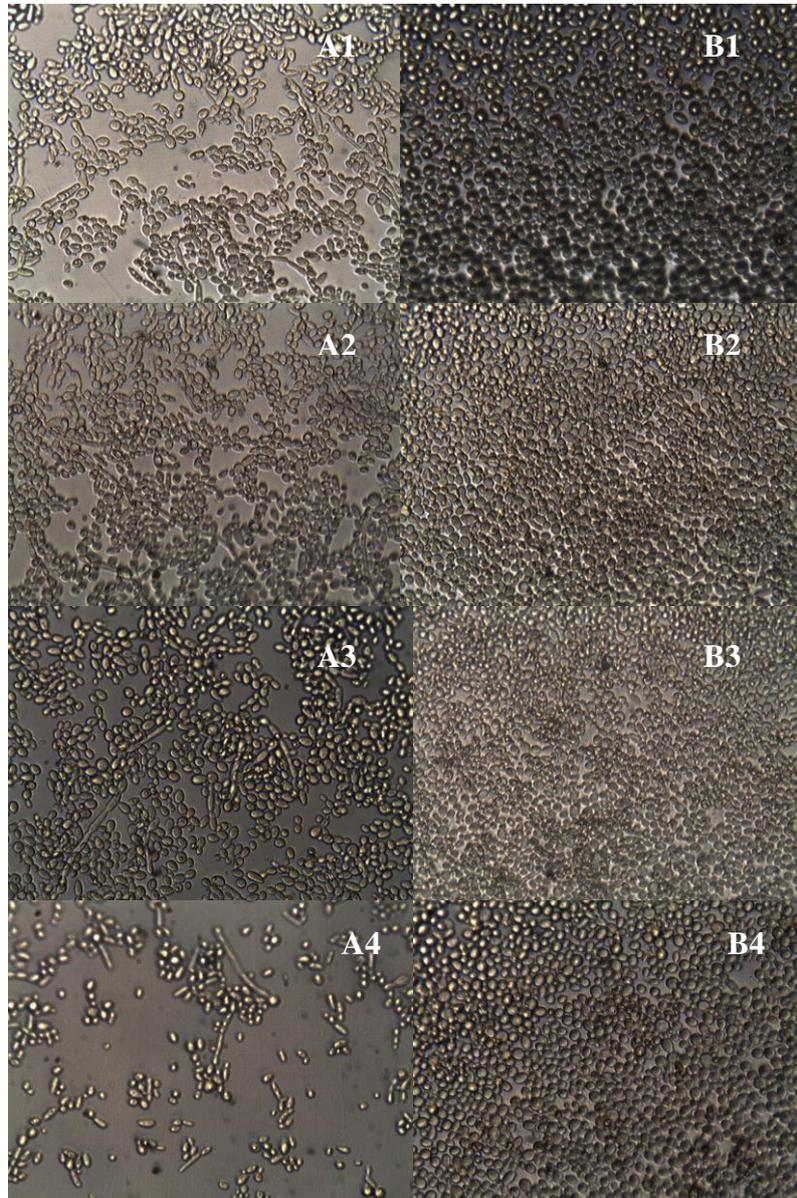


Fig 66. Adherencia a 37°C (A) y 22°C (B). Cepas 442 (1), 444 (2), 446 (3), 448 (4).

4.3.2. Comparación de la adherencia de cepas urinarias frente a las no urinarias.

En la Figura 67 se representó la comparación entre la adherencia inmediata y tardía de cepas de origen urinario frente a las de origen no urinario a 37°C y 22°C. Sólo la adherencia tardía a 22°C presentó diferencias estadísticamente significativas ($p=0,010$). Para el resto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 18).

Tabla 18. Adherencia de cepas de origen urinario y no urinario a 37°C y 22°C.

Adherencia	37°C		22°C	
	Adherencia inmediata (15 minutos) (X±DS)	Adherencia tardía (24 horas) (X±DS)	Adherencia inmediata (15 minutos) (X±DS)	Adherencia tardía (24 horas) (X±DS)
Cepas urinarias	0,11±0,02	0,09±0,02	0,11±0,02	0,16±0,02
Cepas no urinarias	0,10±0,01	0,10±0,03	0,11±0,02	0,14±0,02
Valor p=	0,093*	0,917*	0,191**	0,010**

*Prueba no paramétrica de Mann-Whitney. **Prueba de Student-Fisher para muestras independientes.



Fig 67. Comparación de la adherencia entre cepas de origen urinario y no urinario.

4.3.3. Estudio de la adherencia inespecífica. HSC.

Se determinó la hidrofobicidad de superficie celular (HSC) de todas las cepas incluidas en el estudio a dos temperaturas, 37°C y 22°C, mediante el test de adhesión microbiana a hidrocarburos (MATH), calculándose como el siguiente porcentaje:

$$\% \text{HSC} = [(\text{DO}_{\text{Inicial}} - \text{DO}_{\text{Final}}) / \text{DO}_{\text{Inicial}}] \times 100.$$

Se establecieron los siguientes rangos de HSC: alta (HSC>50%), media (HSC 25-50%) y baja (HSC<25%).

A 37°C, el 66,67% de las cepas de *C. tropicalis* fueron altamente hidrofóbicas, el 30% presentó actividad media, y únicamente la cepa control presentó valores menores al 25% (Tabla 19). En la Tabla 20 se expresaron los valores obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 37°C y 22°C, así como las desviaciones estándar correspondientes. A 37°C, la HSC presentó un amplio rango de dispersión en los valores, con una variación comprendida entre 17,44±3,72 y 91,18±2,89, con un valor medio de 64,04±21,25. Por el contrario, a 22°C, todas las cepas presentaron valores altos de HSC, con un rango de valores comprendidos entre 64,25±4,00 y 98,26±0,86; con un valor medio de 89,08±8,24, siendo para todos los

aislamientos estudiados, excepto en un caso en los que resultaron similares, mayores los valores a esta temperatura que los obtenidos a 37°C ($R^2=0,37$).

En las Figuras 68 y 69 se representó la comparación entre los resultados de la HSC obtenidos a las dos temperaturas estudiadas.

Tabla 19. Proporción de cepas con HSC alta, media y baja a 37°C y 22°C.

%HSC	37°C			22°C		
[(DOi-DOf) / DOi] * 100	ALTA	MEDIA	BAJA	ALTA	MEDIA	BAJA
	66,7%	30%	3,3%	100%	0%	0%

*alta (>50%); media (25-50%); baja (<25%).

Tabla 20. Medida de la hidrofobicidad de superficie celular a 37°C y 22°C.

CEPAS	HSC (X±DS) 37°C	HSC (X±DS) 22°C
CECT-1440	17,44 ± 3,72	65,04 ± 17,96
365	71,26 ± 22,04	85,15 ± 9,44
367	43,95 ± 5,30	64,25 ± 4,00
368	78,19 ± 2,21	94,33 ± 2,60
372	39,62 ± 5,98	91,26 ± 5,18
373	44,04 ± 29,97	82,59 ± 9,51
379	57,28 ± 7,51	81,41 ± 12,01
381	91,18 ± 2,89	96,14 ± 1,36
404	74,93 ± 11,21	92,69 ± 4,51
405	68,12 ± 2,96	83,53 ± 10,01
408	89,93 ± 9,65	97,17 ± 1,19
413	87,82 ± 15,50	86,69 ± 14,42
416	31,98 ± 0,87	91,14 ± 2,67
419	68,94 ± 13,66	91,49 ± 4,85
421	82,43 ± 4,29	89,23 ± 7,30
429	84,28 ± 12,83	93,86 ± 1,82
432	46,37 ± 23,19	84,89 ± 4,25
434	68,72 ± 4,64	94,71 ± 3,12
435	40,29 ± 18,42	89,21 ± 4,69
436	80,27 ± 9,50	95,94 ± 3,36
438	88,12 ± 5,86	95,18 ± 1,74
440	77,96 ± 10,95	88,02 ± 11,22
441	86,29 ± 1,94	95,87 ± 0,20
442	72,68 ± 7,79	97,82 ± 1,66
443	57,81 ± 21,65	92,27 ± 2,97
444	83,85 ± 4,71	91,89 ± 8,33
445	37,02 ± 11,25	91,58 ± 5,41
446	76,69 ± 13,01	98,26 ± 0,86
447	33,68 ± 3,51	81,25 ± 11,99
448	40,08 ± 8,23	89,65 ± 5,95
Global	64,04 ± 21,25	89,08 ± 8,24

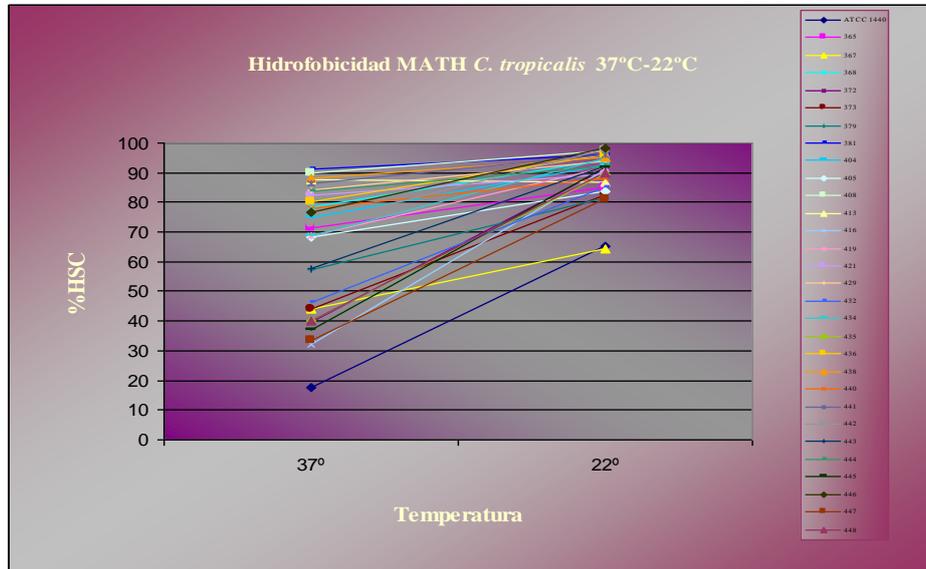


Fig 68. HSC a 37°C y a 22°C.

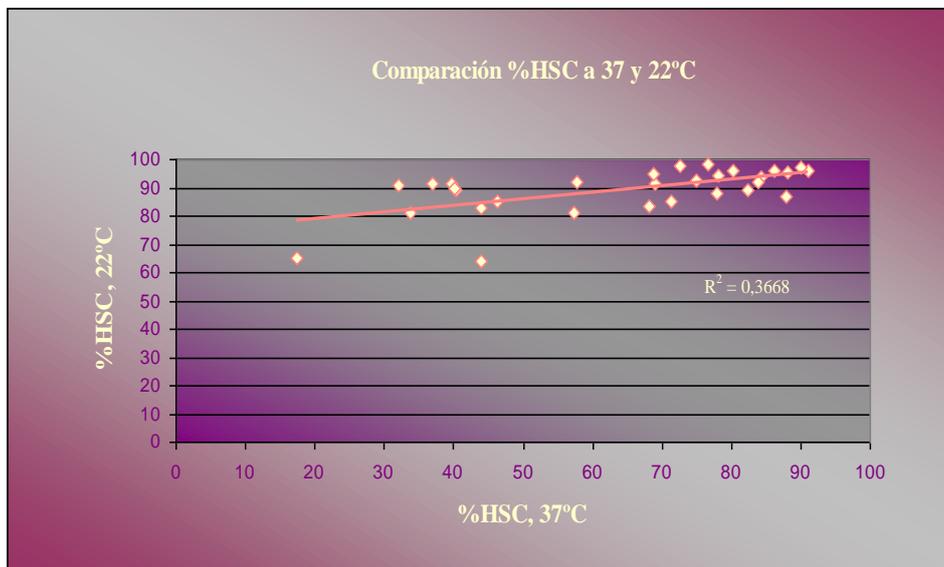


Fig 69. Comparación entre la proporción de la HSC a 37°C y a 22°C.

4.3.4. Comparación de la HSC de cepas urinarias frente a las no urinarias.

En la Tabla 21 se estableció la proporción de cepas que presentaron HSC alta, media o baja a las dos temperaturas, en función de su procedencia urinaria o no urinaria, observándose cómo las cepas de origen urinario presentaron en ambos casos valores de hidrofobicidad más elevados que las cepas procedentes de otra localización diferente. Sólo para 22°C la diferencia resultó estadísticamente significativa ($p=0,049$). Para 37°C, el valor de p fue 0,141.

En la Figura 70 se estableció la representación de las diferencias existentes entre los valores medios de HSC en las cepas de origen urinario frente a las de origen no urinario a 37°C y 22°C. En la Figura 71 se establecieron comparaciones entre los diferentes grupos de hidrofobicidad.

En las Figuras 72 y 73 se representó la diferencia entre la correlación de los resultados de HSC obtenidos a 37°C y 22°C en las cepas de procedencia urinaria frente a la de cepas de procedencia no urinaria, siendo mayor en las cepas de procedencia no urinaria ($R^2=0,42$ frente a $R^2=0,25$ en cepas de origen urinario).

Tabla 21. Proporción de cepas de origen urinario y no urinario con HSC alta, media y baja a 37°C y 22°C.

%HSC	37°C				22°C			
	MUY ALTA (>82%)	ALTA (>50%)	MEDIA (25-50%)	BAJA (<25%)	MUY ALTA (>82%)	ALTA (>50%)	MEDIA (25-50%)	BAJA (<25%)
[(DOi-DOf) / DOi] * 100								
Cepas urinarias	40%	33,3%	26,6%	0%	100%	0%	0%	0%
Cepas no urinarias	13,3%	46,6%	33,3%	6,7%	73,3%	26,6%	0%	0%
Valor p=	0,667*	0,357*	0,475*		0,431*			

*Prueba T de Student-Fisher para medias de dos grupos independientes.

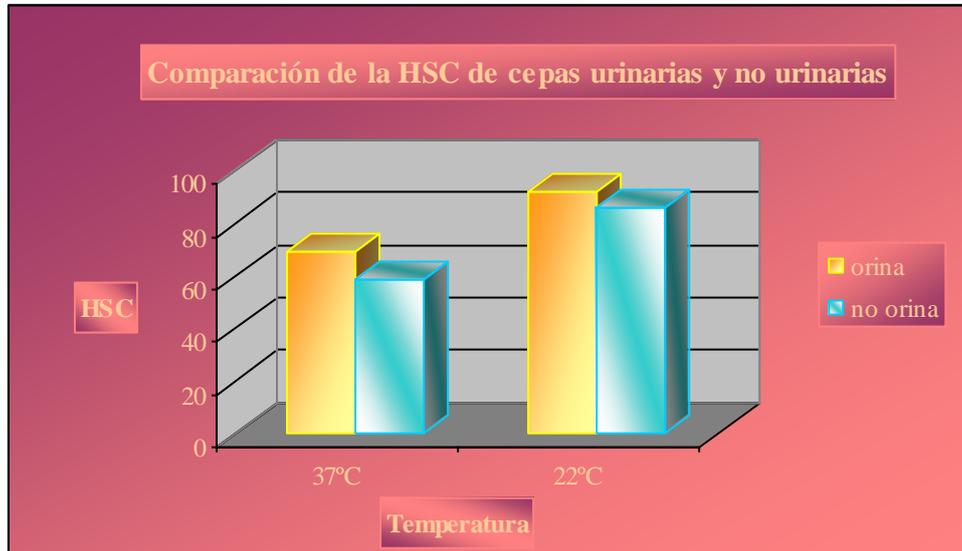


Fig 70. Comparación de los valores medios de HSC en las cepas de procedencia urinaria frente a las de procedencia no urinaria a 37°C y 22°C.



Fig 71. Comparación de los valores medios de HSC en las cepas de procedencia urinaria frente a las cepas de procedencia no urinaria a 37°C y 22°C, clasificadas por niveles.

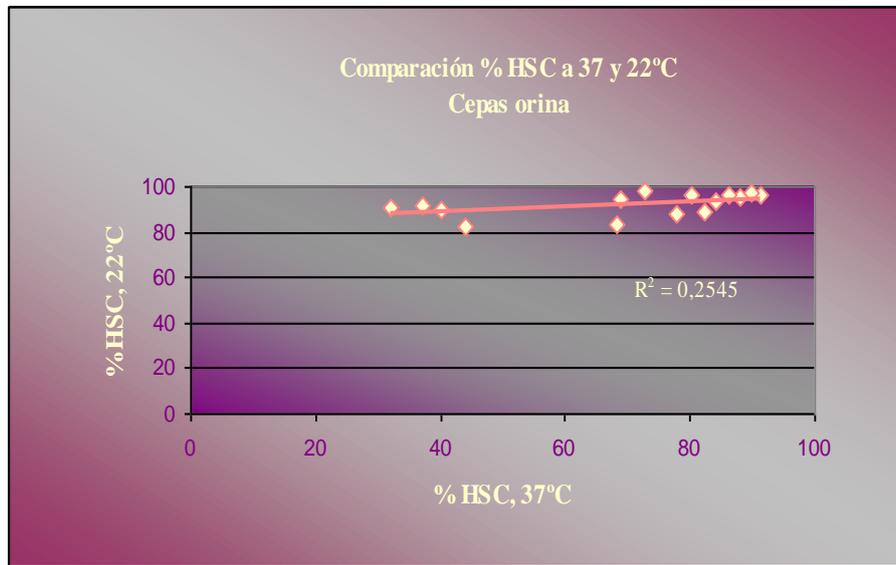


Fig 72. Comparación entre la proporción de la HSC a 37°C y a 22°C. Cepas de procedencia urinaria.

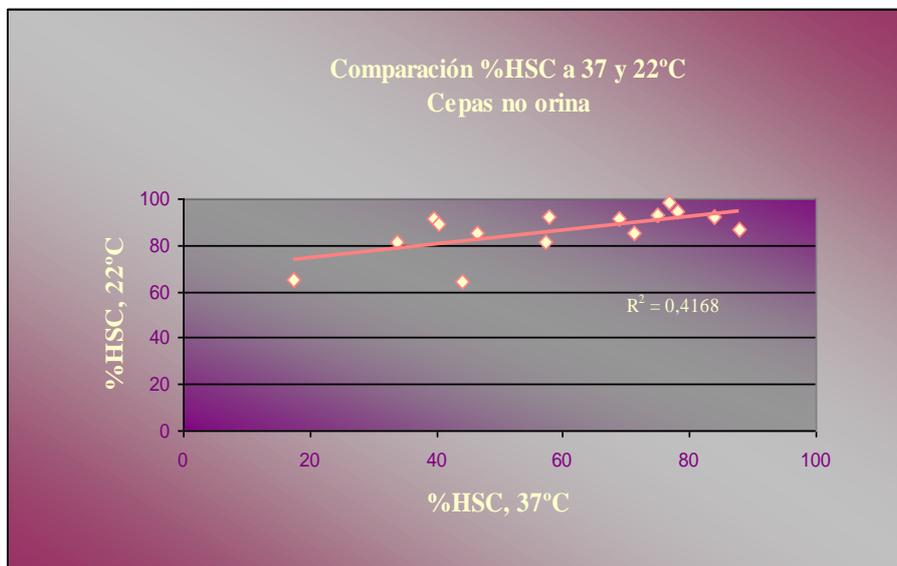


Fig 73. Comparación entre la proporción de la HSC a 37°C y a 22°C. Cepas de procedencia no urinaria.

4.3.5. Estudio de la adherencia específica. Cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en células planctónicas.

Se estableció la cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en células planctónicas de *C. tropicalis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real con el uso de sondas SYBR® Green. Se determinaron la media y desviación estándar de los valores obtenidos en los diferentes experimentos, resumiéndose los resultados en la Tabla 22. (Los valores son los resultados directos obtenidos, sin resta del housekeeping).

Se realizó la comparación entre la media de los valores obtenidos para las cepas de *C. tropicalis* incluidas en el estudio clasificadas posteriormente en dos grupos como alta o escasamente productoras de biofilm, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de proteína Alst1 en células planctónicas de ambos grupos ($p=0,498$). En la Figura 74 se representó gráficamente la cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en los dos grupos de cepas estudiadas.

Tabla 22. Cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en células planctónicas de *C. tropicalis*.

Cepas de <i>C. tropicalis</i>	X±DS
	373 21,71±0,40
Muy productoras de biofilm	405 18,08±1,48
	441 18,36±0,17
	445 19,15±0,35
Poco productoras de biofilm	408 19,69±1,21
	438 19,91±1,82
	440 20,04±0,48
	448 20,05±1,71

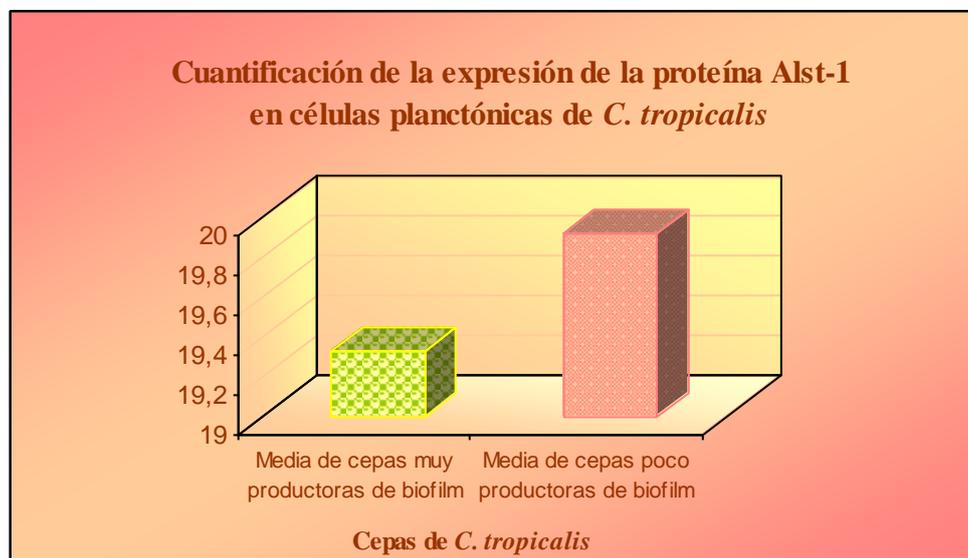


Fig 74. Representación de la expresión de proteína Alst1 en células planctónicas de *C. tropicalis* clasificadas según su grado de producción de biofilm.

4.4. Estudio de la capacidad de formación de biofilm

4.4.1. Determinación del crecimiento de *C. tropicalis*

Para poder evaluar posteriormente el biofilm formado, se determinó en primer lugar el crecimiento de todas las cepas incluidas en el estudio a dos temperaturas, 37°C y 22°C, a las 24 y a las 96 horas de incubación en medio RPMI-1640, mediante la de terminación de la DO, calculándose como :

$$\text{Crecimiento (DO)} = \text{DO}_{\text{Final (24 ó 96h)}} - \text{DO}_{\text{Inicial (inóculo)}}$$

En la Tabla 23 se expresaron los valores obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 37°C y 22°C, así como las desviaciones estándar correspondientes, a las 24 y las 96 horas de incubación. Para 37°C, la fase estacionaria del crecimiento se alcanzó a las 24 horas, permaneciendo los valores similares a las 96 horas. A las 24 horas, el crecimiento presentó una variación comprendida entre 0,80±0,23 y 1,10±0,04 en función de la cepa estudiada, con un valor medio de 0,96±0,08. A las 96 horas, estos valores estuvieron entre 0,96±0,03 y 1,16±0,09, con un valor medio de 1,06±0,06. Para 22°C, el crecimiento fue más lento, siendo necesario esperar a las 96

horas para alcanzar la fase estacionaria. A las 24 horas, el crecimiento presentó una variación comprendida entre $0,40\pm 0,08$ y $1,06\pm 0,14$, con un valor medio de $0,82\pm 0,13$, mientras que para las 96 horas, los valores mínimo y máximo alcanzados fueron de $1,07\pm 0,06$ y $1,34\pm 0,03$, respectivamente, con un valor medio de $1,23\pm 0,07$.

En las Figuras 75 y 76 se representaron los resultados del crecimiento a las 24 y 96 horas a 37°C y a 22°C , observándose un alto grado de correlación entre los dos tiempos de incubación ($R^2=0,559$ para 37°C ; $R^2=0,499$ para 22°C).

Las Figuras 77 y 78 muestran la comparación de los resultados obtenidos para las dos temperaturas del estudio a las 24 y 96 horas, respectivamente. En ellas se observa un mayor crecimiento a los 37°C de incubación para las primeras 24 horas, con un grado de correlación entre las dos temperaturas de $R^2=0,171$, existiendo una diferencia estadísticamente significativa al establecer la comparación de medias ($p<0,05$). Para las 96 horas, se apreció un mayor crecimiento a los 22°C de incubación para el 96,67% de las cepas, con un grado de correlación entre las dos temperaturas de $R^2=0,357$, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos ($p<0,05$).

Tabla 23. Medida del crecimiento a las 24 horas y 96 horas a 37°C y 22°C.

CEPAS	37°C		22°C	
	Crecimiento 24h-0h ($\bar{X} \pm DS$)	Crecimiento 96h-0h ($\bar{X} \pm DS$)	Crecimiento 24h-0h ($\bar{X} \pm DS$)	Crecimiento 96h-0h ($\bar{X} \pm DS$)
CECT-1440	0,93 ± 0,07	1,09 ± 0,03	0,93 ± 0,17	1,29 ± 0,02
365	0,99 ± 0,04	0,97 ± 0,02	0,83 ± 0,18	1,20 ± 0,05
367	0,93 ± 0,17	1,11 ± 0,03	0,83 ± 0,12	1,31 ± 0,03
368	0,81 ± 0,06	0,96 ± 0,03	0,88 ± 0,13	1,25 ± 0,06
372	0,88 ± 0,07	1,01 ± 0,01	0,76 ± 0,10	1,18 ± 0,01
373	0,90 ± 0,06	1,01 ± 0,04	0,40 ± 0,08	1,17 ± 0,06
379	1,01 ± 0,17	1,10 ± 0,10	0,99 ± 0,12	1,27 ± 0,02
381	0,95 ± 0,09	1,10 ± 0,01	0,87 ± 0,09	1,22 ± 0,05
404	1,04 ± 0,07	1,15 ± 0,01	0,89 ± 0,10	1,32 ± 0,02
405	0,85 ± 0,09	0,96 ± 0,01	0,59 ± 0,05	1,12 ± 0,02
408	1,04 ± 0,08	1,09 ± 0,01	0,90 ± 0,08	1,25 ± 0,03
413	1,08 ± 0,02	1,12 ± 0,04	0,91 ± 0,10	1,34 ± 0,03
416	1,10 ± 0,04	1,10 ± 0,02	0,81 ± 0,22	1,22 ± 0,10
419	0,97 ± 0,04	1,01 ± 0,03	0,78 ± 0,19	1,22 ± 0,04
421	1,01 ± 0,09	1,09 ± 0,02	0,73 ± 0,26	1,22 ± 0,06
429	0,98 ± 0,02	1,13 ± 0,05	0,71 ± 0,23	1,27 ± 0,06
432	1,04 ± 0,07	1,11 ± 0,04	0,93 ± 0,21	1,27 ± 0,06
434	0,80 ± 0,23	0,97 ± 0,11	0,62 ± 0,20	1,07 ± 0,06
435	1,07 ± 0,06	1,07 ± 0,03	0,97 ± 0,10	1,31 ± 0,01
436	0,93 ± 0,09	1,04 ± 0,03	0,92 ± 0,10	1,23 ± 0,05
438	0,92 ± 0,07	1,02 ± 0,03	0,76 ± 0,17	1,18 ± 0,04
440	0,95 ± 0,05	1,01 ± 0,02	0,79 ± 0,13	1,21 ± 0,08
441	0,85 ± 0,04	1,00 ± 0,29	0,79 ± 0,09	1,11 ± 0,02
442	0,93 ± 0,02	1,05 ± 0,04	0,82 ± 0,28	1,28 ± 0,04
443	0,97 ± 0,07	1,06 ± 0,06	1,00 ± 0,10	1,32 ± 0,02
444	1,01 ± 0,04	1,06 ± 0,05	0,73 ± 0,25	1,22 ± 0,05
445	1,03 ± 0,05	1,08 ± 0,03	0,87 ± 0,20	1,25 ± 0,08
446	0,88 ± 0,12	0,98 ± 0,10	0,81 ± 0,21	1,20 ± 0,06
447	1,08 ± 0,04	1,11 ± 0,04	0,73 ± 0,15	1,08 ± 0,20
448	1,02 ± 0,12	1,16 ± 0,09	1,06 ± 0,14	1,32 ± 0,04
Global	0,96 ± 0,08	1,06 ± 0,06	0,82 ± 0,13	1,23 ± 0,07

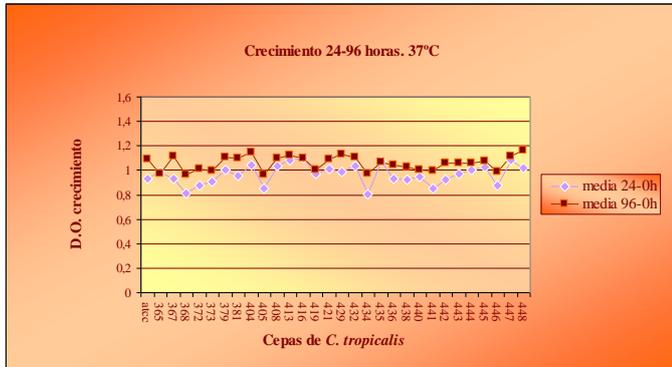


Fig 75. Resultados del crecimiento a las 24 y 96 horas a 37°C, corregidos con inóculo inicial.

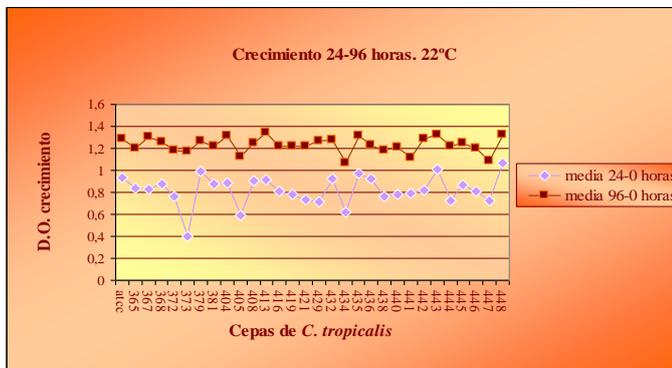


Fig 76. Resultados del crecimiento a las 24 y 96 horas a 22°C, corregidos con inóculo inicial.

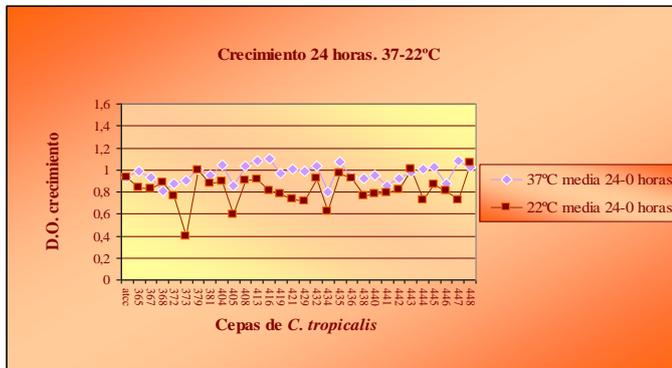


Fig 77. Resultados del crecimiento a las 24 horas, 37°C-22°C, corregidos con inóculo inicial.

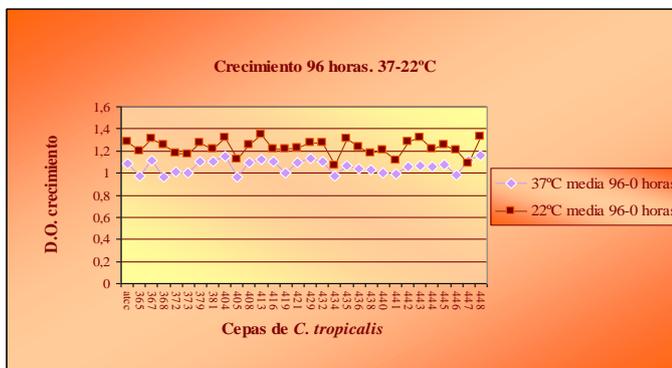


Fig 78. Resultados del crecimiento a las 96 horas, 37°C-22°C, corregidos con inóculo inicial.

4.4.2. Estudio de la capacidad de formación de biofilm

4.4.2.1. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre placas de poliestireno utilizando como medio de cultivo medio RPMI-1640.

1. Determinación de la formación de biofilm mediante la medida de la DO.

Se determinó la capacidad de formación de biofilm de todas las cepas incluidas en el estudio a dos temperaturas, 37°C y 22°C, a las 24 y a las 96 horas de incubación en medio RPMI-1640 mediante la de terminación de la DO. El límite inferior de formación de biofilm medida por DO (BF-DO) se estableció como el valor de adherencia media a 24 horas (BF-DO+>0,13 para 37°C; BF-DO+>0,17 para 22°C).

En la Tabla 24 se expresaron los valores de formación de biofilm (DO) obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 37°C y 22°C, así como las desviaciones estándar correspondientes, a las 24 y las 96 horas de incubación. Para 37°C, 27 cepas fueron formadoras de biofilm a las 24 horas, con unos valores comprendidos entre 0,14±0,01 y 0,99±0,14 (valor medio: 0,52±0,29), y 28 para las 96 horas de incubación. A este tiempo, los valores estuvieron comprendidos entre 0,14±0,01 y 1,01±0,05 (valor medio: 0,48±0,27). Para 22°C, sólo 17 cepas fueron formadoras de biofilm a las 24

horas, con unos valores de biofilm comprendidos entre $0,18\pm 0,07$ y $0,75\pm 0,16$ (valor medio: $0,49\pm 0,22$), siendo 27 positivas para las 96 horas de incubación. A este tiempo, los valores estuvieron comprendidos entre $0,19\pm 0,11$ y $1,20\pm 0,01$ (valor medio: $0,68\pm 0,36$).

De la Figura 79 a la 82 se representó la comparación entre los resultados del biofilm formado a las 24 y 96 horas a 37°C y a 22°C , observándose un alto grado de correlación entre los dos tiempos de incubación ($R^2=0,816$ para 37°C ; $R^2=0,864$ para 22°C). Para todas las cepas, a 22°C la formación de biofilm fue mayor para las 96 horas.

De la Figura 83 a la 86 se mostró la comparación entre los resultados del biofilm formado a 37°C y a 22°C para los dos tiempos de incubación. Para las 24 horas de incubación la correlación fue $R^2=0,384$ considerando todas las cepas incluidas en el estudio. Cuando la correlación se realizó teniendo en cuenta sólo las cepas positivas para la formación de biofilm a las dos temperaturas, la correlación fue menor ($R^2=0,160$), sin encontrar diferencias estadísticamente significativa entre valores a este tiempo de incubación ($p=0,691$). Para las 96 horas, esta correlación fue $R^2=0,356$ considerando todas las cepas. Al utilizar sólo las cepas positivas para la formación de biofilm a las dos temperaturas, la correlación fue $R^2=0,202$.

En la Figura 87 se seleccionaron tres cepas representativas de los diferentes grados de producción de biofilm a ambas temperaturas de estudio. Así, como cepa no productora de biofilm se eligió la cepa 432, como cepa con producción intermedia de biofilm la cepa 429 y como cepa muy productora de biofilm la cepa 434.

Tabla 24. Medida de la formación de biofilm (D.O.) a las 24 horas y 96 horas, a 37°C-22°C.

CEPAS	37°C		22°C	
	Biofilm 24h-0h (X±DS)	Biofilm 96h-0h (X±DS)	Biofilm 24h-0h (X±DS)	Biofilm 96h-0h (X±DS)
CECT-1440	0,04 ± 0,01	0,21 ± 0,12	0,08 ± 0,04	0,15 ± 0,03
365	0,17 ± 0,05	0,28 ± 0,12	0,17 ± 0,03	0,62 ± 0,26
367	0,05 ± 0,02	0,13 ± 0,06	0,06 ± 0,03	0,09 ± 0,03
368	0,19 ± 0,04	0,21 ± 0,09	0,09 ± 0,01	0,32 ± 0,19
372	0,26 ± 0,06	0,23 ± 0,07	0,51 ± 0,13	0,79 ± 0,19
373	0,67 ± 0,21	0,78 ± 0,16	0,03 ± 0,01	0,21 ± 0,09
379	0,17 ± 0,05	0,19 ± 0,07	0,09 ± 0,04	0,42 ± 0,26
381	0,33 ± 0,04	0,40 ± 0,09	0,55 ± 0,09	0,89 ± 0,24
404	0,33 ± 0,15	0,44 ± 0,19	0,15 ± 0,04	0,47 ± 0,18
405	0,94 ± 0,07	1,01 ± 0,05	0,65 ± 0,07	1,15 ± 0,03
408	0,35 ± 0,14	0,37 ± 0,27	0,27 ± 0,14	0,32 ± 0,13
413	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,26 ± 0,05
416	0,80 ± 0,07	0,49 ± 0,16	0,32 ± 0,19	0,95 ± 0,17
419	0,67 ± 0,23	0,54 ± 0,16	0,07 ± 0,02	0,30 ± 0,13
421	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,27 ± 0,12	0,88 ± 0,29
429	0,39 ± 0,04	0,40 ± 0,05	0,16 ± 0,07	0,52 ± 0,24
432	0,22 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,02
434	0,82 ± 0,20	0,93 ± 0,08	0,54 ± 0,19	1,05 ± 0,03
435	0,26 ± 0,07	0,15 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,19 ± 0,11
436	0,27 ± 0,07	0,31 ± 0,12	0,27 ± 0,07	0,45 ± 0,23
438	0,55 ± 0,09	0,40 ± 0,09	0,70 ± 0,11	1,12 ± 0,13
440	0,52 ± 0,13	0,32 ± 0,16	0,70 ± 0,12	1,14 ± 0,06
441	0,78 ± 0,08	0,61 ± 0,15	0,75 ± 0,16	1,09 ± 0,06
442	0,73 ± 0,20	0,93 ± 0,08	0,18 ± 0,07	0,65 ± 0,28
443	0,72 ± 0,11	0,57 ± 0,13	0,18 ± 0,03	0,42 ± 0,10
444	0,98 ± 0,10	0,97 ± 0,12	0,75 ± 0,25	1,20 ± 0,04
445	0,74 ± 0,19	0,43 ± 0,13	0,19 ± 0,03	0,30 ± 0,09
446	0,89 ± 0,09	0,92 ± 0,10	0,71 ± 0,09	1,09 ± 0,14
447	0,99 ± 0,14	0,93 ± 0,10	0,74 ± 0,14	1,20 ± 0,01
448	0,11 ± 0,04	0,25 ± 0,09	0,12 ± 0,01	0,31 ± 0,22
Global (BF+)	0,52 ± 0,29	0,48 ± 0,27	0,49 ± 0,22	0,68 ± 0,36

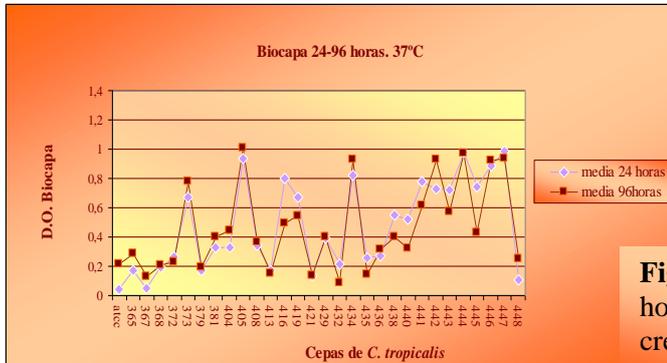


Fig 79. Formación de biocapa a las 24 y 96 horas a 37°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).

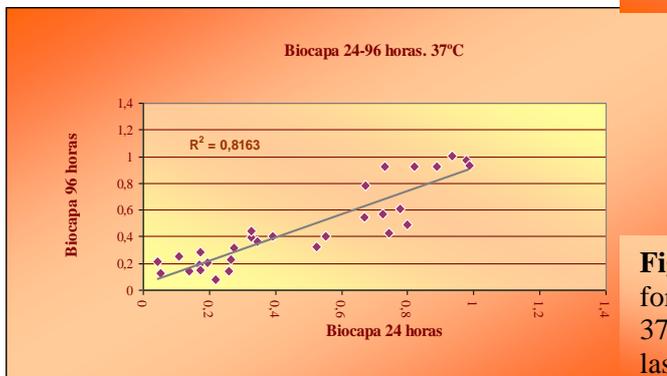


Fig 80. Estudio comparativo de la formación de biocapa a las 24 y 96 horas a 37°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).

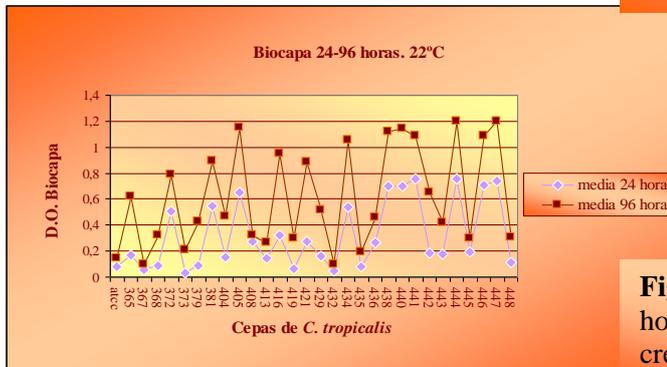


Fig 81. Formación de biocapa a las 24 y 96 horas a 22°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).

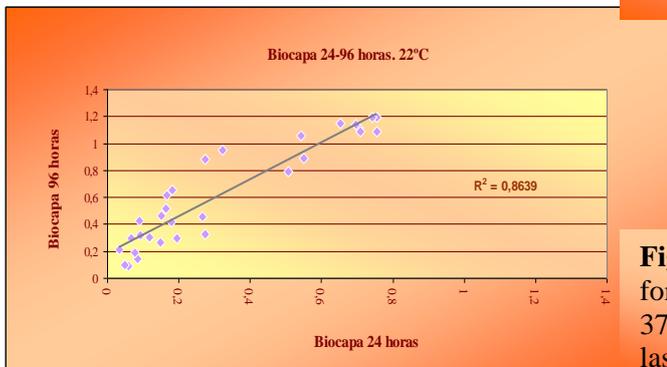


Fig 82. Estudio comparativo de la formación de biocapa a las 24 y 96 horas a 37°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).

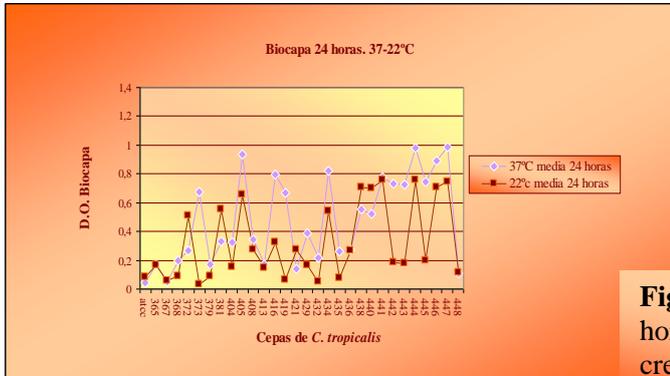


Fig 83. Formación de biocapa a las 24 horas a 37°C-22°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).

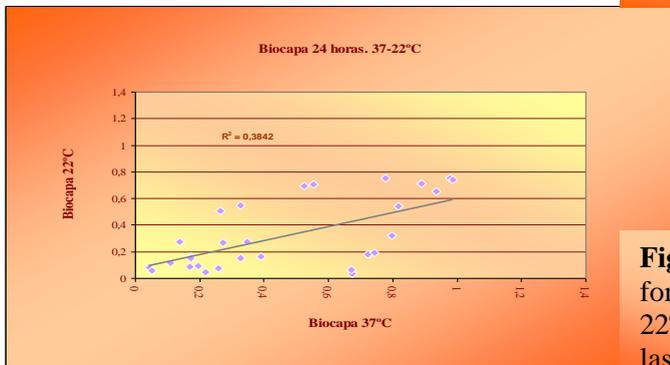


Fig 84. Estudio comparativo de la formación de biocapa a las 24 horas 37°C-22°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).

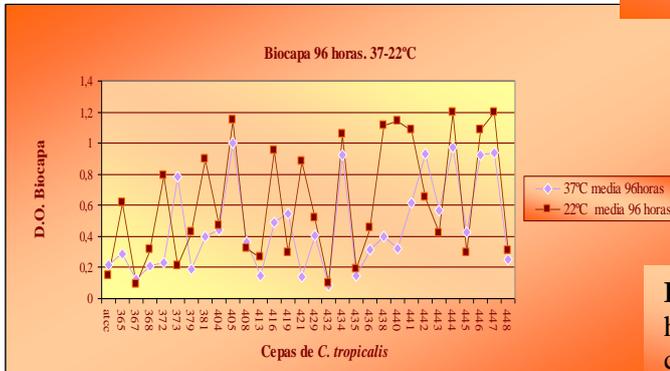


Fig 85. Formación de biocapa a las 96 horas a 37-22°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).

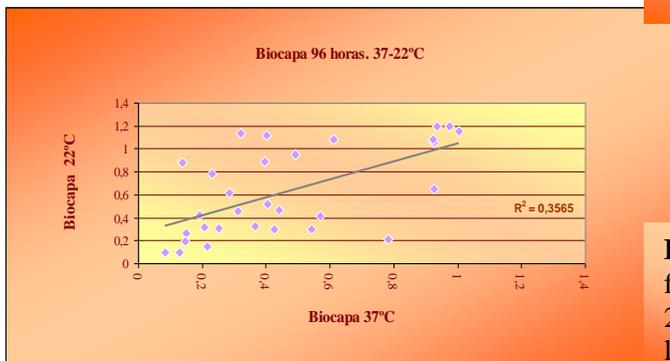


Fig 86. Estudio comparativo de la formación de biocapa a las 24 horas 37-22°C, no corregida con crecimiento. Todas las cepas (BF+ y BF-).

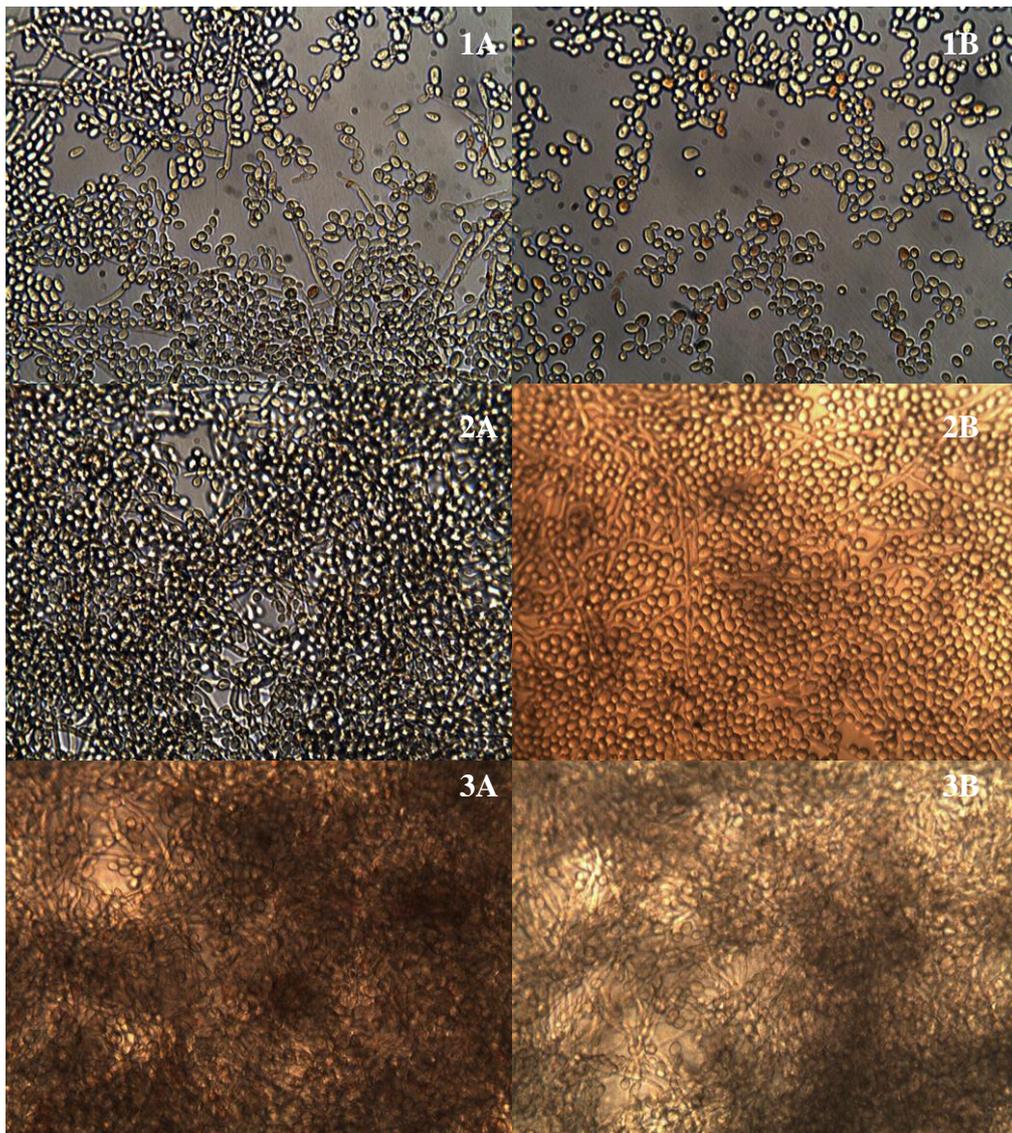


Fig 87. Representación de cepas no productoras de biofilm (1, cepa 432), cepas con producción intermedia (2, cepa 429) y cepas muy productoras de biofilm (3, cepa 434), a 37°C (A) y 22°C (B).

1. a. Comparación del biofilm formado (DO) por cepas urinarias frente a las no urinarias.

En la Figura 88 se representó la comparación entre los resultados del biofilm formado por las cepas de origen urinario frente a las de procedencia no urinaria a las 24 y a las 96 horas a 37°C y 22°C. A pesar de que la producción de biofilm resultó mayor para las cepas de procedencia urinaria, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las dos temperaturas (37°C y 24 horas, $p=0,152$; 37°C y 96 horas, $p=0,141$; 22°C y 24 horas, $p=0,065$; 22°C y 96 horas, $p=0,097$).

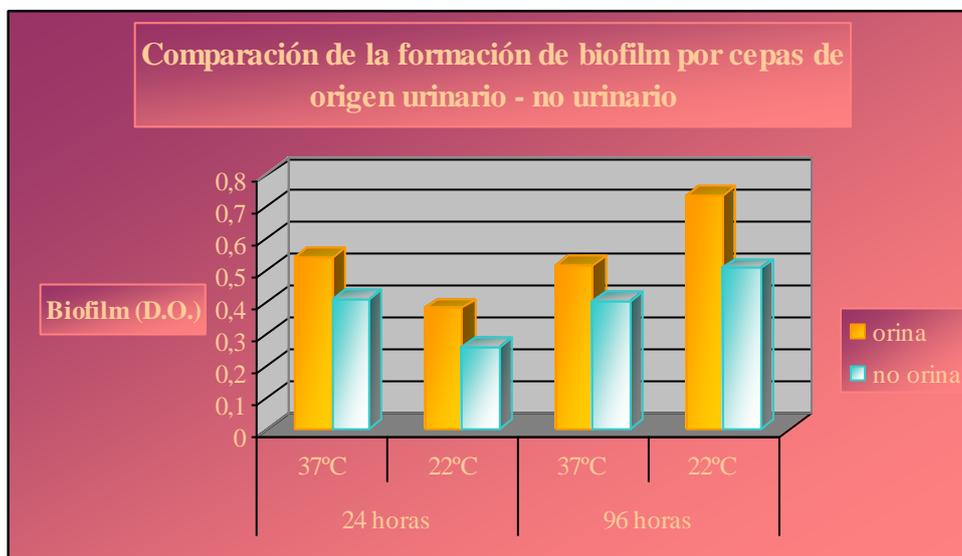


Fig 88. Comparación entre la formación de biofilm de cepas de procedencia urinaria frente a las de origen no urinario.

2. Determinación de la formación de biofilm mediante la medida del Índice de Slime (IS-DO).

La capacidad de formación de biofilm de todas las cepas incluidas en el estudio a dos temperaturas, 37°C y 22°C, a las 24 y a las 96 horas de incubación en medio RPMI-1640, se expresó como porcentaje mediante la utilización del Índice de Slime, que establece la relación entre el biofilm formado (DO) y el crecimiento del cultivo, mediante la siguiente fórmula:

$$IS = (\text{Biofilm/Crecimiento del cultivo}) \times 100$$

El Índice de Slime se utilizó por tanto como factor de corrección, con el fin de mejorar los valores obtenidos mediante la medida de la DO₄₉₂. El límite inferior positivo del Índice de Slime se estableció considerando el menor valor de Índice de Slime obtenido cuya cepa correspondiente había presentado previamente formación de biofilm positivo medido por DO (BF-DO) (IS-DO₊ ≥ 12,69 para 37°C, y IS-DO₊ ≥ 14,54 para 22°C).

En la Tabla 25 se expresaron los valores del Índice de Slime (IS-DO) obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 37°C y 22°C, así como las desviaciones estándar correspondientes a las 24 y las 96 horas de incubación. Para 37°C, 27 cepas fueron formadoras de biofilm a las 24

horas, con unos valores de Índice de Slime comprendidos entre $13,61 \pm 0,31$ y $109,82 \pm 3,16$ (valor medio: $55,43 \pm 30,46$), y 28 para las 96 horas de incubación. A este tiempo, los valores estuvieron comprendidos entre $12,69 \pm 0,98$ y $104,14 \pm 5,09$ (valor medio: $46,96 \pm 29,18$). Hasta el 76,92% de las cepas a las 24 horas presentaron valores de IS-DO+ mayores que para 96 horas. Para 22°C, 21 cepas fueron formadoras de biofilm a las 24 horas, con unos valores de Índice de Slime comprendidos entre $16,27 \pm 1,68$ y $110,75 \pm 3,01$ (valor medio: $56,21 \pm 35,23$), y 27 para las 96 horas de incubación, con valores comprendidos entre $14,54 \pm 8,64$ y $122,13 \pm 38,05$ (valor medio: $57,25 \pm 33,23$).

De la Figura 88 a la 91 se representó la comparación entre los resultados del biofilm formado a las 24 y 96 horas a 37°C y a 22°C, observándose un alto grado de correlación entre los dos tiempos de incubación para las dos temperaturas estudiadas ($R^2=0,889$; para 37°C; $R^2=0,888$ para 22°C).

De la Figura 92 a la 95 se representó la comparación entre los resultados del biofilm formado a 37°C y 22°C para los dos tiempos de incubación, observándose una correlación de $R^2=0,469$ para las 24 horas y de $R^2=0,421$ para las 96 horas, considerando todas las cepas. Cuando la correlación se realizó teniendo en cuenta sólo las cepas positivas para la formación de biofilm a las dos temperaturas, la correlación fue menor ($R^2=0,43$ para 24 horas; $R^2=0,34$ para 96 horas).

Tabla 25. Medida de la formación del biofilm (Índice de Slime) a las 24 horas y 96 horas, a 37°C y 22°C.

CEPAS	37°C		22°C	
	Biofilm-IS 24 h (X±DS)	Biofilm-IS 96 h (X±DS)	Biofilm-IS 24 h (X±DS)	Biofilm-IS 96 h (X±DS)
CECT-1440	4,51 ± 0,54	14,37 ± 13,39	8,22 ± 2,21	11,63 ± 2,03
365	26,28 ± 15,09	29,48 ± 13,12	21,04 ± 8,29	52,02 ± 26,14
367	5,51 ± 1,26	8,61 ± 6,15	6,91 ± 2,73	7,15 ± 1,95
368	28,82 ± 6,89	21,42 ± 9,03	10,50 ± 1,51	25,89 ± 17,95
372	30,36 ± 6,94	22,73 ± 6,95	68,33 ± 22,31	66,88 ± 17,68
373	73,91 ± 21,19	78,62 ± 18,90	8,61 ± 1,71	18,29 ± 5,78
379	23,42 ± 16,44	17,67 ± 6,95	8,95 ± 3,40	33,30 ± 22,48
381	34,67 ± 3,72	36,06 ± 6,81	63,94 ± 12,59	72,99 ± 18,53
404	32,13 ± 16,89	38,29 ± 17,80	16,75 ± 3,91	35,26 ± 14,54
405	109,82 ± 3,16	104,14 ± 5,09	110,75 ± 3,01	102,35 ± 3,26
408	34,25 ± 18,21	33,57 ± 26,12	31,28 ± 20,38	25,85 ± 9,96
413	16,07 ± 2,07	13,30 ± 2,82	16,27 ± 1,68	19,60 ± 1,47
416	73,00 ± 7,88	44,61 ± 16,30	37,45 ± 14,75	78,66 ± 15,39
419	69,24 ± 25,35	54,52 ± 17,91	8,40 ± 0,50	24,66 ± 10,09
421	13,61 ± 0,31	12,69 ± 0,98	38,92 ± 14,82	72,20 ± 15,55
429	39,78 ± 4,16	35,61 ± 4,01	22,98 ± 7,60	40,80 ± 20,66
432	21,10 ± 3,11	7,52 ± 2,42	5,35 ± 1,22	7,50 ± 1,39
434	102,28 ± 3,32	95,38 ± 2,97	86,61 ± 9,94	98,74 ± 4,04
435	24,30 ± 4,75	13,73 ± 2,98	8,05 ± 2,09	14,54 ± 8,65
436	29,89 ± 10,28	29,94 ± 13,14	29,53 ± 10,65	37,37 ± 21,07
438	60,27 ± 11,12	39,17 ± 10,32	94,00 ± 8,93	94,29 ± 8,82
440	55,05 ± 11,33	31,88 ± 16,12	88,87 ± 0,89	94,46 ± 4,06
441	91,48 ± 10,78	64,71 ± 4,18	95,86 ± 15,36	97,56 ± 1,67
442	70,94 ± 28,10	67,65 ± 32,72	22,07 ± 3,93	50,92 ± 22,07
443	74,00 ± 6,79	53,19 ± 8,89	17,84 ± 2,10	31,57 ± 7,50
444	96,99 ± 6,50	91,84 ± 8,27	103,07 ± 2,07	98,47 ± 2,71
445	72,15 ± 19,75	39,41 ± 10,48	22,95 ± 4,22	23,46 ± 6,37
446	101,74 ± 5,27	93,90 ± 2,62	89,70 ± 11,07	90,43 ± 13,77
447	91,10 ± 11,00	84,00 ± 10,05	102,16 ± 3,54	122,13 ± 38,05
448	10,63 ± 1,42	16,51 ± 11,70	11,17 ± 2,10	23,14 ± 13,80
Global (IS-DO+)	55,43 ± 30,46	46,96 ± 29,18	56,21 ± 35,23	57,25 ± 33,23

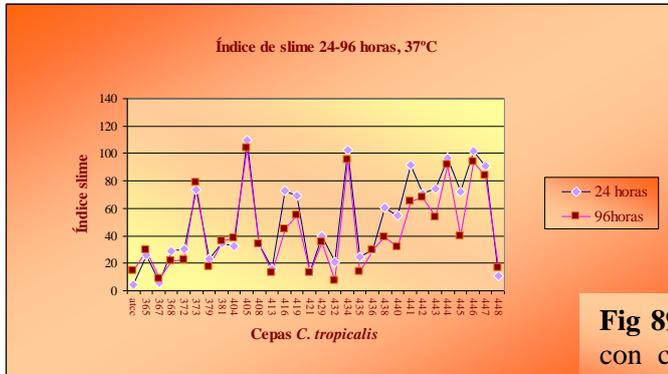


Fig 89. Índice de slime (biofilm corregido con crecimiento) a las 24 y 96 horas a 37°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

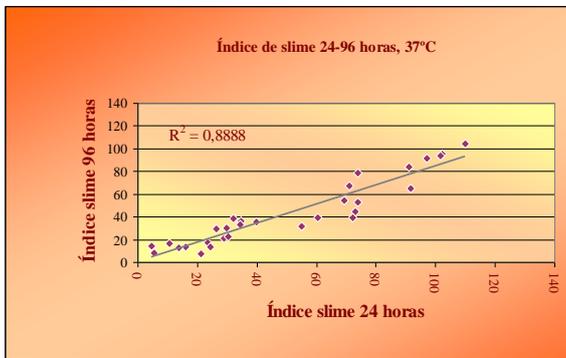


Fig 90. Estudio comparativo de índice de slime a las 24 y 96 horas a 37°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

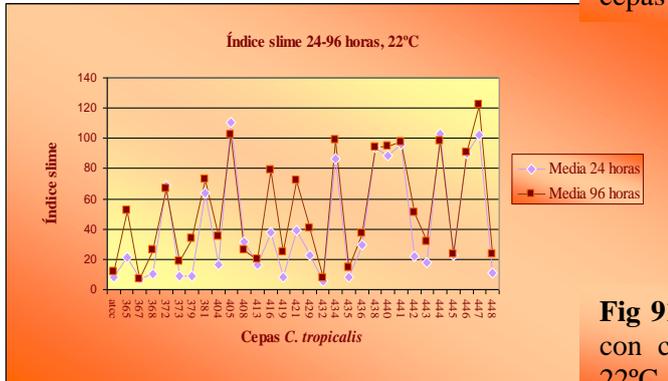


Fig 91. Índice de slime (biofilm corregido con crecimiento) a las 24 y 96 horas a 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

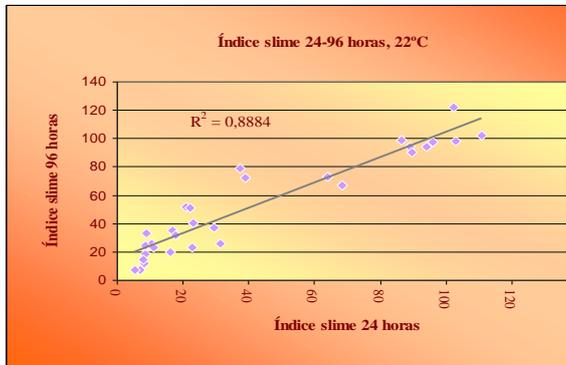


Fig 92. Estudio comparativo de índice de slime a las 24 y 96 horas a 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

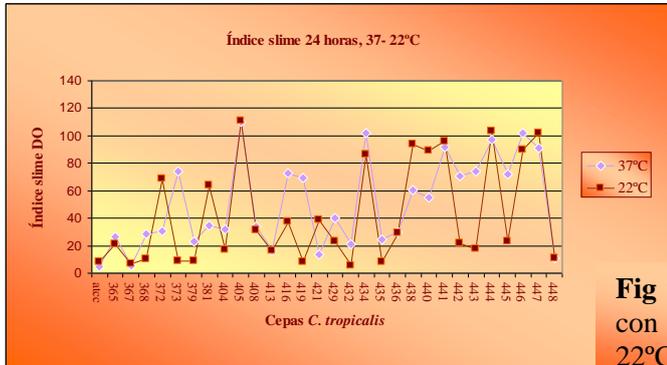


Fig 93. Índice de slime (biofilm corregido con crecimiento) a las 24 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

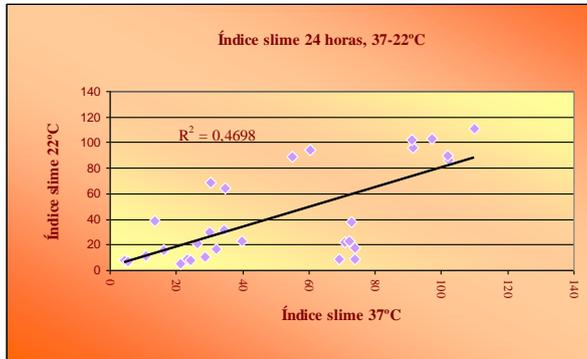


Fig 94. Estudio comparativo de índice de slime a las 24 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

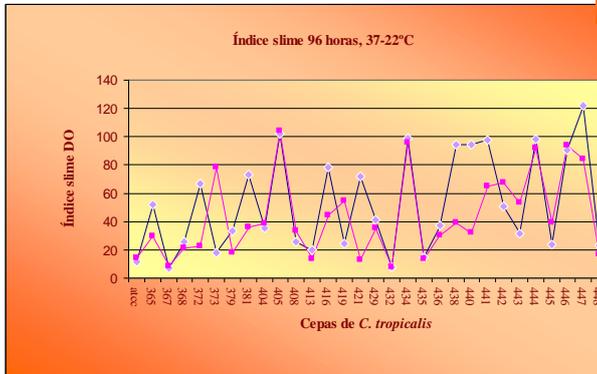


Fig 95. Índice de slime (biofilm corregido con crecimiento) a las 96 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

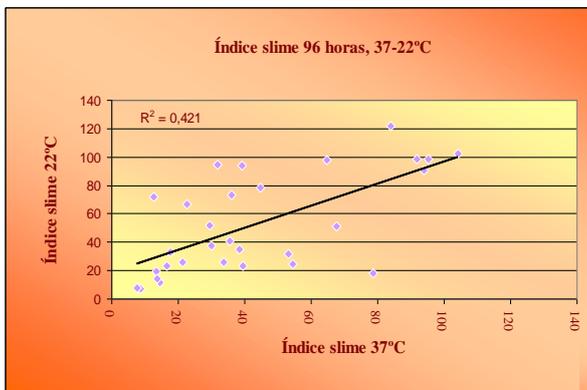


Fig 96. Estudio comparativo de índice de slime a las 96 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

2. a. Comparación del biofilm formado (IS-DO) por cepas urinarias frente a las no urinarias.

En la Figura 97 se representó la comparación entre los resultados del biofilm formado (IS-DO) por las cepas de procedencia urinaria con respecto a las cepas de origen no urinario a las 24 y 96 horas, a 37°C y 22°C. Se observó una mayor producción en cepas de origen urinario, encontrándose diferencias estadísticamente significativas sólo para 22°C y 24 horas (37°C y 24 horas, $p=0,130$; 37°C y 96 horas, $p=0,141$; 22°C y 24 horas, $p=0,029$; 22°C y 96 horas, $p=0,093$).

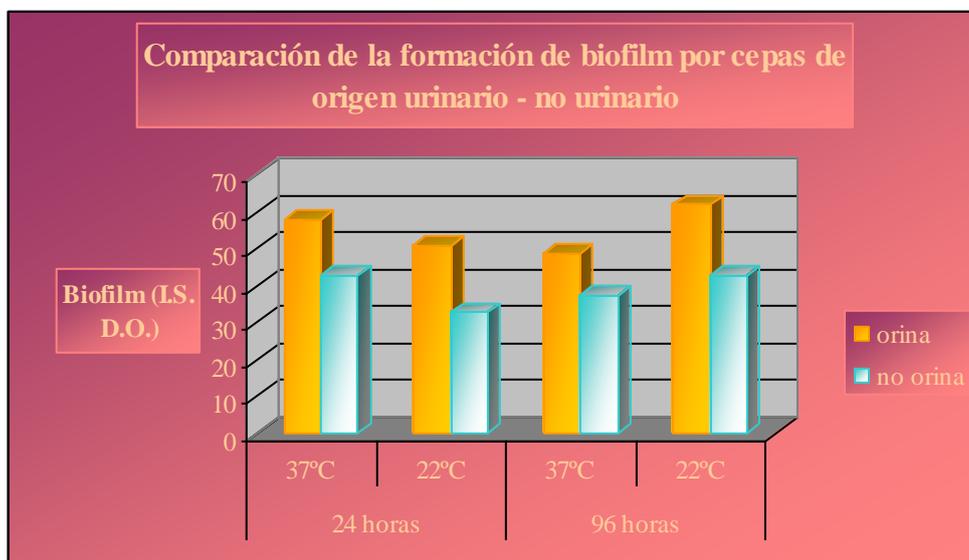


Fig 97. Comparación de la formación de biofilm (IS-OD) en cepas de origen urinario en relación con las de origen no urinario a 37°C y 22°C.

3. Determinación de la formación de biofilm mediante la medida de la actividad mitocondrial del biofilm (XTT).

La actividad metabólica del biofilm formado por todas las cepas incluidas en el estudio a dos temperaturas, 37°C y 22°C, a las 24 y a las 96 horas de incubación en medio RPMI-1640, se determinó mediante la utilización del método colorimétrico basado en la reducción del XTT.

El límite inferior positivo de la actividad metabólica del biofilm (BF-XTT+) se definió como el menor valor obtenido por la reducción del XTT obtenido cuya cepa correspondiente había presentado previamente formación de biofilm positivo medido por DO (BF-XTT+ \geq 0,20 para 37°C, y BF-XTT+ \geq 0,34 para 22°C).

En la Tabla 26 se expresaron los valores de la actividad metabólica del biofilm (BF-XTT+) obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 37°C y 22°C, así como las desviaciones estándar correspondientes a las 24 y las 96 horas de incubación. Para 37°C, 28 cepas fueron formadoras de biofilm a las 24 horas, con unos valores de actividad metabólica del biofilm comprendidos entre 0,35 \pm 0,09 y 2,14 \pm 0,25 (valor medio: 1,03 \pm 0,47), y 29 para las 96 horas de incubación. A este tiempo, los valores estuvieron comprendidos entre 0,20 \pm 0,22 y 1,25 \pm 0,17 (valor medio: 0,60 \pm 0,29). Para 22°C, 20 cepas fueron formadoras de biofilm a las 24 horas, con unos valores de actividad metabólica comprendidos entre 0,34 \pm 0,12 y 2,41 \pm 0,53

(valor medio: $1,07 \pm 0,61$), y 30 para las 96 horas de incubación. A este tiempo, los valores estuvieron comprendidos entre $0,38 \pm 0,27$ y $2,37 \pm 0,18$ (valor medio: $1,03 \pm 0,63$).

De la Figura 98 a la 101 se representó la comparación entre los resultados de la actividad metabólica del biofilm formado a las 24 y 96 horas a 37°C y a 22°C, observándose un buen grado de correlación entre los dos tiempos de incubación ($R^2=0,641$ para 37°C; $R^2=0,844$ para 22°C). Calculando la correlación sólo con las cepas positivas (BF-XTT+) los valores resultantes fueron algo menor $R^2=0,582$ para 37°C y $R^2=0,807$ para 22°C.

De la Figura 102 a la 106 se mostró la comparación entre los resultados del biofilm formado a 37 y 22°C para los dos tiempos de incubación. Para las 24 horas se observó una correlación entre las dos temperaturas de incubación de $R^2=0,568$ al considerar todas las cepas. Cuando la correlación se realizó teniendo en cuenta sólo las cepas que fueron positivas para la formación de biofilm a las dos temperaturas, la correlación fue menor ($R^2=0,465$), sin encontrar diferencias estadísticamente significativa entre valores a este tiempo de incubación ($p>0,05$). Para las 96 horas, la correlación fue de $R^2=0,285$, considerando todas las cepas. Valorando sólo las cepas positivas para la formación de biofilm a las dos temperaturas la correlación fue $R^2=0,276$.

Tabla 26. Medida de la actividad mitocondrial del biofilm (XTT) a las 24 horas y 96 horas, a 37°C y 22°C.

CEPAS	37°C		22°C	
	Biofilm-XTT 24h (X±DS)	Biofilm-XTT 96h (X±DS)	Biofilm-XTT 24h (X±DS)	Biofilm-XTT 96h (X±DS)
CECT-1440	0,19 ± 0,06	0,20 ± 0,22	0,20 ± 0,11	0,40 ± 0,22
365	0,50 ± 0,11	0,31 ± 0,13	0,33 ± 0,12	0,70 ± 0,13
367	0,16 ± 0,07	0,12 ± 0,11	0,35 ± 0,39	0,63 ± 0,47
368	0,51 ± 0,07	0,27 ± 0,12	0,31 ± 0,20	0,74 ± 0,33
372	0,63 ± 0,12	0,32 ± 0,13	0,79 ± 0,12	1,02 ± 0,22
373	1,28 ± 0,38	0,88 ± 0,46	0,10 ± 0,01	0,62 ± 0,33
379	0,39 ± 0,23	0,42 ± 0,19	0,30 ± 0,21	0,47 ± 0,14
381	0,89 ± 0,20	0,55 ± 0,31	1,53 ± 0,15	1,08 ± 0,85
404	0,70 ± 0,27	0,80 ± 0,41	0,32 ± 0,19	0,46 ± 0,36
405	1,72 ± 0,27	0,85 ± 0,42	1,15 ± 0,21	1,11 ± 0,83
408	0,64 ± 0,25	0,44 ± 0,31	0,66 ± 0,12	0,52 ± 0,39
413	0,76 ± 0,07	0,44 ± 0,31	0,68 ± 0,23	0,38 ± 0,27
416	1,24 ± 0,12	0,77 ± 0,25	0,65 ± 0,31	1,04 ± 0,18
419	1,06 ± 0,36	0,54 ± 0,13	0,21 ± 0,14	0,55 ± 0,14
421	0,81 ± 0,21	0,37 ± 0,23	1,18 ± 0,36	1,67 ± 0,51
429	1,15 ± 0,23	0,36 ± 0,19	0,65 ± 0,32	0,73 ± 0,29
432	0,53 ± 0,12	0,53 ± 0,53	0,16 ± 0,13	0,67 ± 0,43
434	1,36 ± 0,13	1,09 ± 0,13	1,10 ± 0,78	1,51 ± 0,27
435	0,50 ± 0,17	0,26 ± 0,10	0,31 ± 0,30	0,42 ± 0,16
436	1,07 ± 0,21	0,44 ± 0,21	0,94 ± 0,19	1,05 ± 0,20
438	1,32 ± 0,28	0,51 ± 0,23	1,40 ± 0,31	2,00 ± 0,41
440	1,15 ± 0,29	0,43 ± 0,21	1,44 ± 0,37	2,10 ± 0,16
441	2,14 ± 0,25	0,83 ± 0,26	2,41 ± 0,53	2,37 ± 0,18
442	1,11 ± 0,43	0,89 ± 0,36	0,39 ± 0,18	0,82 ± 0,21
443	1,07 ± 0,21	0,69 ± 0,14	0,41 ± 0,19	0,65 ± 0,08
444	2,00 ± 0,38	1,25 ± 0,17	2,16 ± 0,73	2,26 ± 0,21
445	1,10 ± 0,33	0,56 ± 0,10	0,34 ± 0,12	0,49 ± 0,07
446	1,32 ± 0,09	1,08 ± 0,14	1,28 ± 0,22	1,70 ± 0,33
447	1,66 ± 0,06	1,12 ± 0,22	1,96 ± 0,23	2,23 ± 0,16
448	0,35 ± 0,09	0,28 ± 0,20	0,27 ± 0,14	0,61 ± 0,12
Global (BF-XTT+)	1,03 ± 0,47	0,60 ± 0,29	1,07 ± 0,61	1,03 ± 0,63

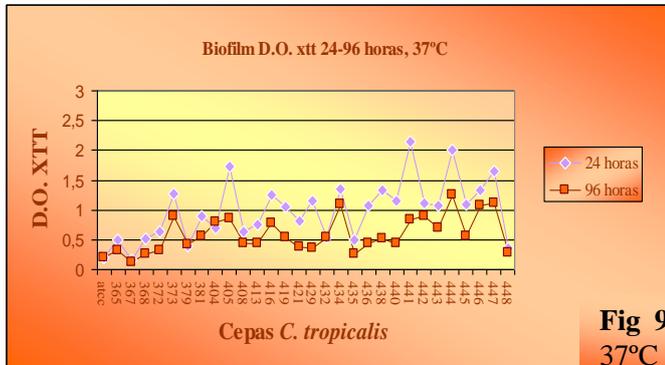


Fig 98. D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 37°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).

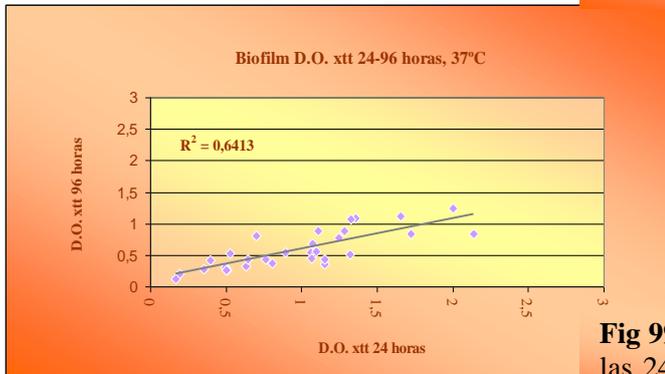


Fig 99. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 37°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

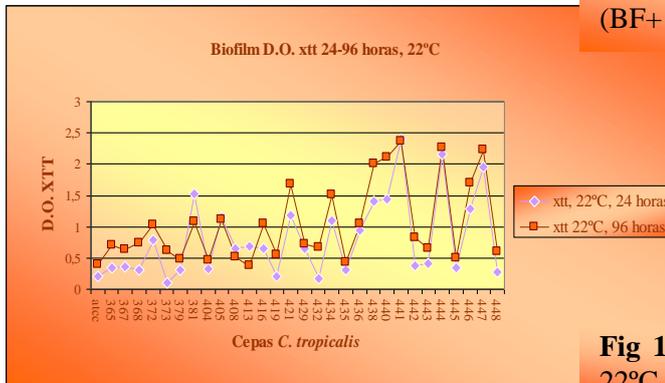


Fig 100. D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 22°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).

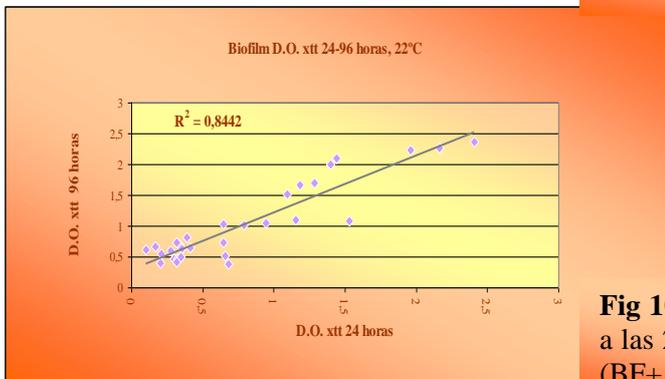


Fig 101. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

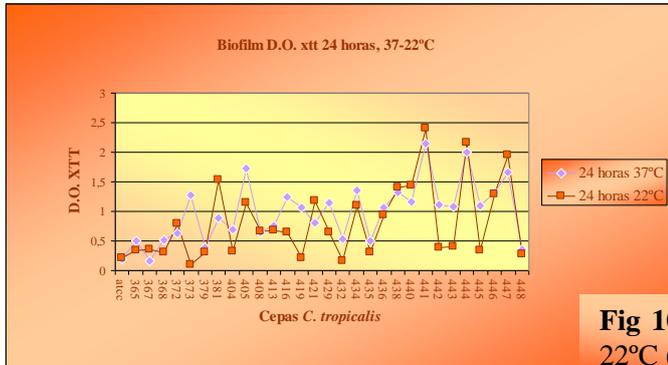


Fig 102. D.O.XTT a las 24 horas a 37°C-22°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).

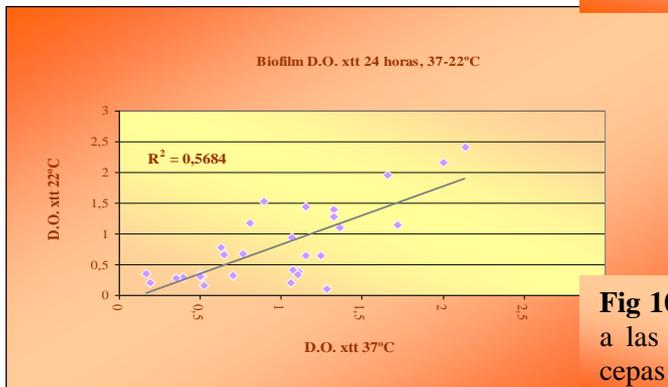


Fig 103. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 24 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

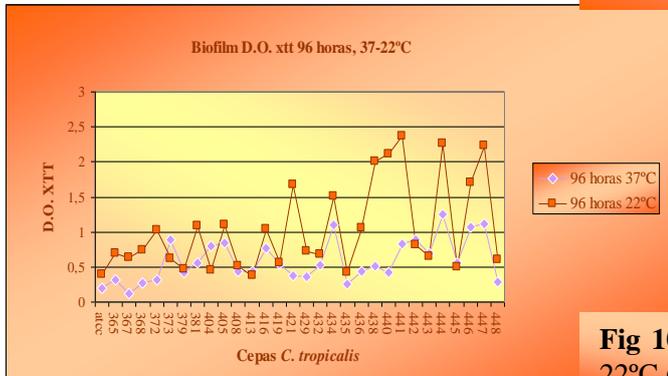


Fig 104. D.O.XTT a las 96 horas a 37°C-22°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).

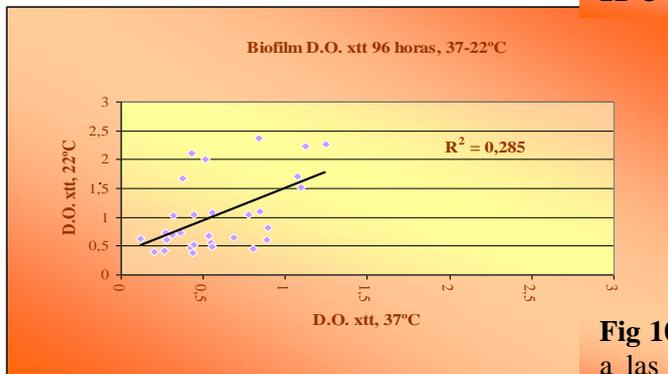


Fig 105. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 96 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

3. a. Comparación de la actividad metabólica del biofilm formado por cepas urinarias frente a las no urinarias.

En la Figura 106 se representó la comparación entre los resultados de la actividad metabólica del biofilm formado (XTT) a las 24 y 96 horas, a 37 y 22°C de las cepas de procedencia urinaria con respecto a las cepas de origen no urinario. Se observó una mayor actividad en cepas de origen urinario, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los casos estudiados (37°C y 24 horas, $p=0,051$; 37°C y 96 horas, $p=0,272$; 22°C y 24 horas, $p=0,101$; 22°C y 96 horas, $p=0,071$).

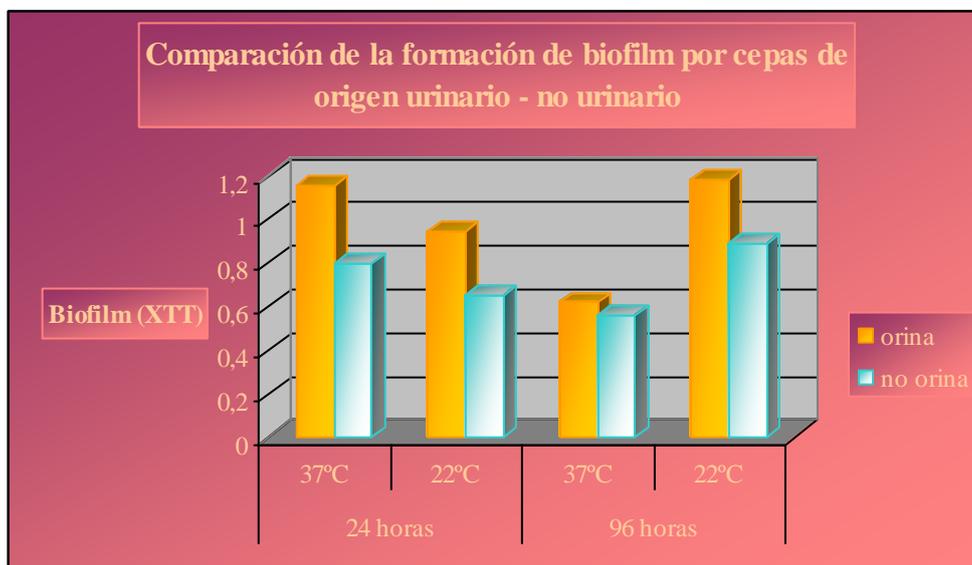


Fig 106. Comparación de la actividad del biofilm (XTT) de cepas urinaria y no urinarias a 37°C y 22°C.

4. Determinación de la formación de biofilm mediante la medida del Índice de Slime de la actividad mitocondrial del biofilm (XTT).

La determinación de la actividad metabólica mitocondrial del biofilm formado por todas las cepas incluidas en el estudio a dos temperaturas, 37°C y 22°C, a las 24 y a las 96 horas de incubación en medio RPMI-1640, se expresó como porcentaje mediante la utilización del Índice de Slime, que establece la relación entre la actividad metabólica del biofilm formado (DO-XTT) y el crecimiento del cultivo, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IS-XTT} = (\text{Biofilm (BF-XTT)}/\text{Crecimiento del cultivo}) \times 100$$

El Índice de Slime-XTT se utilizó por tanto como factor de corrección, con el fin de mejorar los valores obtenidos mediante la medida de la DO₄₉₂-XTT. El límite inferior positivo del Índice de Slime-XTT se estableció considerando el menor valor de Índice de Slime-XTT obtenido cuya cepa correspondiente había presentado previamente formación de biofilm positivo medido por BF-XTT (IS-XTT_{+≥}15,94 para 37°C, y IS-XTT_{+≥}31,01 para 22°C).

En la Tabla 27 se expresaron los valores del Índice de Slime-XTT (IS-XTT) obtenidos tras hallar las medias resultantes de los distintos experimentos realizados como mínimo por triplicado a 37°C y 22°C, así como las desviaciones estándar correspondientes a las 24 y las 96 horas de incubación. Para 37°C, 30 cepas fueron formadoras de biofilm a las 24 horas, con unos valores de Índice de Slime-XTT comprendidos entre 18,72±9,09 y 253,63±42,08 (valor medio: 104,13±57,17), y 29 para las 96 horas de incubación. A este tiempo, los valores estuvieron comprendidos entre 15,94±18,36 y 118,62±22,62 (valor medio: 57,93±29,54). Para 22°C, 23 cepas fueron formadoras de biofilm a las 24 horas, con unos valores de Índice de Slime-XTT comprendidos entre 33,93±17,37 y 305,62±52,97 (valor medio: 125,88±86,44), y 29 para las 96 horas de incubación. A este tiempo, los valores estuvieron comprendidos entre 31,01±15,94 y 226,74±70,73 (valor medio: 93,73±58,74).

De la Figura 107 a la 110 se representó la comparación entre los resultados del biofilm formado a las 24 y 96 horas a 37°C y a 22°C, , observándose un alto grado de correlación entre los dos tiempos de incubación ($R^2=0,669$ para 37°C; $R^2=0,933$ para 22°C).

De la Figura 111 a la 114 se representó la comparación entre los resultados del biofilm formado a 37°C y 22°C para los dos tiempos de incubación, observándose una correlación de $R^2=0,608$ para las 24 horas y de $R^2=0,354$ para las 96 horas considerando todas las cepas. Cuando la correlación se realizó teniendo en cuenta sólo las cepas que fueron positivas para la formación de biofilm a las dos temperaturas, la correlación fue similar ($R^2=0,626$ para 24 horas; $R^2=0,317$ para 96 horas).

Tabla 27. Medida de la actividad del biofilm (Índice de Slime-XTT) a las 24 y 96 horas, a 37°C y 22°C.

CEPAS	37°C		22°C	
	Biofilm IS-XTT 24 h (X±DS)	Biofilm IS-XTT 96h (X±DS)	Biofilm IS-XTT 24 h (X±DS)	Biofilm IS-XTT 96 h (X±DS)
CECT-1440	21,02 ± 8,53	15,94 ± 18,36	21,04 ± 9,18	30,77 ± 18,43
365	50,70 ± 10,83	32,10 ± 14,86	40,16 ± 9,90	57,94 ± 10,37
367	18,72 ± 9,09	10,58 ± 9,92	38,63 ± 42,45	48,74 ± 41,57
368	62,58 ± 4,25	27,84 ± 13,50	33,93 ± 17,37	60,07 ± 32,64
372	72,84 ± 18,75	31,83 ± 14,62	105,12 ± 24,01	86,97 ± 21,09
373	140,87 ± 40,42	90,05 ± 55,99	25,08 ± 1,62	54,03 ± 34,73
379	42,92 ± 31,65	37,37 ± 13,08	28,89 ± 19,51	31,01 ± 15,94
381	95,31 ± 29,58	49,95 ± 30,69	176,33 ± 16,49	135,15 ± 28,56
404	68,09 ± 25,04	70,18 ± 40,44	35,06 ± 19,37	51,25 ± 15,32
405	202,50 ± 38,25	87,65 ± 48,01	194,84 ± 21,44	147,92 ± 3,02
408	63,57 ± 31,31	40,52 ± 32,35	73,81 ± 15,83	60,93 ± 7,79
413	70,64 ± 1,81	39,72 ± 32,36	73,73 ± 19,57	40,69 ± 6,70
416	113,94 ± 14,94	70,58 ± 24,83	75,87 ± 27,43	85,21 ± 6,97
419	109,76 ± 41,60	54,21 ± 8,20	24,85 ± 12,62	45,31 ± 9,75
421	81,77 ± 28,97	34,26 ± 24,27	164,35 ± 19,46	135,34 ± 38,42
429	117,13 ± 26,24	31,36 ± 18,42	91,14 ± 32,56	56,66 ± 22,66
432	51,09 ± 13,06	49,66 ± 56,49	20,43 ± 12,90	53,44 ± 3 8,43
434	178,06 ± 47,43	113,24 ± 18,32	155,00 ± 112,70	140,83 ± 21,15
435	47,09 ± 15,31	24,66 ± 10,48	30,98 ± 21,01	32,11 ± 13,25
436	116,53 ± 33,99	42,85 ± 23,64	101,71 ± 14,29	85,61 ± 16,53
438	144,94 ± 39,89	50,43 ± 25,31	190,55 ± 39,36	168,74 ± 28,48
440	121,59 ± 20,80	42,83 ± 23,13	185,59 ± 16,44	174,84 ± 14,92
441	253,63 ± 42,08	88,29 ± 25,85	305,62 ± 52,97	213,03 ± 15,04
442	119,26 ± 50,07	84,01 ± 36,56	45,20 ± 7,05	63,89 ± 16,11
443	109,83 ± 18,15	64,97 ± 15,10	39,82 ± 15,62	49,04 ± 4,05
444	200,30 ± 48,53	118,62 ± 22,62	295,21 ± 9,74	185,73 ± 13,99
445	107,73 ± 38,50	51,63 ± 0,28	39,15 ± 6,76	39,33 ± 4,80
446	153,70 ± 27,55	109,97 ± 18,91	162,01 ± 19,90	141,78 ± 31,46
447	153,56 ± 9,85	100,83 ± 22,57	272,46 ± 25,40	226,74 ± 70,73
448	34,18 ± 5,98	24,35 ± 19,84	24,78 ± 11,41	45,70 ± 4,08
Global (IS-XTT)	104,13 ± 57,17	57,93±29,54	125,88±86,44	93,73 ±58,74

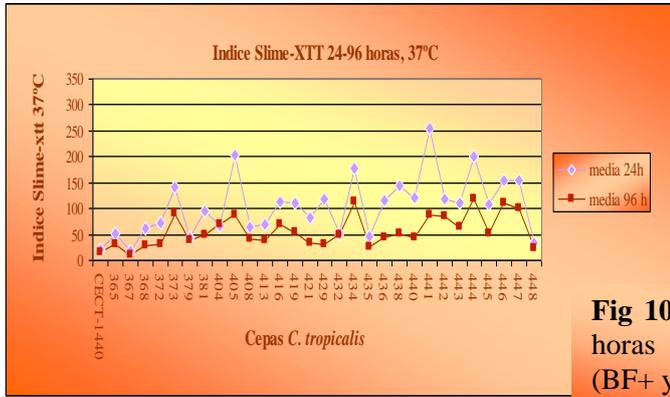


Fig 107. Índice Slime-XTT a las 24 y 96 horas a 37°C. Todas las cepas. (BF+ y BF-).

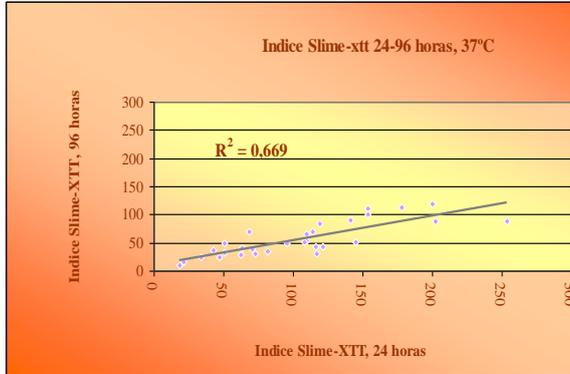


Fig 108. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 37°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

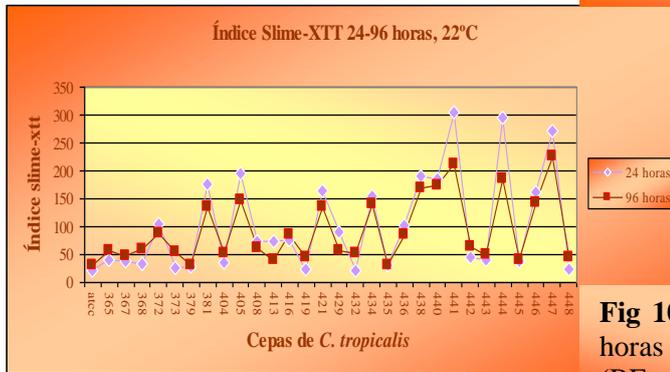


Fig 109. Índice Slime-XTT a las 24 y 96 horas a 22°C. Todas las cepas. (BF+ y BF-).

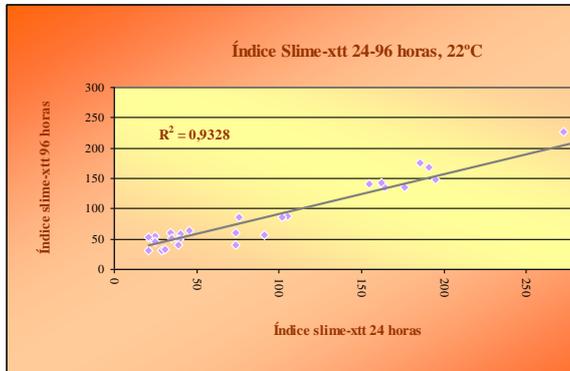


Fig 110. Estudio comparativo de D.O.XTT a las 24 y 96 horas a 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

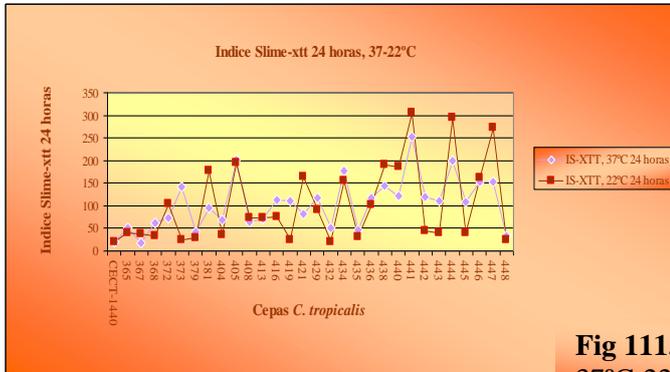


Fig 111. Indice Slime-XTT a las 24 horas a 37°C-22°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).

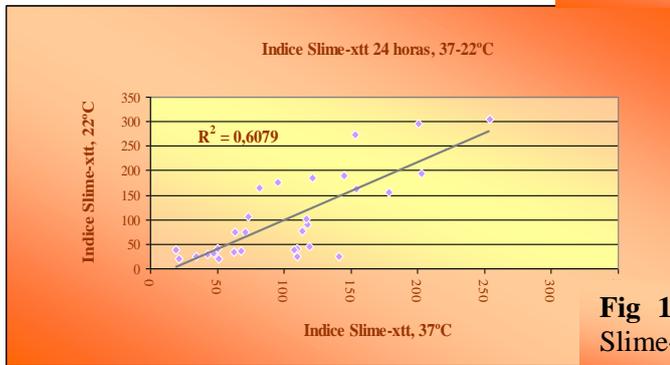


Fig 112. Estudio comparativo de Indice Slime-XTT a las 24 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

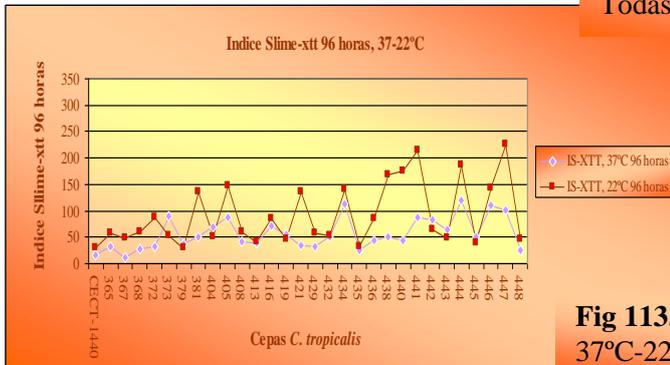


Fig 113. Indice Slime-XTT a las 96 horas a 37°C-22°C (todas las cepas) (BF+ y BF-).

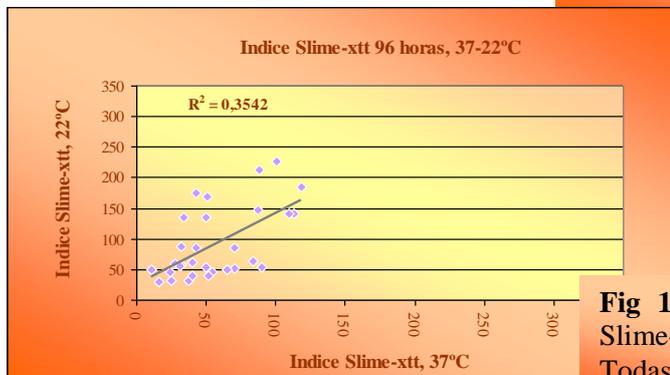


Fig 114. Estudio comparativo de Indice Slime-XTT a las 96 horas a 37°C y 22°C. Todas las cepas (BF+ y BF-).

4. a. Comparación del Índice de Slime de la actividad mitocondrial del biofilm formado por cepas urinarias frente a las no urinarias.

En la figura 115 se representó la comparación entre los resultados del biofilm formado (IS-XTT) a las 24 y 96 horas, a 37 y 22°C de las cepas de procedencia urinaria con respecto a las cepas de origen no urinario. Se observó una mayor actividad corregida por crecimiento (IS-XTT) en cepas de origen urinario, pero sólo para 37°C y 24 horas la diferencia resultó estadísticamente significativa (37°C y 24 horas, $p=0,033$; 37°C y 96 horas, $p=0,503$; 22°C y 24 horas, $p=0,054$; 22°C y 96 horas, $p=0,054$).

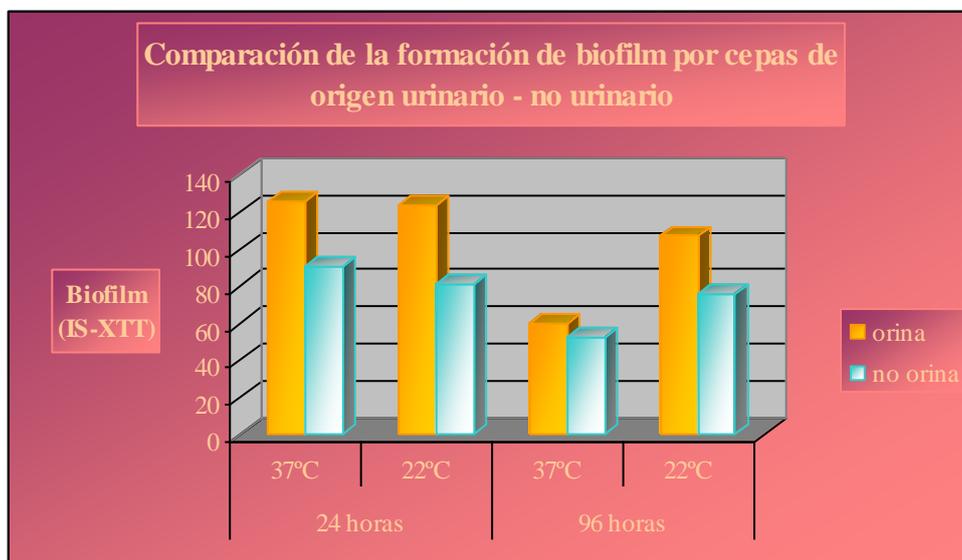


Fig 115. Comparación de la actividad del biofilm de cepas de origen urinario y no urinario a 37°C y 22°C.

4.4.2.2. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre placas de poliestireno utilizando como medio de cultivo orina artificial.

Se procedió a la realización del estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre placas de microtitulación de poliestireno a las 24 horas de incubación a 37°C de tres cepas de *C. tropicalis* procedentes de pacientes con candiduria (cepas 368, 441, 442), y de la cepa control CECT-1440, siguiendo el mismo método que el utilizado en el apartado anterior, pero usando orina artificial estéril como medio de cultivo. Estas cepas se escogieron como representación de cepas poco productoras o muy productoras de biofilm detectadas previamente en placas de microtitulación en medio RPMI-1640.

Se estableció la determinación de la formación de biofilm mediante la medida de la DO, así como mediante la corrección de ésta por el crecimiento, determinando el IS (IS-DO). El límite inferior de formación de biofilm se estableció al igual que en el apartado anterior con el valor de adherencia media a las 24 horas (BF-DO+>0,13).

En orina artificial, sólo dos de las cuatro cepas estudiadas fueron productoras de biofilm (cepas 368 y 441). El Índice de Slime de las cepas productoras de biofilm fue de 49,15 y 75,17%, respectivamente. La tercera cepa (cepa 442) y la control no fueron productoras de BF (DO=0,05-0,12; IS=35,53-43,21%, respectivamente).

A su vez, se procedió a la realización del estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre placas de microtitulación de poliestireno a las 24 horas de incubación a 37°C de las mismas tres cepas de *C. tropicalis* utilizadas anteriormente, procedentes de pacientes con candiduria, utilizando medio RPMI-1460 como medio de cultivo. Al igual que en el caso previo, el límite inferior de formación de biofilm se estableció con el valor de adherencia media a las 24 horas ($BF-DO+>0,13$). Utilizando este método, tres de las cuatro cepas fueron productoras de biofilm. La cepa control resultó no formadora de biofilm. Estos datos, así como los obtenidos en el párrafo anterior se resumieron en la Tabla 28 y en las Figuras 116.

Tabla 28. Crecimiento, formación de biofilm e Índice Slime en placa de poliestireno a las 24 h de incubación en orina artificial y en medio RPMI-1460.

CEPAS	CECT-1440	368	441	442
Orina artificial				
Crecimiento Media±DS	0,15±0,05	0,31±0,02	0,24±0,02	0,28±0,04
Biofilm Media±DS	0,05±0,02	0,15±0,05	0,18±0,07	0,12±0,04
Índice slime	35,53	49,15	75,17	43,21
RPMI-1460				
Crecimiento Media±DS	0,97±0,08	1,05±0,03	0,97±0,05	1,07±0,07
Biofilm Media±DS	0,05±0,02	0,17±0,05	0,81±0,06	0,68±0,17
Índice slime	4,98	16,59	83,00	63,92

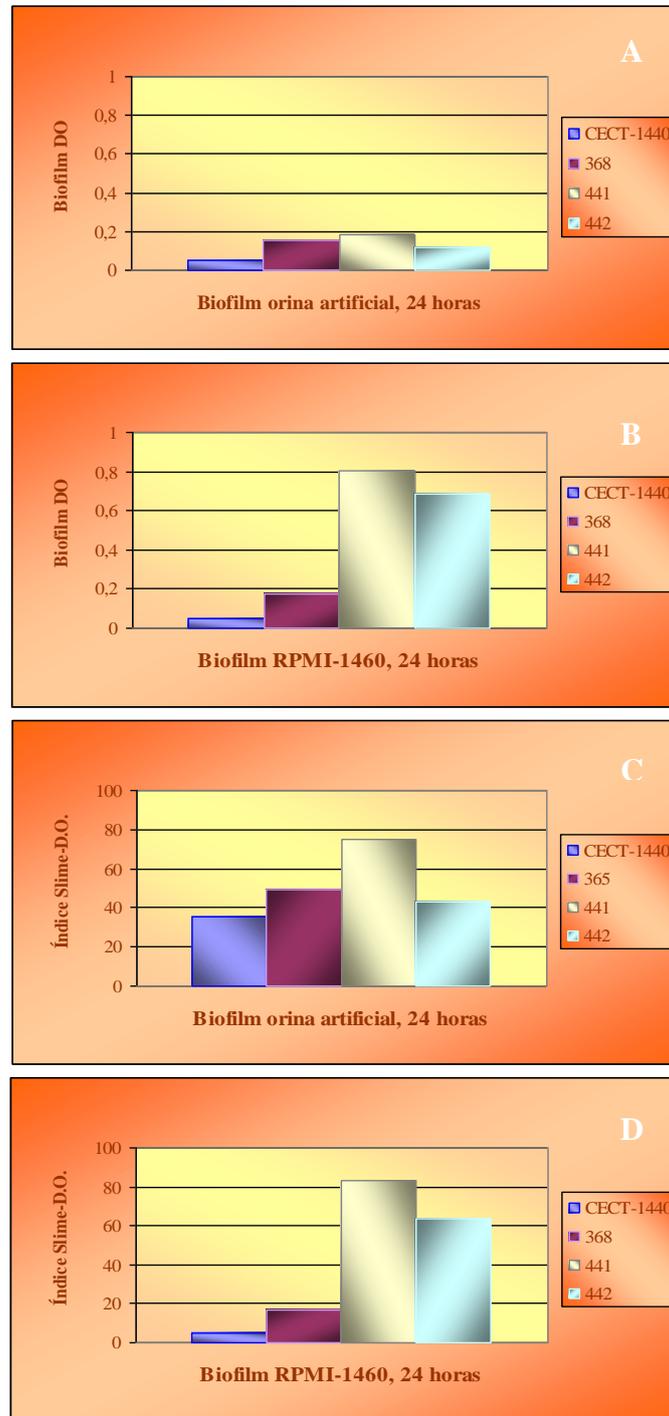


Fig 116. Formación de biofilm e Índice de Slime a las 24 horas de incubación en placas de poliestireno a 37°C incubadas en orina artificial (A y C) y en medio RPMI-1440 (B y D).

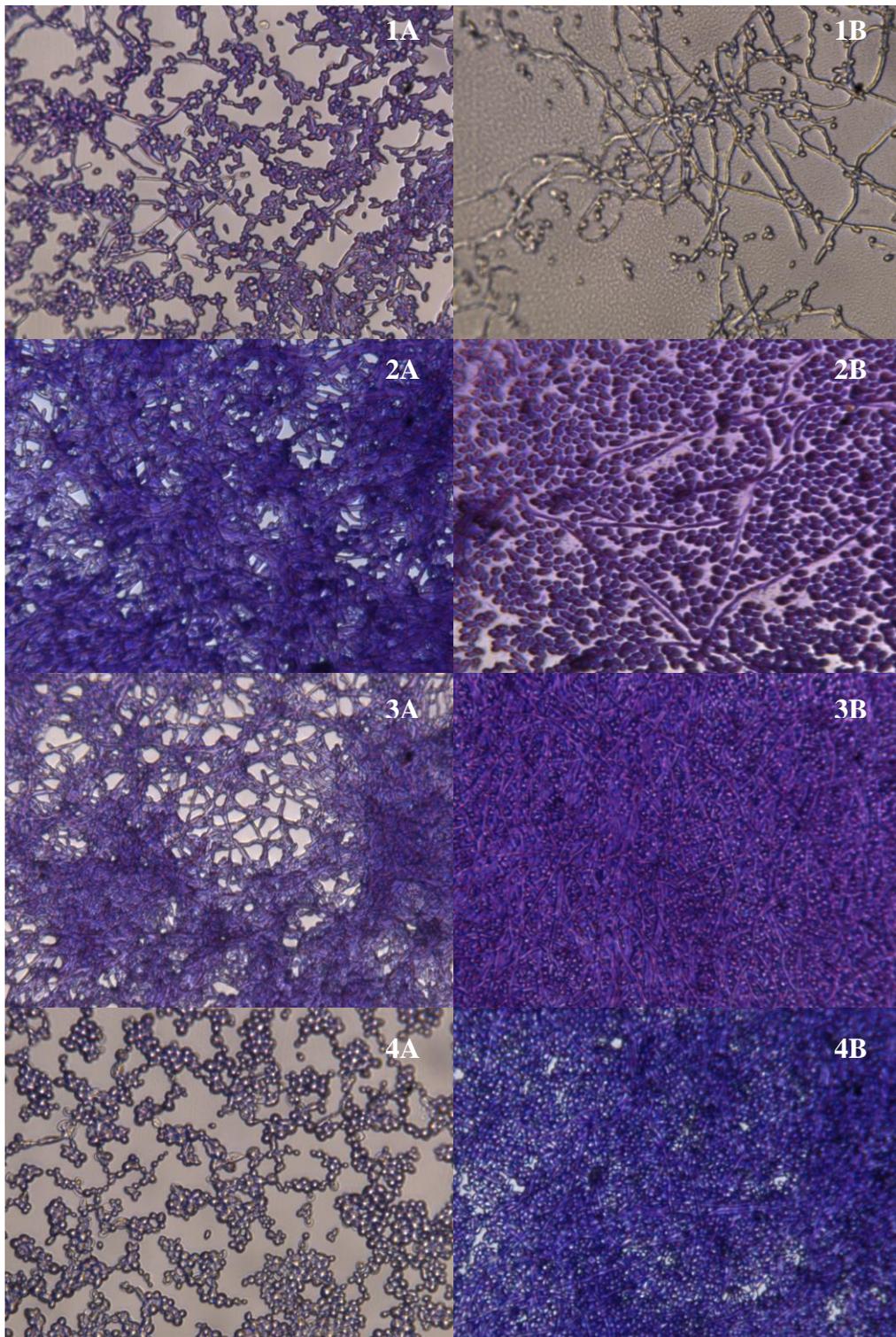


Fig 117. Formación de biofilm utilizando medio de cultivo orina artificial (A) o medio RPMI-1640 (B) a 37°C, 24 horas. Cepas CECT-1440 (1), 368 (2), 441 (3) y 442 (4).

4.4.2.3. Estudio de la capacidad de formación de biofilm sobre catéter Foley bajo condiciones de flujo continuo de orina artificial y su determinación por UFC/ml.

Se procedió a la realización del estudio de la capacidad de formación de biofilm en catéteres urinarios de látex (sondas Foley) de las mismas tres cepas de *C. tropicalis* procedentes de pacientes con candiduria de los apartados anteriores, así como de la cepa patrón, utilizando como medio de cultivo orina artificial estéril. Posteriormente, se determinó el número de UFC recuperadas tras el raspado del biofilm formado en el interior del mismo. Dos de las cuatro cepas estudiadas fueron productoras de biofilm. La formación de biofilm en el catéter Foley tuvo unos valores de DO₅₇₀ de 0,07 y de 0,11, oscilando el recuento de las UFC/ml entre 0,643E+04 y 2,42E+04 (Tabla 29, Figuras 118 y 119). Las dos cepas formadoras de biofilm presentaron el menor recuento de UFC/ml.

Tabla 29. Formación de biofilm en catéter Foley a 37°C en orina artificial estéril. Resultados ELISA (Cristal violeta 1%) y recuento de UFC/ml.

CEPAS	CECT-1440	368	441	442
Biofilm en catéter con orina artificial Media±DS	0,03±0,01	0,07±0,01	0,11±0,02	0,02±0,03
Recuento de UFC/ml Media±DS	2,42E+04± 4,88E+02	6,43E+03± 2,83E+03	9,53E+03± 4,54E+03	1,78E+04± 7,84E+02

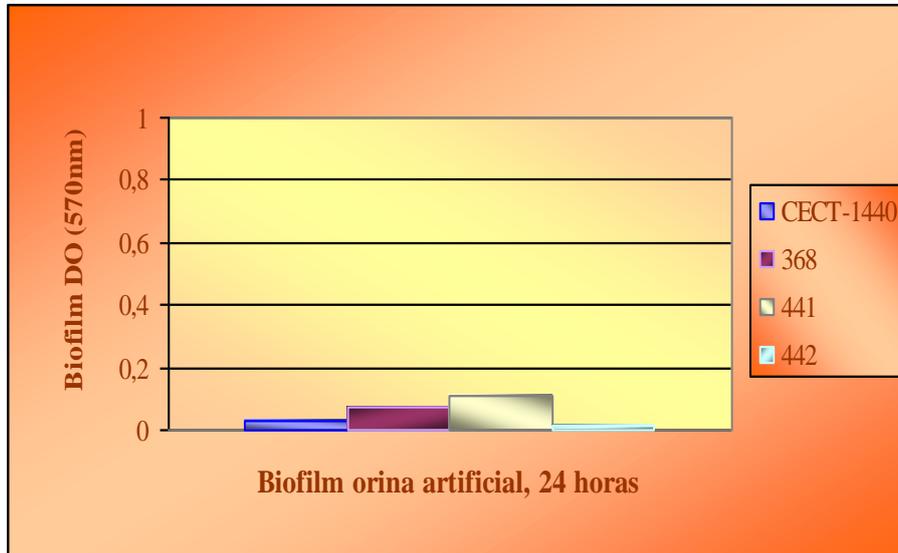


Fig 118. Formación de biofilm en catéteres Foley a 37°C en orina artificial.

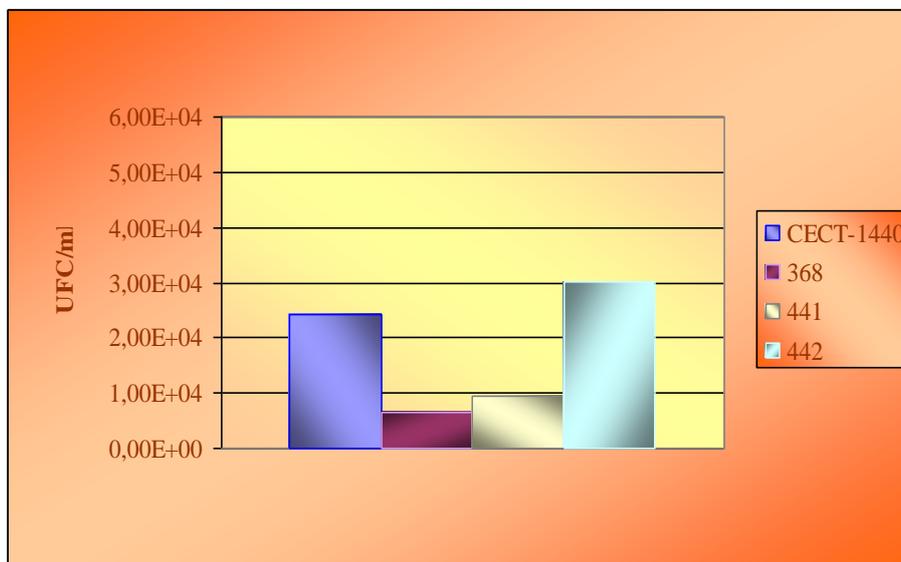


Fig 119. Recuento de unidades formadoras de colonia por mililitro, catéter Foley.

4.4.2.4.Comparación de la capacidad de formación de biofilm de aislamientos de *C. tropicalis* de origen urinario en catéteres Foley y en placas de poliestireno.

Se estableció la comparación entre la capacidad de formación de biofilm en catéteres urinarios de látex (sondas Foley) de las tres cepas de *C. tropicalis* procedentes de pacientes con candiduria de los apartados anteriores utilizando como medio de cultivo orina artificial estéril frente a la determinación del biofilm formado sobre placas de microtitulación de poliestireno utilizando orina artificial estéril y medio RPMI-1640.

Se observó cómo la formación de biofilm fue variable entre las diferentes cepas así como en relación con el medio de cultivo utilizado. Utilizando orina artificial estéril como medio de cultivo se obtuvieron resultados similares usando ambos métodos, tanto en el catéter Foley como en las placas de microtitulación de poliestireno, siendo dos de las cuatro cepas estudiadas productoras de biofilm (cepas 368 y 441). A diferencia de lo ocurrido anteriormente, los resultados obtenidos en placas de microtitulación de poliestireno utilizando como medio de cultivo RPMI-1640 no fueron superponibles con los resultados obtenidos con la formación de biofilm en catéteres Foley con orina artificial estéril como medio de cultivo. Las dos cepas productoras de biofilm en orina también fueron formadoras de biofilm en RPMI-1640. En este medio, la tercera cepa no productora de biofilm en orina sí resultó positiva. La cepa patrón no produjo biofilm en ningún caso. Estos datos se resumieron en las Figuras 120 y 121.

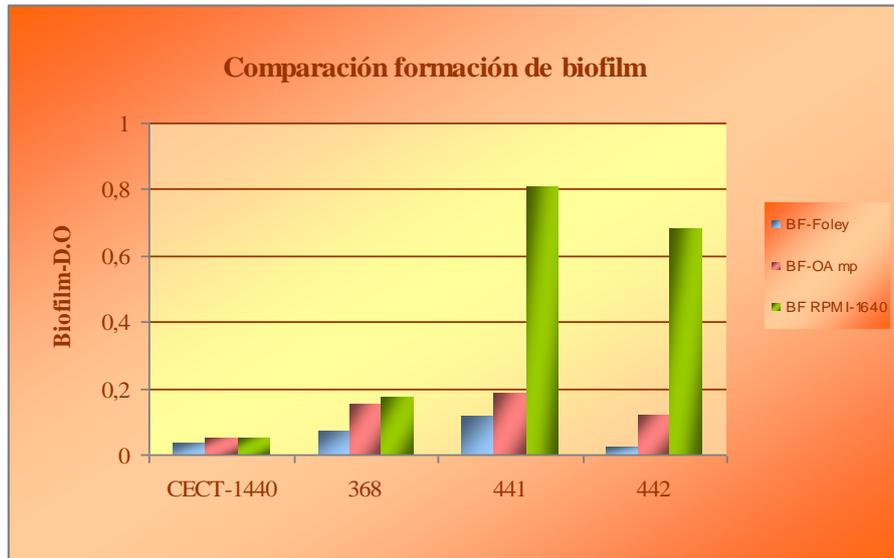


Fig 120. Formación de biofilm en catéter urinario (BF-Foley) y en placa de microtitulación en orina artificial (BF-OA mp) o en medio RPMI-1640 (BF RPMI-1460).

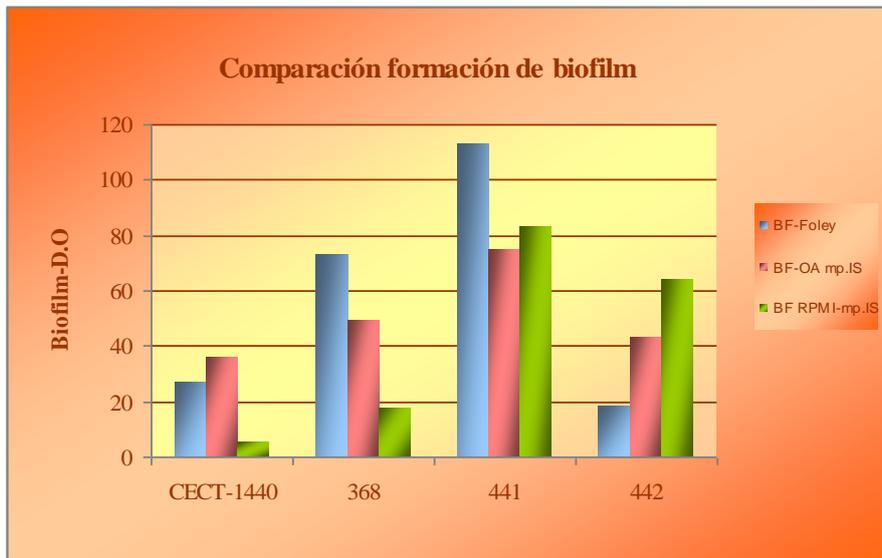


Fig 121. Representación de la formación de biofilm en catéter urinario (BF-Foley) y en placa de microtitulación en orina artificial (BF-OA mpIS) o en medio RPMI-1640 (BF-RPMI mp IS), en función del índice de Slime.

4.4.3. Estudio de la adherencia específica. Cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en células sésiles.

Se estableció la cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en células sésiles de biofilm de *C. tropicalis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, con el uso de sondas SYBR® Green. Se escogieron ocho cepas, cuatro de ellas muy formadoras de biofilm (cepas 373, 405, 441, 445) y las otras cuatro poco productoras de biofilm (cepas 408, 438, 440, 448). Se determinaron la media y desviación estándar de los diferentes experimentos.

En la Tabla 30 se representaron los valores de la media del porcentaje de la expresión del gen *ALS1*, sin resta de los valores del housekeeping ni de su calibrador. En la Figura 122 se representó la expresión de la proteína Alst1 en células sésiles de *C. tropicalis* y su comparación entre cepas con alta o baja producción de biofilm. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Tabla 30. Cuantificación de la expresión de la proteína Ast1 en células sésiles de distintas cepas de *C. tropicalis*. Valores netos.

Cepas de <i>C. tropicalis</i>	X±DS
	373 19,06±0,52
Muy productoras de biofilm	405 17,35±1,25
	441 16,49±0,57
	445 17,33±0,49
	408 17,38±0,52
Poco productoras de biofilm	438 18,31±1,03
	440 17,22±0,36
	448 18,86±0,36

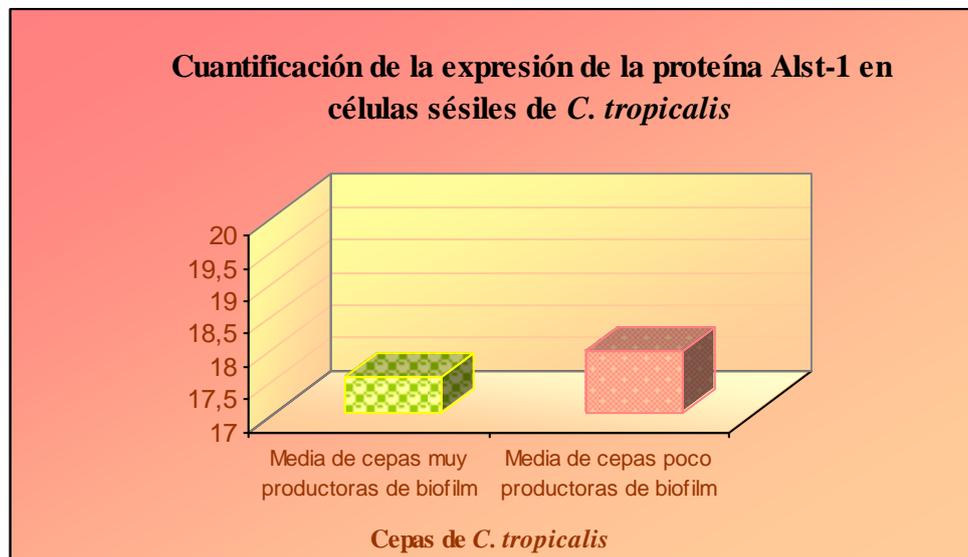


Fig 122. Cuantificación de la expresión de la proteína Alst1 en células sésiles de cepas de *C. tropicalis* muy productoras o poco productoras de biofilm.

4.4.3.1. Comparación de la expresión de la proteína Alst1 en células planctónicas y en células sésiles.

Se procedió a la comparación de la expresión de la proteína Alst1 en células planctónicas y en células sésiles de biofilm, determinándose el número de veces que se expresan en mayor proporción en células sésiles en relación con las células planctónicas, una vez restados los valores del housekeeping y de los valores del calibrador correspondiente a cada cepa, reflejándose los resultados obtenidos en la Tabla 31.

Para todas las cepas de *C. tropicalis* estudiadas se observó una sobreexpresión de la proteína Alst1 en las células del biofilm, presentando variación en función de la cepa utilizada, siendo 1,67 y 6,59 respectivamente, el menor y el mayor valor de número de veces expresada en el biofilm con respecto a sus correspondientes planctónicas. La media de la sobreexpresión de proteína Alst1 en el biofilm con respecto a las correspondientes planctónicas fue de $4,52 \pm 1,83$. Los resultados se representaron en la Figura 123. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas muy formadoras y las poco formadoras de biofilm.

Tabla 31. Expresión de la proteína Alst1 en células sésiles de biofilm con respecto a sus correspondientes planctónicas.

Cepas de <i>C. tropicalis</i>	Planctónicas	Sésiles X±DS	
	373	1	6,59±2,57
Muy productoras de biofilm	405	1	1,67±0,32
	441	1	3,98±2,26
	445	1	3,53±0,39
Poco productoras de biofilm	408	1	5,94±4,52
	438	1	3,51±2,14
	440	1	7,05±0,72
	448	1	3,91±4,38

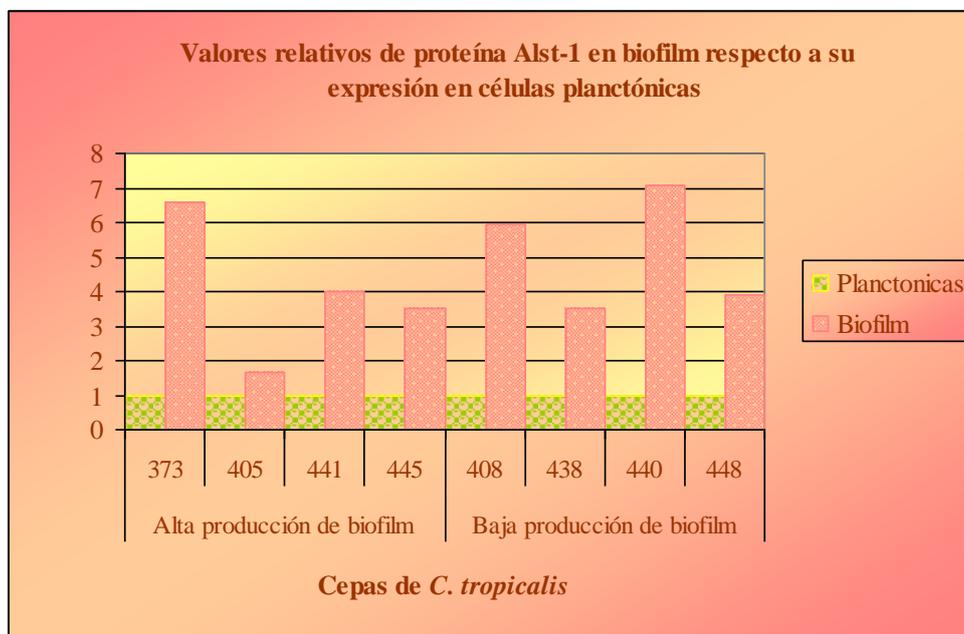


Fig 123. Expresión de la proteína Alst1 en células sésiles de biofilm en relación a sus correspondientes planctónicas.

4.5. Cambios morfológicos y capacidad de conjugación

4.5.1. Dimorfismo. Capacidad de filamentación.

Según su capacidad de filamentación, las cepas de *C. tropicalis* incluidas en el estudio se clasificaron en cuatro niveles: nivel 0, cepas no formadoras de filamentos (-), nivel 1, cepas con formación de escasos filamentos (+/-), nivel 2, cepas con formación de filamentos (+) y nivel 3, cepas con formación de alto número de filamentos (++) .

En la Tabla 32 se recogieron los resultados de la capacidad de filamentación determinada en medio RPMI-1640, expresando los cambios producidos según la diferente temperatura, y los distintos niveles de filamentación. El grado de filamentación en medio RPMI-1640 fue muy variable en función de la temperatura y del tiempo de incubación. El mayor grado de filamentación se alcanzó a las 96 horas a 37°C, estando a esta temperatura el 70% de las cepas clasificadas en el nivel 3, mientras que el sólo el 13,3% de las cepas se incluyó en este grupo al realizar el estudio a 22°C. No fue posible detectar formas filamentosas en cuatro cepas a las dos temperaturas y tiempos, y para dos cepas y para la cepa control (incluida en el nivel 1), el grado de filamentación permaneció estable para ambas temperaturas. El menor grado de filamentación se obtuvo a las 24 horas a 22°C, presentando en este tiempo el 56,6% de las cepas filamentación nula (nivel de filamentación 0). Estos porcentajes se recogieron en la Tabla 33.

Tabla 32. Niveles de filamentación a las 24 y 96 horas, a 37°C y 22°C.

CEPAS	24 horas		96 horas	
	37°C	22°C	37°C	22°C
CECT 1440	1	1	1	1
365	0	0	3	0
367	0	0	1	0
368	0	0	3	1
372	1	1	3	3
373	1	0	3	3
379	0	0	0	0
381	3	3	3	3
404	2	0	3	0
405	2	2	3	3
408	2	2	3	1
413	2	0	3	1
416	3	3	3	2
419	3	0	3	0
421	1	1	3	2
429	2	0	3	1
432	0	0	0	0
434	3	2	3	1
435	1	0	0	0
436	2	0	3	0
438	1	0	3	1
440	3	2	3	1
441	3	1	3	2
442	3	1	3	0
443	2	3	3	0
444	2	2	2	2
445	2	0	2	0
446	0	0	0	0
447	3	0	3	1
448	0	0	0	0

Tabla 33. Clasificación en niveles de la capacidad de filamentación a 37°C y 22°C.

Filamentación	37°C				22°C			
Niveles de filamentación	3 (++)	2 (+)	1 (+/-)	0 (-)	3 (++)	2 (+)	1 (+/-)	0 (-)
24 horas	26,7%	30,0%	20,0%	23,3%	10%	16,7%	16,7%	56,6%
96 horas	70%	6,7%	6,7%	16,6%	13,3%	13,3%	30%	43,4%

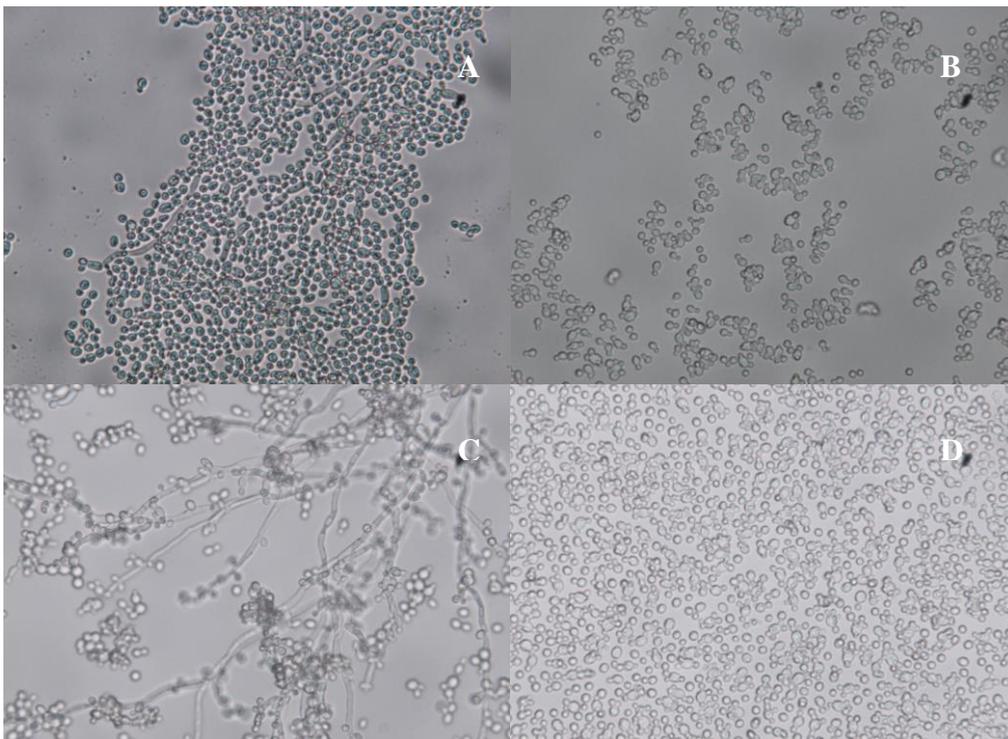


Fig 124. Estudio de filamentación a 37°C (A,C) y 22°C (B,D) a las 24 (A,B) y 96 horas (C,D).

4.5.2. Determinación de la capacidad de “switching”.

La capacidad de “switching” se realizó según el método descrito por Anderson y Soll, 1987, con la utilización del medio descrito por Lee *et al.*, 1975. Se estudiaron los diferentes morfotipos de las colonias de las cepas incubadas a 25°C en ausencia y en presencia de CO₂ al 5%.

La variabilidad morfológica de las cepas de *C. tropicalis* del estudio fue clasificada según los diferentes morfotipos de colonias descritos por Soll *et al.*, 1988, aunque con modificaciones en función de la variedad de morfologías de colonias encontradas. Así, para el estudio realizado sin CO₂, se estableció la clasificación de las colonias según las siguientes morfologías:

1. Colonias elevadas, lisas, oscuras.
2. Colonias elevadas, lisas, con centro oscuro y borde más claro.
3. Colonias elevadas, lisas, oscuras, con micelio aéreo (filamentos).
4. Colonias elevadas, lisas, con centro oscuro y borde más claro, con micelio aéreo (filamentos).
5. Colonias elevadas, lisas, oscuras, con sectores más claros lisos sin borde micelial (sin filamentos).
6. Colonias elevadas, lisas, oscuras, con sectores más claros lisos con borde micelial (con filamentos).
7. Colonias mixtas, mitad oscura con filamentos, mitad rosa lisa.
8. Colonias en diana.

9. Colonias claras, de fenotipo pequeño.
10. Colonias claras, de fenotipo pequeño, con filamentos.
11. Colonias claras grandes.
12. Colonias claras grandes con sectores oscuros.
13. Colonias con doble halo rugoso, con bultos.

Para el estudio realizado con CO₂, se estableció la clasificación de las colonias en:

1. Colonias elevadas, lisas, oscuras.
2. Colonias elevadas, lisas, con centro oscuro y borde más claro.
3. Colonias elevadas, lisas, oscuras, con micelio aéreo (filamentos).
4. Colonias elevadas, lisas, con centro oscuro y borde más claro, con micelio aéreo (filamentos).
5. Colonias lisas, planas, oscuras.
6. Colonias lisas, planas, oscuras, con micelio aéreo.
7. Colonias elevadas, lisas, oscuras, con sectores más claros lisos sin borde micelial (sin filamentos).
8. Colonias elevadas, lisas, oscuras, con sectores más claros lisos con borde micelial (con filamentos).
9. Colonias mixtas, mitad oscura con filamentos, mitad rosa lisa.
10. Colonias en diana.
11. Colonias claras, de fenotipo pequeño.
12. Colonias claras, de fenotipo pequeño, con filamentos.
13. Colonias claras grandes.
14. Colonias claras pequeñas con sectores oscuros.

15. Colonias con doble halo rugoso.
16. Colonias con doble halo con filamentos.

En términos generales, para esta última condición atmosférica las colonias fueron más aplanadas y extendidas, y a pesar de la similitud de las diferentes morfologías detectadas con las obtenidas sin la presencia de CO₂, la mayor proporción de las cepas tendió a presentar menor variabilidad que en las condiciones anteriores.

Para ambas atmósferas, globalmente, *C. tropicalis* presentó una gran variabilidad morfológica. En las Figuras 125 y 126 se representaron las fotografías de los principales morfotipos de las colonias observadas con la ausencia o la presencia de CO₂, mientras que en la Tabla 34 se reflejó el número variable de morfotipos diferentes presentados por las distintas cepas de *C. tropicalis* del estudio. En las Tablas incluidas en el Anexo II (Tablas 40 y 41) se estableció la proporción en que fueron expresados los variables fenotipos presentados por las cepas de *C. tropicalis* según los distintos experimentos (realizados al menos por triplicado). Debido a la gran variabilidad observada en los resultados obtenidos en función de los diferentes experimentos, así como la elevada desviación estándar obtenida a partir de los mismos, se optó por representar los resultados en función del rango de valores mínimo y máximo entre los que oscilaron los diferentes fenotipos por cepa estudiada. En las Figuras 127, 128 y 129, se expresaron el número de morfotipos en función del origen urinario o no urinario de las cepas incluidas en el estudio.

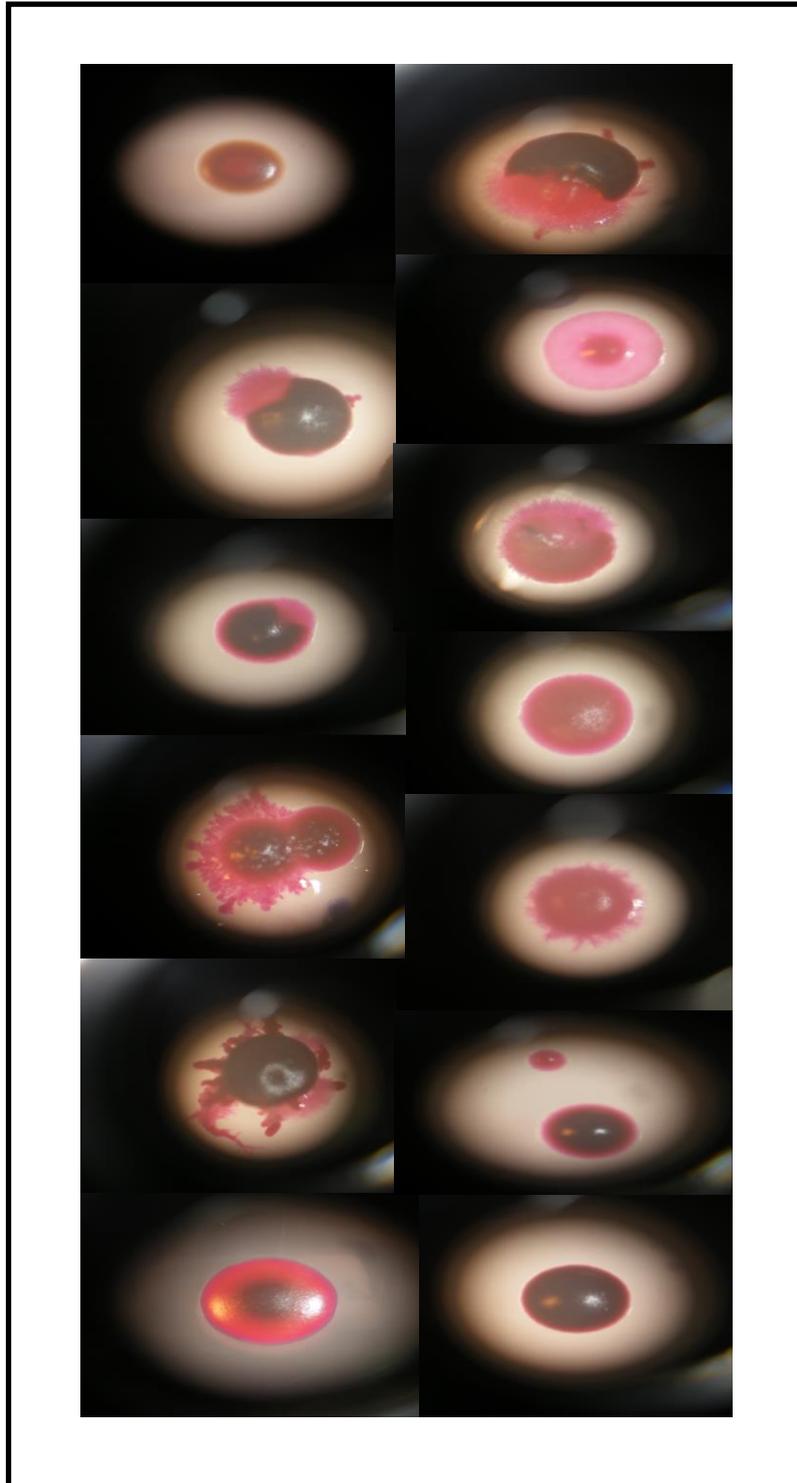


Fig 125. Principales morfotipos de las colonias de *C. tropicalis* estudiadas sin presencia de CO₂.

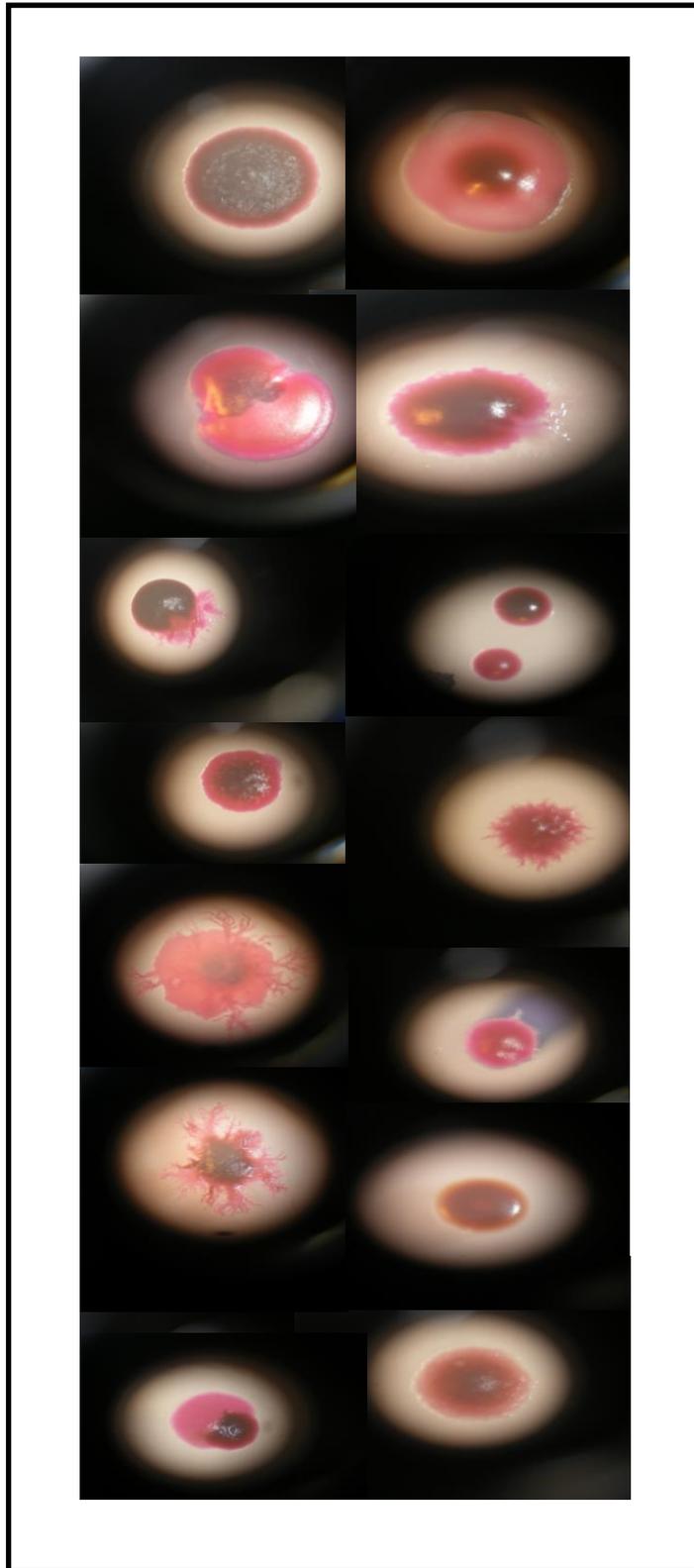


Fig 126. Principales morfotipos de las colonias de *C. tropicalis* estudiadas en presencia de CO₂.

Tabla 34. Número de fenotipos observados en ausencia o presencia de CO₂, y origen de la muestra a 25°C.

Switching fenotípico			
Cepas	Origen	Sin CO ₂	Con CO ₂
CECT 1440		4	5
365	Aspirado bronquial	3	4
367	Frotis lingual	5	4
368	Catéter	5	3
372	Exudado vaginal	6	4
373	Orina	5	3
379	Catéter	2	3
381	Orina	7	7
404	Líquido ascítico	4	3
405	Orina	3	2
408	Orina	7	8
413	Frotis faríngeo	8	7
416	Orina	8	5
419	Aspirado bronquial	3	4
421	Orina	8	5
429	Orina	9	4
432	Absceso abdominal	7	5
434	Orina	6	5
435	Uña	9	4
436	Orina	9	6
438	Orina	7	6
440	Orina	6	5
441	Orina	3	4
442	Orina	5	3
443	Frotis faríngeo	6	5
444	Espujo espontáneo	6	7
445	Orina	9	8
446	Aspirado traqueal	8	8
447	Espujo espontáneo	7	6
448	Orina	7	4

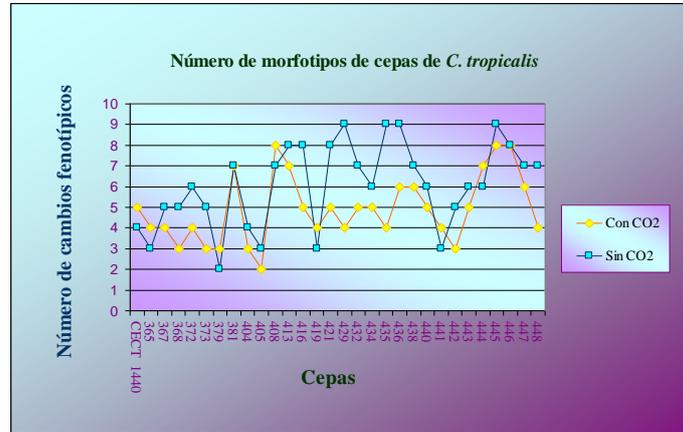


Fig 127. Número de morfotipos de cepas de *C. tropicalis* en ausencia o presencia de CO₂.

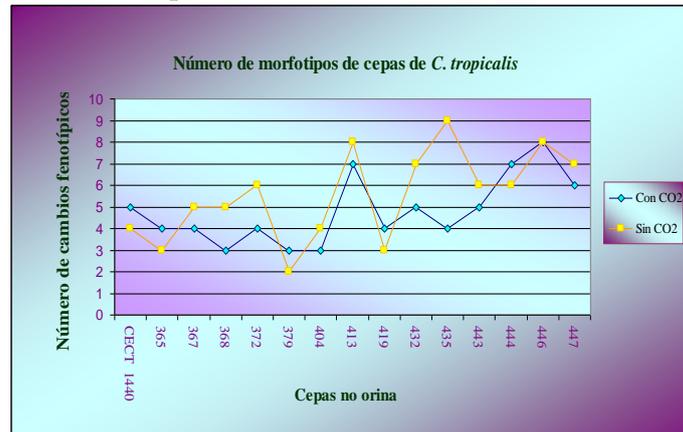


Fig 128. Número de morfotipos de cepas de *C. tropicalis* de origen no urinario en ausencia o presencia de CO₂.

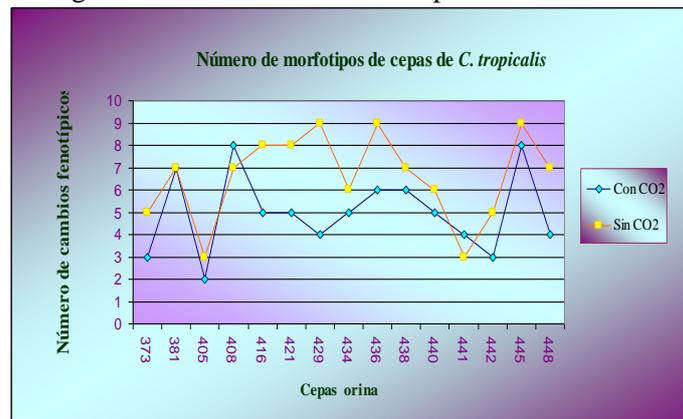
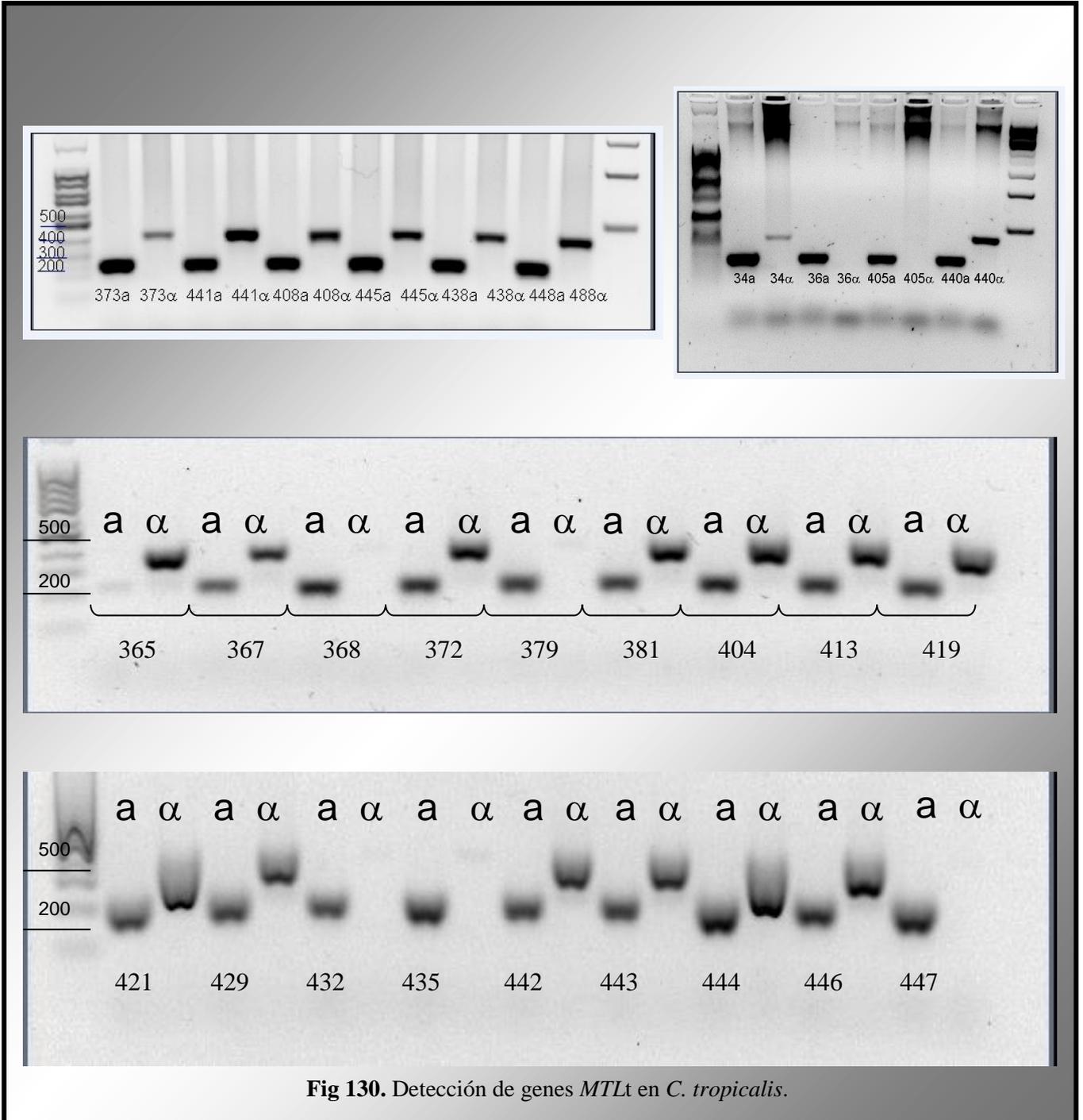


Fig 129. Número de morfotipos de cepas de *C. tropicalis* de origen urinario en ausencia o presencia de CO₂.

4.6. Estudios de conjugación. Configuración genotípica del locus *MTLt*

La configuración genotípica del locus *MTLt* de las cepas de *C. tropicalis* del estudio se llevó a cabo mediante el examen de los genes *MTLta2* y *MTLtα2* implicados en la capacidad de conjugación de *C. tropicalis* (Butler *et al.*, 2009; Porman *et al.*, 2011), a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

De las 28 cepas estudiadas, 20 (71,4%) resultaron heterocigotas para los genes *MTLt* (*MTLa/MTLα*). De las cepas que mostraron homocigosis para el locus *MTLt* (8 cepas; 28,6%), sólo una cepa (cepa 365; 12,5% de cepas homocigotas) resultó positiva para *MTL0/α*, siendo *MTL0/a* (cepas 368, 379, 405, 432, 435, 436 y 447) el resto de las mismas (87,5%). En la Figura 130 se recogió la detección de los genes *MTLa/MTLα* en las cepas de *C. tropicalis* estudiadas.



4.7.1. Relación entre la HSC y la adherencia inmediata y tardía a material plástico.

A 37°C, tanto la adherencia inmediata como la adherencia tardía presentaron una buena correlación con la HSC ($R^2=0,488$; $R^2=0,548$, respectivamente). La mejor correlación con la adherencia tardía se obtuvo cuando sólo las cepas con valores de adherencia tardía $<0,109$ ($R^2=0,840$), o cuando las cepas con valores de HSC $<90\%$ ($R^2=0,556$), fueron consideradas, observándose por tanto una buena correlación entre ambos factores hasta determinados valores máximos de HSC y de adherencia, perdiéndose esta correlación a partir de estos niveles, reforzando así la idea de la importancia de la HSC en los primeros estadios de la adherencia. A 22°C, sin embargo, no fue posible establecer una buena correlación entre estos dos factores, a diferencia de lo ocurrido a 37°C ($R^2<0,001$; $R^2=0,232$; para adherencia inmediata y tardía, respectivamente), puesto que todas las cepas presentaron valores elevados de adherencia (inmediata y tardía) y de HSC. Fue posible encontrar una correlación considerablemente mayor cuando únicamente fueron tenidas en consideración las cepas con los menores valores de adherencia tardía ($<0,13$; $R^2=0,966$), o de HSC ($<90\%$; $R^2=0,554$). Estos datos tanto a 37°C como a 22°C se representaron en la Figura 131.

En la Figura 132 se representaron la HSC y la adherencia inmediata y tardía tanto a 37°C como 22°C, pudiéndose observar el aumento de la adherencia en relación con el aumento de la hidrofobicidad hasta los niveles indicados anteriormente.

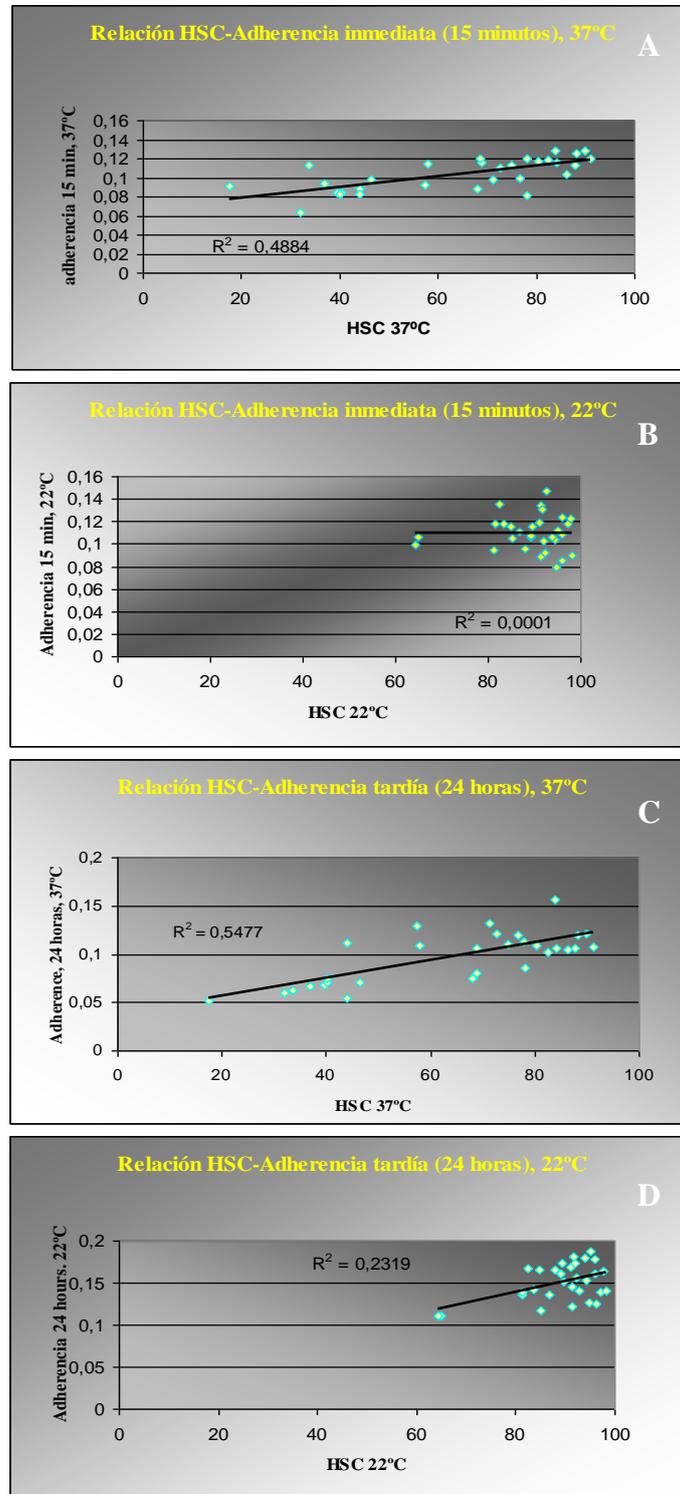


Fig 131. Relación entre la HSC y la adherencia inmediata (A y B) y tardía (C y D) a 37°C (A y C) y 22°C (B y D).

4.7.2. Relación entre la HSC y la formación de biofilm

Se estudió la influencia de la HSC en la formación de biofilm (BF-DO) a las 24 y 96 horas de incubación tanto a 37°C como a 22°C. Para ello se estableció el grado de correlación existente entre estos dos factores. Los resultados se representaron en la Figura 133. A las 24 horas de incubación a 37°C no se encontró correlación ($R^2=0,005$), siendo algo mayor para los 22°C ($R^2=0,101$). Tampoco se encontró correlación para las 96 horas de incubación, variando de $R^2=0,014$ para 37°C a $R^2=0,129$ para 22°C.

4.7.3. Relación entre la adherencia y la formación de biofilm.

Se estudió la influencia de la adherencia inmediata (15 minutos) y tardía (24 horas) a material plástico (poliestireno) en la posterior formación de biofilm (DO) a las 24 horas de incubación a los 37 y 22°C. Estos resultados se resumieron en la Figura 134.

No se obtuvo correlación entre la adherencia inmediata y el biofilm formado a las 24 horas de incubación a 37°C ($R^2=0,029$), al igual que para los 22°C ($R^2=0,096$). Para la adherencia tardía (24 horas) y la formación de biofilm a las 24 horas de incubación, tampoco se observó correlación variando los valores entre $R^2=2E-06$ para 37°C y $R^2=0,010$ para 22°C.

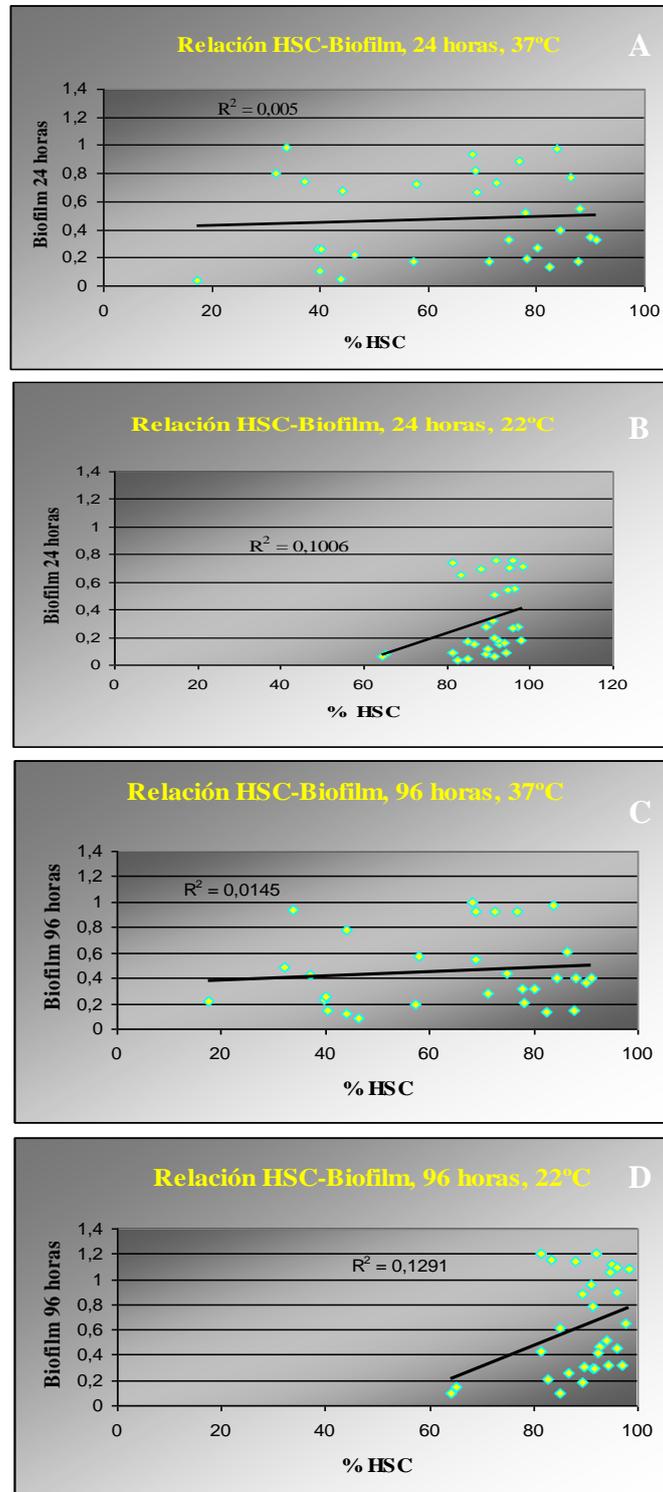


Fig 133. Relación entre la HSC y la formación de biofilm (BF-DO) a las 24 (A y B) y 96 horas (C y D), para 37 (A,C) y 22°C (B,D).

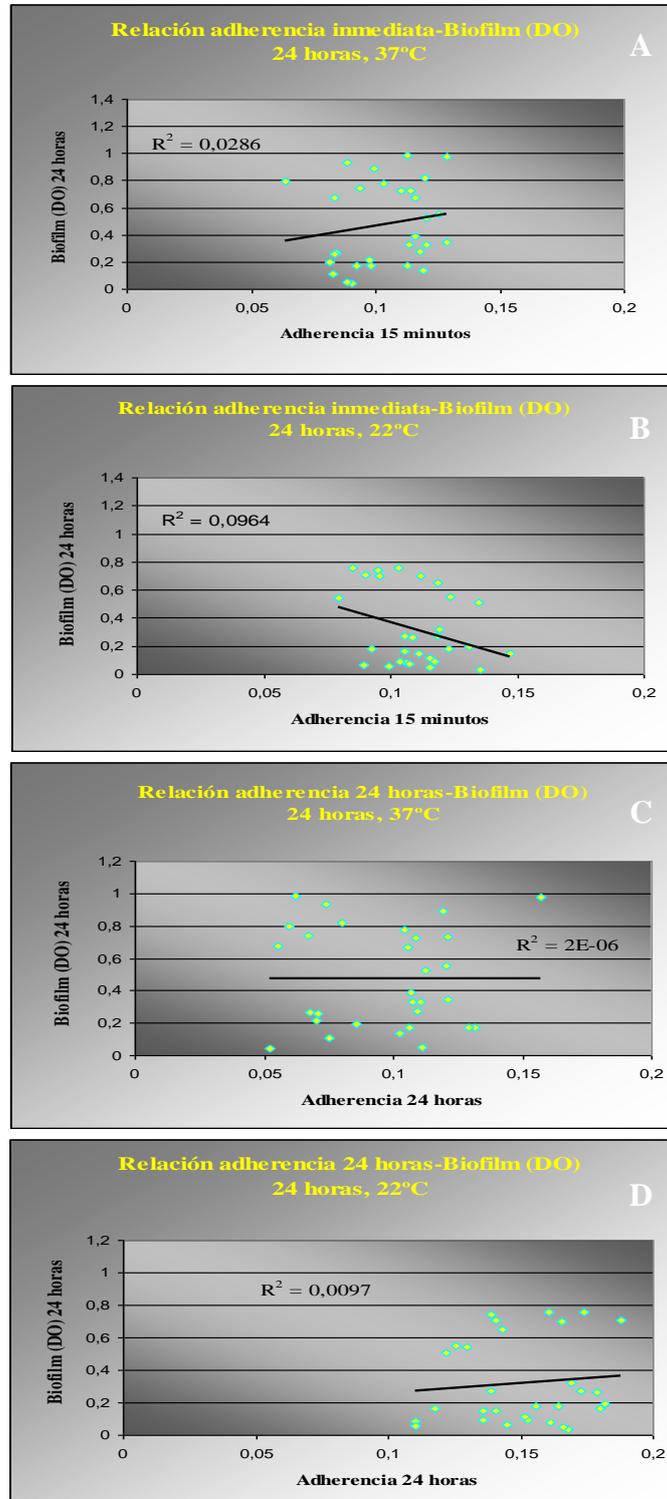


Fig 134. Relación entre la adherencia inmediata (A, B) y tardía (C, D) y la formación de biofilm (BF-DO) a las 24 y 96 horas, para 37°C (A,C) y 22°C (B,D).

4.7.4. Relación entre la actividad enzimática y la HSC, la adherencia y la formación de biofilm.

En este apartado se analizó la correlación existente entre las diferentes actividades enzimáticas (aspartil-proteasa, fosfolipasa, esterásica y hemolítica) a las 24, 48 y 72 horas de estudio y la HSC, la adherencia inmediata y tardía, y la formación de biofilm, tanto a 37°C como a 22°C. El resumen de todos estos datos se representó en las Tablas 35 y 36.

En general, no se encontró correlación entre la actividad enzimática y los otros factores de patogenicidad incluidos en este apartado al considerar todas las cepas en conjunto. Sin embargo, en función de diferentes puntos de corte establecidos sí se pudo conseguir una mejor correlación.

Dentro de las asociaciones que se encontraron entre estas variables estudiadas destacó la correlación entre la actividad hemolítica a las 24 horas y la adherencia tardía a 22°C, obteniendo buena correlación sólo para valores bajos de adherencia (hasta 0,14), observándose cómo se fue perdiendo la relación para valores más elevados. Para 37°C, sí existió correlación entre la actividad hemolítica a las 48 horas de incubación y la adherencia inmediata, ya que a medida que se produjo la disminución de la actividad hemolítica se observó una menor relación. No se observó de forma tan evidente en función de los cambios producidos en los valores de adherencia, sólo ordenando la actividad hemolítica según valores. Entre la actividad hemolítica a las 48 horas de incubación y la adherencia tardía, al

igual que sucedió anteriormente con la adherencia inmediata, también se observó relación entre las dos variables, ya que cuanto menor resultó la actividad hemolítica se obtuvo una menor relación con la adherencia tardía. Así, cuando se ordenaron según valores de adherencia tardía, la relación resultó muy evidente, existiendo correlación para valores bajos de adherencia. Para 22°C, entre la actividad hemolítica a las 48 horas de incubación y la adherencia inmediata, al igual que lo observado para 37°C, también para valores más bajos de actividad enzimática se observó una mayor correlación con la adherencia tardía. Además de la correlación encontrada entre la actividad hemolítica y la adherencia, también para el estudio de la actividad esterásica a las 24 horas y el desarrollo de biofilm (96 horas) se observó una relación decreciente a medida que fue disminuyendo la formación de biofilm, siendo estas las únicas asociaciones que pudieron establecerse en este apartado.

Tabla 35. Coeficiente de correlación de Pearson (R^2). Relación entre la actividad aspartil-proteasa y fosfolipasa a las 24, 48 y 72 horas y la HSC, la adherencia inmediata y tardía y la formación de biofilm a las 24 y 96 horas. Todas las cepas.

Actividad enzimática			HSC	Adherencia inmediata	Adherencia tardía	Biofilm (D.O.) 24 horas	Biofilm (D.O.) 96 horas
Aspartil-proteasa	37°C	24 horas	<0,001	0,060	<0,001	8E-06	<0,001
		48 horas	0,155	0,084	0,099	0,011	0,002
		72 horas	0,191	0,183	0,117	0,007	0,007
	22°C	24 horas	0,036	0,003	0,095	0,005	0,003
		48 horas	0,098	0,004	4E-05	0,015	0,025
		72 horas	0,060	0,002	0,042	0,004	<0,001
Fosfolipasa	37°C	24 horas	0,009	0,125	0,017	0,025	<0,001
		48 horas	0,046	0,002	0,040	0,147	0,121
		72 horas	0,00a	0,021	0,015	0,078	0,08
	22°C	24 horas	-	-	-	-	-
		48 horas	0,078	0,007	8E-05	0,069	0,087
		72 horas	0,031	0,011	0,216	0,124	0,149

Tabla 36. Coeficiente de correlación de Pearson (R^2). Relación entre la actividad esterásica y hemolítica a las 24, 48 y 72 horas y la HSC, la adherencia inmediata y tardía y la formación de biofilm a las 24 y 96 horas. Todas las cepas.

Actividad enzimática			HSC	Adherencia inmediata	Adherencia tardía	Biofilm (D.O.) 24 horas	Biofilm (D.O.) 96 horas
Esterásica	37°C	24 horas	0,077	0,038	0,026	0,102	0,138
		48 horas	0,004	0,012	0,027	0,125	0,141
		72 horas	0,001	0,002	0,020	0,010	0,006
	22°C	24 horas	0,016	0,034	0,100	0,004	8E-05
		48 horas	<0,001	0,010	0,012	0,011	0,058
		72 horas	0,056	0,045	0,026	0,001	0,001
Hemolítica	37°C	24 horas	0,164	0,143	0,057	0,052	0,067
		48 horas	0,053	0,035	4E-06	0,058	0,061
		72 horas	0,062	0,090	<0,001	0,125	0,050
	22°C	24 horas	0,032	1E-04	0,013	0,055	0,007
		48 horas	0,019	0,115	0,012	0,035	0,115
		72 horas	0,011	0,129	0,027	0,059	0,087

4.7.5. Relación entre la capacidad de filamentación y los otros factores de patogenicidad estudiados.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la adherencia tardía de las cepas clasificadas en función de los diferentes grupos de filamentación a las 24 horas a 37°C ($p=0,193$), ni entre la HSC a esta temperatura ($p=0,236$), ni entre el crecimiento a las 24 horas ($p=0,696$). Sin embargo, para el biofilm (DO) a las 24 horas, sí se encontraron diferencias entre los grupos de los diferentes grados de filamentación ($p=0,010$), con el biofilm corregido con el crecimiento (IS) ($p=0,020$), con la actividad del biofilm ($p=0,012$), y con la actividad del biofilm corregida con el crecimiento (IS-XTT) ($p=0,018$).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento a las 96 horas a 37°C de las cepas de *C. tropicalis* clasificadas en función de los grupos de los diferentes grados de filamentación a 96 horas ($p=0,427$), ni para el biofilm (DO) a las 96 horas, ($p=0,053$), ni para el biofilm corregido con el crecimiento (IS) ($p=0,051$), ni entre la actividad del biofilm ($p=0,077$) de los diferentes grupos de filamentación, ni entre la actividad del biofilm corregida con el crecimiento (IS-XTT) ($p=0,088$).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la adherencia tardía a 22°C de los grupos de los diferentes grados de filamentación ($p=0,951$), ni entre la HSC ($p=0,673$), ni entre el crecimiento a las 24 horas ($p=0,199$). No obstante, para el biofilm (DO) a las 24 horas, sí se encontraron diferencias entre los grupos de los diferentes grados de

filamentación ($p=0,040$), así como con el biofilm corregido con el crecimiento (IS) ($p=0,032$). Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido a 37°C , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad del biofilm ($p=0,078$) de los diferentes grupos de filamentación, ni entre la actividad del biofilm corregida con el crecimiento (IS-XTT) ($p=0,061$).

Sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento a las 96 horas a 22°C de las cepas clasificadas en función de los grupos de los diferentes grados de filamentación ($p=0,037$), aunque no para el biofilm (DO) a las 96 horas, ($p=0,054$), ni para el biofilm corregido con el crecimiento (IS) ($p=0,054$). Para la actividad del biofilm de los diferentes grupos de filamentación sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,038$), así como entre la actividad del biofilm corregida con el crecimiento (IS-XTT) ($p=0,021$).

Por tanto, se pudo comprobar cómo las cepas que se clasificaron en niveles de menor filamentación o no filamentadas, presentaron menor producción de biofilm en los estadios iniciales de la formación del biofilm a 37°C , no detectándose esta diferencia una vez obtenido el biofilm a las 96 horas. Para la actividad metabólica a 22°C , no se observan diferencias durante las primeras 24 horas, pero sí a las 96 horas, a diferencia de lo detectado a 37°C . Cuando se establecieron diferencias en el grado de filamentación de las cepas según su clasificación por niveles de $\text{HSC} < \text{ó} > 50\%$ a 37°C , sí se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p=0,02$). Así, al determinar la filamentación durante las primeras 24 horas, se observó cómo hasta el 70% de las cepas con $\text{HSC} > 50\%$ alcanzaron el nivel 2 o más de filamentación, mientras que de

entre las cepas con HSC<50%, sólo el 30% llegó a este grado de filamentación. A las 96 horas, el 50% de las cepas con HSC<50% alcanzó el nivel 2 o más de filamentación, frente al 90% de las cepas con HSC>50%. Para 22°C no se observó esta relación, puesto que todas las cepas presentaron una HSC muy elevada.

4.7.6. Relación entre el crecimiento y la formación de biofilm, y la capacidad de filamentación.

Para 37°C y 24 horas, aunque de las 9 cepas que presentaron menor crecimiento 7 (77,78% de las mismas) mostraron alta formación de biofilm, no se pudo observar que las cepas con menor crecimiento conllevaran una mayor formación de biofilm o un mayor grado de filamentación que el resto de las cepas. Sin embargo, como se comentó en el apartado anterior, las cepas con mayor capacidad de formación de biofilm a esta temperatura y tiempo sí mostraron a su vez mayor nivel de filamentación. Para las 96 horas de estudio sí se observó cómo de las 17 cepas que tuvieron menor crecimiento, 11 (el 64,70% de las mismas) coincidieron con las cepas más formadoras de biofilm, presentando todas a su vez una elevada capacidad de filamentación.

Para 22°C y 24 horas, esta relación fue más evidente que para 37°C, mostrando 10 de las 14 cepas con menor crecimiento (71,4% de las mismas) valores comprendidos entre los más elevados de biofilm (DO, IS-DO) obtenidos en este estudio. Se apreció sin embargo que los valores mayores de actividad enzimática del biofilm (XTT-DO, IS-XTT), correspondían en su mayoría a las cepas con mayor nivel de crecimiento. Para las 96 horas a esta temperatura fue cuando se comprobó con mayor claridad la relación entre el menor crecimiento y la mayor formación de biofilm, ya que de las 15 cepas con crecimiento más bajo, 12 de ellas (80%) tuvieron a su vez los valores más altos de biofilm medidos por DO, y 13 de ellas (86,67%) los valores de biofilm más altos de los obtenidos medidos por IS-DO, estando a su vez los mayores niveles de filamentación comprendidos entre estas cepas.

4.7.7. Relación entre la capacidad de conjugación y los otros factores de patogenicidad estudiados.

Se establecieron comparaciones entre las diferentes variables estudiadas en función de las cepas homocigotas y heterocigotas para el locus *MTL*. Así, para la HSC a 37°C, no se encontraron diferencias entre ambos grupos ($p=0,203$), ni para 22°C ($p=0,093$). Para la adherencia inmediata y tardía a 37°C, tampoco se encontraron diferencias ($p=0,179$ y $p=0,143$, respectivamente), ni para 22°C ($p=0,944$ y $p=0,808$). En cuanto al crecimiento, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas para 37°C ($p=0,868$ y $p=0,793$, para 24 y 96 horas, respectivamente), ni para 22°C ($p=0,365$ y $p=0,745$, para 24 y 96 horas, respectivamente). Con respecto a la producción de biofilm, para la determinación por DO, para 37°C, para 24 y 96 horas, no se encontraron diferencias ($p=0,610$ y $p=0,154$), ni para 22°C ($p=0,333$ y $p=0,610$, para 24 y 96 horas). Para la actividad metabólica del biofilm (XTT), tampoco se observaron diferencias para 37°C, 24 y 96 horas ($p=0,568$ y $p=0,661$), ni para 22°C ($p=0,359$ y $p=0,799$).

En general, las cepas homocigotas para el gen *MTL* presentaron bajo grado de filamentación (excepto la cepa 405), así como baja producción de biofilm en relación con las cepas heterocigotas para todas las temperaturas y periodos de tiempo estudiados. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0.53$ para 37°C y 24 horas; $p=0.38$ para 22°C y 24 horas; $p=0.26$ para 37°C y 96 horas; $p=0.84$

para 22°C y 96 horas). A su vez, en relación con los resultados del biofilm obtenido expresados en función del Índice de Slime, la media de los valores pertenecientes al grupo de las cepas homocigotas resultó menor que la media del Índice de Slime obtenido de las cepas heterocigotas para las mismas temperaturas y periodos de tiempo estudiados. Sin embargo, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p=0,43$ para 37°C y 24 horas; $p=0,46$ para 22°C y 24 horas; $p=0,33$ para 37°C y 96 horas; $p=1$ para 22°C y 96 horas). En general, las cepas homocigotas presentaron menor nivel de filamentación y biofilm que las heterocigotas para la misma temperatura y periodo de tiempo estudiado. Estos datos se resumieron en la Tabla 37. En la Tabla 38 se recogieron las principales características de las cepas homocigotas para el gen *MTL*.

Tabla 37. Comparación entre la formación de biofilm (DO; IS-DO) y la filamentación el grupo de cepas heterocigotas para el locus *MTL* frente a las homocigotas.

	HETEROCIGOTAS				HOMOCIGOTAS			
	24 horas		96 horas		24 horas		96 horas	
	37°C	22°C	37°C	22°C	37°C	22°C	37°C	22°C
MediaBF-OD	0,49	0,26	0,48	0,63	0,40	0,27	0,39	0,55
Media BF-IS	51,88	43,94	44,86	52,30	44,34	37,04	38,49	49,39
Media Filamentación	1,7	0,9	2,47	1,05	1	0,25	1,87	0,62

Tabla 38. Principales características de las cepas de *C. tropicalis* homocigotas para el gen *MTL*.

Cepas	Origen	Filamentación 24 horas	Filamentación 96 horas	Biofilm 37°C, 24-96 horas	Biofilm 22°C, 24- 96horas	Biofilm IS 37°C, 24-96 horas	Biofilm IS22°C, 24- 96horas
365	Aspirado bronquial	No filamentación	No a 22°C	0,17±0,05 - 0,28±0,12	0,17±0,03 - 0,62±0,26	26,3-29,5	21,0-52,0
368	Catéter	No filamentación		0,19±0,04 - 0,21±0,09	0,09±0,01 - 0,32±0,19	28,8-21,4	10,50-25,9
379	Catéter	No filamentación	No filamentación	0,17±0,05 - 0,19±0,07	0,09±0,04 - 0,42±0,26	23,4-17,7	8,9-33,3
405	Orina			0,94±0,07 - 1,01±0,05	0,65±0,07 - 1,15±0,03	109,82- 104,14	110,7- 102,3
432	Absceso abdominal	No filamentación	No filamentación	0,22±0,02 - 0,08±0,02	0,05±0,02 - 0,09±0,02	21,1-7,5	5,3-7,5
435	Ungueal	No filamentación	No filamentación	0,26±0,07 - 0,15±0,03	0,08±0,02 - 0,19±0,02	24,3-13,7	8,0-14,5
436	Orina	No a 22°C	No a 22°C	0,27±0,07 - 0,31±0,13	0,27±0,07 - 0,45±0,23	29,9-29,9	29,5-37,4
447	Espuito espontáneo	No a 22°C		0,99±0,14 - 0,93±0,11	0,74±0,15 - 1,20±0,01	91,1-84,0	102,1- 122,1

5. DISCUSIÓN

El creciente aumento de las infecciones relacionadas con las diferentes especies de *Candida* no *albicans* observado en los últimos años se ha visto favorecido por la presencia de un mayor número de pacientes inmunocomprometidos, con alteración de las barreras de protección, con presencia de dispositivos biomédicos o previamente tratados con antibioterapia de amplio espectro (Hazen, 1995; Beers y Berkow, 1999; Aktas *et al.*, 2002; Sugita *et al.*, 2002). Así, en nuestro estudio, la mayor proporción de las cepas de *C. tropicalis* incluidas en el mismo presentaron un origen intrahospitalario, aislándose principalmente a partir de pacientes ingresados en unidades quirúrgicas, de cuidados intensivos o de patología infecciosa, tratándose por tanto de pacientes con una patología de base subyacente, con inmunodepresión previa o sujetos a estrés postquirúrgico, lo cual ratifica el predominio de esta especie en pacientes hospitalizados.

Además de ser una causa frecuente de candidemia de origen nosocomial y representar el agente etiológico más habitualmente productor de candidiasis invasiva en pacientes neutropénicos, *C. tropicalis* se ha asociado con la producción de infecciones del tracto urinario de origen nosocomial (Jang *et al.*, 2005; Kothavade *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2010). Según los datos recogidos en este estudio y coincidiendo con los previamente descritos por Nucci, 2000; Matsumoto *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2007 y Negri *et al.*, 2011, los aislamientos de *C. tropicalis* en el Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz durante el periodo de tiempo comprendido entre abril de 2003 y diciembre de 2006, fecha de recolección de las cepas, representaron la segunda especie de *Candida* productora de candiduria tras *C. albicans*. Todas tuvieron su origen

en pacientes hospitalizados. Para otros autores como Kauffman *et al.*, 2000 y Álvarez-Lerma *et al.*, 2003, *C. tropicalis*, sin embargo, constituye la tercera especie del género *Candida* aislada con mayor frecuencia a partir de cultivos de orina tras *C. albicans*, siendo probablemente debida esta diferencia a las amplias variaciones en la prevalencia en función de la localización geográfica presentadas por esta especie.

C. albicans posee una serie de **factores de patogenicidad** que facilitan la colonización y la posterior infección del hospedador (Haynes, 2001; Pontón y Ruiz, 2006), siendo ampliamente estudiados en esta especie, mientras que en otras especies de *Candida no-albicans*, como en el caso de *C. tropicalis*, aún permanecen poco esclarecidos. Hasta hace relativamente poco tiempo se había prestado escasa atención a estos factores de virulencia en estas especies diferentes de *C. albicans*, y sin embargo, muchos de los factores identificados en *C. albicans* tienen sus homólogos en otras especies de *Candida*, aunque su papel en el inicio y la progresión de la infección es aún poco conocido (Haynes, 2001). En los últimos años sin embargo, el número de estudios enfocados a dilucidar estos aspectos en las especies de *Candida no-albicans* se están viendo aumentados en relación con años previos, debido probablemente al aumento en la incidencia comentado anteriormente detectado en estas especies, aunque aún es necesaria la realización de estudios amplios y extensos centrados en la capacidad patógena de estas especies emergentes, siendo por ello éste el principal motivo de la realización de esta tesis doctoral.

Dentro de los determinantes de patogenicidad de *Candida* spp. ocupa un lugar destacado la capacidad de **secreción de enzimas** que permiten destruir barreras y alcanzar nutrientes del medio externo, siendo considerada uno de los principales factores de virulencia microbianos (Schaller *et al.*, 2005), ya que la hidrólisis de los sustratos producida por las mismas puede terminar afectando a la función y a la viabilidad del hospedador. Así, las proteasas y las lipasas extracelulares (fosfolipasas y estererasas) juegan un importante papel tanto en la destrucción de las membranas celulares (constituidas principalmente por proteínas y lípidos), como en la degradación de proteínas necesarias en la defensa del hospedador, como inmunoglobulinas, factores del complemento y citocinas (Haynes, 2001; Kantarcioglu y Yücel, 2002). Los factores hemolíticos que permiten la adquisición de hierro a partir de los eritrocitos del hospedador también se consideran importantes factores de virulencia (Manns *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2001).

En este estudio se procedió a determinar las diferentes actividades enzimáticas de las cepas de *C. tropicalis*, expresando los resultados mediante la valoración del índice Pz (“Precipitation zone”) en medio sólido, que permite establecer una relación directa entre los halos de precipitación o lisis formados (H), corregidos con el diámetro del crecimiento de la colonia (C), y la actividad enzimática producida (C/H). Desde su descripción por Price *et al.*, 1982, este índice ha sido ampliamente utilizado (Williamson *et al.*, 1986; Kantarcioglu y Yücel, 2002; Samaranayake *et al.*, 2005; Koga-Ito *et al.*, 2006), ya que permite obtener una medida objetiva de los resultados obtenidos, siendo una técnica semicuantitativa reproducible, que permite un

fácil screening de varias cepas simultáneamente, con desviaciones estándar aceptables. Sin embargo, los puntos de corte para determinar el grado de actividad enzimática y su clasificación en diferentes categorías difieren según los distintos autores. En este estudio se utilizaron los puntos de corte descritos por Williamson *et al.*, 1986, que establecen diferentes rangos de actividad enzimática, clasificando ésta en alta ($Pz \leq 0,40$), media ($Pz 0,41-0,60$), baja ($Pz 0,61-0,99$) o nula ($Pz=1$). Sin embargo, otros autores como Kantarcioglu y Yücel, 2002 y Kumar *et al.*, 2006 (a), utilizan cuatro categorías muy diferentes: 4+ ($Pz \leq 0,69$), 3+ ($Pz 0,79-0,70$), 2+ ($Pz 0,89-0,80$), 1+ ($Pz 0,9-1$) o negativo ($Pz=1$). A su vez, otros autores como França *et al.*, 2010, clasifican la producción enzimática no por el índice Pz, sino por la fórmula $(H-C)/2$, siendo H la medida en milímetros del halo de hemólisis y C el diámetro de la colonia, dividiendo estos valores en actividad franca (+), media (++) , fuerte (+++) o muy fuerte (++++), o según la fórmula H-C (empleada por Borst y Fluit, 2003), estableciendo las siguientes categorías: - no actividad; +/- para valores comprendidos entre 1,01 y 1,25; + para valores entre 1,26 y 1,50; ++ para valores entre 1,51 y 1,75; +++ para valores entre 1,76 y 2,00; y ++++ para valores entre 2,01 y 2,25. Por todo lo anteriormente expuesto, sería conveniente considerar la unificación de los criterios para establecer las diferentes categorías de actividad enzimática, puesto que un determinado valor puede corresponder, dependiendo de los autores, a categorías distintas, dificultando la comparación entre los diferentes resultados obtenidos.

La temperatura de incubación, junto con el pH, representa uno de los principales factores que afectan a diferentes propiedades de *Candida spp*, entre ellas la actividad enzimática. Por este motivo se comparó la actividad de las cuatro enzimas detectadas en este estudio a dos temperaturas

diferentes, 37°C y 22°C, obteniéndose importantes variaciones en función de la temperatura entre los resultados hallados según el tipo de actividad enzimática.

En primer lugar, se determinó la **actividad proteolítica extracelular**, una de las principales actividades enzimáticas descritas en *Candida* spp., y que es debida a las enzimas aspartil-proteasas (“Secreted aspartic proteinases”; Sap) (Odds, 1988). Los elevados niveles de producción de este tipo de actividad enzimática se ha correlacionado con un mayor grado de patogenicidad, tanto a nivel clínico como de laboratorio, considerándose por ello que estas enzimas desempeñan un importante papel en la virulencia (Hube, 1996; Pichová *et al.*, 2001), ya que se ha demostrado en *C. albicans* que mutantes con alteraciones en los genes que codifican para estas enzimas muestran una virulencia atenuada (Hube *et al.*, 1997; Schaller *et al.*, 2000). Desde las primeras observaciones de actividad proteolítica en *C. albicans* realizadas por Staib en 1965, el papel de la actividad aspartil-proteasa en la virulencia de *Candida* spp. ha sido ampliamente analizado (Barrett-Bee *et al.*, 1985; Hube *et al.*, 1997; De Bernardis *et al.*, 2001; Kantargcioglu y Yücel, 2002; Sugita *et al.*, 2002; Borst y Fluit, 2003; Naglik *et al.*, 2003; Fotedar y Al-Hedaithy, 2005; Schaller *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006 (a); Silva *et al.*, 2011 (a)), destacando su papel tanto en la adherencia y penetración de los tejidos (Sap5 en *C. albicans* degrada E-cadherina, involucrada en las uniones celulares, Sap2p en *C. albicans* degrada mucina y facilita la diseminación a partir de la colonización gastrointestinal), como en las interacciones con el sistema inmune del hospedador.

C. tropicalis, al igual que *C. albicans*, presenta in vitro actividad aspartil-proteasa cuando es incubada en medio con albúmina sérica bovina como única fuente de nitrógeno (Pichová *et al.*, 2001; Zaugg *et al.*, 2001). Así, para la determinación de la producción de la actividad aspartil-proteasa de las diferentes cepas de *C. tropicalis* incluidas en este estudio se utilizó como medio de cultivo Yeast Carbon Base con albúmina bovina (YCB-BSA) como única fuente de nitrógeno, usado previamente por Cassone *et al.* 1987, con el fin de estimular la producción de aspartil-proteasas. A 37°C todas las cepas presentaron actividad aspartil-proteasa, siendo baja o nula en el 100% de las cepas a las 24 horas de incubación. La actividad fue en aumento, hasta presentar el 50% de las cepas a las 72 horas de estudio actividad media. El 46,7% de las mismas continuó con baja actividad. A 22°C todas las cepas presentaron actividad aspartil-proteasa a las 72 horas, siendo ésta menor que la obtenida a 37°C (el 100% de las cepas presentó actividad baja o nula) y tardando más tiempo en detectarse la aparición de actividad, ya que a las 24 horas hasta el 23,3% presentó actividad nula. Esta actividad proteolítica obtenida en función de las variaciones de la temperatura en *C. tropicalis* resulta semejante a la detectada en *C. albicans*. A su vez, estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Kantarcioglu y Yücel, 2002, y los de Mohan das y Ballal, 2008, donde detectan actividad aspartil-proteasa en todas las cepas de *C. tropicalis* estudiadas por ellos. En este estudio sólo una de las cepas presentó actividad nula a las 72 horas a 37°C, habiéndose detectado en ella actividad en las horas previas. Yamamoto *et al.*, 1992, también detectaron actividad proteolítica en 13 de 18 cepas de *C. tropicalis* incluidas en su estudio, y Kumar *et al.*, 2006 (a), en 17 de 22 cepas estudiadas en su análisis, así como Marcos-Arias *et al.* 2009 (a), donde observaron actividad en 11 de 18 cepas. Bramono *et al.*, 2006 y Seneviratne *et al.*, 2011, también obtuvieron alta

producción de actividad proteolítica en sus cepas, considerándolas altamente productoras, junto con las cepas de las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

Se ha observado que la producción de actividad proteasa en *C. albicans* no depende sólo del tipo de cepa o del lugar de procedencia de la misma, sino también del fenotipo que presenta, de las condiciones ambientales o del estado de la infección (De Bernardis *et al.*, 2001). Así, Sugita *et al.*, 2002, encontraron diferencias en la actividad proteasa en función del origen de la cepa. En este estudio, al comparar cepas de procedencia urinaria frente a no urinaria no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas, aunque sí resultó mayor en las cepas de origen urinario. Algunos estudios han correlacionado el dimorfismo con la expresión de los genes de proteinasas, especialmente en los genes SAP4-SAP6 asociados a la formación de hifas (Schröppel *et al.*, 2000; Felk *et al.*, 2002; Staib *et al.*, 2002). Factores de transcripción como Efg1, involucrados en la regulación de la transición levadura-hifa, se encuentran a su vez implicados en la expresión de los genes SAP (Felk *et al.*, 2002). Se ha sugerido la existencia de vías regulatorias comunes o coordinadas en la expresión de proteinasas (Saps) y la producción de hifas (Naglik, 2003). Korting *et al.*, 2003, demostraron en *C. albicans* que la alteración de los factores de transcripción involucrados en la transición levadura-hifa presentan consecuencias también en la expresión de genes hifa-independientes, como los genes de las proteinasas SAP1 y SAP3. En este estudio, se encontraron diferencias en la producción de actividad enzimática en función de las diferentes cepas, siendo por tanto la producción cepa dependiente, aunque estas diferencias en función del origen de las mismas resultaron ser no estadísticamente significativas. Cuando se

correlacionó la producción de actividad aspartil-proteasa con el grado de filamentación a las dos temperaturas, sí se pudo observar una mayor actividad enzimática a 37°C, temperatura a la cual el grado de filamentación resultó mayor que a 22°C, pudiendo por tanto afirmarse que en este estudio sí existió relación entre el dimorfismo o transición levadura-hifa y la producción de actividad aspartil-proteasa.

Para finalizar con este apartado, resulta conveniente añadir que el método utilizado en este estudio presenta una serie de limitaciones, ya que la especificidad de sustrato de todas las proteínas Saps por el medio BSA no está completamente definida, no pudiéndose excluir que otras proteínas no Sap hidrolicen también el medio BSA, contribuyendo al alcance de los niveles de actividad proteasa detectados (Tavanti *et al.*, 2004). Otros autores (Lerman y Morschhäuser, 2008) afirman que en medio YCB-BSA, la expresión el gen SAP2 es específicamente inducida en *C. albicans*, permitiendo su crecimiento bajo estas condiciones limitantes de nitrógeno, sin que ocurra expresión significativa de otros genes SAP bajo estas condiciones, ya que mutantes defectivas en el gen SAP2 no son capaces de crecer en este medio. A su vez, este método es relativamente insensible para detectar cepas con bajos niveles de actividad proteínasa (Naglik *et al.*, 2003), siendo necesarios otros tipos de estudios, como los basados en fluorescencia, para observar actividad en este tipo de cepas.

Varias especies de *Candida* han sido descritas como productoras de actividad lipolítica (Chattaway *et al.*, 1971; Zviagintseva y Pitriuk, 1976; Rudek, 1978; Ghannoun, 2000). Algunas de las especies patógenas de *Candida* secretan enzimas lipolíticas como estererasas (Slifkin, 2000) y fosfolipasas (Ghannoun, 2000). La secreción de **fosfolipasas extracelulares**

se considera un potencial determinante de virulencia de las especies de *Candida* (Anil y Samaranayake, 2003; Birinci *et al.*, 2005), ya que representan un importante papel en la invasión de los tejidos del hospedador por rotura de las membranas de las células epiteliales, al degradar los lípidos que las constituyen, permitiendo a las hifas penetrar hasta el citoplasma (Banno *et al.*, 1985; Borst y Fluit, 2003). Se ha observado cómo mutantes deficientes para genes de fosfolipasa presentan una virulencia atenuada (Mukherjee *et al.*, 2001), siendo menos eficientes en la producción de invasión y colonización del hospedador. Para *C. albicans*, la producción de actividad fosfolipasa ha sido extensamente comprobada, siendo descrita por primera vez por Costa *et al.*, 1967. Sin embargo, para *C. tropicalis* los estudios se presentan contradictorios, existiendo controversia entre los resultados obtenidos por los diferentes autores.

Para la determinación de la actividad fosfolipasa de las cepas de *C. tropicalis* del estudio se utilizó el medio agar malta yema de huevo (MEA) y el medio agar Sabouraud yema de huevo (SEA), desarrollado por Price y Cawson, 1977. Se evaluó el índice de actividad enzimática (Pz) con la fórmula de Williamson *et al.*, 1986, y se midió a dos temperaturas diferentes, 37°C y 22°C. La actividad estudiada en el medio MEA resultó negativa para todas las cepas a ambas temperaturas. Sin embargo, en medio SEA, a 37°C, hasta el 73,3% de las cepas estudiadas presentaron baja actividad a las 24 horas, teniendo el resto actividad nula. A las 72 horas de estudio sólo el 23,3% de las cepas presentó actividad, aunque ésta fue muy baja. El 76,7% restante mostró actividad nula. El fenómeno de negativización de la actividad enzimática observado puede deberse al hecho de que en cepas productoras de niveles muy bajos de actividad fosfolipasa, al producirse el crecimiento del diámetro de la colonia a lo largo del tiempo,

termina produciéndose la ocultación del halo de lisis. A 22°C a las 24 horas de estudio, el 100% de las cepas mostró actividad nula. A las 72 horas, el 96,6% presentó actividad muy baja, llegando a ser nula en hasta en el 3,3% de los casos. A esta temperatura no se observó el fenómeno de disminución de actividad detectado a 37°C, pudiendo deberse al menor crecimiento del diámetro de la colonia a esta temperatura. Estos datos coinciden con los publicados por Tamura *et al.*, 2007, quienes también encontraron producción de actividad fosfolipasa en 6 cepas de *C. tropicalis*, presentando un índice Pz para fosfolipasa muy bajo (0,80-0,82), al igual que en las cepas de este estudio. A su vez, Clancy *et al.*, 1998, observaron cómo el 70% de las cepas de *C. tropicalis* incluidas en su trabajo presentaba actividad fosfolipasa, aunque el número de cepas estudiado por estos autores fue muy limitado. Kumar *et al.*, 2006 (a), también encontraron actividad fosfolipasa en 4 de 22 cepas de *C. tropicalis* analizadas por ellos. Cafarchia *et al.*, 2008, encontraron que los mayores valores de actividad fosfolipasa en las cepas de su estudio, realizado en levaduras aisladas a partir de aves y asociadas a enfermedad en humanos, correspondieron a las especies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. lusitaniae*, entre otras. Anil y Samaranayake, 2003, también encontraron actividad fosfolipasa en todas las cepas de *C. tropicalis* de su estudio, aunque menor que la detectada en *C. albicans*, y Furlaneto-Maia *et al.*, 2008, Mohan das y Ballal, 2008, y Rörig *et al.*, 2009, también detectaron actividad fosfolipasa en *C. tropicalis*. Negri *et al.*, 2010, encontraron que sólo una cepa de su estudio produjo actividad fosfolipasa. Sin embargo, Samaranayake *et al.*, 1984, no encontraron cepas de *C. tropicalis* productoras de fosfolipasas extracelulares, mientras que el 73% de los aislamientos de *C. albicans* estudiados por ellos sí. Otros autores (Kantarcioglu y Yücel, 2002; Birinci *et al.*, 2005; Gümürü *et al.*, 2006;

Gokce *et al.*, 2007; Da Costa *et al.*, 2009) tampoco detectaron actividad fosfolipasa en las cepas de *C. tropicalis* estudiadas.

Todas estas contradicciones observadas en los resultados obtenidos por los diferentes autores pueden deberse a las limitaciones que presenta el método usado para la determinación de la actividad fosfolipasa extracelular, descrita por primera vez mediante el crecimiento de las levaduras en medio sólido con yema de huevo o lecitina, analizando los productos liberados por la rotura de los lípidos, utilizado por Price *et al.*, 1982, ya que al contener el medio sustratos tanto para fosfolipasas (fosfolípidos), como para lipasas (triglicéridos), no es considerado un medio específico para el estudio de la actividad fosfolipasa, debiendo por ello limitarse su uso para la realización de estudios iniciales de screening de actividad. En relación con los medios utilizados en este ensayo, Echevarría *et al.*, 2002, concluyeron que ninguno de los dos medios resultaba óptimo para el estudio de actividad fosfolipasa en otros hongos levaduriformes como *Cryptococcus neoformans*, obteniendo mayor sensibilidad en medio Sabouraud suplementado con yema de huevo, al igual que muestran los resultados de este estudio, donde también el medio SEA resultó ser más sensible para detectar estas cepas, mientras que según estos autores, para *C. albicans* resulta mejor emplear el medio agar malta yema de huevo. Sin embargo, afirman que ninguno de los dos medios muestra la suficiente sensibilidad, sin poder aceptarse como definitivo un resultado negativo obtenido por cualquiera de las dos metodologías, siendo necesario por tanto el empleo de al menos dos métodos para asegurar un resultado negativo. También demostraron que la mejor medida en *C. albicans* se realizaba a las 72 horas, ya que a las 24 horas los resultados fueron negativos. En este estudio, esta última afirmación coincide con los resultados obtenidos a 22°C, donde la actividad

resulta mayor conforme transcurre el tiempo de incubación. Sin embargo, para 37°C, la lectura resulta mejor a las 24 horas, ya que a las 72 horas el crecimiento de la colonia termina ocultando el halo de precipitación. A su vez, este método presenta una segunda limitación, ya que no detecta actividad fosfolipasa en los aislamientos de las especies de *Candida* que producen niveles muy bajos de fosfolipasa (Ghannoum, 2000; Kumar, 2005 (a)), requiriendo por tanto la confirmación de la actividad fosfolipasa el uso de un ensayo radiométrico o colorimétrico específico, especialmente en cepas poco productoras de actividad fosfolipasa.

Adicionalmente, las discrepancias observadas al analizar los trabajos realizados por los diferentes autores para la determinación de la actividad fosfolipasa detectada en las especies no-*albicans* debe atribuirse tanto a la variación de la producción de actividad existente entre cepas como al limitado número de cepas incluidas en los estudios (en ocasiones muy bajo), así como a las diferencias en la preparación del método de agar-yema de huevo en placa utilizado por los distintos autores. Hay que tener en cuenta como se menciona anteriormente, que el método utilizado en este estudio no detecta actividad en aislamientos de *Candida* que producen niveles muy bajos de fosfolipasa (Ghannoum, 2000), como parece ser que ocurre en *C. tropicalis*, siendo quizás éste un importante argumento para justificar la falta de uniformidad de resultados. En este estudio se consiguió obtener una mayor sensibilidad de la técnica utilizada debido a que el seguimiento de la actividad se realizó a las 24, 48 y 72 horas, y además, la cantidad de medio utilizado se limitó a 10 ml/placa, consiguiendo de esta manera una fina capa que permite observar con claridad los halos de lisis producidos.

En general, las diferencias encontradas en la actividad fosfolipasa al realizar la determinación por triplicado fueron mínimas, coincidiendo con estudios como los de Borst y Fluit, 2003 y otros estudios previos en los cuales sí se observaron diferencias entre los diferentes aislamientos, pero bastante similitud en el grado de actividad de aislamientos individuales (Price *et al.*, 1982, Samaranayake *et al.*, 1984), siendo la actividad observada independiente del tamaño del inóculo.

Para *C. albicans*, Price *et al.*, 1982, así como Borst y Fluit, 2003, encontraron diferencias entre la actividad fosfolipasa en relación al lugar de procedencia de las cepas, mostrando las de origen hematológico y respiratorio, según respectivos estudios la mayor actividad enzimática. Sin embargo, para *C. tropicalis* en nuestro estudio, y probablemente al obtenerse valores tan bajos de actividad y ser muy similares los resultados obtenidos, no se encontraron diferencias entre cepas de diferentes orígenes.

Desde el momento en que la actividad aspartil proteasa y fosfolipasa se consideran importantes factores de virulencia, la ausencia o la expresión disminuida de estas enzimas puede indicar una menor virulencia en la especie estudiada en comparación con *C. albicans*.

La **actividad esterásica** se ha detectado en los aislamientos clínicos de *C. tropicalis* (Slifkin, 2000; Aktas *et al.*, 2002; Yücesoy y Marol, 2003; Dolapci *et al.*, 2004; Keceli y Budak, 2004; Kumar *et al.*, 2006 (b)). Esta actividad ha sido demostrada usando el test de opacidad del Tween 80 (Rudek, 1978; Slifkin, 2000; Aktas *et al.*, 2002), ya que los ácidos grasos liberados se unen con el calcio añadido al medio, precipitando y formando cristales insolubles visibles alrededor de las colonias. La ausencia de una

fuente de carbohidratos combinada con Tween 80 resulta crucial para la inducción de la actividad esterásica extracelular. Los Tweens (consistentes en una mezcla de compuestos de polioxietilensorbitano) son usados normalmente como detergentes, al ser solubles en agua, y el Tween 80 (polioxietilensorbitano monooleato) actúa como un sustrato esencial para la inducción de esterases (Tsuboi *et al.*, 1996), siendo los niveles de actividad enzimática dependientes de la concentración de Tween 80 en el medio. La falta de una fuente de carbohidratos combinada con la presencia de un monoéster soluble conjugado con un ácido graso de cadena larga parece ser determinante para la inducción de la actividad esterásica. La esterasa (monoéster hidrolasa) parece ser rápidamente secretada al medio. Puesto que se trata de un método muy útil debido a que es simple, económico y fácil de preparar e interpretar (Aktas *et al.*, 2002; Yücesoy y Marol, 2003; Keceli y Budak, 2004), este test se utilizó para la determinación de la actividad esterásica de las cepas de *C. tropicalis* del estudio.

El índice de actividad enzimática (Pz) se evaluó con la fórmula de Williamson *et al.*, 1986 a dos temperaturas, 37°C y 22°C. A 37°C todas las cepas estudiadas presentaron actividad esterásica, siendo mayor a las 72 horas del estudio (hasta el 23,3% de las cepas presentó alta actividad). A 22°C a las 24 horas de estudio sólo es 20% de las cepas presentó actividad, siendo este número menor que el detectado a 37°C para este tiempo. Sin embargo, a las 48 y 72 horas las cepas mostraron mayor actividad que a 37°C, siendo positiva en el 100% de las cepas, alcanzando hasta el 63,3% de las mismas, alta actividad a las 72 horas. Este fenómeno pudo deberse al crecimiento más lento producido a esta temperatura. Los datos obtenidos fueron coincidentes con los descritos por otros autores como Slifkin, 2000, quien comprobó cómo todas las cepas de *C. tropicalis* incluidas en su

estudio fueron positivas para la actividad esterásica, al igual que Dolapci *et al.*, 2004, Keceli y Budak, 2004, y Gültekin *et al.*, 2011. Aktas *et al.*, 2002, también afirmaron en su investigación que el 100% de las cepas de *C. tropicalis* estudiadas presentaron actividad esterásica entre las 48-72 horas de incubación. Sin embargo, otros autores como Yücesoy y Marol, 2003, encontraron que no todas las cepas de *C. tropicalis* incluidas en su estudio presentaron actividad esterásica, ya que sólo para el 93% de sus cepas los resultados fueron positivos, a pesar de prolongar la incubación hasta diez días, observando diariamente la producción de actividad. A su vez, Kumar *et al.*, 2006 (b), tampoco detectaron actividad en todas sus cepas, ya que sólo el 92,3% presentó actividad. La diferencia observada en los resultados según los distintos autores podría ser debida a las variaciones en la composición de calcio en el medio o por la baja concentración de sustrato utilizada, ya que algunos autores como Rudek, 1978, observaron incluso ausencia total de actividad lipolítica en el medio Tween 80, observando que era debido a la falta de suplementación del medio con CaCl₂.

La producción de un factor hemolítico en *C. albicans* está ampliamente estudiado (Manns *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1997; Tsang *et al.*, 2007). Sin embargo, existen pocas investigaciones respecto a la **actividad hemolítica** presentada por *C. tropicalis*. En este estudio se intentó evidenciar la capacidad de hemólisis de *C. tropicalis* tal y como afirmaban Luo *et al.*, en 2001.

Para la evaluación de la actividad hemolítica de las cepas de *C. tropicalis* del estudio se utilizó una modificación del ensayo en placa de Manns *et al.*, 1994, descrito por Luo *et al.*, 2001, usando como medio agar Sabouraud, suplementado con glucosa al 3% al que se añadió sangre de

cordero desfibrinada para poder determinar si las cepas de *C. tropicalis* producían algún factor hemolítico que tuviera capacidad de lisar los hematíes. El método de Luo *et al.*, 2001, permite comparar cualitativa y cuantitativamente las diferencias especie-específicas en la producción de hemolisinas. En relación al tipo de sangre utilizada en el estudio, en 2011, Favero *et al.* observaron que los aislamientos de *C. tropicalis* estudiados por ellos mostraban un patrón de hemólisis similar tanto en sangre de cordero como en sangre humana. También recientemente, Yigit y Aktas, 2009, realizaron un estudio comparativo entre la producción hemolítica de *Candida* en sangre de diferentes orígenes, comprobando que el medio de sangre de cordero representa el medio más apropiado para el estudio de la actividad hemolítica, motivo por el cual se utilizó ésta en el estudio. Favero *et al.*, 2011 también demostraron que el suplemento del 3% de glucosa no es necesario cuando se utiliza para el estudio Sabouraud dextrosa, puesto que se obtienen resultados similares. Sin embargo, estos autores probaron que la presencia de glucosa en el medio es necesaria, ya que parece ser un factor determinante en la producción de actividad hemolítica en *Candida* spp. Así, Manns *et al.*, 1994, describieron que *C. albicans* no produce actividad hemolítica cuando el medio no contiene glucosa, y Luo *et al.*, 2001, encontraron únicamente producción de actividad alfa pero no beta en medio de crecimiento sin glucosa, por lo que se cree que la producción de este factor hemolítico en *C. tropicalis* puede estar regulada por la glucosa, considerando la posibilidad de que este factor hemolítico contenga residuos glucídicos (Watanabe *et al.*, 1999). Autores como Moors *et al.*, 1992, mostraron la importancia en la adquisición del hierro de moléculas similares a los receptores del complemento en *C. albicans*, pero Watanabe *et al.*, 1999, pusieron de manifiesto que el componente activo con alta probabilidad no era una proteína, ya que la actividad hemolítica no es

inhibida por pepstatina A (inhibidor de la aspartil-proteasa) ni por el calor (100°C, 10 minutos), confirmando el papel del manano de la pared celular en la hemólisis. A pesar de que la naturaleza de estos factores hemolíticos en *C. tropicalis* aún es muy desconocida, estudios realizados con posterioridad plantean la posibilidad de que la hemólisis observada en presencia de glucosa se deba a la producción de etanol generada en la propia fermentación de la glucosa, siendo por tanto un factor de virulencia inherente en *C. tropicalis* (Shuster *et al.*, 2004).

La producción de hemolisinas se evaluó calculando el índice de actividad enzimática (Pz) con la fórmula de Williamson *et al.*, 1986. Las placas se incubaron a 37°C al 5% de CO₂. Para los estreptococos beta hemolíticos, las condiciones de la atmósfera de incubación puede influir en las reacciones hemolíticas, siendo óptima la producción de hemólisis bajo una atmósfera enriquecida con CO₂ entre el 5 y el 10%, siendo éste el motivo principal por el cual en este estudio se añadió para la incubación aproximadamente una atmósfera enriquecida al 5% de CO₂. Sin embargo, Favero *et al.*, 2011, no encontraron diferencias entre la incubación bajo condiciones normales o bajo condiciones enriquecidas con CO₂, observando que la expresión de los factores hemolíticos en *C. tropicalis* se muestra influenciada de forma diferente a su expresión en los modelos bacterianos.

Coincidiendo con los datos publicados por Luo *et al.*, 2001 y con los de França *et al.*, 2009 (a), todas las cepas estudiadas produjeron actividad hemolítica. Una vez transcurridas las primeras 24 horas de incubación a 37°C, todas las cepas de *C. tropicalis* estudiadas presentaron actividad hemolítica. El 90% de las mismas mostró actividad media, mientras que el resto, baja. Sólo a las 72 horas de estudio la hemólisis comenzó a ser más

evidente (en ese momento el 3,3% de las cepas presentó alta actividad), continuando el 90% con actividad media. El resto presentó actividad baja. Estos resultados parecen coincidir con los observados por Luo *et al.*, en 2001, a pesar de que ellos establecieron diferencias entre la producción de hemólisis parcial (lisis parcial de los eritrocitos causada por la reducción de la hemoglobina a metahemoglobina) y total (lisis completa de los eritrocitos) del medio. Así, describieron cómo durante las 48 primeras horas de incubación las cepas presentaron actividad parcial, y no fue hasta pasadas las 48 horas cuando la actividad hemolítica comenzó a ser más evidente, mostrando ya hemólisis completa del medio (hemólisis beta), lo cual evidenció un aumento de la actividad conforme transcurrió el tiempo, al igual que los resultados obtenidos en el presente estudio. Los resultados de Furlaneto-Maia *et al.*, 2008 y los de Favero *et al.*, 2011, también coinciden, ya que a mayor periodo de incubación encontraron mayor actividad hemolítica. A 22°C, durante las primeras 24 horas, la actividad permaneció baja (93,3%) o incluso nula para algunas cepas (6,7%). Sin embargo a las 72 horas, el 6,7% presentó valores altos y el resto mostró actividad media, observándose por tanto el mismo aumento de actividad que se describió para 37°C conforme transcurrió el tiempo. Para Negri *et al.*, 2010, todos los aislamientos de *C. tropicalis* de su estudio presentaron actividad hemolítica, y autores como Seneviratne *et al.*, 2011, encontraron que *C. tropicalis* junto con *C. albicans* y *C. glabrata* fueron las tres especies más productoras de actividad hemolítica incluidas en su estudio, y por el contrario, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* resultaron no hemolíticas, en general.

França *et al.*, 2010, así como Favero *et al.*, 2011, no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de actividad hemolítica entre cepas de *C. tropicalis* procedentes de diferentes orígenes, al

igual que reflejan los resultados de este estudio, donde la mayoría de las cepas presentó un patrón enzimático similar para la misma temperatura y tiempo, sólo con pequeñas diferencias. Sin embargo, debido a que el número de cepas clasificadas por su origen en cada grupo es pequeño, los resultados obtenidos podrían no ser extrapolables, siendo por tanto necesarios estudios con un mayor número de cepas para intentar aclarar este aspecto.

Manns *et al.*, 1994, encontraron que las formas filamentosas de *C. albicans* producían una mayor actividad enzimática que las formas levaduriformes. Estos resultados podrían estar en concordancia con los hallados en este estudio, puesto que a 37°C, temperatura a la cual existe una mayor proporción de formas filamentosas frente a las encontradas a 22°C, se obtiene una mayor producción de actividad enzimática. Posteriormente, Tanaka *et al.*, 1997, publicaron que sólo las formas filamentosas son las que poseen capacidad para producir actividad hemolítica. Sin embargo, convendría añadir que *C. glabrata*, considerada una especie hifa negativa, sí posee capacidad hemolítica, no estando por tanto muy claras las afirmaciones realizadas por estos últimos autores. A su vez, Tanaka *et al.*, 1997, encontraron que la capacidad de unir hemoglobina se encontraba aumentada en las formas filamentosas de *C. albicans*, ya que el número de receptores en las hifas era mayor que en las levaduras, y que sólo las hifas usaban hemoglobina como recurso de hierro, pero no así las levaduras.

Otros factores de patogenicidad como la capacidad de **adherencia** a los tejidos del hospedador así como a los dispositivos médicos, principalmente determinada por los componentes de la pared celular, constituye un primer paso fundamental en la producción de la infección por *Candida* (Haynes, 2001; JabraRisk *et al.*, 2001; Jones, 2001; Silva *et al.*, 2011 (b)), siendo necesaria para la posterior progresión de la enfermedad y presentando una buena correlación con la patogenicidad (Glee *et al.*, 2001; Okawa *et al.*, 2008). *C. tropicalis* ha sido descrita junto con *C. albicans* como una de las especies de *Candida* con mayor capacidad de adherencia (Klotz *et al.*, 1983). En este estudio se determinó la capacidad de adherencia a material plástico, mostrando todas las cepas capacidad de adherencia tanto inmediata como tardía a 37°C y 22°C, mayor en general a 22°C, siendo esta diferencia estadísticamente significativa sólo en el caso de la adherencia tardía. Para la evaluación de la capacidad de adherencia a plástico se utilizó el método descrito por Christensen *et al.*, 1985, con modificaciones posteriores realizadas por Blanco *et al.*, 1997. A su vez, para la determinación de la adherencia se han utilizado otros métodos, como técnicas de fluorescencia, inmunohistología y radioisótopos en el caso de adherencia a tejidos. En las fases iniciales, se observa un aumento rápido de la adherencia (aproximadamente durante los 5 primeros minutos iniciales), conocida como fase de anclaje o de interacción célula-superficie. Posteriormente, una segunda fase tiene lugar, y ocurre a entre los 5 y los 20 minutos de incubación, donde se forman los agregados intercelulares (fase de agregación o interacción célula-célula). El anclaje inicial de las células a la superficie representa un paso transicional hacia la fase de agregación, constituyendo ambas etapas lo que se mide como adherencia (Gaur *et al.*,

1999). En la adherencia se encuentran involucradas tanto uniones de tipo específico ligando-receptor, como uniones de tipo no específicas (Gallardo *et al.*, 2002). Estas uniones no específicas se han atribuido principalmente a las fuerzas hidrofóbicas de la superficie celular (Blanco *et al.*, 1997; Jabra-Rizk *et al.*, 2001; Gallardo *et al.*, 2002; Colling *et al.*, 2005). La **hidrofobicidad de superficie celular** facilita de manera indirecta la adhesión al sustrato, siendo uno de los factores primordiales en la unión a los tejidos, estando en *C. tropicalis*, a diferencia de lo que ocurre en *C. albicans*, poco estudiada. Se han descrito numerosos factores ambientales y condiciones de crecimiento que modifican la hidrofobicidad, como el crecimiento en medio líquido frente al crecimiento en medio sólido, las variaciones en la concentración de glucosa y otras sustancias como el estradiol, y sobre todo, destacando entre ellos, las variaciones observadas en función de la temperatura de incubación (Colling *et al.*, 2005). Así, en *C. albicans* se han descrito modificaciones del comportamiento en función de la temperatura, siendo hidrofóbicas a 22°C, e hidrofílicas a 37°C (Blanco *et al.*, 1997; Glee *et al.*, 2001; Colling *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2008). De acuerdo con esto, Hazen *et al.*, 2001, describieron la importancia de la distribución y conformación de las fibrillas de la pared celular en la hidrofobicidad en función de la temperatura, observando cómo alteraciones en los componentes de la superficie celular pueden implicar variaciones en la hidrofobicidad. Sin embargo, *C. dubliniensis* presenta hidrofobicidad constante, probablemente debido a la falta de variación de la capa fibrilar externa, no presentando cambios en función de la temperatura. En este estudio, para las cepas estudiadas de *C. tropicalis*, al igual que lo observado en los estudios realizados en *C. albicans*, se encontraron variaciones de la hidrofobicidad en función de la temperatura de incubación, mostrando mayores niveles de hidrofobicidad las cepas incubadas a 22°C que las

incubadas a 37°C. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con *C. albicans* donde se ha observado que las cepas muestran un carácter totalmente hidrofílico a 37°C, hasta el 66,7% de las cepas de *C. tropicalis* de este estudio presentaron hidrofobicidad alta a 37°C, aunque siempre, excepto para un caso, menor que a 22°C. Para la medida de la hidrofobicidad se han empleado diferentes métodos, como la determinación de ésta por ángulos de contacto, la adherencia a hidrocarburos y solventes orgánicos, estudios de coagregación o el anclaje a superficies hidrofóbicas como el estireno. El método utilizado en este estudio (test de adhesión microbiana a hidrocarburos; MATH; descrito por Rosenberg *et al.*, 1980) constituye una técnica de fácil realización, útil y práctico incluso para su uso diario en laboratorios de microbiología clínica como un método diagnóstico rápido al que aún no se le ha prestado la suficiente atención en este campo, siendo fundamental para la diferenciación entre especies similares y de difícil diferenciación por otros tests rápidos, como el test de filamentación, como ocurre con *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Blanco *et al.*, 2008). Otros métodos, como la medida de la hidrofobicidad por ángulos de contacto, requiere de un equipamiento más sofisticado y costoso no encontrado habitualmente en los laboratorios de microbiología clínica, no siendo útil por tanto para ser utilizado con este fin. La utilización de la fórmula: $[(DO_i - DO_f) / DO_i] * 100$, es también aplicada por otros autores, como en el trabajo de Rodrigues *et al.*, 1999 $[1 - (DO_f / DO_i)] * 100$.

El papel de la HSC en la virulencia no se encuentra aún totalmente aclarado. Algunos autores (Hazen *et al.*, 2001; Jabra-Rizk *et al.*, 2001), han publicado que las células hidrofóbicas de *C. albicans*, incubadas a 22°C, muestran mayor virulencia que las hidrofílicas, incubadas a 37°C, comprobándose que las células hidrofóbicas son más adherentes que las

hidrofílicas. Sin embargo, estudios realizados en otras especies, como los de Okawa *et al.*, 2008, en *C. tropicalis*, mostraron que la hidrofobicidad no presentaba correlación con la patogenicidad. En esta línea, Hazen *et al.*, 2001, afirman que la hidrofobicidad por sí misma no confiere a las cepas más virulencia, y Camacho *et al.*, 2007, y Silva *et al.*, 2010, no encontraron relación entre la HSC y la adherencia. En este estudio, sin embargo, a 37°C, para *C. tropicalis*, las cepas con mayor grado de HSC presentaron mayores valores de adherencia inmediata y permanente que las de menor nivel de hidrofobicidad. Estos datos parecen coincidir con los publicados por otros autores, como Glee *et al.*, 2001, Gallardo-Moreno *et al.*, 2002, y Masuoka y Hazen, 2004, quienes también encuentran una mayor capacidad de adherencia en las cepas hidrofóbicas. En el estudio, esta correlación positiva entre el aumento de la hidrofobicidad y adherencia se encontró únicamente a 37°C, ya que no ocurrió lo mismo a 22°C cuando se consideraron todos los valores obtenidos en su conjunto. Sin embargo, tomando únicamente valores bajos de HSC y de adherencia a 22°C, se observa cómo esta correlación lineal también se mantiene. Probablemente este hecho sea debido a que los niveles de HSC y de adherencia obtenidos fueron muy elevados a 22°C, y aquí se puede comprobar cómo a partir de un determinado valor máximo de HSC, la adherencia no continua aumentando, pudiendo ser causado por mecanismos de saturación de las levaduras adheridas al pocillo, ya que a partir de valores elevados de adherencia y de HSC se termina perdiendo la correlación entre ambas, sugiriendo estos datos que una vez alcanzado un determinado valor máximo de HSC, la adherencia y la HSC se comportan como variables independientes, pudiendo por tanto la falta de coincidencia observada entre los resultados de los diferentes autores deberse a este hecho, ya que muchos autores analizan los resultados globales obtenidos en general, y no tienen en cuenta la eliminación de los valores elevados de

HSC y adherencia a la hora de establecer correlaciones entre ellos. Así, los datos obtenidos en este análisis coinciden con los descritos previamente en *C. albicans* por Hazen, 1989, quien también encontró correlación positiva entre HSC y adherencia a 37°C, pero no a 22°C, o Samaranayake *et al.*, 2005. Estos resultados parecen corroborar la idea de que la hidrofobicidad, a pesar de contribuir a la adherencia de manera significativa, no constituye el único factor involucrado en la misma, sí influyendo en los estadios iniciales de la adherencia, pero debiendo encontrarse implicados otros mecanismos a partir de un determinado grado de adherencia, pudiéndose por tanto considerar que sólo la HSC por sí misma no predice la capacidad de adherencia a los tejidos, al igual que afirmaban Colling *et al.*, 2005, aunque sí proporciona una medida de la afinidad intrínseca del organismo a las superficies hidrofóbicas.

En relación a la **adherencia de tipo específico**, ésta se debe fundamentalmente a uniones de tipo ligando-receptor. Las interacciones hidrofóbicas inespecíficas facilitan a su vez las interacciones específicas adhesina-receptor, ya que permiten el acercamiento de las estructuras de superficie favoreciendo la unión entre ligandos y receptores. Los componentes de superficie celular de *Candida* involucrados en la adherencia de tipo específico reciben el nombre de adhesinas, e incluyen glicoproteínas (Chaffin *et al.*, 1998), principalmente manoproteínas, polisacáridos (Fukazawa y Kagaya, 1997) y lípidos (Ghannoum *et al.*, 1986; en: Gaur *et al.*, 1999). En *Candida*, el principal grupo de adhesinas está constituido por glicoproteínas de superficie celular codificadas por la familia de genes *ALS* (agglutinin-like sequence; *ALA* (agglutinin-like adhesin)) (Hoyer *et al.*, 1995), conteniendo la mayor parte de las especies patógenas de *Candida* múltiples ortólogos de estos genes (Butler *et al.*, 2009). Al tratarse de una

especie muy próxima genéticamente en la evolución a *C. albicans* (Barns *et al.*, 1991; Fitzpatrick *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2009), muchos de los genes presentes en esta especie muestran un nivel de similitud entre sus secuencias con los de *C. albicans* mayor del 99%. Hasta 16 genes diferentes que codifican regiones ALS-like han sido identificados en *C. tropicalis* (genes ALSt) (Moran *et al.*, 2011). En este estudio se procedió a la determinación de la expresión de la proteína Alst1 en las cepas de *C. tropicalis*, tanto en células planctónicas como sésiles de biofilm mediante la utilización de transcripción reversa-PCR a tiempo real a partir del RNA aislado. La secuencia del gen *ALST1* estudiado se obtuvo en primer lugar por homología con el genoma de *C. albicans* publicado en la base de datos <http://www.candidagenome.org/>, siendo posteriormente comprobada con las secuencias previamente descritas por Punithavathy y Menon, 2012. Los genes que codifican para este tipo de proteínas tienden a estar localizados en cromosomas que también contienen los genes *SAPs*, principalmente en los cromosomas 3, 6 y R (Monod *et al.*, 1994; Monod *et al.*, 1998). Este dato en *C. tropicalis* fue comprobado por Hoyer *et al.*, 2001, indicando que la expresión de estos genes puede ocurrir de manera simultánea, relacionándose por tanto una mayor expresión de genes *SAPs* con una elevada expresión de los genes involucrados en la adherencia. A su vez, las proteínas Saps activan enzimas que modifican proteínas de unión o ligandos tanto de superficie de *Candida* como de células del hospedador, que alteran la hidrofobicidad de superficie celular o facilitan cambios conformacionales, permitiendo una mejor adhesión. Así, algunos estudios han demostrado que las cepas de *C. albicans* que presentan mayor actividad proteolítica se adhieren de manera más significativa a las células epiteliales in vitro que las de menor producción de proteasas (Ghannoum *et al.*, 1986). Otros autores han demostrado disminución de la adherencia al añadir inhibidores de

proteinasas (pepstatina) (Borg y Rüchel, 1988; El-Maghrabi *et al.*, 1990). En este estudio no se encontraron correlaciones aceptables entre la actividad aspartil-proteasa detectada y la adherencia inmediata y tardía tanto a 37 como a 22°C. Sin embargo, para valores elevados de expresión enzimática se obtuvo siempre cierta mejoría en relación con la adherencia, aunque siempre con una correlación baja. Se cree que en *C. albicans*, las proteinasas pueden actuar como ligandos a complejos de superficie celular.

La adherencia de *C. albicans* a proteínas y células se caracteriza por dos pasos secuenciales, ya que en primer lugar tiene lugar el anclaje a las superficies, seguido posteriormente de agregación entre las células de *Candida* (interacción célula-célula) (Gaur *et al.*, 1999). El anclaje de las levaduras induce agregación por sobreexpresión del gen *ALAI*, y *ALSI* se comporta de manera similar. Cuando las células no expresan cantidades suficientes de adhesina, produciendo baja concentración, sólo tiene lugar el anclaje a las superficies, mientras que si la expresión ocurre en cantidades suficientes, tanto el anclaje como la posterior agregación entre células tienen lugar, sirviendo ya de este modo como lugar de anclaje no únicamente la superficie colonizada, sino a su vez las propias células de *Candida*. Este hecho ha demostrado ser fundamental a la hora de la formación de los biofilms. Coincidiendo con estos datos, en este estudio se observó cómo en las células sésiles crecidas en los biofilms presentaban claramente una mayor expresión de esta proteína que en sus correspondientes planctónicas, apareciendo una evidente sobreexpresión de la misma de aproximadamente 4,5 veces más (valor medio) de las cantidades obtenidas en las células planctónicas. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la expresión proteica entre las cepas muy productoras y las poco productoras de biofilm. A su vez, autores como Mores *et al.*, 2009, también destacan que otras

proteínas, como las enzimas saps también presentan sobreexpresión en biofilms.

Otro factor decisivo en la patogenicidad de las diferentes especies de *Candida* reside en su capacidad de **producción de biofilm**. La mayoría de los microorganismos en su hábitat natural se encuentran formando ecosistemas de biofilms generalmente anclados a superficies, y no como estructuras de vida libre (células planctónicas). El biofilm debe ser comprendido como una comunidad microbiana compleja y altamente diferenciada (Watnick y Kolter, 2000). Variables estudios genéticos han mostrado que los biofilms se forman siguiendo múltiples etapas o fases, requieren de señalización intercelular (quórum-sensing) y presentan un perfil de transcripción génica diferente de sus correspondientes planctónicas. La formación de estas organizaciones multicelulares debe ayudar a la supervivencia en ambientes con condiciones limitantes de nutrientes mediante el acceso a los que se encuentran acumulados en las superficies, o bien por su obtención a partir de las células lisadas en la propia población. La formación de biofilm se encuentra involucrada en una considerable proporción de infecciones clínicas, teniendo una enorme importancia su implantación sobre las superficies de los dispositivos biomédicos, ya que las células inmersas en el biofilm presentan una resistencia a los distintos antifúngicos y al sistema inmunitario aumentada en comparación con sus correspondientes planctónicas (Hawser y Douglas, 1994; Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2001 (c); Douglas, 2002; Ramage *et al.*, 2002 (a); Cocuaud *et al.*, 2005; Kumamoto y Vines, 2005; López-Ribot, 2005; Seneviratne *et al.*, 2008). La adherencia juega por tanto un papel determinante en la formación del biofilm, ya que en primer lugar las células deben anclarse a la superficie colonizada para posteriormente

producirse el desarrollo del biofilm (Colling *et al.*, 2005; Kumamoto *et al.*, 2005; Perumal *et al.*, 2007). Como los dispositivos biomédicos se encuentran normalmente en contacto con fluidos corporales como orina, sangre, saliva o líquido sinovial, su superficie adquiere glicoproteínas y sustancias que favorecen la unión específica de las adhesinas, como proteínas del suero (fibrinógeno y fibronectina) o de la saliva, constituyendo de esta manera un primer paso para la implantación del biofilm en el dispositivo.

En este ensayo se procedió a realizar el estudio de la formación de biofilm mediante la determinación por espectrofotometría (densidad óptica) de la biomasa formada, así como mediante el Índice de Slime, que permite establecer una relación entre el biofilm formado y el crecimiento, y adicionalmente mediante la reducción del XTT, medida de la actividad metabólica de las células que forman parte del biofilm. El ensayo de reducción del XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[phenylamine) carbonil]-2H-tetrazolium hydroxide) demuestra una excelente correlación entre la densidad celular de la biopelícula y su actividad metabólica (Ramage *et al.*, 2001 (a)). El uso de ensayos colorimétricos como el XTT para determinar la viabilidad celular y por tanto la sensibilidad de las células de *Candida* en los biofilms a antifúngicos, está ampliamente aceptada. Todas estas determinaciones se realizaron tanto a 37°C como a 22°C, midiendo el biofilm a las 24 y a las 96 horas de incubación, ya que según lo observado en *C. albicans* (Ramage *et al.*, 2001 (b)), durante las primeras horas del desarrollo de biofilm, entre las 0 y 2 horas se produce la adherencia inicial de las formas levaduriformes, seguida de la germinación y de la formación de micro-colonias entre las 2 y las 4 horas, y posteriormente ocurre la filamentación, crecimiento

confluente (6-8 horas), proliferación (8-24 horas) y maduración o envejecimiento del biofilm (a partir de las 24-48 horas), tratando por tanto de realizar el estudio durante la proliferación del biofilm y durante la fase o estado de maduración del mismo. El estudio se realizó en agitación, ya que se ha comprobado diferente desarrollo de biofilm en condiciones estáticas y dinámicas, puesto que la agitación favorece la formación de la matriz exopolimérica. Estas condiciones además se aproximan más que la incubación en condiciones estáticas a las encontradas in vivo, favoreciendo la formación de biofilm en ciertas cepas. Otros autores sin embargo (Krom *et al.*, 2009) afirman que los efectos de la agitación no se observan en las placas de 96 pocillos, debido a que no se produce suficiente flujo de medio en esto pocillos. En cuanto al punto de corte (cut-off) utilizado a la hora de decidir si una cepa se considera productora o no de biofilm se tomó como valor límite inferior la media de la adherencia para esa temperatura y tiempo, considerando que valores superiores a ellos ya definen a una cepa como productora de biofilm y no simplemente adherente. Autores como Hasan *et al.*, 2009, establecen otros puntos de corte diferentes. Así, una cepa que presente una $DO < 0,1$ equivaldría a ser incluida en el grupo de cepas no formadoras de biofilm, y dividen a su vez a las cepas como poco o altamente productoras de biofilm a partir de una DO de 0,50, aunque en esta publicación los autores no explican el motivo de la elección de estos valores.

La producción de biofilm en *Candida* resulta variable en función de la especie estudiada y a su vez, esta variabilidad aparece también entre las diferentes cepas de una misma especie, aunque parece permanecer estable y ser específica en cada cepa. Autores como Hasan *et al.*, 2009, Negri *et al.*, 2010 o Silva *et al.*, 2011 (b), consideran a *C. tropicalis* como una de las

especies de *Candida* con mayor capacidad de formación de biofilm. Así, coincidiendo con estos datos, en este estudio, todas las cepas de *C. tropicalis* fueron formadoras de biofilm, aunque los resultados variaron en función del método usado en su determinación, así como en las condiciones de cultivo utilizadas. Hasan *et al.*, 2009 encontraron claras evidencias de asociación entre la formación de biofilm y la tasa de crecimiento de la cepa, procediéndose por tanto también a realizar la determinación del crecimiento con el fin de establecer su posible relación a través de la determinación del Índice de Slime. A 37°C se observó cómo la fase estacionaria del crecimiento se alcanzó a las 24 horas, permaneciendo los valores similares a las 96 horas, mientras que a 22°C, el crecimiento fue más lento, siendo necesario esperar a las 96 horas para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. De igual manera, cuando se midió el biofilm formado mediante absorbancia (DO), para 22°C y 24 horas de incubación, sólo 17 cepas aparecieron como formadoras de biofilm, siendo necesario esperar hasta las 96 horas para detectar actividad en 27 de las 30 cepas del estudio. A esta temperatura para todas las cepas el biofilm fue mayor para las 96 horas que para las 24 horas, observando por tanto que no se alcanza la formación completa del biofilm hasta transcurridas más de 24 horas. Por el contrario, a 37°C y para ambos tiempos, resultó similar el número de cepas productoras de biofilm, pudiendo pensarse según estos datos que la maduración del biofilm se alcanza antes a 37°C que a 22°C. Estos resultados ponen de manifiesto que la formación del biofilm depende del crecimiento, encontrando que a 24 horas, la DO del crecimiento fue menor para 22°C que para 37°C, y sin embargo, para las 96 horas de incubación fue mayor a 22°C, probablemente debido a la mayor turbidez de las formas levaduriformes predominantes a esta temperatura. Por esta razón, se procedió a expresar los resultados en función del Índice de Slime, ya que de esta manera no se ven

afectados los resultados del biofilm en función del crecimiento. Los mejores resultados se obtuvieron a 22°C y 24 horas, ya que a esta temperatura y tiempo aumentaron en 4 el número de cepas consideradas productoras de biofilm, llegando a la conclusión que el Índice de Slime resulta un buen marcador cuando por causa de diferentes factores no existe un buen crecimiento, siendo útil como factor corrector de la producción de biofilm en estas condiciones. Al aplicar este parámetro, se comprueba cómo tras corregir con el crecimiento, para 37°C la formación de biofilm es similar a las 24 y a las 96 horas, mientras que para 22°C, resulta superior para 96 horas, corroborando que a 37°C y 24 horas el biofilm ya aparece maduro, mientras que para 22°C tiene que transcurrir más tiempo para la maduración. Hasan *et al.*, 2009, encontraron relación entre la mayor formación de biofilm y la menor tasa de crecimiento. En este ensayo, coincidiendo con lo descrito por estos últimos autores, al realizar la diferenciación entre cepas, sí se pudo comprobar cómo para ambas temperaturas, las cepas con menor crecimiento resultaron comprendidas entre las más formadoras de biofilm. La cuantificación del biofilm formado mediante el ensayo de reducción del XTT permite establecer la actividad metabólica de las células inmersas en el mismo. En el estudio, para 22°C la mayoría de las cepas presentó mayor actividad a las 96 que a las 24 horas. Sin embargo, al corregir mediante el crecimiento, los valores obtenidos resultaron similares, siendo ligeramente mayores a 96 horas para algunos casos, existiendo una relación lineal entre ellos muy elevada ($R^2=0.93$). Por el contrario, a 37°C, en el 90% de las cepas la actividad resultó mayor para las primeras 24 horas. Ramage *et al.*, 2001 (a) describieron cómo los biofilms son muy activos metabólicamente durante las 8 primeras horas de incubación, pero a medida que el biofilm madura, y su complejidad aumenta (a las 24-48 horas), la actividad metabólica alcanza un máximo, probablemente siendo reflejado el aumento

del número de células del biofilm maduro. Así, en este estudio, el valor máximo a 22°C se alcanza pasadas las primeras 24 horas, permaneciendo elevado. Sin embargo, para 37°C, al alcanzarse antes el valor máximo, la disminución de la actividad observada a las 96 horas puede ser debida a que el biofilm se encuentra en fases de desarrollo más avanzadas que a 22°C, estando por tanto ya en fase de envejecimiento del biofilm. Esto explicaría además por qué la actividad enzimática a 37°C desciende a las 96 horas con respecto a las primeras 24 horas, ya que en este estadio comenzaría la depleción de oxígeno o nutrientes en el biofilm. Los resultados del estudio coinciden con los de Bizerra *et al.*, 2008, ya que se observa una relación lineal entre la actividad metabólica y la densidad celular (biomasa del biofilm) detectada por espectrofotometría. Por tanto, si únicamente se pretende cuantificar el biofilm formado, la evaluación utilizando el método del XTT para la actividad enzimática no resulta necesario. Andes *et al.*, 2004, describen que la maduración del biofilm *in vivo* ocurre en las primeras 24 horas del desarrollo, mientras que *in vitro* aparece tardíamente entre las 48 y las 72 horas.

Las células sésiles del biofilm se caracterizan por diferir de sus correspondientes planctónicas en múltiples aspectos y presentar características fenotípicas diferentes de éstas. Así, se ha observado una sobreexpresión de múltiples genes involucrados en los mecanismos de resistencia a antifúngicos (Bizerra *et al.*, 2008), en el metabolismo de los aminoácidos y de los nucleótidos, en la síntesis proteica, y diversas funciones metabólicas, así como en genes implicados en la adherencia, como se ha comentado anteriormente. Se ha observado cómo mutaciones que afectan a la adherencia repercuten en la formación del biofilm. Así, alteraciones en factores de transcripción que regulan la expresión de

proteínas de pared, muestran reducida adherencia y formación de biofilm disminuida. Como se comentó en el apartado anterior, en este estudio, las células sésiles de los biofilms presentaron una sobreexpresión de la adhesina Alst-1 con respecto a las planctónicas, reforzando de esta manera la importancia que desempeñan las proteínas involucradas en la adherencia en la formación del biofilm. En *S. cerevisiae* se ha detectado que la estabilidad de la adherencia no se encuentra afectada por los niveles de Ala1p, pero sin embargo, la agregación resulta proporcional a los niveles de Ala1p. En *Candida*, Gaur *et al.*, 1999, observaron que Als1 se comporta en este aspecto como Ala1p, siendo responsable de un tipo de adherencia caracterizado por el anclaje a la superficie colonizada, y la posterior agregación celular. Por tanto, la sobreexpresión de la proteína Als1 encontradas en este estudio en biofilm con respecto a las células planctónicas resulta congruente con estas afirmaciones, ya que en este caso, la agregación entre células facilitaría la formación del biofilm. A su vez, los datos coinciden con los publicados por Nailis *et al.*, 2010, ya que estos autores también demostraron una sobreexpresión de las adhesinas de la familia ALS en biofilms de *C. albicans*.

En este estudio se relacionaron las diferentes actividades enzimáticas con la producción de biofilm al estudiarse todas las cepas conjuntamente, sin encontrarse correlación clara entre ambos factores de patogenicidad. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Marcos-Arias *et al.*, 2009 (c), ya que tampoco observaron correlación entre estos factores.

La colonización por *Candida* de los diferentes dispositivos biomédicos no sólo predice una posterior infección, sino que también desarrolla un efecto adverso sobre la función del mismo. La formación de

biofilm sobre dispositivos como shunts, prótesis, catéteres venosos centrales o periféricos, catéteres de hemodiálisis y de diálisis peritoneal, catéteres urinarios, etc..., permite la persistencia de la infección a este nivel. Con respecto a los catéteres de origen urinario, *Candida* spp. representa el patógeno más frecuentemente aislado a partir de muestras urinarias de pacientes en UCIs quirúrgicas (Ramage *et al.*, 2006), viéndose aumentada la presencia de candiduria en estas unidades en los últimos años (Álvarez-Lerma *et al.*, 2003). Las infecciones urinarias por *Candida* son en su mayoría nosocomiales, y ocurren en pacientes con catéteres urinarios. La duración del mantenimiento del catéter se relaciona directamente con la incidencia de candiduria. *C. tropicalis* constituye la segunda (Matsumoto *et al.*, 2002, Weinberger *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2007) o tercera especie (Kauffman *et al.*, 2000; Álvarez-Lerma *et al.*, 2003), según autores, del género *Candida* aislada con mayor frecuencia a partir de cultivos de orina. Las infecciones del tracto urinario por *Candida* guardan relación con la presencia de catéteres urinarios, y poseen una elevada mortalidad, atribuida principalmente a las enfermedades de base que suelen presentar los pacientes con candiduria (Kojic y Darouiche, 2004). A su vez, la presencia de candiduria puede constituir un marcador precoz de infecciones diseminadas en pacientes críticos, aunque en otros casos puede constituir una situación benigna autolimitada, incluso sin necesidad de tratamiento. En este estudio se trató de cuantificar el biofilm formado sobre los dispositivos biomédicos en el curso de una candiduria producida por *C. tropicalis*, reproduciendo in vitro las características que tienen lugar in vivo durante la infección. Así, se procedió a establecer la cantidad de biofilm formado sobre catéteres urinarios (sondas Foley) de látex con cubierta de silicona, y con el fin de intentar asemejar las condiciones que tienen lugar in vivo durante el curso de una candiduria, se hizo pasar a su través un flujo

dinámico continuo de orina a una temperatura de incubación de 37°C, favoreciendo de esta manera el desarrollo extensivo del biofilm. La composición de la orina artificial fue tomada de Silva *et al.*, 2010, usada previamente por Jain *et al.*, 2007. Hasta ahora, el método más utilizado para este fin ha sido el modelo del dispositivo de Robbins y sus variaciones y múltiples modificaciones. También existen otros tipos, como el dispositivo de Calgary, reactor-disco, CDC reactor, etc... Sin embargo, el método usado en este trabajo se basó en el procedimiento seguido por autores más recientes (Negri *et al.*, 2012), que consiste en un dispositivo que incluye una bomba de flujo que permite el paso del líquido con el inóculo inicial a través del catéter y su posterior salida del dispositivo. Una vez conseguida la formación in vitro del biofilm, dentro de los métodos utilizados con mayor frecuencia para conseguir el desprendimiento del mismo y la liberación de los organismos asociados a él, figuran los que incluyen algún tipo de fuerza mecánica, como el cepillado intraluminal, la sonicación o la agitación por vórtex (Donlan y Costerton, 2002). A su vez, el procedimiento más usado para la medida del biofilm una vez liberado consiste en la realización del recuento en placa. En este procedimiento, las células resuspendidas y dispersas del biofilm son inoculadas en un medio sólido y posteriormente se procede a la realización del recuento de las unidades formadoras colonias presentes en la placa, cuantificando de esta forma las células del biofilm, y obteniendo una medida del total del biofilm acumulado en el dispositivo. Otros métodos como la rotación del catéter en placa (técnica de Maki), la medida de la absorbancia o la cuantificación de las proteínas totales, han sido adicionalmente utilizados para la cuantificación del biofilm. Para que este estudio fuera más completo, se incluyeron dos técnicas diferentes de entre las descritas anteriormente para obtener la cuantificación del biofilm formado en el catéter Foley. En primer lugar, se utilizó la técnica del

recuento en placa tras el raspado mecánico de su interior y la posterior sonicación y vortado del catéter, consiguiendo de esta manera un desprendimiento y recuperación del biofilm del interior del catéter, cuantificando posteriormente las unidades formadoras de colonias recuperadas en la placa de Sabouraud inoculada tras la incubación de la misma durante 24 horas. Como segundo método se utilizó la técnica de tinción directa del catéter con cristal violeta y su posterior cuantificación por absorbancia. De las cuatro cepas estudiadas, dos resultaron formadoras de biofilm por la medida de la absorbancia del cristal violeta, y dos fueron no formadoras. Sin embargo, tras realizar el raspado, sonicación y vortado del catéter, la recuperación de las unidades formadoras de colonias resultó mayor para las cepas no productoras de biofilm. Estos resultados parecen coincidir con los obtenidos por Silva *et al.*, 2010, quienes observaron que en orina artificial *C. tropicalis* no formaba densas cantidades de biofilm, y sin embargo, el recuento de células viables resultó elevado. No obstante, esta aparente contradicción observada en los resultados puede deberse a varios motivos. En primer lugar, es posible que estos datos reflejen el mayor grado de filamentación existente en el biofilm. En las cepas no formadoras de biofilm, las unidades formadoras de colonias recuperadas se deberían a células que se encontrarían simplemente adheridas al catéter, fundamentalmente en forma de levaduras, mientras que las incluidas en el biofilm presentarían una mayor variabilidad morfológica, estando presentes simultáneamente formas filamentadas y levaduriformes, que retendrían en gran medida el cristal violeta y sin embargo, el recuento en placa no sería tan elevado como el caso anterior. Otra posibilidad a destacar es que en el caso de las cepas no productoras de biofilm, la adherencia pudiera ocurrir a lo largo de toda la longitud del catéter, y sin embargo en las formadoras de biofilm, las células del biofilm se encontrarían agregadas en microcolonias

separadas entre ellas por canales de agua, no ocupando toda la superficie del catéter, quedando por tanto zonas del catéter libres de células. También es posible que estos resultados deriven de las características específicas presentadas por las células constitutivas del biofilm, ya que como se ha descrito anteriormente, difieren en gran medida de sus correspondientes planctónicas, existiendo en el biofilm células quiescentes y persistentes, que pueden presentar un menor grado de actividad y poseer por tanto una curva de crecimiento diferente o más ralentizada en referente a las planctónicas, pudiendo presentar inhibición de la división y multiplicación celular, o actividad celular mínima. En relación a este punto, Jain *et al.*, 2007, encontraron que el mayor número de unidades formadoras de colonias recuperadas correspondía a los biofilms que presentaban mayores valores de XTT. En este estudio sin embargo, no se midió actividad, y simplemente biomasa, con lo cual, ésta también podría ser una de las razones que justificarían los resultados obtenidos, pudiendo presentar sin embargo las cepas que produjeron menor biofilm mayor actividad metabólica. Hay que tener también en consideración que la medida del biofilm se realizó a las primeras 24 horas. Es posible sin embargo, que si el estudio se hubiera realizado en condiciones más tardías, con el biofilm ya en fase de envejecimiento, o en condiciones donde los nutrientes escasearan, podrían existir un mayor número de células desprendidas del biofilm con capacidad de diseminación hacia otros órganos, pudiendo dar de esta manera un mayor recuento en el estudio en placa. Finalmente, otra posibilidad que tampoco puede descartarse es que el método utilizado en este estudio no recupere totalmente el biofilm adherido al catéter, y que existiera por tanto un defecto en la obtención del biofilm formado, siendo en este caso necesaria la aplicación de otra serie de técnicas para conseguir la correcta recuperación de las células constitutivas del biofilm. De cualquier modo, la recuperación

de un alto número de unidades formadoras de colonias en cepas no productoras de biofilm resulta de enorme importancia, ya que implica que bajo las condiciones adecuadas, *C. tropicalis* puede colonizar y proliferar en el interior del catéter en presencia de orina y poseer potencial para infectar otros órganos distales. Para ratificar la formación de biofilm obtenida por este método, se comprobó también por la técnica descrita anteriormente realizada en placa de microtitulación de 96 pocillos, obteniendo resultados similares cuando en lugar de utilizar medio RPMI-1640 como en los apartados previos, se utilizó orina artificial, observando que en medio RPMI-1640, los resultados obtenidos no son superponibles ni se correlacionan con los obtenidos al incubar con orina artificial, destacando así la importancia del medio de cultivo utilizado en los ensayos. Estos datos coinciden con el estudio realizado por Jain *et al.*, 2007, donde se obtienen diferentes resultados en la formación del biofilm en función del medio utilizado. Uppuluri *et al.*, 2009, encontraron que los biofilms producidos en presencia de orina artificial presentaban menor grado de complejidad y una estructura más distorsionada que los crecidos en medio RPMI-1640. Tal y como se ha comentado anteriormente, la formación de biofilms maduros depende fundamentalmente de las condiciones ambientales, como la composición del medio de cultivo (observado en este estudio), las variaciones de pH, de concentración de oxígeno,.. A su vez, se ha observado que un aumento en la concentración de glucosa del medio de cultivo favorecería la formación de biofilm, pudiendo este hecho ser representativo de lo que ocurre en los pacientes con Diabetes Mellitus. La naturaleza de la superficie de contacto influye también significativamente en la magnitud de la formación del biofilm, que se encuentra incrementada en látex en comparación con otras sustancias como polivinilo, pero siendo menor que el formado sobre poliuretano o silicona, probablemente debido a la altamente

específica expresión génica inducida por la superficie de contacto. Para la realización de este estudio se incluyeron catéteres Foley fabricados de látex recubiertos de silicona, puesto que son los más frecuentemente utilizados en el hospital de origen de las cepas incluidas en este trabajo.

En relación con el **dimorfismo** o transición levadura-hifa/pseudohifa, Hazen *et al.*, 1991, describieron en *C. albicans* cómo las levaduras hidrofóbicas producen tubos germinales, mientras que las hidrofílicas permanecen en forma de levaduras. También Glee *et al.*, 1995, afirmaron que las levaduras hidrofóbicas de *C. albicans* producían hifas, mientras que las hidrofílicas sólo presentaban pseudohifas y morfologías levaduriformes. De acuerdo con este punto, se ha publicado que las formas filamentosas de *C. albicans* se adhieren más que las levaduras (Martínez-López *et al.*, 2006) y presentan un mayor grado de HSC (Rodrigues *et al.*, 1999). *C. tropicalis*, al igual que *C. albicans*, produce hifas verdaderas (Martin, 1979; Silva *et al.*, 2011 (b)). En este estudio, coincidiendo con lo observado en *C. albicans*, para *C. tropicalis* esta relación se aprecia de forma evidente a 37°C, tanto a las primeras 24 horas de filamentación como a las 96 horas, alcanzando las cepas de mayor HSC un mayor nivel de filamentación, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Para 22°C, sin embargo, y probablemente debido al elevado grado de HSC presentado por todas las cepas, los resultados obtenidos sí indicaron una relación clara entre la HSC y la adherencia cuando sólo los niveles bajos de éstas se tuvieron en consideración, pero menos clara sin embargo en relación con la filamentación. De esta forma, a esta temperatura, donde la HSC y la adherencia tardía son mayores que a 37°C, se detecta no obstante, un menor grado de filamentación, conduciendo estos datos a pensar que la HSC ejerce más influencia en la adherencia que la propia filamentación.

Estos datos parecen coincidir con los obtenidos por Negri *et al.*, 2010, ya que estos autores tampoco encontraron una evidente relación entre la filamentación y la capacidad de adherencia. Jin *et al.*, 2005, encontraron relación entre la adherencia y el grado de filamentación, pero sin embargo, y siguiendo la línea de los resultados obtenidos en este estudio, otros autores muestran la falta de claridad existente entre ambos. Así, estudios como el realizado en *C. albicans* por Grubb *et al.*, 2009, en condiciones estáticas, muestran una mayor adherencia de las hifas a las células endoteliales que las levaduras. Sin embargo, el mismo estudio realizado bajo condiciones de flujo dinámico revela que las formas levaduriformes se adhieren en mayor número que las hifas y pseudohifas. Estas consideraciones son consistentes con el modelo general de infección por *Candida*, ya que las formas levaduriformes se adhieren al endotelio previamente a su germinación, y se ha demostrado que mutantes defectivas en capacidad de filamentación pueden producir extravasación hacia tejidos profundos. A su vez, también se ha observado cómo levaduras como *C. glabrata*, que permanece en forma levaduriforme, también produce candidiasis diseminada, no estando por tanto totalmente aclarada la relación entre la adherencia y la filamentación. Klotz *et al.*, 1983, afirmaron que las levaduras de *C. albicans* y *C. tropicalis*, penetraban a través del endotelio mediante un mecanismo independiente de la formación del tubo germinal, demostrando que la invasión vascular ocurre cuando los tubos germinales aún no se han desarrollado. Por otro lado, se ha comprobado en *C. albicans*, que la mayor penetración en los tejidos se correlaciona con un aumento del número de hifas (Schaller *et al.*, 2000), y que alteraciones en genes implicados en la transición de levadura a hifa como *CPHI* o *EFG1* producen fallo en la formación de hifas, mostrando estas cepas menor virulencia (Korting *et al.*, 2003). Así, el grado de daño de las células endoteliales resulta proporcional

a la longitud media del tubo germinal en *C. albicans* (Ghannoum *et al.*, 1992). Algunos estudios realizados en *C. albicans* han demostrado que durante la transición de levadura a hifa, cientos de genes son regulados, sugiriendo que una amplia red de genes se encuentra involucrada en los cambios morfológicos (Lane *et al.*, 2001). Se conoce que los antígenos de superficie de *C. albicans* varían de manera significativa cuando ocurre la transición de levadura a hifa. Como ejemplo de la diferencias antigénicas, se sabe que las levaduras estimulan la formación de IFN- γ , y sin embargo existe una pérdida de su producción en respuesta a las formas filamentosas, mostrando este hecho relevante importancia, ya que el IFN- γ promueve la respuesta inmunitaria contra este patógeno (van der Graaf *et al.*, 2005).

La filamentación parece desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de la organización espacial de la arquitectura del biofilm maduro. Así, para *C. albicans*, Ramage *et al.*, 2002 (c), describieron que la filamentación es esencial para proporcionar integridad estructural al completo desarrollo del biofilm, ya que cepas defectivas en el gen *EFG1* que presentan falta de filamentación son incapaces de formar biofilm. Estos datos van acordes con los descritos previamente por Hawser y Douglas, 1994, y Baillie y Douglas, 1999, que demostraron la importancia de las hifas en la formación del biofilm. También Hasan *et al.*, 2009 observaron que la formación de hifas era más generalizado en las cepas altamente productoras de biofilm que en las poco productoras, y Jin *et al.*, 2005, relacionaron a su vez la capacidad de filamentación con la producción de biofilm. Los datos de este estudio parecen ir en consonancia con los de estos autores, ya que las cepas que no presentaron filamentación o filamentaron en menor grado fueron las menos formadoras de biofilm, pareciendo de esta manera que la capacidad individual de filamentación de cada cepa influye de manera

decisiva en la posterior capacidad de formación de biofilm. En este estudio, para 37°C sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el biofilm formado corregido con el crecimiento (IS-DO) a las 24 horas de los diferentes grupos clasificados en función de los distintos grados de filamentación, ocurriendo de manera similar con la actividad metabólica del biofilm, así como la actividad del biofilm corregida con el crecimiento (IS-XTT). Para las 96 horas sin embargo no se pudo apreciar esta diferencia de forma estadísticamente significativa. A 22°C para el biofilm (DO) a las 24 horas, sí se encontraron diferencias entre los grupos de los diferentes grados de filamentación así como con el biofilm corregido con el crecimiento (IS), pero a diferencia de lo ocurrido a 37°C, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad del biofilm de los diferentes grupos de filamentación, ni entre la actividad del biofilm corregida con el crecimiento (IS-XTT), mientras que a las 96 horas, fue cuando sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la actividad del biofilm, así como para la actividad del biofilm corregida con el crecimiento (IS-XTT).

Según estos datos, se pudo comprobar por tanto cómo las cepas que se clasificaron en niveles de menor filamentación o no filamentadas, presentaron menor producción de biofilm en los estadios iniciales de la formación del biofilm a 37°C, no detectándose esta diferencia una vez obtenido el biofilm a las 96 horas. Para la actividad metabólica a 22°C, no se observan diferencias estadísticamente significativas durante las primeras 24 horas, pero sí a las 96 horas, a diferencia de lo detectado a 37°C. Según los resultados de este trabajo se puede afirmar que cepas con niveles de menor filamentación o no filamentadas presentan menor producción de biofilm en los estadios iniciales de la formación del biofilm a 37°C, no detectándose

esta diferencia una vez obtenido el biofilm a las 96 horas. Para la actividad metabólica a 22°C, no se observan diferencias durante las primeras 24 horas, pero sí a las 96 horas, de manera distinta a lo detectado para 37°C. Adicionalmente, Hasan *et al.*, 2009, también ponen de manifiesto que las cepas de crecimiento lento presentan mayor grado de filamentación coincidiendo con las más formadoras de biofilm. A su vez, Sudbery *et al.*, 2004, y coincidiendo con los datos obtenidos en este estudio, afirman que la temperatura de 37°C induce la formación de formas filamentosas, y temperaturas por debajo de los 30°C favorecen la aparición de morfología levaduriforme. Así, en este estudio, a 37°C se apreció una mayor filamentación a esta temperatura al compararla con las formas recuperadas a 22°C. Esta diferencia se observó tanto a las 24 como a las 96 horas de estudio. Al analizar la variabilidad observada entre las cepas a 37°C y 22°C, en función del crecimiento y su relación con la formación de biofilm, se comprobó cómo a 22°C el crecimiento resultó más lento que a 37°C, aunque a las 96 horas éste terminó siendo mayor. De acuerdo con las afirmaciones de Hasan *et al.*, 2009, la formación de biofilm para 22°C y 96 horas resultó mayor que para 37°C, observando por tanto una mayor producción de biofilm en las condiciones que favorecieron un crecimiento más lento (22°C). Al correlacionar estos factores entre las diferentes cepas crecidas a una misma temperatura y tiempo, se obtuvo que para 37°C y 24 horas, no se pudo observar que las cepas con menor crecimiento conllevaran una mayor formación de biofilm o un mayor grado de filamentación que el resto de las cepas. Sin embargo, las cepas con mayor capacidad de formación de biofilm a esta temperatura y tiempo sí mostraron a su vez mayor nivel de filamentación. Para las 96 horas de estudio sí se probó cómo el 64,70% de las cepas que tuvieron menor crecimiento coincidieron con las cepas más formadoras de biofilm, presentando todas a su vez una elevada capacidad de

filamentación. Para 22°C y 24 horas, esta relación fue más evidente que para 37°C, mostrando el 71,4% de las cepas con menor crecimiento valores comprendidos entre los más elevados de biofilm medidos por DO e IS-DO. Se apreció sin embargo, que los valores mayores de actividad enzimática del biofilm (XTT-DO, IS-XTT), correspondían en su mayoría a las cepas con mayor nivel de crecimiento. Para las 96 horas a esta temperatura fue cuando se comprobó con mayor claridad la relación entre el menor crecimiento y la mayor formación de biofilm, ya que el 80% y el 86,67% de cepas con crecimiento más bajo tuvieron a su vez los valores más altos de biofilm medidos por DO y por IS-DO, respectivamente, estando a su vez los mayores niveles de filamentación comprendidos entre estas cepas. Autores como Nobile y Mitchell, 2005, identificaron moléculas específicas que producían defectos en la formación del biofilm de manera independiente de la capacidad de filamentación, y por tanto, mutantes incapaces de formar biofilm presentaban capacidad de filamentación conservada, lo que demuestra que son múltiples las vías regulatorias que se encuentran implicadas en la formación del biofilm, no dependiendo únicamente de la filamentación, aunque ésta sea fundamental para los mismos. Estudios de microscopía electrónica han demostrado que el biofilm en *C. albicans* consiste en dos capas bien diferenciadas: una región basal compuesta por formas levaduriformes constituyendo una estructura densa compacta, y una capa más externa constituida por las formas filamentosas, siendo esta última capa más gruesa, pero más abierta, rodeada de la matriz exopolimérica. Estudios realizados en cepas defectivas, incapaces de formar estructuras levaduriformes, presentando únicamente formas filamentadas forman biofilms más fácilmente desprendibles de las superficies de los dispositivos estudiados, sugiriendo el importante rol que desempeña en el anclaje del biofilm a la superficie la capa interna de estructuras levaduriformes (Baillie

y Douglas, 1999). Sin embargo, otros autores como Kumamoto, 2002, considera que los dos tipos morfológicos son capaces de formar biofilm, y que los biofilms pueden estar compuestos por cada uno de los morfotipos o por ambos, dependiendo de las condiciones, y que ningún tipo morfológico resulta absolutamente esencial para la formación de biofilm. Entre los factores que promueven el crecimiento en forma filamentosa se encuentran el pH neutro, el suero, las condiciones de microaerofilia, la densidad celular ($>10^7$ células/ml), la temperatura, como se ha señalado anteriormente, y las señales nutricionales (condiciones limitantes de nitrógeno), entre otras.

El cambio en el dimorfismo celular también ocurre durante la **variación fenotípica macroscópica** reversible que ocurre en las colonias de *Candida*. Para ser patógenos, muchos organismos han desarrollado la capacidad de producir variantes fenotípicas y antigénicas. Este fenómeno debe ser reversible, ocurrir espontáneamente y con relativa alta frecuencia, tratándose de un fenómeno epigenético, y es diferente de la mera transición levadura-hifa/pseudohifa. Así, en el dimorfismo, todas las células de una población expresan fenotipos alternativos bajo las mismas condiciones ambientales, mientras que en el “switching”, sólo un pequeño número de células en una población expresan un fenotipo diferente bajo presión ambiental (Soll, 1992). Este mecanismo conlleva un reordenamiento genético reversible, pudiendo de forma espontánea generar variantes antigénicas en una misma población, siendo esta característica ampliamente estudiada en *C. albicans*. Así, las levaduras forman habitualmente colonias suaves, romas, y sin embargo, con escasa frecuencia, pueden de manera espontánea y reversible convertirse en una morfología de la colonia diferente, en las que las colonias están compuestas por una mezcla de levaduras y formas filamentosas. En *C. albicans*, cuando se cultiva en un

agar rico en aminoácidos (medio de Lee), con concentraciones limitantes de zinc a 25°C, aparecen de manera espontánea variantes de colonias, descritas como “estrella”, “anillo”, “rugosa”, y si se irradia con bajas dosis de luz UV se ha observado que la frecuencia de variación aumenta y que aparecen otras morfologías diferentes, como de tipo “algodonosas”,..., siendo este mismo medio el utilizado en el estudio del cambio morfológico en *C. tropicalis* de este estudio. En *C. tropicalis*, este fenómeno de “switching” fue demostrado por primera vez por Soll *et al.*, 1988. Así, incluyeron un fenotipo algodonoso micelial, con proyecciones irregulares, con sectores más suaves, con sectores algodonosos miceliados, colonias mixtas con sectores de diferente morfología..., apareciendo al igual que en *C. albicans* múltiples fenotipos morfológicos en el curso de una misma infección. De acuerdo con estos autores, las cepas de *C. tropicalis* del estudio también presentaron cambios fenotípicos en el aspecto de las colonias, siendo variables en función de la cepa. Se ha demostrado que los diferentes morfotipos en *C. albicans* presentan características variables, como diferencias en la asimilación de azúcares, en la adherencia, en la formación de biofilm, en la capacidad de filamentación (Jin *et al.*, 2005) y en la secreción enzimática (encontrándose descrita en la actividad aspartil-proteasa y en la fosfolipasa). Así, Lane y García, 1991, encontraron diferencias en la producción de actividad fosfolipasa. Sin embargo en este estudio, para *C. tropicalis* esta diferencia entre fenotipos no se apreció de forma evidente, ya que la producción de este tipo de enzima fue muy escasa o nula para todas las cepas. A su vez, en función del origen de las cepas, Soll *et al.*, 1988, encontraron diferencias fenotípicas según las diferentes localizaciones de procedencia de las cepas. En este estudio, sin embargo, no fue posible establecer diferencias en función del lugar de aislamiento. Hay que destacar que la concentración de zinc resulta fundamental a la hora de realizar el

estudio del cambio morfológico, ya que puede inhibir la aparición de algún morfotipo en particular y favorecer el cambio a otro morfotipo diferente (Soll, 1992), y por tanto, cuando en una cepa se describe poca variabilidad morfológica o no variable, debe tenerse en cuenta que la cepas se ha analizado en un agar cuyas propiedades permitan de manera adecuada la expresión de estos cambios morfológicos.

Otro punto interesante a destacar de los biofilm es su capacidad para favorecer la **conjugación**, apareciendo tasas aceleradas en comparación con sus correspondientes planctónicas. Esto sugiere que la evolución por transferencia horizontal de material genético ocurre rápidamente en el biofilm bacteriano, constituyendo un lugar idóneo para la emergencia de nuevos patógenos por adquisición de genes de resistencia antibiótica, factores de virulencia y habilidades de supervivencia ambiental aumentadas. La comparación entre genomas de hongos patógenos en humanos ha revelado que algunos procesos genéticos han desarrollado un importante papel en la adquisición de los genes asociados a la virulencia. Así, uno de estos mecanismos es la duplicación o expansión de familias de genes (genes *ALS*, *SAP*...), que constituye una importante fuerza en la evolución, aunque también se ha comprobado que la transferencia horizontal de genes también desempeña un papel importante en estos patógenos (Moran *et al.*, 2011). Hasta hace relativamente poco tiempo, se creía que *C. albicans* y las especies de *Candida* no *albicans* relacionadas no poseían ciclo de reproducción sexual. Sin embargo, en la actualidad, se conoce que la conjugación entre individuos del género *Candida* es posible (Hull *et al.*, 2000). La configuración genotípica o tipo conjugativo (“mating type”) viene determinada por los genes localizados en el locus *MTL* (“Mating Type-Like”). Así, cepas homocigotas para el gen *MTL* pueden conjugarse con

cepas homocigotas *MTLa*. La capacidad de conjugación en *C. tropicalis*, considerada hasta ahora asexual, fue descrita recientemente por Porman *et al.*, 2011, presentando un mecanismo similar al de *C. albicans*, pero mostrando, a diferencia de esta especie, conjugación eficaz tanto a 25°C como a 37°C, ya que a 37°C las células en fase “opaque” presentan inestabilidad a esta temperatura en *C. albicans*, produciéndose una transformación masiva a fase “white”. Para que sea posible la producción de conjugación es necesario que la cepa sea homocigoto para el locus *MTL*. Células diploides a y α adquieren una forma conjugativa competente, resultando en la formación de tetraploides a/α . En *C. albicans*, cepas homocigotas para este locus presentan un sistema de cambio morfológico bifásico conocido como “white-opaque”, aunque no todos los homocigotos son capaces de modificar el fenotipo, y la heterocigocidad para el locus *MTL* suprime la transición “white-opaque”. Este sistema bifásico parecía ser único para *C. albicans*, así como para su especie próxima *C. dubliniensis*, sin estar previamente descrita en otra especie de hemiascomicetos. Los estudios desarrollados en *C. albicans* en cepas “white-opaque” han demostrado que este fenotipo facilita la conjugación, cambiando de fenotipo “white” a “opaque” para conjugar, ya que este último fenotipo es el necesario para la conjugación. Se cree que feromonas secretadas por las células en fase “opaque” de tipo conjugativo opuesto o condiciones de hipoxia o concentraciones elevadas de CO₂ estabilizan las células en fase “opaque”, de ahí la importancia de los biofilms como nichos donde se favorece la conjugación. Otro factor determinante de la estabilización de las células en fase “opaque” es la temperatura, ya que a temperaturas bajas permanecen estables, a diferencia de lo que ocurre a 37°C, donde las células “opaque” son estimuladas a cambiar a fenotipo “white”, de ahí que la conjugación se limite a localizaciones externas del cuerpo humano, como la

piel, o a reservorios ambientales, y siendo este dato fundamental a la hora de estudiar in vitro esta propiedad en las diferentes especies de *Candida*. Adicionalmente, presentan un metabolismo fundamentalmente oxidativo, mientras que las células en fase “white” expresan un metabolismo fermentativo (Ramírez-Zavala *et al.*, 2008). A su vez, la edad de la colonia parece afectar igualmente la producción de cambios fenotípicos, ya que con mayores días de incubación aparecen más colonias con sectores opacos en la periferia de las colonias. En las colonias blancas predominan las células ovales, con morfología levaduriforme normal. Las colonias opacas contienen a su vez células más alargadas, de doble tamaño que las de las colonias blancas, y tienen enorme importancia ya que esta forma es competente para producir conjugación. Porman *et al.*, 2011, comprobaron que *C. tropicalis* a su vez, exhibe una forma de cambio fenotípico “white-opaque”, que regula un programa de reproducción sexual, observando, al igual que en este estudio que bajo una variedad de condiciones in vitro, las colonias presentan de forma ocasional sectores diferentes del resto de la colonia, indicativos de cambio fenotípico. En este estudio no se observaron llamativas diferencias entre las células aisladas de los sectores de las colonias y el resto de las células de la colonia. Sin embargo, Porman *et al.*, 2011, sí observaron diferencias en la morfología de ambas, al igual que se observa en *C. albicans*. La transición de fases en *C. albicans* es identificada en agar conteniendo phloxina B, que tiñe las células en fase opaca de rojo (Anderson y Soll, 1987), aunque otras tinciones como rojo metilo o medio con bismuto también se han utilizado con este fin. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con *C. albicans*, la tinción de las colonias en fase opaque no se distinguió utilizando phloxina B en las cepas de *C. tropicalis* del estudio. Estos datos coincidirían con los publicados por Portman *et al.*, 2011, que demostraron cómo otras tinciones como fluoresceína-isocianato-

concanavalina A (verde) (FIAC-ConA) y rodamina-concanavalina A (rojo) que tiñen específicamente homocigotos *MTL α* y *MTL α* en células en fase “opaque”, respectivamente, son necesarias para la adecuada visualización de la fusión entre los dos tipos celulares, ya que es su estudio tampoco observaron utilidad de la phloxina B para este fin. La conjugación en *C. albicans* ocurre de manera similar a la acontecida en *S. cerevisiae*. Así, en respuesta a feromonas liberadas desde el tipo conjugativo opuesto, las células forman un tubo de conjugación. Cuando los tubos de tipos conjugativos opuestos coinciden, fusionan sus ápices, hacia donde migran los núcleos celulares. En *C. tropicalis* se ha observado un mecanismo similar de polarización de las proyecciones celulares hacia la célula del tipo opuesto en respuesta a feromonas.

En este estudio se procedió por último a la determinación mediante PCR de la presencia de los genes *MTL α* y *MTL α* en *C. tropicalis*, con el fin de estudiar si las cepas incluidas en el estudio presentaban heterocigocidad u homocigocidad para los mismos. De las 28 cepas estudiadas, 20 (71,4%) resultaron heterocigotas para los genes *MTL α* (*MTL α /MTL α*). De las cepas que mostraron homocigosis para el locus *MTL α* , sólo una cepa resultó positiva para *MTL α* , siendo positivas sólo para el gen *MTL α* el resto de las mismas. Siguiendo esta línea, Martínez-Závala *et al.*, 2008, también encontraron que sólo una minoría de las cepas de *C. albicans* de su estudio resultaron homocigotas para *MTL*, considerándose por tanto que la heterocigocidad constituye en general la forma predominante. Este último dato hace pensar que el cambio fenotípico “white-opaque” ocurre sólomente a una frecuencia muy baja, y por tanto, la probabilidad de que células en fase “opaque” de fenotipos conjugativos opuestos coincidan de forma natural para permitir la conjugación y el intercambio genético es muy baja,

siendo fundamental entonces como se mencionó anteriormente la formación del biofilm. Para que las células en fase “opaque” de diferente fenotipo conjugativo entren en contacto, las células en fase “white” forman biofilms, inducidas por las feromonas secretadas por las células “opaque”, sirviendo así de nicho conjugativo. Sin embargo, existen condiciones ambientales que inducen la transformación en masa de células hacia la fase “opaque”, no siendo necesario en este caso la formación de biofilm. Al intentar correlacionar esta variabilidad con el resto de los factores de patogenicidad estudiados, en términos generales, cabe destacar la ausencia o bajo grado de filamentación (excepto para una cepa) presentado por las cepas homocigotas, así como su bajo grado de formación de biofilm (éste último resultó no estadísticamente significativo en relación con las cepas heterocigotas). Sin embargo, para el resto de los factores como la HSC, la adherencia inmediata y tardía o el crecimiento, tanto a 37°C como a 22°C, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de cepas heterocigotas y el grupo de cepas homocigotas para el locus *MTL*.

En función de los datos analizados en esta tesis doctoral en relación con los múltiples factores de patogenicidad presentados por la especie *C. tropicalis*, se puede afirmar que la capacidad de producir enfermedad presentada por la misma no puede ser atribuida a un único factor, sino que deben valorarse en conjunto y de manera combinada los múltiples factores que globalmente presenta esta especie, ya que como se ha observado en este estudio, existen amplias correlaciones entre ellos, dependiendo en muchas ocasiones unos de otros, siendo necesaria su actuación de manera combinada y coordinada en los diferentes estadios de la infección. Hasta ahora, la mayoría de los estudios realizados en levaduras del género *Candida* se encontraban centrados principalmente en *C. albicans*. Sin embargo, y debido al aumento que se ha venido observando en las últimas décadas en la frecuencia de las infecciones causadas por diferentes especies de *Candida no-albicans*, resultan necesarias amplias revisiones e investigaciones acerca de la virulencia de estas nuevas especies, debiendo ir dirigidas fundamentalmente a dilucidar la cascada de patogenicidad que tienen lugar in vivo durante la infección y a establecer las asociaciones existentes entre los diversos eventos patogénicos que ocurren durante la misma .

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral al estudiar las 29 cepas de *C. tropicalis* incluidas en la misma, se obtienen las conclusiones que se enumeran a continuación:

1. *C. tropicalis* representó el 8,9% del total de las candidurias detectadas en el Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz durante el periodo de tiempo estudiado, situándose como la segunda especie identificada del género *Candida* productora de candiduria tras *C. albicans*.
2. *C. tropicalis* presenta actividad esterásica media-alta a 22°C; actividad aspartil proteasa y hemolítica media-baja y actividad fosfolipasa baja-nula a las dos temperaturas. La lectura a las 72 horas permite discriminar mejor la actividad enzimática.
3. Todas las cepas son adherentes a plástico a las dos temperaturas. La adherencia tardía fue similar a la adherencia inmediata a 37°C, presentando valores superiores a 22°C.
4. *C. tropicalis* es hidrofóbica a ambas temperaturas, con valores de HSC dentro de un amplio rango a 37°C con predominio de cepas altamente hidrofóbicas, alcanzando niveles mayores a 22°C.
5. A 37°C, la adherencia inmediata y la adherencia tardía presentan buena correlación con la HSC. A 22°C sin embargo, no se puede

establecer, ya que al presentar todas las cepas valores elevados de adherencia e HSC, no se observa linealidad.

6. *C. tropicalis* es capaz de filamentar en RPMI-1640. El grado de filamentación es variable en función de la temperatura y del tiempo de incubación, alcanzando el mayor grado de filamentación a 37°C a las 96 horas.
7. A 22°C, el crecimiento planctónico fue más lento que a 37°C, siendo necesario esperar 96 horas para alcanzar la fase estacionaria; a 37°C, ésta se alcanzó a las 24 horas. Sin embargo, el crecimiento a 22°C resultó mayor para las 96 horas que a 37°C. A 37°C se alcanzó maduración del biofilm en las primeras 24 horas, mientras que a 22°C fueron necesarias 96 horas de incubación.
8. Todas las cepas presentan producción de la adhesina Alst1 en células planctónicas y una sobreexpresión de la misma en las células del biofilm. No hay diferencias significativas entre las cepas altamente formadoras y las poco formadoras de biofilm.
9. El cálculo del índice de Slime es útil para la valoración de la formación de biofilm cuando el crecimiento es bajo.
10. La determinación de la formación de biofilm mediante el estudio de la actividad metabólica mitocondrial del biofilm formado (XTT) fue superponible a la determinación por DO.

11. No se encuentra correlación entre la formación de biofilm y la HSC, ni con la adherencia inmediata y tardía, a las 24 y 96 horas de incubación, tanto a 37°C como a 22°C.
12. Las cepas con mayor nivel de filamentación muestran a su vez mayor capacidad de formación de biofilm a ambas temperaturas, así como de hidrofobicidad a 37°C, no encontrándose diferencias significativas con la adherencia tardía, ni con el crecimiento.
13. En general, las cepas que tuvieron menor crecimiento coincidieron con las cepas más formadoras de biofilm, presentando todas a su vez una elevada capacidad de filamentación. Se apreció sin embargo, que los valores mayores de actividad metabólica del biofilm correspondían en su mayoría a las cepas con mayor nivel de crecimiento.
14. *C. tropicalis* es capaz de crecer y de producir biofilm en orina artificial estéril utilizada como medio de cultivo, con una producción variable entre las diferentes cepas, así como en relación con el medio RPMI-1640 utilizado. El 50% de las cepas presenta mayor Índice de Slime en orina artificial en comparación con el medio RPMI-1640.
15. La capacidad de formación de biofilm en orina artificial estéril de aislamientos de *C. tropicalis* de origen urinario, fue similar en catéter Foley y en placas de poliestireno. Se obtuvo una menor recuperación de unidades formadoras de colonia/ml en las cepas productoras de biofilm sobre catéter urinario de látex que en las no productoras de biofilm.

16. Las cepas de procedencia urinaria presentaron tanto a 37°C como a 22°C valores más elevados de hidrofobicidad y de adherencia tardía (a 22°C) que las cepas de origen no urinario. La producción de biofilm resultó también mayor. El perfil enzimático es similar al del resto de los aislados, excepto la actividad fosfolipasa a 22°C para 72 horas, que resultó menor para las cepas de origen urinario.

17. *C. tropicalis* presenta una gran variabilidad fenotípica en la morfología de las colonias (“switching” fenotípico). En atmósfera enriquecida con CO₂, las colonias son más aplanadas y extendidas, con morfologías similares a las detectadas sin la presencia de CO₂, aunque la mayoría de las cepas presenta una menor variabilidad.

18. De los aislados clínicos de *C. tropicalis*, una minoría presenta homocigosis en el gen MTL necesario para la conjugación. De las 8 cepas que mostraron homocigosis para el locus MTLt, sólo una cepa fue homocigota para MTL α , siendo el resto de ellas homocigotas para el gen MTL α .

19. En las cepas homocigotas para el locus MTL cabe destacar la ausencia o bajo grado de filamentación (excepto para una cepa), así como un bajo grado de formación de biofilm. No se encuentran diferencias significativas entre el grupo de cepas heterocigotas y el grupo de cepas homocigotas para el locus MTL para la HSC, ni para la adherencia inmediata y tardía, ni para el crecimiento a 37°C y 22°C.

20. En función de los datos analizados en esta tesis doctoral en relación con los múltiples factores de patogenicidad presentados por la especie *C. tropicalis*, se puede afirmar que la capacidad de producir enfermedad presentada por la misma no puede ser atribuida a un único factor, sino que deben valorarse en conjunto y de manera combinada los múltiples factores que globalmente presenta esta especie, ya que como se ha observado en este estudio, existen amplias correlaciones entre ellos, dependiendo en muchas ocasiones unos de otros, siendo necesaria su actuación de manera combinada en los diferentes estadios de la infección.

7. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Abbass K, Jaffery AT, Markert RJ, Saklayen MG, Khan NA. Fungus balls due to *Candida tropicalis*. Int Urol Nephrol. 2012; **44**: 1293-1294.
2. Aktas E, Yigit N, Ayyildiz A. Esterase activity in various *Candida* species. J Int Med Res. 2002; **30**: 322-324.
3. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol. 2006; **55**: 999-1008.
4. Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. Eukaryot Cell. 2006; **5**: 1770-1779.
5. Álvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, León C, Palomar M, Jordá R, Carrasco N, Bobillo F; EPCAN Study Group. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. Intensive Care Med. 2003; **29**: 1069-1076.
6. Anderson JM, Soll DR. Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. J Bacteriol. 1987; **169**: 5579-5588.

7. Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun.* 2004; **72**: 6023-6031.
8. Anil S, Samaranayake LP. Brief exposure to antimycotics reduces the extracellular phospholipase activity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Chemotherapy.* 2003; **49**: 243-247.
9. Antley PP, Hazen KC. Role of yeast cell growth temperature on *Candida albicans* virulence in mice. *Infect Immun.* 1988; **56**: 2884-2890.
10. Arendrup M, Horn T, Frimodt-Møller N. In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection.* 2002; **30**: 286-291.
11. Argimón S, Wishart JA, Leng R, Macaskill S, Mavor A, Alexandris T, Nicholls S, Knight AW, Enjalbert B, Walmsley R, Odds FC, Gow NA, Brown AJ. Developmental regulation of an adhesin gene during cellular morphogenesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2007; **6**: 682-692.
12. Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol.* 1999; **48**: 671-679.

13. Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother.* 2000; **46**: 397-403.
14. Banno Y, Yamada T, Nozawa Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia.* 1985; **23**: 47-54.
15. Barns SM, Lane DJ, Sogin ML, Bibeau C, Weisburg WG. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J Bacteriol.* 1991; **173**: 2250-2255.
16. Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol.* 1985; **131**: 1217-1221.
17. Bedell GW, Soll DR. Effects of low concentrations of zinc on the growth and dimorphism of *Candida albicans*: evidence for zinc-resistant and -sensitive pathways for mycelium formation. *Infect Immun.* 1979; **26**: 348-354.
18. Beers MH, Berkow R. El manual Merck de diagnóstico y terapéutica. 10ª ed. Madrid: Ediciones Harcourt, S.A; 1999.
19. Bendel CM, Hostetter MK. Correlation of adhesion and pathogenic potential in yeast. *Pediatr Res.* 1991; **29**: 167A.

20. Bendel CM, Hostetter MK. Distinct mechanisms of epithelial adhesion of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. J Clin Invest. 1993; **92**: 1840-1849.
21. Bennett RJ, Uhl MA, Miller MG, Johnson AD. Identification and characterization of a *Candida albicans* mating pheromone. Mol Cell Biol. 2003; **23**: 8189-8201.
22. Beteta A. Capacidad de adherencia y formación de biocapa de especies de *Candida* no *albicans* no *parapsilosis*: modulación por antifúngicos. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura, España, 2007.
23. Birinci A, Cihan CC, Bilgin K, Acuner C, Durupinar B. Phospholipase activity of *Candida* species isolated from different clinical samples. Mikrobiyol Bul. 2005; **39**: 205-209.
24. Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. FEMS Yeast Res. 2008; **8**: 442-450.
25. Blanco MT, Blanco J, Sánchez-Benito R, Pérez-Giraldo C, Morán FJ, Hurtado C, Gómez-García AC. Incubation temperatures affect adherence to plastic of *Candida albicans* by changing the cellular surface hydrophobicity. Microbios. 1997; **89**: 23-28.

26. Blanco MT, Morales JJ, Lucio L, Pérez-Giraldo C, Hurtado C, Gómez-García AC. Modification of adherence to plastic and to human buccal cells of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by a subinhibitory concentration of itraconazole. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; **21**: 69–72.
27. Blanco MT, Sacristán B, Beteta A, Fernández-Calderón MC, Hurtado C, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Cellular surface hydrophobicity as an additional phenotypic criterion applied to differentiate strains of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; **60**: 129-131.
28. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, Wenzel RP; National Epidemiology of Mycoses Survey (NEMIS) Study Group. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis.* 2001; **33**: 177-186.
29. Borg M, Rüchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun.* 1988; **56**: 626-631.
30. Borst A, Fluit AC. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *J Med Microbiol.* 2003; **52**: 971-974.

31. Bouza E, Muñoz P. Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium* spp. Clin Microbiol Infect. 2004; **10** Suppl 1: 76-85.
32. Bramono K, Yamazaki M, Tsuboi R, Ogawa H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. Jpn J Infect Dis. 2006; **59**: 73-76.
33. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, Rheinbay E, Grabherr M, Forche A, Reedy JL, Agrafioti I, Arnaud MB, Bates S, Brown AJ, Brunke S, Costanzo MC, Fitzpatrick DA, de Groot PW, Harris D, Hoyer LL, Hube B, Klis FM, Kodira C, Lennard N, Loque ME, Martin R, Neiman AM, Nikolaou E, Quail MA, Quinn J, Santos MC, Schmitzberger FF, Sherlock G, Shah P, Silverstein KA, Skrzypek MS, Soll D, Staggs R, Stansfield I, Stumpf MP, Sudbery PE, Srikantha T, Zeng Q, Berman J, Berriman M, Heitman J, Gow NA, Lorenz MC, Birren BW, Kellis M, Cuomo CA. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. Nature. 2009; **459**: 657-662.
34. Cafarchia C, Romito D, Caccioli C, Camarda A, Otranto D. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. Med Mycol. 2008; **46**: 429-434.
35. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiol Rev. 1991; **55**: 1-20.

36. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001; **9**: 327-335.
37. Camacho DP, Gasparetto A, Svidzinski TI. The effect of chlorhexidine and gentian violet on the adherence of *Candida* spp. to urinary catheters. Mycopathologia. 2007; **163**: 261-266.
38. Cao YY, Cao YB, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, Zhu ZY, Chen WS, Jiang YY. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. Antimicrob Agents Chemother. 2005; **49**: 584-589.
39. Cassone A, De Bernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. J Infect Dis. 1987; **156**: 777-783.
40. Cassone A. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. Curr Top Med Mycol. 1989; **3**: 248-314.
41. Chaffin WF, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; **62**: 130-180.
42. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001; **183**: 5385-5394.

43. Chattaway FW, Odds FC, Barlow AJ. An examination of the production of hydrolytic enzymes and toxins by pathogenic strains of *Candida albicans*. J Gen Microbiol. 1971; **67**: 255- 263.
44. Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; **101**: 5048-5052.
45. Chen H, Fink GR. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. Genes Dev. 2006; **20**: 1150-1161.
46. Cheng MF, Yu KW, Tang RB, Fan YH, Yang YL, Hsieh KS, Ho M, Lo HJ. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004; **48**: 33-37.
47. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. 1985; **22**: 996-1006.
48. Clancy CJ, Ghannoun MA, Nguyen MH. Abstract 317, 36th Annu Meet Infect Dis Soc Am, 1998. En: Anil S, Samaranayake LP. Brief exposure to antimycotics reduces the extracellular phospholipase activity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Chemotherapy. 2003; **49**: 243-247.

49. Cocuaud C, Rodier MH, Daniault G, Imbert C. Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. J Antimicrob Chemother. 2005; **56**: 507-512.
50. Coleman DA, Oh SH, Zhao X, Hoyer LL. Heterogeneous distribution of *Candida albicans* cell-surface antigens demonstrated with an Als1-specific monoclonal antibody. Microbiology. 2010; **156**: 3645-3659.
51. Colling L, Carter RN, Essmann M, Larsen B. Evaluation of relative yeast cell surface hydrophobicity measured by flow cytometry. Infect Dis Obstet Gynecol. 2005; **13**: 43-48.
52. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; **36**: 599-607.
53. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Warnock D, Morgan J; Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol. 2006; **44**: 2816-2823.
54. Colombo AL, Guimarães T, Silva LR, de Almeida Monfardini LP, Cunha AK, Rady P, Alves T, Rosas RC. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate,

- epidemiology and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007; **28**: 570-576.
55. Comert F, Kulah C, Aktas E, Eroglu O, Ozlu N. Identification of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit and in vitro susceptibility to fluconazole for a 3-year period. *Mycoses.* 2007; **50**: 52-57.
56. Costa A, Misefari A, Amaro A. Abstr. Atti XIV Congr. Naz. Microbiol. Messina, abstr. p35-36. 1967. En: Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000; **13**: 122-143.
57. Da Costa KR, Ferreira JC, Komesu MC, Candido RC. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. *Mycopathologia.* 2009; **167**: 73-79.
58. Da Silva EH, Ruiz Lda S, Matsumoto FE, Auler ME, Giudice MC, Moreira D, Szeszs W, Paula CR. Candiduria in a public hospital of São Paulo (1999-2004): characteristics of the yeast isolates. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007; **49**: 349-353.
59. Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2004; **28**: 261-289.

66. Doebbeling BN, Hollis RJ, Isenberg HD, Wenzel RP, Pfaller MA. Restriction fragment analysis of a *Candida tropicalis* outbreak of external wound infections. J Clin Microbiol. 1991; **29**: 1268-1270.
67. Dolapçı I, Tekeli A, Arikan S. Evaluation of the Tween 80 opacity test for detection of the lipolytic activity of various *Candida* species and its utility in differentiation of *C. albicans* and *C. dubliniensis*. Mikrobiyol Bul. 2004; **38**: 429-433.
68. Domer JE, Garner RE. Immunomodulation in response to *Candida*. Immunol Ser. 1989; **47**: 293-317.
69. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002; **15**: 167-193.
70. Dougherty SH. Pathobiology of infection in prosthetic devices. Rev Infect Dis. 1988. **10**: 1102-1117.
71. Douglas LJ. *Candida* proteinases and candidosis. Crit Rev Biotechnol. 1988; **8**: 121-129.
72. Douglas JL. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol. 2002; **19**: 139-143.
73. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003; **11**: 30-36.

74. Dowd SE, Delton Hanson J, Rees E, Wolcott RD, Zischau AM, Sun Y, White J, Smith DM, Kennedy J, Jones CE. Survey of fungi and yeast in polymicrobial infections in chronic wounds. *J Wound Care*. 2011; **20**: 40-47.
75. Dumitru R, Navarathna DH, Semighini CP, Elowsky CG, Dumitru RV, Dignard D, Whiteway M, Atkin AL, Nickerson KW. In vivo and in vitro anaerobic mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2007; **6**: 465-472.
76. Echevarría A, Durante AG, Arechaval A, Negroni R. Comparative study of two culture media for the detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* strains. *Rev Iberoam Micol*. 2002; **19**: 95-98.
77. Edwards JEJ. *Candida* species. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 4^a ed. Buenos Aires: Ed. Panamericana, S.A; 1997. p. 2571-2589.
78. El-Azizi M, Khardori N. Factors influencing adherence of *Candida* spp. to host tissues and plastic surfaces. *Indian J Exp Biol*. 1999; **37**: 941-951.
79. Ellis M. Invasive fungal infections: evolving challenges for diagnosis and therapeutics. *Mol Immunol*. 2002; **38**: 947-957.

80. El-Maghrabi EA, Dixon DM, Burnett JW. Characterization of *Candida albicans* epidermolytic proteases and their role in yeast-cell adherence to keratinocytes. *Clin Exp Dermatol*. 1990; **15**: 183-191.
81. Enjalbert B, Whiteway M. Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during *Candida albicans* resumption of growth. *Eukaryot Cell*. 2005; **4**: 1203-1210.
82. Favero D, França EF, Furlaneto-Maia L, Quesada RM, Furlaneto MC. Production of haemolytic factor by clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Mycoses*. 2011; **54**: e816-820.
83. Federle MJ, Bassler BL. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest*. 2003; **112**: 1291-1299.
84. Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, Sanglard D, Korting HC, Schäfer W, Hube B. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun*. 2002; **70**: 3689-3700.
85. Filler SG, Swerdloff JN, Hobbs C, LUCKETT PM. Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1995; **63**: 976-983.

86. Filler SG, Pfunder AS, Spellberg BJ, Spellberg JP, Edwards JE Jr. *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun.* 1996; **64**: 2609-2617.
87. Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol.* 2006; **6**: 99.
88. Fleck R, Dietz A, Hof H. In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. *J Antimicrob Chemother.* 2007; **59**: 767-771.
89. Fotedar R, Al-Hedaithy SS. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses.* 2005; **48**: 62-67.
90. França EJ, Fávero D, Scremin H, Oliveira MT, Furlaneto-Maia L, Quesada RM, Furlaneto MC. Hemolysis produced by *Candida tropicalis* isolates from clinical samples. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010; **43**: 318-321.
91. França EJ, Furlaneto-Maia L, Quesada RM, Favero D, Oliveira MT, Furlaneto MC. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. *Mycoses.* 2011; **54**: e44-51.

92. Frank AT, Ramsook CB, Otoo HN, Tan C, Soybelman G, Rauceo JM, Gaur NK, Klotz SA, Lipke PN. Structure and function of glycosylated tandem repeats from *Candida albicans* Als adhesins. *Eukaryot Cell*. 2010; **9**: 405-414.
93. Fridkin SK. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin Infect Dis*. 2005; **41**: 1455-1460.
94. Fromtling RA, Abruzzo GK, Giltinan DM. *Candida tropicalis* infection in normal, diabetic, and neutropenic mice. *J Clin Microbiol*. 1987; **25**: 1416-1420.
95. Fu Y, Rieg G, Fonzi WA, Belanger PH, Edwards JE Jr, Filler SG. Expression of the *Candida albicans* gene ALS1 in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun*. 1998; **66**: 1783-1786.
96. Fukazawa Y, Kagaya K. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol*. 1997; **35**: 87-99.
97. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. 1994; **176**: 269-275.
98. Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, de Oliveira MT, Furlaneto MC. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia*. 2008; **166**: 209-217.

99. Galán-Ladero MA, Blanco MT, Sacristán B, Fernández-Calderón MC, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. *Med Mycol.* 2010; **48**: 207-210.
100. Galán-Ladero MA, Blanco-Blanco MT, Hurtado C, Pérez-Giraldo C, Blanco MT, Gómez-García AC. Determination of biofilm production by *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients and its relation to cellular surface hydrophobicity, plastic adherence and filamentation ability. *Yeast.* 2013; **30**: 331-339.
101. Gallardo-Moreno AM, González-Martín ML, Pérez-Giraldo C, Garduño E, Bruque JM, Gómez-García AC. Thermodynamic analysis of growth temperature dependence in the adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene. *Appl Environ Microbiol.* 2002; **68**: 2610-2613.
102. Gaur NK, Klotz SA, Henderson RL. Overexpression of the *Candida albicans* ALA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to those of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1999; **67**: 6040-6047.
103. Gentry LO, Price MF. Urinary and peritoneal *Candida* infections. En: Bodey G.P. *Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment.* 2^a ed. New York: Raven Press; 1993; p.249-260.

104. Ghannoum MA, Burns GR, Elteen KA, Radwan SS. Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* spp. to human buccal epithelial cells. *Infect Immun.* 1986; **54**: 189-193.
105. Ghannoum MA, Filler SG, Ibrahim AS, Fu Y, Edwards JE Jr. Modulation of the interactions of *Candida albicans* and endothelial cells by fluconazole and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; **36**: 2239-2244.
106. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000; **13**: 122-143.
107. Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell.* 1992; **68**:1077-1090.
108. Giri S, Kindo AJ. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J Med Microbiol.* 2012; **30**: 270-278.
109. Glee PM, Sundstrom P, Hazen KC. Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* in vivo. *Infect Immun.* 1995; **63**: 1373-1379.
110. Glee PM, Cutler JE, Benson EE, Bargatze RF, Hazen KC. Inhibition of hydrophobic protein-mediated *Candida albicans* attachment to endothelial cells during physiologic shear flow. *Infect Immun.* 2001; **69**:2815-2820.

111. Gognies S, Barka EA, Gainvors-Claisse A, Belarbi A. Interactions between yeasts and grapevines: filamentous growth, endopolygalacturonase and phytopathogenicity of colonizing yeasts. *Microb Ecol.* 2006; **51**:109-116.
112. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia.* 2007; **164**: 265-269.
113. González Gravina H, González de Morán E, Zambrano O, Lozano Chourio M, Rodríguez de Valero S, Robertis S, Mesa L. Oral Candidiasis in children and adolescents with cancer. Identification of *Candida* spp. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007; **12**: E419-423.
114. Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol.* 2002; **5**: 366-371.
115. Green CB, Zhao X, Yeater KM, Hoyer LL. Construction and real-time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of ALS gene expression in budding and filamenting cells. *Microbiology.* 2005; **151**: 1051-1060.
116. Grubb SE, Murdoch C, Sudbery PE, Saville SP, Lopez-Ribot JL, Thornhill MH. Adhesion of *Candida albicans* to endothelial cells under physiological conditions of flow. *Infect Immun.* 2009; **77**: 3872-3878.

117. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kirdar S, Aydın N. Investigation of antifungal susceptibilities and some virulence factors of *Candida* strains isolated from blood cultures and genotyping by RAPD-PCR. Mikrobiyol Bul. 2011; **45**: 306-317.
118. Gümrü B, Kadir T, Uygun-Can B, Ozbayrak S. Distribution and phospholipase activity of *Candida* species in different denture stomatitis types. Mycopathologia. 2006; **162**: 389-394.
119. Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. A subpopulation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilm cells are highly tolerant to chelating agents. FEMS Microbiol Lett. 2007; **272**: 172-181.
120. Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. Microbes Infect. 2009; **11**: 753-761.
121. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect Immun. 1994; **62**: 915-921.
122. Hawser SP, Baillie GS, Douglas LJ. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. J Med Microbiol. 1998; **47**: 253-256. (a)
123. Hawser SP, Norris H, Jessup CJ, Ghannoum MA. Comparison of a 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method

- with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 1998; **36**: 1450-1252. (b)
124. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2001; **9**: 591-596.
125. Hazen KC, Cutler JE. Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1979; **24**: 661-666.
126. Hazen K, Cutler JE. Isolation and purification of morphogenic autoregulatory substance produced by *Candida albicans*. *J Biochem.* 1983; **94**: 777-783.
127. Hazen KC, Hazen BW. Temperature-modulated physiological characteristics of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol.* 1987; **31**: 497-508.
128. Hazen BW, Hazen KC. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and germ tube formation of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1988; **56**: 2521-2525.
129. Hazen KC. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infect Immun.* 1989; **57**: 1894-1900.

130. Hazen KC, Brawner DL, Riesselman MH, Jutila MA, Cutler JE. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. *Infect Immun.* 1991; **59**: 907-912.
131. Hazen KC, Hazen BW. Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1992; **60**: 1499-1508.
132. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 1995; **8**: 462-478.
133. Hazen KC, Glee. PM. Cell surface hydrophobicity and medically important fungi. *Curr Top Med Mycol.* 1995; **6**: 1-31.
134. Hazen KC, Wu JG, Masuoka J. Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect Immun.* 2001; **69**: 779-786.
135. Henke JM, Bassler BL. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol.* 2004; **14**: 648-656.
136. Henriques M, Martins M, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* morphogenesis. *Lett Appl Microbiol.* 2007; **44**: 199-205.
137. Hogan DA. Quorum sensing: alcohols in a social situation. *Curr Biol.* 2006; **16**: R457-458. (a)

138. Hogan DA. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*. 2006; **5**: 613-619. (b)
139. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*. 2001; **67**: 2982-2992.
140. Hornby JM, Kebaara BW, Nickerson KW. Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; **47**: 2366-2369.
141. Hornby JM, Nickerson KW. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; **48**: 2305-2307.
142. Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev*. 1994; **7**: 29-42.
143. Hoyer LL, Scherer S, Shatzman AR, Livi GP. *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol*. 1995; **15**: 39-54.

144. Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM, Scherer S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet.* 1998; **33**: 451-459. (a)
145. Hoyer LL, Payne TL, Hecht JE. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol.* 1998; **180**: 5334-5343. (b)
146. Hoyer LL, Fundyga R, Hecht JE, Kapteyn JC, Klis FM, Arnold J. Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics.* 2001; **157**: 1555-1567.
147. Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family—a sticky pursuit. *Med Mycol.* 2008; **46**: 1-15.
148. Hsueh PR, Lau YJ, Chuang YC, Wan JH, Huang WK, Shyr JM, Yan JJ, Yu KW, Wu JJ, Ko WC, Yang YC, Liu YC, Teng LJ, Liu CY, Luh KT. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; **49**: 512-517.
149. Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ, Gow NA. Expression of seven members of the gene family encoding

- secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 1994; **14**: 87-99.
150. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol.* 1996; **7**: 55-69.
151. Hube B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, Monod M, Schäfer W, Brown AJ, Gow NA. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* 1997; **65**: 3529-3538.
152. Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue- specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.* 2004; **7**: 336-341.
153. Hui FM, Morrison DA. Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: nucleotide sequence analysis shows comA, a gene required for competence induction, to be a member of the bacterial ATP-dependent transport protein family. *J Bacteriol.* 1991; **173**: 372-381.
154. Hull CM, Raisner RM, Johnson AD. Evidence for mating of the “asexual” yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science.* 2000; **289**: 307-310.
155. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SF, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE Jr, Nozawa Y, Ghannoum MA. Evidence implicating

- phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect Immun. 1995; **63**: 1993-1998.
156. Isenberg HD, Tucci V, Cintron F, Singer C, Weinstein GS, Tyras DH. Single-source outbreak of *Candida tropicalis* complicating coronary bypass surgery. J Clin Microbiol. 1989; **27**: 2426-2428.
157. Ivanoska N. Phospholipases as a factor of pathogenicity in microorganisms. J Mol Catal B Enzym. 2003; **22**: 357-361.
158. Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Merz WG, Kelley JI, Baqui AA, Meiller TF. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. J Clin Microbiol. 1999; **37**: 1464-1468.
159. Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Merz WG, Meiller TF. New assay for measuring cell surface hydrophobicities of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; **8**: 585-587.
160. Jabra-Rizk MA, Shirtliff M, James C, Meiller T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. FEMS Yeast Res. 2006; **6**: 1063-1073.
161. Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, Harris D, Aslett M, Barrell JF, Butler G, Citiulo F, Coleman DC, de Groot PW, Goodwin TJ, Quail MA, McQuillan J, Munro CA, Pain A, Poulter RT, Rajandream MA, Renauld H, Spiering MJ, Tivey A, Gow NA, Barrell B, Sullivan DJ, Berriman M.

- Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res.* 2009; **19**: 2231-2244.
162. Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries BC. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microbiol.* 2007; **73**: 1697-1703.
163. Jang SJ, Han HL, Lee SH, Ryu SY, Chaulagain BP, Moon YL, Kim DH, Jeong OY, Shin JH, Moon DS, Park YJ. PFGE-based epidemiological study of an outbreak of *Candida tropicalis* candiduria: the importance of medical waste as a reservoir of nosocomial infection. *Jpn J Infect Dis.* 2005; **58**: 263-267.
164. Jayatilake JA. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. *Mycopathologia.* 2011; **171**: 235-250.
165. Jiang SH, Myers RL, Walters GD. *Candida tropicalis* bezoar as a cause of obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2011; **79**: 690.
166. Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol.* 2003; **41**: 2961-2967.

167. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. Arch Oral Biol. 2004; **49**: 789-798.
168. Jin Y, Samaranayake YH, Yip HK, Samaranayake LP. Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. Mycopathologia. 2005; **160**: 191-200.
169. Jones DS, McGovern JG, Adair CG, Woolfson AD, Gorman SP. Conditioning film and environmental effects on the adherence of *Candida* spp. to silicone and poly(vinylchloride) biomaterials. J Mater Sci Mater Med. 2001; **12**: 399-405.
170. Juhas M, Eberl L, Tümmler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. Environ Microbiol. 2005; **7**: 459-471.
171. Kaiser D. Signalling in myxobacteria. Annu Rev Microbiol. 2004; **58**: 75-98.
172. Kantarcioglu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses. 2002; **45**: 160-165.
173. Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS, Baughman WS, Reingold AL, Rothrock GA, Pfaller MA, Pinner RW, Hajjeh RA. The epidemiology of candidemia in two

- United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis.* 1999; **29**: 1164-1170.
174. Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, Sugar AM, Sharkey PK, Wise GJ, Mangi R, Mosher A, Lee JY, Dismukes WE. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. The National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis.* 2000; **30**: 14-18.
175. Keçeli SA, Budak F. Esterase activities of *Candida* species. *Microbiyol Bul.* 2004; **38**: 99-103.
176. Kennedy MJ, Volz PA, Edwards CA, Yancey RJ. Mechanisms of association of *Candida albicans* with intestinal mucosa. *J Med Microbiol.* 1987; **24**: 333-341.
177. Kennedy MJ, Rogers AL, Hanselmen LR, Soll DR, Yancey RJ Jr. Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *Mycopathologia.* 1988; **102**: 149-156.
178. Khot PD, Suci PA, Miller RL, Nelson RD, Tyler BJ. A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and β -1,6-glucan pathway genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; **50**: 3708-3716.

179. Kimura LG, Pearsall NN. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infect Immun.* 1978; **21**: 64-68.
180. King RD, Lee JC, Morris AL. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect Immun.* 1980; **27**: 667-674.
181. Kliemann DA, Pasqualotto AC, Falavigna M, Giaretta T, Severo LC. *Candida* esophagitis: species distribution and risk factors for infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008; **50**: 261-263.
182. Klotz SA, Drutz DJ, Harrison JL, Huppert M. Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. *Infect Immun.* 1983; **42**: 374-384.
183. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun.* 1985; **50**: 97-101.
184. Knight SA, Vilaire G, Lesuisse E, Dancis A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect Immun.* 2005; **73**: 5482-5492.
185. Kobayashi CC, de Fernandes OF, Miranda KC, de Sousa ED, Silva Mdo R. Candiduria in hospital patients: a study prospective. *Mycopathologia.* 2004; **158**: 49-52.

186. Koga-Ito CY, Lyon JP, Vidotto V, de Resende MA. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia*. 2006; **161**: 219-223.
187. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*. 2004; **17**: 255-267.
188. Kontoyiannis DP, Vaziri I, Hanna HA, Boktour M, Thornby J, Hachem R, Bodey GP, Raad II. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin Infect Dis*. 2001; **33**: 1676-1681.
189. Korting HC, Hube B, Oberbauer S, Januschke E, Hamm G, Albrecht A, Borelli C, Schaller M. Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes SAP1 and SAP3 in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J Med Microbiol*. 2003; **52**: 623-632.
190. Kothari A, Sagar V. Epidemiology of *Candida* bloodstream infections in a tertiary care institute in India. *Indian J Med Microbiol*. 2009; **27**: 171-172.
191. Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol*. 2010; **59**: 873-880.

192. Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002; **50**: 243-260.
193. Krishnasamy PV, Liby C 3rd. Emphysematous pyelonephritis caused by *Candida tropicalis*. *Am J Med.* 2010; **123**: e7-8.
194. Krom BP, Cohen JB, McElhaneey-Feser G, Busscher HJ, van der Mei HC, Cihlar RL. Conditions for optimal *Candida* biofilm development in microtiter plates. En: Cihlar RL, Calderone RA. *Candida albicans: Methods and Protocols*. New York: Humana Press; 2009. p. 55-62.
195. Kruppa M, Krom BP, Chauhan N, Bambach AV, Cihlar RL, Calderone RA. The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2004; **3**: 1062-1065.
196. Kruppa M. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses.* 2009; **52**:1-10.
197. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; **46**: 1773-1780.

198. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. J Clin Microbiol. 2003; **41**: 506-508.
199. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. Curr Opin Microbiol. 2002; **5**: 608-611.
200. Kumamoto CA, Vines MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. Annu Rev Microbiol. 2005; **59**: 113-133.
201. Kumar CP, Kumar SS, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. Mycopathologia. 2006; **161**: 213-218. (a)
202. Kumar CP, Menon T, Sundararajan T, Nalini S, Thirunarayan MA, Rajasekaran S, Venkatadesikal. Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts. Rev Iberoam Micol. 2006; **23**: 101-103. (b)
203. Laffey SF, Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. Microbiology. 2005; **151**: 1073-1081.
204. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. Antimicrob Agents Chemother. 2006; **50**: 3839-3846.

205. Lai CC, Tan CK, Huang YT, Shao PL, Hsueh PR. Current challenges in the management of invasive fungal infections. *J Infect Chemother*. 2008; **14**: 77-85.
206. Lamagni TL, Evans BG, Shigematsu M, Johnson EM. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-1999). *Epidemiol Infect*. 2001; **126**: 397-414.
207. Lane T, Garcia JR. Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. *Mycoses*. 1991; **34**: 217-220.
208. Lane S, Birse C, Zhou S, Matson R, Liu H. DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 2001; **276**: 48988-48996.
209. Larone DH. Medically important fungi. A guide to identification. 3^a ed. Washington, D.C: ASM Press; 1995.
210. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*. 2009; **52**: 197-205.
211. Lee KL, Buckley HR, Campbell CC. An amino acid liquid synthetic medium for development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1975; **13**: 148-153.

212. Legrand M, Lephart P, Forche A, Mueller FM, Walsh T, Magee PT, Magee BB. Homozygosity at the MTL locus in clinical strains of *Candida albicans*: karyotypic rearrangements and tetraploid formation. *Mol Microbiol.* 2004; **52**: 1451-1462.
213. Lermann U, Morschhäuser J. Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. *Microbiology.* 2008; **154**: 3281-3295.
214. Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; **31**: 21-31.
215. Lingappa BT, Prasad M, Lingappa Y, Hunt DF, Biemann K. Phenethyl alcohol and tryptophol: autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science.* 1969; **163**: 192-194.
216. Liu Y, Filler SG. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell.* 2011; **10**: 168-173.
217. Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* 1997; **90**: 939-949.
218. Lockhart SR, Daniels KJ, Zhao R, Wessels D, Soll DR. Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2003; **2**: 49-61.

219. López-Ribot JL. *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. *Curr Biol.* 2005; **15**: R453-455.
220. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro haemolytic activities. *J Clin Microbiol.* 2001; **39**: 2971-2974.
221. Magee BB, Magee PT. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science.* 2000; **289**: 310-313.
222. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a haemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1994; **62**: 5154-5156.
223. Marchetti O, Bille J, Fluckinger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Täuber MG, Pittet D; Fungal Infection Network of Switzerland. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis.* 2004; **38**: 311-320.
224. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindós G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses.* 2009; **54**: e10-e16. (a)
225. Marcos-Arias C, Martín Sainz de la Maza O, Miranda I, Sánchez Sousa A, Eraso E, Rodríguez Andrés C, Quindós G. Supervivencia de cuatro especies de *Candida* sobre materiales porosos y no porosos. IX Congreso Nacional de Micología. Córdoba. 2009. (b)

226. Marcos-Arias C, Eraso E, Aguirre JM, Quindós G. Evaluación de la formación de biopelículas y producción de fosfolipasa y proteinasa por aislamientos orales de *Candida albicans*. IX Congreso Nacional de Micología. Córdoba. 2009. (c)
227. Marol S, Yücesoy M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. *Mycoses*. 2008; **51**: 40-49.
228. Martin MV. Germ-tube formation by oral strains of *Candida tropicalis*. *J Med Microbiol*. 1979; **12**: 187-193.
229. Martínez-López R, Park H, Myers CL, Gil C, Filler SG. *Candida albicans* Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells. *Eukaryot Cell*. 2006; **5**: 140-147.
230. Martins M, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Farnesol: beyond morphogenesis. Control in Non-*Candida albicans* *Candida* species. En: Gilbert P, Allison D, Brading M, Pratten J, Spratt D, Upton M. *Biofilms: coming of age*. The Biofilm Club, Manchester. 2007. p: 53-60.
231. Masuoka J, Hazen KC. Cell wall protein mannosylation determines *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. *Microbiology*. 1997; **143**: 3015-3021.

232. Masuoka J, Hazen KC. Differences in the acid-labile component of *Candida albicans* mannan from hydrophobic and hydrophilic yeast cells. *Glycobiology*. 1999; **9**: 1281-1286.
233. Masuoka J, Hazen KC. Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains. *Infect Immun*. 2004; **72**: 6230-6236.
234. Matsumoto FE, Gandra RF, Ruiz LS, Auler ME, Marques SA, Pires MF, Gambale W, Paula CR. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*. 2002. **154**: 63-69.
235. Miller MG, Johnson AD. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*. 2002; **110**: 293-302.
236. Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, Sousa AP, Sienna RA, Gobara S, Santos CR, Lobo RD, Pessoa VP Jr, Levin AS. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect*. 2009; **72**: 9-16.
237. Mohan das V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol*. 2008; **25**: 208-210.

238. Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol.* 1994; **13**: 357-368.
239. Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D. Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology.* 1998; **144**: 2731-2737.
240. Moors MA, Stull TL, Blank KF, Buckley HR, Mosser DM. A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*. *J Exp Med.* 1992; **175**: 1643-1651.
241. Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi. *Eukaryot Cell.* 2011; **10**: 34-42.
242. Mores AU, Souza RD, Cavalca L, de Paula e Carvalho A, Gursky LC, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EA. Enhancement of secretory aspartyl protease production in biofilms of *Candida albicans* exposed to sub-inhibitory concentrations of fluconazole. *Mycoses.* 2009; **54**: 195-201.
243. Morrow B, Srikantha T, Soll DR. Transcription of the gene for a pepsinogen, PEP1, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol.* 1992; **12**: 2997-3005.

244. Mosel DD, Dumitru R, Hornby JM, Atkin AL, Nickerson KW. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Appl Environ Microbiol.* 2005; **71**: 4938-4940.
245. Mukherjee PK, Seshan KR, Leidich SD, Chandra J, Cole GT, Ghannoum MA. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. *Microbiology.* 2001; **147**: 2585-2597.
246. Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol.* 2005; **43**: 191-208.
247. Muñoz P, Giannella M, Fanciulli C, Guinea J, Valerio M, Rojas L, Rodríguez-Crèixems M, Bouza E. *Candida tropicalis* fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2011; **17**: 1538-1545.
248. Myoken Y, Kyo T, Fujihara M, Sugata T, Mikami Y. Clinical significance of breakthrough fungemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematologic malignancies. *Haematologica.* 2004; **89**: 378-380.
249. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; **67**: 400-428.

250. Nailis H, Kucharíková S, Ricicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and –independent gene expression. BMC Microbiol. 2010; **10**: 114.
251. Navarathna DH, Hornby JM, Hoerrmann N, Parkhurst AM, Duhamel GE, Nickerson KW. Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis. J Antimicrob Chemother. 2005; **56**: 1156-1159.
252. Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski TI, Azeredo J, Oliveira R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. Mycopathologia. 2010; **169**: 175-182.
253. Negri M, Silva S, Henriques M, Azeredo J, Svidzinski T, Oliveira R. *Candida tropicalis* biofilms: artificial urine, urinary catheters and flow model. Med Mycol. 2011; **49**: 739-747.
254. Ng KP, Saw TL, Na SL, Soo-Hoo TS. Systemic *Candida* infection in University hospital 1997-1999: the distribution of *Candida* biotypes and antifungal susceptibility patterns. Mycopathologia. 2001; **149**: 141-146.

255. Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol.* 2006; **72**: 3805-3813.
256. Nobile CJ, Mitchell AP. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol.* 2005; **15**: 1150-1155.
257. Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan QT, Edwards JE, Filler SG, Mitchell AP. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog.* 2006; **2**: e63.
258. Noble SM, Johnson AD. Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen. *Annu Rev Genet.* 2007; **41**: 193-211.
259. Nucci M. Candiduria in hospitalized patients: a review. *Braz J Infect Dis.* 2000; **4**: 168-172.
260. Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis.* 2005; **41**: 521-526.
261. Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; **58**: 77-82.

262. Odds FC. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. 2^a ed. London: Bailliere Tindall; 1988.
263. Oh KB, Miyazawa H, Naito T, Matsuoka H. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating morphological transition in *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; **98**: 4664-4668.
264. Okawa Y, Miyauchi M, Kobayashi H. Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. Biol Pharm Bull. 2008; **31**: 1507-1510.
265. Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends Microbiol. 2005; **13**: 27-33.
266. Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. J Bacteriol. 1999; **181**: 1203-1210.
267. Pemán J, Cantón E, Gobernado M; Spanish ECMM Working Group on Candidemia. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005; **24**: 23-30.
268. Perea E. Enfermedades infecciosas. Barcelona: Doyma, SA; 1991.

269. Perfect JR. Antifungal resistance: the clinical front. *Oncology*. 2004; **18** (Suppl. 13): 15-22.
270. Perumal P, Mekala S, Chaffin WL. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; **51**: 2454-2463.
271. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; **31**: 327-332.
272. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA; SENTRY Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2001; **39**: 3254-3259.
273. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, Tiraboschi N, Nagy E, Gibbs DL. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol*. 2005; **43**: 5848-5859.

274. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; **20**: 133-163.
275. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ; ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Group. Comparison of results of fluconazole and voriconazole disk diffusion testing for *Candida* spp. with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; **65**: 27-34.
276. Pichová I, Pavlíčková L, Dostál J, Dolejší E, Hrusková-Heidingsfeldová O, Weber J, Ruml T, Soucek M. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem.* 2001; **268**: 2669-2677.
277. Pontón J, Ruiz I. Candidosis. En: Ausina V, Moreno S. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 1^a ed. Madrid: Ed. Panamericana; 2006. p. 617-624.
278. Pontón J. The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin. *Rev Iberoam Micol.* 2008; **25**: 78-82.
279. Porman AM, Alby K, Hirakawa MP, Bennett RJ. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic

- fungual pathogen *Candida tropicalis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2011; **108**: 21158-21163.
280. Prakobphol A, Leffler H, Fisher SJ. Specific adherence of *Candida tropicalis* to lysophospholipids. Biochemistry. 1994; **33**: 9496-9503.
281. Price MF, Cawson RA. Phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia. 1977; **15**: 197-285.
282. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia. 1982; **20**: 7-14.
283. Pugh D, Cawson RA. The cytochemical localization of phospholipase A and lysophospholipase in *Candida albicans*. Sabouraudia. 1975; **13**: 110-115.
284. Pugh D, Cawson RA. The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. Sabouraudia. 1977; **15**: 29-35.
285. Punithavanthy PM, Menon T. Characterization of gene family that mediates the adhesion of biofilms formed by *Candida tropicalis* isolated from HIV and non-HIV patients. BMC Infectious Diseases 2012; **12** (Suppl 1): 08. From First International Science Symposium on HIV and Infectious Diseases (HIV Science 2012) Chennai, India. 2012.

286. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for in Vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; **45**: 2475-2479. (a)
287. Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 2001; **18**: 163-170. (b)
288. Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL. Biofilms of *Candia albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am Clin Lab.* 2001; **20**: 42-44. (c)
289. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2002; **49**: 973-980. (a)
290. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol.* 2002; **68**: 5459-5463. (b)
291. Ramage G, VandeWalle K, López-Ribot JL, Wickes BL. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; **214**: 95-100. (c)

292. Ramage G, Martinez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006; **6**: 979-980.
293. Ramírez-Závala B, Reuss O, Park YN, Ohlsen K, Morschhäuser J. Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2008; **4**: e1000089.
294. Ray TL, Digre KB, Payne CD. Adherence of *Candida* species to human epidermal corneocytes and buccal mucosal cells: correlation with cutaneous pathogenicity. *J Invest Dermatol.* 1984; **83**: 37-41.
295. Ray TL, Payne CD. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. *Infect Immun.* 1988; **56**: 1942-1949.
296. Reynolds TB, Fink GR. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science.* 2001; **291**: 878-881.
297. Rice SA, McDougald D, Kumar N, Kjelleberg S. The use of quorum-sensing blockers as therapeutic agents for the control of biofilm-associated infections. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005; **6**: 178-184.
298. Rodrigues AG, Mårdh PA, Pina-Vaz C, Martinez-de-Oliveira J, Fonseca AF. Germ tube formation changes surface hydrophobicity of *Candida* cells. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999; **7**: 222-226.

299. Rodríguez D, Almirante B, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Mensa J, Ayats J, Sánchez F, Pahissa A; Barcelona Candidemia Project Study Group. Predictors of candidaemia caused by non-*albicans* *Candida* species: results of a population-based surveillance in Barcelona, Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2010; **16**: 1676-1682.
300. Rodríguez-Crèixems M, Alcalá L, Muñoz P, Cercenado E, Vicente T, Bouza E. Bloodstream infections: evolution and trends in the microbiology workload, incidence, and etiology, 1985-2006. *Medicine*. 2008; **87**: 234-249.
301. Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, Francesconi A, Kasai M, Filioti J, Tsivitanidou M, Sofianou D, Kremenopoulos G, Walsh TJ. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J Clin Microbiol*. 2003; **41**: 735-741.
302. Rörig KC, Colacite J, Abegg MA. Production of virulence factors in vitro by pathogenic species of the genus *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; **42**: 225-227.
303. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett*. 1980; **9**: 29-33.

304. Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; **262**: 129-134.
305. Ruan SY, Hsueh PR. Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2009; **108**: 443-451.
306. Rudek W. Esterase activity in *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 1978; **8**: 756-759.
307. Sacristán B, Blanco MT, Galán-Ladero MA, Blanco J, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Aspartyl proteinase, phospholipase, hemolytic activities and biofilm production of *Candida albicans* isolated from bronchial aspirates of ICU patients. *Med Mycol.* 2011; **49**: 94-97.
308. Samaranayake LP, MacFarlane TW. The adhesion of the yeast *Candida albicans* to epithelial cells of human origin in vitro. *Arch Oral Biol.* 1981; **26**: 815-820.
309. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia.* 1984; **22**: 201-207.
310. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelia and denture acrylic surfaces. *APMIS.* 1995; **103**: 707-713.

311. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Jayatilake JA, Cheung BP, Yau JY, Yeung KW, Samaranayake LP. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *J Med Microbiol.* 2005; **54**: 583-593.
312. Sandford GR, Merz WG, Wingard JR, Charache P, Saral R. The value of fungal surveillance cultures as predictors of systemic fungal infections. *J Infect Dis.* 1980; **142**: 503-509.
313. Schaller M, Schackert C, Korting HC, Januschke E, Hube B. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol.* 2000; **114**: 712-717.
314. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2005; **48**: 365-377.
315. Schelenz S. Management of candidiasis in the intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 2008; **61**: Suppl 1: i31-34.
316. Schröppel K, Sprösser K, Whiteway M, Thomas D. Y, Röllinghoff M, Csank C. Repression of hyphal proteinase expression by the mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase Cpp1p of *Candida albicans* is independent of the MAP kinase Cek1p. *Infect Immun.* 2000; **68**: 7159-7161.

317. Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; **52**: 3259-3266.
318. Seneviratne CJ, Wong SS, Yuen KY, Meurman JH, Pärnänen P, Vaara M, Samaranayake LP. Antifungal susceptibility and virulence attributes of bloodstream isolates of *Candida* from Hong Kong and Finland. *Mycopathologia.* 2011; **172**: 389-395.
319. Shchepin R, Hornby JM, Burger E, Niessen T, Dussault P, Nickerson KW. Quorum sensing in *Candida albicans*: probing farnesol's mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs. *Chem Biol.* 2003; **10**: 743-750.
320. Shimizu MT, Almeida NQ, Fantinato V, Unterkircher CS. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. *Mycoses.* 1996; **39**: 161-167.
321. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol.* 2002; **40**: 1244-1248.
322. Shin JH, Kim MN, Shin DH, Jung SI, Kim KJ, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Genetic relatedness among *Candida tropicalis* isolates from sporadic cases of fungemia in two

- university hospitals in Korea. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004; **25**: 634-640.
323. Shuster A, Osherov N, Rosenberg M. Alcohol-mediated hemolysis in yeast. *Yeast.* 2004; **21**: 1335-1342.
324. Silva TM, Glee PM, Hazen KC. Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Candida albicans* to extracellular matrix proteins. *J Med Vet Mycol.* 1995; **33**: 117-122.
325. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol.* 2009; **47**: 681-689.
326. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *J Med Microbiol.* 2010; **59**: 747-754.
327. Silva S, Hooper SJ, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. *Clin Microbiol Infect.* 2011; **17**: 264-272. (a)
328. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2011; **19**: 241-247. (b)

329. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012; **36**: 288-305.
330. Skerl, LG, Calderone RA, Segal E, Sreevalsan T, Scheld WM. In vitro binding of *Candida albicans* yeasts cells to human fibronectin. Can J Microbiol. 1984; **30**: 221-227.
331. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. J Clin Microbiol. 2000; **38**: 4626-4628.
332. Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. Science. 1985; **230**: 666-669.
333. Soll DR, Staebell M, Langtimm C, Pfaller M, Hicks J, Rao TV. Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic infection. J Clin Microbiol. 1988; **26**: 1448-1459.
334. Soll DR. High-frequency switching in *Candida albicans*. Clin Microbiol Rev. 1992; **5**: 183-203.
335. Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhäuser J. Transcriptional regulators Cph1p and Efg1p mediate activation of the *Candida albicans* virulence gene SAP5 during infection. Infect Immun. 2002; **70**: 921-927.
336. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004; **12**: 317-324.

337. Sugita T, Kurosaka S, Yajitate M, Sato H, Nishikawa A. Extracellular proteinase and phospholipase activity of three genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbiol Immunol*. 2002; **46**: 881-883.
338. Suntharalingam P, Cvitkovitch DG. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol*. 2005; **13**: 3-6.
339. Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. *Guide to Clinical Significant Fungi*. 1^a ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1998.
340. Takahashi M, Banno Y, Nozawa Y. Secreted *Candida albicans* phospholipases: purification and characterization of two forms of lysophospholipase-transacylase. *J Med Vet Mycol*. 1991; **29**: 193-204.
341. Tamura NK, Negri MF, Bonassoli LA, Svidzinski TI. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; **40**: 91-93.
342. Tanaka WT, Nakao N, Mikami T, Matsumoto T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; **232**: 350-353.
343. Tavanti A, Pardini G, Campa D, Davini P, Lupetti A, Senesi S. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (SAP1-10) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. *J Clin Microbiol*. 2004; **42**: 4726-4734.

344. Tellier R, Krajden M, Grigoriev GA, Campbell I. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; **36**: 1619-1625.
345. Togni G, Sanglard D, Falchetto R, Monod M. Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis*. *FEBS Lett.* 1991; **286**:181-185.
346. Torres-Rodriguez JM, del Palacio-Hernanz A, Guarro-Artigas J, Negroni-Briz R, Pereiro-Miguens M. *Micología médica*. 1ª ed. Barcelona: Masson, SA. 1993.
347. Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, Prigitano A, Viviani MA; FIMUA-ECMM Candidemia Study Group. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-*albicans Candida* isolates from blood. *J Antimicrob Chemother.* 2003; **52**: 679-682.
348. Tsang CS, Chu FC, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol.* 2007; **56**: 1393-1398.
349. Tsuboi R, Komatsuzaki H, Ogawa H. Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect Immun.* 1996; **64**: 2936-2940.

350. Uppuluri P, Dinakaran H, Thomas DP, Chaturvedi AK, López-Ribot JL. Characteristics of *Candida albicans* biofilms grown in a synthetic urine medium. J Clin Microbiol. 2009; **47**: 4078-4083.
351. Van der Graaf CA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. Infect Immun. 2005; **73**: 7458-7464.
352. Van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJ. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. Appl Environ Microbiol. 1987; **53**: 1893-1897.
353. Verma AK, Prasad KN, Singh M, Dixit AK, Ayyagari A. Candidemia in patients of a tertiary health care hospital from north India. Indian J Med Res. 2003; **117**: 122-128.
354. Visick KL, Fuqua C. Decoding microbial chatter: cell-cell communications in bacteria. J Bacteriol. 2005; **187**: 5507-5519.
355. Voziyan PA, Haug JS, Meinykovich G. Mechanism of farnesol cytotoxicity: further evidence for the role of PKC- dependent signal transduction in farnesol-induced apoptotic cell death. Biochem Biophys Res Commun. 1995; **212**: 479-486.
356. Warren NG, Hazen RC. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA,

- Tenover FC, Yolken, RH. Manual of Clinical Microbiology. 7^a ed. Washington, D.C.: ASM Press; 1999. p. 1184-1199.
357. Watanabe T, Takano M, Murakami M, Tanaka H, Matsuhisa A, Nakao N, Mikami T, Suzuki M, Matsumoto T. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. Microbiology. 1999; **145**: 689-694.
358. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol. 2000; **182**: 2675-2679.
359. Weber K, Sohr R, Schulz B, Fleischhacker M, Ruhnke M. Secretion of E,E-Farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother. 2008; **52**:1859-1861.
360. Weinberger M, Sweet S, Leibovici L, Pitlik SD, Samra ZJ. Correlation between candiduria and departmental antibiotic use. J Hosp Infect. 2003; **53**: 183-186.
361. Wenzel RP, Pfaller MA. *Candida* species: Emerging hospital bloodstream pathogens. Infect Control Hosp Epidemiol. 1991; **12**: 523-524.
362. Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. J Med Vet Mycol. 1986; **24**: 415-417.

363. Wingard JR, Merz WG, Saral R. *Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients. *Ann Intern Med.* 1979; **91**: 539-543.
364. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US Hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004; **39**: 309-317.
365. Yamamoto T, Nohara K, Uchida K, Yamauchi H. Purification and characterization of secretory proteinase of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol.* 1992; **36**: 637-641.
366. Yang YL, Ho YA, Cheng HH, Ho M, Lo HJ. Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004; **25**: 60-64.
367. Yigit N, Aktas E. Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the haemolytic of *Candida* species. *J Mycol Med.* 2009; **19**: 110-115.
368. Yücesoy M, Marol S. Determination of esterase activity of *Candida* varieties. *Mikrobiyol Bul.* 2003; **37**: 59-63.
369. Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun.* 2001; **69**: 405-412.

370. Zhang, J, Hollis RJ, Pfaller MA. Variations in DNA subtype and antifungal susceptibility among clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1997; **27**: 63-67.
371. Zhang XB, Yu SJ, Yu JX, Gong YL, Feng W, Sun FJ. Retrospective analysis of epidemiology and prognostic factors for candidemia at a hospital in China, 2000–2009. *Jpn J Infect Dis*. 2012; **65**, 510-515.
372. Zviagintseva IS, Pitriuk IA. Lipids and lipases of yeasts. *Mikrobiologiya*. 1976; **45**: 470-474.

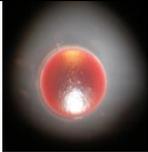
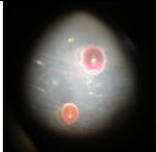
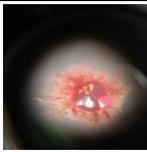
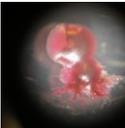
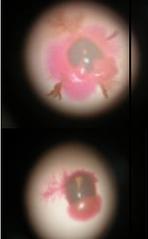
ANEXO I

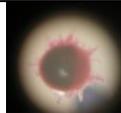
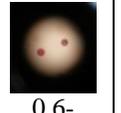
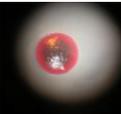
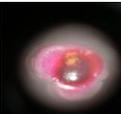
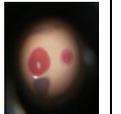
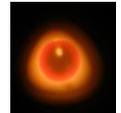
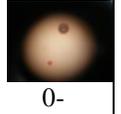
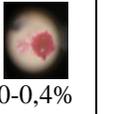
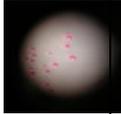
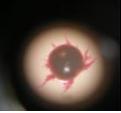
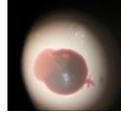
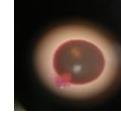
Tabla 39. Resultados de HSC, adherencia y biofilm de 30 cepas de *C. tropicalis* a 37°C y 22°C.

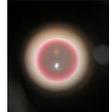
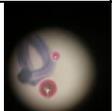
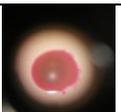
	37° C			22° C			Estadísticos	
	N°cepas+	Rangos	Media	N°cepas+	Rango	Media	p	R ²
HIDROFOBICIDAD (%)	30	17.44±3.72 - 91.18±2.89	64.04±21.25	30	64.25±4.00 - 98.26±0.90	89.08±8.24	<0.005	0.367
ADHERENCIA (DO) -15 min	30	0.06±0.01 - 0.12±0.03	0.10±0.02	30	0.08±0.02 - 0.15±0.03	0.11 ±0.02	>0.05	0.073
-24h	30	0.05±0.02 - 0.16±0.04	0.10±0.03	30	0.11±0.04 - 0.19±0.10	0.15 ±0.02	<0.005	0.003
CRECIMIENTO (DO) -24h	30	0.80±0.23 - 1.09±0.04	0.96±0.08	30	0.39±0.07 - 1.06±0.14	0.82 ±0.13	<0.005	0.171
-96 h	30	0.96±0.02 - 1.16±0.09	1.06±0.06	30	1.07±0.06 - 1.34±0.03	1.23 ±0.71	<0.005	0.357
FILAMENTACIÓN Nivel a 24h	23	1-2	1.7	13	1-2	1.4		
Nivel a 96h	26	1-2	1.9	17	1-2	1.47		
BIOFILM-DO - 24h	27	0.14±0.01 - 0.99±0.14	0.52±0.29	17	0.18±0.01 - 0.75±0.16	0.49 ±0.22	>0.05	0.160
- 96h	28	0.19±0.07 - 1.01±0.05	0.48±0.27	27	0.19±0.11 - 1.19±0.01	0.68 ±0.36	<0.05	0.202
IS-DO-24h	27	13.61±0.31 - 109.82±3.16	55.43±30.46	21	16.27±1.68 - 110.75±3.01	56.21±35.23	>0.05	0.417
IS-DO-96h	28	12.69±0.98 - 104.14±5.09	46.96±29.18	27	14.54±8.64 - 122.13±38.05	57.25 ±33.23	>0.05	0.339
BIOFILM-XTT - 24h	28	0.35±0.09 - 2.14±0.25	1.03±0.47	20	0.34±0.12 - 2.40±0.53	1.07 ±0.61	>0.05	0.473
- 96h	29	0.20±0.22 - 1.25±0.17	0.60±0.29	30	0.38±0.27 - 2.37±0.18	1.03 ±0.63	<0.05	0.221
IS-XTT-24h	30	18.72±9.1 - 253.63±42.1	104.13±57.17	23	33.93±17.37 - 305.62±52.9	125.88 ±86.44	>0.05	0.647
IS-XTT-96 h	29	15.94±18.4 - 118.62±22.6	57.93±29.54	29	31.01±15.94 - 226.74±70.7	93.73 ±58.74	<0.05	0.331

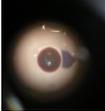
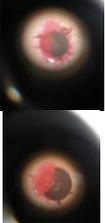
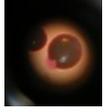
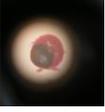
ANEXO II

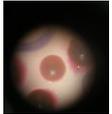
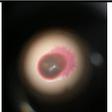
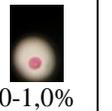
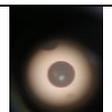
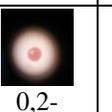
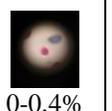
Tabla 40. Diferentes morfotipos de *C. tropicalis*, a 25°C, sin CO₂. Rango de frecuencia de morfotipos según los diferentes estudios.

Cepa/ Morfofot	Elevada, lisa, centro oscuro	Elevada, lisa, oscura, borde claro con filamentos	Elevada, lisa, oscura, sin borde claro	Elevada, lisa, oscura, sin borde claro, con filamentos	Oscura con segmento, sin filamentos	Oscura con segmento, con filamentos	Mixta, rosa lisa- oscura con filamentos	Colonia en diana	Clara, sin filament	Clara, con filament	Clara grande rosa	Clara grande con segment	Doble halo
CECT 1440	 12,5-44,4%	 22,2-60%				 0-37,5%	 0-50%						
365	 66,7-100%	 0-33,3%			 0-16,7%								
367				 0-33,3%		0- 1,7%	 0- 33,3%	 0- 66,6%	 0-100%				
368	 0- 66,7%	0-100%			 0-40,0%	 0-50,0%	 0- 33,3%						
372	 87,3- 98,2%				 0,6- 4,5%	 0-2,7%			 0-1%	 0-0,9%			 0-4,5%

373	 96,0- 99,4%	 0-1,0%			 0-0,9%	 0-,5%			 0-3,3%			
379								 0,6-6,1%				 93,9-99,0%
381	 0- 2,8%			 0,4-4,5%	 0- 2,7%	 0-1,3%	 0-0,9%			 0- 0,5%		 92,8-98,8%
404	 0,2-76,3%							 0-.99,2%	 0-0,4%			 0-99,8%
405	 95,8- 98,7%	 1- 4,2%										 0- 0,3%
408	 0-76,7%		 22,9- 85,7%	 0- 6,5%	 0-1,9%	 0- 6,8%	 0- 1,2%		 0-1,8%			

413	 0- 0,9%		 72,5-100%	 0- 7,6%	 0-10,1%	 0-7,2%	 0-2,9%		 0-1,3%		0-0,3%		
416	 0-100%	 0- 91,3%	 0-3,4%		 0-3,4%	 0- 2,3%	 0-0,5%		 0- 3,8%		 0- 0,5%		
419	 88,1-100%				 0-9,4%				 0-2,9%				
421	 0- 0,3%	 0-1%	 0-98,8%	 0-1,2%	0-0,6%	 0- 0,8%			 0- 1,5%				 0-98,9%
429	 0- 96,9%	0-3,9%	 0- 87,2%	 0- 9,9%	 0- 1,5%	 0-1,6%	 0-7,4%		 0- 0,4%			 0-0,4%	
432	 90,4- 97,6%		 0- 0,2%		 0,8- 4,9%	 0-0,3%	 0- 0,5%		 0- 8,7%			 0- 0,4%	

434	 87,9- 97,5%	 0- 3,2%	 0- 0,6%		 0-7,7%	 0-1,4%		 0,5- 2,5%				
435	 92,3-97,5%		 0-1,2%	 0-1,0%	 1,6- 4,3%	 0-0,3%	 0-0,9%		 0-1,2%	 0,2-1%	 0-0,3%	
436	 0- 95,4%	 0-1,7%	 0-96,5%	 0-9,9%		 0-12,9%	0- 1,8%		 0- 2,3%	 0- 1,2%	 0-0,9%	
438		0-1,4%	 58,3-98,4%	 0,8- 18,3%	 0-2,6%	 0- 3,0%	 0-5,2%		 0- 0,4%			
440			 80,4-98,8%	 0-16,7%	 0,9-1,7%	 0-1,4%	 0- 0,8%		 0- 0,4%			

441			 0-14%	  37,5-88,0%			  10,0-62,5%					
442	 0- 77,8%	 0-29,2%			0-82,3%	 0- 80%	 0- 8,3%					
443	 93,9-98,5%	 0- 0,6%			 0,5-5,1%	 0- 0,5%	  0-0,7%		 0-1,0%			
444			 83,0- 98,5%	 0-15,2 %	 0,5-1,2%	 0-1,2%	 0- 0,5%		 0,2-0,6%			
445	 53,7-92,6%	 4,5-10,5%	 19,9- 27,5%	 1,5- 6,0%	  1,1-4,1%	 0,5-2,9%	0-0,4%		 0,4-1,2%	 0-0,4%		

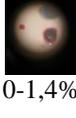
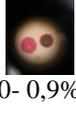
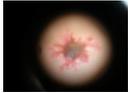
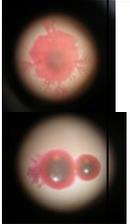
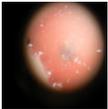
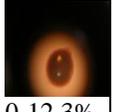
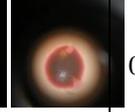
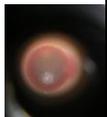
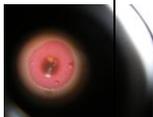
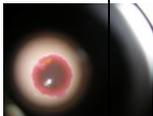
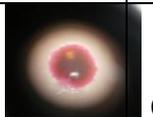
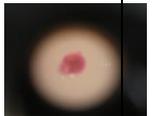
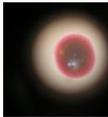
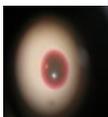
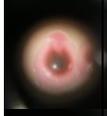
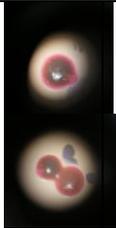
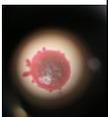
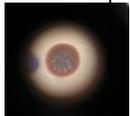
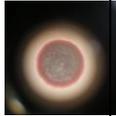
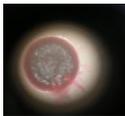
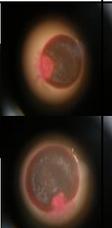
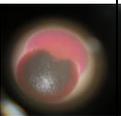
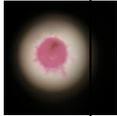
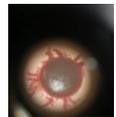
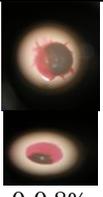
446	 57,1-85,7%			 0,6-8,1%	 8,3-18,8%	 1,4-15,2%	 0,4- 0,5%	 0-1,4%	 0- 0,9%				0-1,8%
447		 0- 89,2%	 2,5- 98,4%	 0,9- 8,3%	 0-4,6%	 0- 0,4%		 0,4- 1,5%	 0-1,0%				
448		 84,9-96,1%	 0-1,2%	 2,4- 8,0%	0-1,5%	 0,6-3,5%		 0,5- 1,2%		 0- 0,3%			

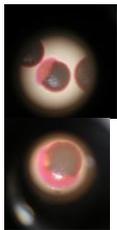
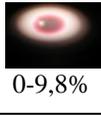
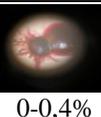
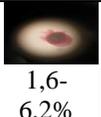
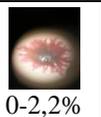
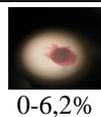
Tabla 41. Diferentes morfotipos de *C. tropicalis*, a 25°C, con CO₂. Rango de frecuencia de morfotipos según los diferentes estudios.

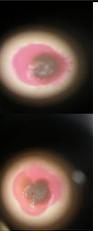
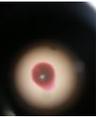
Cepa/ Morfot	Elevada lisa, oscura, borde claro	Elevada lisa, oscura, borde claro filament	Elevada lisa, oscura, sin borde claro	Elevada, lisa, oscura sin borde claro, filamentos	Lisa, plana, oscura	Lisa, plana, oscura filamen	Oscura con segmento no filam.	Oscura con segmento con filam.	Mixta rosa lisa- oscura con filam	En diana	Clara sin filam.	Clara con filam.	Clara grand rosa	Clar peq, con segm	Dobl halo, con filam	Doble halo	
CECT 1440	0-75%			 0-63,6%			 0-100%		 0-50%	 0-80%							
365	0-78,6%		0-100%				0-36,4%		0-22,2%								
367	 0-25%	 2,9-25,0%								 0-97%						 50-97,1%	
368					 0-66,7%										0-80%	 0-100%	
372			 2,1-35%				 0-3,4%		0-2,3%							 65-98%	

373			0-12,4%												
										0-3,4%					84,1-98,7%
379															
	79,9-95,5%			4,5-28,6%											0-1,8%
381															
						0-0,4%									
	0-100%			0,3-32,2%				0-1,0%		0-0,6%	0-63,5%				0-99,6%
404															
				0-12,3%							0-0,5%				87,7-99,5%
405															
				99-99,7%											0,3-1,0%
408		0-2%													
				0-29,0%	0-2%	0-7,2%	0-0,8%							0-0,9%	69-94%
										0-2,7					

413		0-7,0%			0-10,5%	 0-1,9%	 0-4,8%							 11,6-97,5%
416		0-92,4%	0-25,8%					0-0,3%						 0-100%
419		0-38,5%					0-5,1%			0-1,9%				 56,4-100%
421		0-38,1%		0-2,5%		0-1,2%				0-0,4%				 61,9-96,2%
429		0-16,2%			 	0-8,4%				0-1,9%				 83,5-94,5%

432	 86,5-97,8%			 0-11,7%	 0-0,3%				0-3,2%	 0-1,0%			
434	 81,1-96,6%	 0-6,8%		 0,9-9,8%	 0-2,3%				 0,5-3,8%				
435			 0-3,3%	 0-5,5%					0-1,4%				 89-99,1%
436			 60,4% 96,0%	 0,7-11,3%	 0-20,7%	 0-7,5%	 0-1,3%			 0-1,3%			
438			 0-24%	 0-6,6%	 0,9-5,5%	 0-1,9%	 0-0,8%						 71,1-96,7%

440			 92,2-99,1%	0-5,8%	 0,4-4,7%	 0-2,6%					 0-0,6%				
441	 0-14,3%	4,8-53,5%			0-21,7%									 34,8-95,2%	
442	0-100%				 0-40,0%									 0-100%	
443	 0-97,1%				 1,1-6,0%	0-0,5%				0-0,5%				 0-98,9%	
444		0-5,5%	 0-92,9%	 0-92,1%	 0-24,7%	 0,8-2,9%	 0,8-2,5%			 0-0,4%					
445	 0-9,8%		 0-0,4%	 1,6-6,2%	 0-2,2%	 0-6,2%				0-0,7%	0-0,4%			 64,6-98	

446	 43,7- 93,5%	 0-3,4%			 4,4- 51,2%	 0- 11,5%	 0,9- 18,4%				 0- 1,1%	 0- 1,1%				0-0,9%
447		 2,0- 28,4%					 0-0,7%				0- 0,4%	0- 0,7%			 4,7- 27,0	 43,7- 92,6%
448	 88,4- 94,4%						 3,3-7,9%		 0,5- 3,7%		 0-0,8					

Derivadas de esta Tesis Doctoral se realizaron las siguientes publicaciones en revistas científicas y aportaciones a congresos relacionados con la especialidad:

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS:

-Galán-Ladero MA, Blanco-Blanco MT, Hurtado C, Pérez-Giraldo C, Blanco MT, Gómez-García AC. “Determination of biofilm production by *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients and its relation with cellular surface hydrophobicity, plastic adherence and filamentation ability”. *Yeast*. 2013 Jun 16. doi: 10.1002/yea.2965. [Epub ahead of print].

-M.A. Galán-Ladero, M.T. Blanco-Blanco, M. Negri, J. Blanco Palenciano, M.T. Blanco Roca, R. Oliveira, A.C. Gómez-García. “Formación de biocapa por cepas de *Candida tropicalis* responsables de candiduria en catéteres Foley incubadas con orina artificial”. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; **29**. Especial congreso 1: 141.

-M.A. Galán-Ladero, M.T. Blanco, B. Sacristán, M.C. Fernández-Calderón, C. Pérez-Giraldo, A.C. Gómez-García. “Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients”. *Med Mycol*. 2010; **48**: 207-210.

-M.T. Blanco, M.A. Galán-Ladero, L.Lucio, M. Delgado, M.C. Fernández-Calderón, J. Blanco. “Adherencia y formación de biocapa por *Candida tropicalis* aisladas de candidurias en pacientes hospitalizados”. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; **28**: 148.

-M.A.Galán, B. Sacristán, A.Beteta, J.Blanco, E.Garduño, M.T.Blanco. “*Candida tropicalis* aisladas de ITU en pacientes hospitalizados y valoración de su actividad enzimática”. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007; **25**: 38.

COMUNICACIONES APORTADAS A CONGRESOS:

-Galán-Ladero MA, Blanco-Blanco MT, Blanco-Roca MT, Beteta-López A, Sacristán-Enciso B, Gómez-García AC. “Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) expression of ALSt-1 gene in planktonic and biofilm cells of *Candida tropicalis* isolated from urine”. 23rd European Congress of clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlín (Germany). 2013.

-M.A. Galán-Ladero, A. Beteta, M.T. Blanco-Blanco, M.C. Fernández-Calderón, C. Pérez-Giraldo, M.T. Blanco. “Biofilm-forming ability of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients with candiduria”. *Biofilms in Nosocomial Fungal Infections (ESCMID Postgraduate Education Course)*. Institut Pasteur. París (France). 2011.

-Blanco MT, Galán-Ladero MA, Lucio L, Delgado M, Fernández-Calderón MC, Blanco J. “Adherencia y formación de biocapa por *Candida tropicalis* aisladas de candidurias en pacientes hospitalizados”. XIV Congreso de la SEIMC. Barcelona. 2010.

-M.A.Galán, B. Sacristán, M.Sánchez-González, E.Garduño, M.T.Blanco Roca. “Actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* versus *Candida tropicalis* aisladas de pacientes hospitalizados”. IX Congreso Nacional de Micología. Córdoba. 2008.

-M.A.Galán, B.Sacristán, A.Beteta, J.Blanco, E.Garduño, M.T.Blanco. *Candida tropicalis* aisladas de ITU en pacientes hospitalizados y valoración de su actividad enzimática”. XII Reunión SEIMC. La Coruña. 2007.
