



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

---

---

**DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DE  
BIOPELÍCULAS DE ESPECIES DE *CANDIDA* AISLADAS  
DE CASOS DE VULVOVAGINITIS DONDE SE IDENTIFICO  
INFECCIÓN COMBINADA DE ESPECIES DE *CANDIDA*.**

TESIS

Para obtener el título de:

Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A:

**Cisneros Castellanos Alfredo**

Asesores: Dra. Alma Lucila Núñez del Arco  
Dr. Enrique Salas Téllez

Cuautitlán Izcalli, Edo de México 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Determinación de la sensibilidad de biopelículas de especies de *Candida* aisladas de casos de vulvovaginitis donde se identificó infección combinada de especies de *Candida*

Que presenta el pasante: Alfredo Cisneros Castellanos

Con número de cuenta: 306020670 para obtener el Título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Marzo de 2014.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm



## DEDICATORIAS

El presente trabajo de tesis realizado se lo dedico en primer lugar a mis padres Alfredo Cisneros Márquez y Consuelo Castellanos Gonzáles, a los cuales nunca podré compensar todas esas noches de desvelo, consejos, dedicación y esfuerzo que me han proporcionado y por brindarme todas las herramientas y su apoyo incondicional para ver logrados todas mis metas académicas.

A hermana Verónica Cisneros Castellanos por ser mi mejor amiga, mi mejor compañía y mi apoyo principal en esta vida, contigo comparto todo, desde música hasta una carrera que confío que concluyas de excelente forma y superes lo que yo logré.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que fue, es y será mi segundo hogar ya que pasé una gran etapa de mi vida en sus aulas y estancias le agradezco haberme aceptado para ver cumplida una de mis metas más importantes en la vida.

A la Dra Alma L. Núñez del Arco y al Dr Enrique Salas Téllez, por creer en mí al permitirme ingresar al laboratorio 17 de la UIM dándome su apoyo incondicional consejos y enseñanzas para desarrollar este proyecto. ¡Gracias!

A cada uno de los profesores de la FESC-Campo 1 que participaron en mi formación académica al alentarme a trabajar y estudiar apegado siempre a la razón y el pensamiento lógico, por

compartir sus conocimientos conmigo muchas gracias, en especial a la Dra. Luisa Martínez, Verónica Ruiz, Idalia Ávila Miyazawa, Ángel Germán Martínez Sosa, Arcadia Hernández Beltrán y María Esther Revuelta Miranda. Confió en poder aplicar lo aprendido para mejorar no solamente como persona sino ayudar a cambiar y mejorar el mundo.

A la primera generación de Bioquímica Diagnóstica por compartir, sufrir y gozar cada momento de nuestra formación. De manera especial a mis amigos Karina E. Conde, Efren Zarate, Ma. Lourdes Torres Valdéz, Jose I. Merlan, Alberto, Rubén, Freddy, Verónica, Manuel les agradezco por compartir algo que va más allá de una aula y es “la amistad”.

A cada uno de mis amigos que me brindaron su apoyo y compañía en cada momento de mi vida dentro y fuera de las aulas. De manera especial a un amigo que hoy no está a mi lado pero que siempre me brindó aliento y una gran sonrisa (Adalberto López Zárate).

Finalmente quiero agradecer al Programa de Apoyo a Proyectos Para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), que lleva por título “Catalogo gráfico y colección de preparaciones microscópicas para la asignatura de micología” clave PE207414, por ayudarme a culminar mis estudios.

“Soy el conjunto de todas mis experiencias y decisiones tomadas, soy la suma de todas las vivencias que he tenido con las personas que me he encontrado en esta vida, solo tengo una vida y la vida que vivo es la vida que amo y no me gustaría vivirla de otra manera”



## INDICE

	<b>PAGINAS</b>
Índice de abreviaturas	7
Índice de cuadros	8
Índice de imágenes	9
Índice de graficas	10
Índice de tablas	10
 <b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.0</b>	<b>Generalidades de <i>Candida albicans</i></b> <span style="float: right;"><b>11</b></span>
1.1	Candidiasis <span style="float: right;">13</span>
1.2	Composición de la pared celular de <i>Candida</i> <span style="float: right;">17</span>
1.3	Morfogénesis <span style="float: right;">18</span>
1.4	Factores de virulencia <span style="float: right;">20</span>
1.4.1	○ Genética molecular del polimorfismo <span style="float: right;">20</span>
1.4.2	○ Enzimas <span style="float: right;">22</span>
1.4.2.1	Proteasas <span style="float: right;">22</span>
1.4.2.2	Fosfolipasas <span style="float: right;">24</span>
1.4.2.3	Lipasas <span style="float: right;">25</span>
1.4.3	○ Adhesinas <span style="float: right;">25</span>
1.4.3.1	Als <span style="float: right;">26</span>
1.4.3.2	Hwp1p <span style="float: right;">27</span>
1.4.3.3	Int1p <span style="float: right;">27</span>
1.4.3.4	Mnt1p <span style="float: right;">28</span>
1.5	Biopelícula <span style="float: right;">28</span>
1.5.1	○ Fases de desarrollo de biopelículas <span style="float: right;">29</span>
1.5.2	○ Heterogeneidad de las biopelículas <span style="float: right;">32</span>
1.6	Tratamiento para candidiasis <span style="float: right;">33</span>
1.6.1	○ Polienos <span style="float: right;">34</span>
1.6.1.1	Nistatina <span style="float: right;">34</span>
1.6.1.2	Anfotericina B <span style="float: right;">35</span>
1.6.2	○ Azoles <span style="float: right;">37</span>
1.6.2.1	Fluconazol <span style="float: right;">37</span>
1.6.2.2	Itraconazol <span style="float: right;">38</span>
1.6.2.3	Ketoconazol <span style="float: right;">39</span>
1.6.2.4	Voriconazol <span style="float: right;">39</span>
1.6.3	○ Equinocandinas <span style="float: right;">40</span>
1.6.3.1	Caspofungina <span style="float: right;">40</span>
1.7	Resistencia a antibióticos <span style="float: right;">42</span>
1.8	Importancia en salud pública <span style="float: right;">47</span>
1.9	Métodos de estudio <span style="float: right;">49</span>
1.9.1	○ Ensayo de reducción XTT <span style="float: right;">50</span>

2.0	<b>JUSTIFICACION</b>	52
3.0	<b>HIPOTESIS</b>	53
4.0	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	53
4.1	<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	53
5.0	<b>METODOLOGIA</b>	55
6.0	<b>MATERIAL Y METODOS</b>	56
7.0	<b>RESULTADOS</b>	64
8.0	<b>DISCUSION</b>	71
9.0	<b>CONCLUSION</b>	81
10.0	<b>REFERENCIAS</b>	83
11.0	<b>Anexos</b>	88
11.1	Anexo 1: Medios de cultivo y conservación de hongos	89
11.2	Anexo 2: Reactivos	90
11.3	Anexo3: Equipos	91
11.4	Anexo 4: Disposición de residuos	92

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<b>Als</b>	Secuencia parecida a aglutinina (del inglés Agglutinin Like Sequence )
<b>AMPc</b>	Adenosín Monofosfato Cíclico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CLSI</b>	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio ( del inglés Clinical And Laboratory Standars Institute)
<b>CMI<sub>50</sub></b>	Concentración Mínima Inhibitoria 50
<b>CT</b>	Carbohidratos Totales
<b>CVV</b>	Candidiasis Vulvovaginal
<b>CVVR</b>	Candidiasis Vulvovaginal Resistente
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>Hwp1p</b>	Genes específicos para hifas y tubo germinal (del ingles Hyphal And Germ Tube Specific Gene)
<b>Int1p</b>	Primer proteína integrina (del inglés Integrin found 1st protein)
<b>MEC</b>	Matriz Extra Celular
<b>MG</b>	Media geométrica
<b>Mnt1p</b>	Gen 1,2-manosiltransferasa (del inglés 1,2-mannosyltransferase)
<b>PBS</b>	Solución Buffer de Fosfatos
<b>PT</b>	Proteínas Totales
<b>SAP</b>	Proteasas Aspartico Secretoras (del inglés Secretory Aspartic Proteases)
<b>SDC</b>	Caldo Dextrosa Sabouraud (del inglés Sabouraud Dextrose Broth)
<b>SIDA</b>	Síndrome De Inmunodeficiencia Adquirida
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana
<b>XTT</b>	2, 3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-hidroxido de tetrazolio
<b>YPD</b>	Dextrosa Peptona de levadura (del inglés Yeast Peptone Dextrose)



## ÍNDICE DE CUADROS

Número	Titulo	Pagina
1	Taxonomía del Género <i>Candida</i>	12
2	Frecuencia de infección por especies patógenas de <i>Candida</i>	14
3	Infecciones de <i>Candida</i> y sus factores predisponentes asociados.	15
4	Clasificación de los tipos de Candidiasis.	16
5	Tropismo de las principales especies de <i>Candida</i>	17
6	Expresión de los genes de la familia SAP	23
7	Adhesinas de <i>C.albicans</i> e interacción con ligandos de células de mamíferos	26
8	Mecanismos de acción de antifúngicos e implicaciones para su eficacia	41
9	Criterios de sensibilidad y resistencia de distintos antifúngicos (planctónico)	43
10	Actividad de distintos antifúngicos contra especies de <i>Candida</i> en estado planctónico y biopelículas.	44



## ÍNDICE DE IMÁGENES

Número	Título	Página
1	Modelo propuesto para la estructura de la pared celular de <i>C.albicans</i>	18
2	Estructura de <i>Candida albicans</i>	18
3	Polimorfismo de <i>Candida albicans</i> .	20
4	Etapas de desarrollo de una biopelícula	29
5	Fases de formación de biopelículas de <i>Candida sp</i>	31
6	Nistatina: estructura química	35
7	Anfotericina B: estructura química	36
8	Fluconazol: estructura química	38
9	Itraconazol: estructura química	38
10	Ketoconazol: estructura química	39
11	Voriconazol: estructura química	40
12	Caspofungina: estructura química	41
13	Mecanismo de acción de diversos antimicóticos	42
14	Candidiasis urogenital	48
15	Reducción del XTT para la formación de un derivado de formazán	50
16	Ensayo de sensibilidad in vitro a antifúngicos (Nistatina)	69



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Número	Título	Página
1	Porcentaje de aislamiento de infecciones vaginales sencillas y combinadas causadas por especies de Candida	65
2	Porcentaje de especies aisladas en infecciones vaginales donde se identificaron dos especies en la misma muestra.	66
3	Porcentaje de cepas formadoras de biopelículas aisladas a partir de casos con CVV.	67
4	Actividad oxidativa de biopelículas con 48h de maduración a partir de muestras con infección combinada de especies de Candida.	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Número	Título	Página
1	. Hospitales y Clínicas donadores de muestras clínicas	64
2	Especies de Candida aisladas en infecciones combinadas	65
3	Criterios de clasificación en la formación de biopelículas	67
4	. Actividad in vitro ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de Nistatina, Fluconazol y Caspofungina sobre células planctónicas y biopelículas procedentes de cepas presentes en infecciones combinadas por especies de Candida.	70



## INTRODUCCIÓN

### 1. Generalidades de *Candida albicans*

El género *Candida* está conformado por un grupo de levaduras que pertenecen al reino *Fungi* (Ver cuadro 1), dicho género incluye un variado número de especies (aproximadamente 200 especies) muchas especies se han aislado de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos y algunas de ellas forman parte de la biota normal de la piel y membranas mucosas (boca, vagina, vías respiratorias altas, tracto gastrointestinal) de mamíferos, pero solo 58 son oportunistas en animales y hombre, y aproximadamente entre 6 y 8 especies son las que presentan más infecciones en humanos, sobresaliendo *C.albicans*, la que dependiendo de la topografía clínica de donde se aisle, se puede encontrar entre un 40 hasta 85% en infecciones por este género. Por lo regular el género *Candida* tiene características definidas, son levaduras o blastosporas de 2-6 x 3-9  $\mu\text{m}$ , con ausencia de pigmentos (melánicos y carotenoides), forma celular variable, es decir las células pueden ser elípticas, globosas, cilíndricas y triangulares; tiene pared celular de dos capas; su reproducción es de tipo asexual por medio de un proceso denominado gemación. En tejidos infectados pueden formar pseudohifas e hifas (con excepción de *Candida glabrata*) que son células alargadas que permanecen unidas entre sí, estas son estructuras tubulares divididas en septos y pueden surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes (Aguilera, 2009; Bonifaz, 2010; Castañón, 2012)



**Cuadro 1. Taxonomía del Genero *Candida*.**

Reino	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Ascomicotina</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetes</i>
Género	<i>Candida</i>
Especies	Los estados anamorficos se les denomina <i>Candida</i> y los ejemplos más importantes son: <i>C. albicans</i> , <i>C.glabrata</i> , <i>C.tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> <i>C. krusei</i> y <i>C. dubliniensis</i>

(Arenas, 2011; Bonifaz, 2010)

*Candida sp* son organismos comensales en diversos órganos de individuos sanos, el oportunismo causado por especies de *Candida* puede llevar a la infección sistémica cuando el hospedador tiene varios factores de riesgo, como el uso de antibióticos de amplio espectro, esteroides u otros agentes inmunosupresores, diabetes mellitus, SIDA, depresión de las funciones fagocíticas o alteraciones locales del sistema gastrointestinal. Estas situaciones pueden ocasionar candidiasis gastrointestinal o diseminación hematógena. *Candida* es un microorganismo muy versátil, por su capacidad para sobrevivir como comensal en varios sitios anatómicamente distintos (intestino, cavidad oral y vagina), y por ello puede causar un amplio espectro de enfermedades cuando se le presenta la oportunidad, debido a esto es el microorganismo comensal con mayor incidencia. (Aguilera, 2009; Arenas, 2011; Bonifaz, 2010; Castrillón Rivera, 2005; Pemán, 2007; Pemán, 2008)

La limitación por nutrientes y la competencia entre bacterias y hongos (microbiota) en las superficies mucosas proporcionan una presión selectiva que ocasiona la eliminación de los microorganismos menos adaptados. *C.albicans* tiene varios atributos de virulencia para colonizar al hospedador y ocasiona daño de forma directa, al activar, resistir o desviar los mecanismos de defensa del

mismo. Los factores de virulencia expresados o requeridos por el microorganismo para causar infección pueden variar según el tipo, el sitio y la naturaleza de las defensas del hospedador (Arenas, 2011; Bonifaz, 2010; Pemán, 2007; Pemán, 2008)

El delicado equilibrio entre el hospedador y el hongo patógeno puede convertirse en una relación parásita y resultar en enfermedad grave (Bonifaz, 2010; Castrillón Rivera et al, 2005), los hongos no son participantes pasivos en el proceso infeccioso, la interacción entre el hongo y el medio ambiente está afectada por su variabilidad antigénica, el cambio fenotípico y la transición dimórfica. Existen diversos factores potenciales de virulencia, como la morfología celular, la actividad enzimática extracelular, el cambio fenotípico y los factores de adhesión, que favorecen la formación de biopelículas (Castrillón Rivera et al, 2005; Castrillón Rivera et al, 2010; Pemán et al, 2007).

## 1.1 CANDIDIASIS

Es una micosis cosmopolita causada por diversas especies de *Candida*, la especie con mayor incidencia en casos clínicos es *C. albicans* aunque en las últimas décadas se tiene una mayor incidencia en los aislamientos de otras especies (ver cuadro 2) (Aguilera, 2009). Esta infección puede presentar una gran variedad de cuadros clínicos, muchas veces relacionado con el estado inmunológico del paciente afectando principalmente mucosas (boca, vagina etc.), uñas, piel y de manera excepcional puede afectar otros órganos como pulmones e intestinos con tendencia a una evolución aguda o crónica y generalmente severas (ver cuadros 3,4). (Aguilera, 2009; Bonifaz, 2010)



**Cuadro 2. Frecuencia de infección por especies patógenas de *Candida*.**

Espece	Frecuencia
<u><i>C. albicans</i></u>	< 50%
<u><i>C. tropicalis</i></u>	15-30%
<u><i>C. parapsilosis</i></u>	15-30%
<u><i>C. glabrata</i></u>	15-30%
<u><i>C. krusei</i></u>	>1%
<u><i>C. guilliermondii</i></u>	>1%
<u><i>C. dubliniensis</i></u>	>1%

(Castañón, 2012)

Los casos registrados de candidosis muestran que el sexo es indistinto, a excepción de la candidosis urogenital que tiene mayor incidencia en el sexo femenino. La edad y raza de las personas son factores que, según la clínica, no influyen en la presentación de la micosis, la cual realmente dependerá del factor de inmunocompromiso asociado; sin embargo, por lo que respecta a la ocupación aunque no es un factor de importancia, se considera que algunas actividades de las personas pueden favorecer la infección. En el Cuadro 3 se muestra algunos de los factores predisponentes relacionados con el tipo de candidosis adquirida. (Castañón, 2012)



**Cuadro 3. Infecciones de Candida y sus factores predisponentes asociados.**

Tipo de Candidosis	Factor predisponente
Orofaringea	Edad avanzada, uso de prótesis dentales, diabetes mellitus, radioterapia, corticoesteroides inhalados y sistémicos, quimioterapia citotóxica, infección por VIH, enfermedades hematológicas, trasplante de órganos.
Esofágica	Corticoesteroides sistémicos, SIDA, cáncer, trasplantes de órganos.
Vulvovaginal	Anticonceptivos orales, embarazo, diabetes mellitus, corticoesteroides sistémicos, uso prolongado de antibióticos.
Cutánea/onicomicosis	Humedad local, diabetes mellitus, enfermedad vascular periférica.
Tracto urinario	Catéter urinario infectado, obstrucción urinaria, operación en tracto urinario, diabetes mellitus.
Neumonía	Aspiración, inmunosupresión, trasplantes.
Endocarditis	Cirugía mayor, enfermedad cardíaca valvular, abuso de drogas intravenosas, catéter venoso central.
Sistema nervioso central	Cirugía en sistema nervioso, cirugía ocular.
Ocular	Traumatismo, cirugía, esteroides tópicos.
Hematógena	Trasplante de órganos, uso prolongado de antibióticos, cirugía abdominal, nutrición peritoneal, hemodiálisis, inmunosupresión.

(Bonifaz, 2010)

Las candidiasis se clasifican generalmente en superficiales y profundas. Pero debido a la gran diversidad de patologías generadas por este género también se tiene clasificado de acuerdo al origen de la infección, teniendo de manera general 3 tipos: candidiasis cutánea, mucocutánea y sistémica. (ver Cuadro 4) Dentro de las infecciones mucocutáneas la más común es la candidiasis genital afectando principalmente a las mujeres representando aproximadamente el 20% de los casos de vaginitis. Las candidiasis sistémicas o desminadas producen lesiones agudas o crónicas que pueden afectar uno o más órganos. La mortalidad en este tipo de infecciones suele superar el 50% de los casos, aunque generalmente este grado de candidiasis aparece como una complicación a una enfermedad precedente. (Aguilera, 2009)

**Cuadro 4. Clasificación de los tipos de Candidiasis.**

CANDIDIASIS	TIPO CLINICO	CARACTERISTICAS	CUADRO CLINICO
<b>MOCOCUTÁNEA</b>	Oral	Es frecuente en niños recién nacidos, se obtiene por un fuerte inoculo en el parto, generalmente la madre cursaba con candidiasis vaginal, en adultos se presenta generalmente en personas inmunocomprometidas, diabéticos o con tratamiento prolongado de antibióticos.	Placas blancas e cavidad bucal y lengua presentando dolor y ardor.
	Genital A) Vaginitis B) Balanitis	A) Es la infección más frecuente en el aparato genital femenino, se presenta generalmente en edad reproductiva B) Generalmente se adquieren por relación sexual con pareja en curso de vaginitis por <i>Candida</i> .	A) Se presenta un exudado blanquecino (leucorrea) espeso, las mucosas se encuentran eritematosas y con presencia de prurito y ardor vulvar B) La balanitis es superficial presentando eritema, micropustulas y erosiones en el glande y surco prepucial.
	Gastrointestinal A) Esofagitis B) Peritonitis	A) Es secundaria a una candidiasis oral, común en pacientes leucémicos y diabéticos. B) Se presenta en pacientes inmunocomprometidos en una abundante colonización de la flora en intestino	A) Se observan placas blancas similares a la oral, presentando fatiga, nauseas y vomito. B) Diarreas con evacuaciones mucoso-blanquecinas, hay dolor abdominal y meteorismo.
	Respiratoria A)Pulmonar	A) se presenta en pacientes inmunocomprometidos o con fibrosis quística, regularmente es una entidad crónica.	A) Tos con expectoración mucoide y a veces sanguinolenta, dolor torácico, disnea y esputo blanquecino, puede afectar uno o ambos pulmones, con posible derrame pleural.
<b>CUTÁNEA</b>	Intertrigos	Es menos frecuente que los mococutaneos, este se presenta en axilas, ángulo interno del muslo y en los pliegues de la piel.	En estos casos aparecen placas eritematoescamosas con borde eritematoso, los pacientes refieren prurito intenso
	Onicomicosis A)con Perionixis B) con Onicolisis	A) es la forma más común (70%) y a diferencia de las tiñas se presenta en el borde proximal y con inflamación, es más frecuente en uñas de manos. B) es la segunda variedad y menos frecuente (30%) el cual se caracteriza por el desprendimiento de la uña	A) Se observa una periferia eritematosa, la uña se puede tornar oscura y se deforma, los pacientes refieren poco prurito y dolor al tacto. B) la uña se observa opaca y estriada antes de perderla.
	Granuloma	Es muy rara y se observa en niños con severos problemas en la inmunidad celular y en adultos con diabetes mellitus descompensada	Las lesiones se presentan en cualquier lugar de la piel observándose lesiones verrucosas que ulceran.
<b>SISTÉMICA</b>	Meningitis	Es una micosis rara y secundaria a la diseminación a partir de los sitios de infección, con incidencia en pacientes leucémicos, diabéticos o con tratamiento de corticosteroide	Es similar a la meningitis bacteriana con intensa cefalea, rigidez en la nuca, fiebre intermitente y se puede llegar a estado de coma.
	Septicemia	Se presenta en pacientes severamente inmunocomprometidos	Su sintomatología es variable con fiebre y escalofríos, se confunde con septicemias bacterianas.

(Bonifaz, 2010) (Koneman, et al, 2008) (López, 2004)

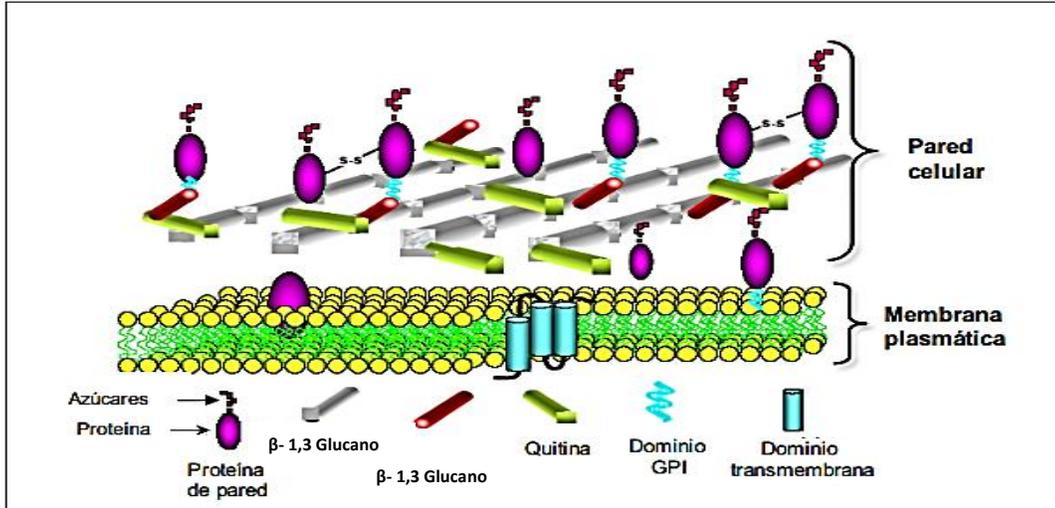
**Cuadro 5. Tropismo de las principales especies de *Candida***

Especie	Cuadro clinico
<b><u><i>C. albicans</i></u></b>	Vaginitis, oral , broncopulmonar, SNC, intestinal y osteoarticular
<b><u><i>C. glabrata</i></u></b>	Politropismo
<b><u><i>C. dubliniensis</i></u></b>	Orofaringea
<b><u><i>C. guilliermondi</i></u></b>	Vaginitis, endocarditis y osteoarticular
<b><u><i>C. krusei</i></u></b>	Mucosas, sistémicas, endocarditis
<b><u><i>C. parapsilosis</i></u></b>	Onocomicosis, endocarditis, otitis
<b><u><i>C. tropicalis</i></u></b>	Vaginitis, broncopulmonar, SNC, intestinal y osteoarticular

(Bonifaz, 2010)

## 1.2 COMPOSICION DE LA PARED CELULAR DE *CANDIDA*

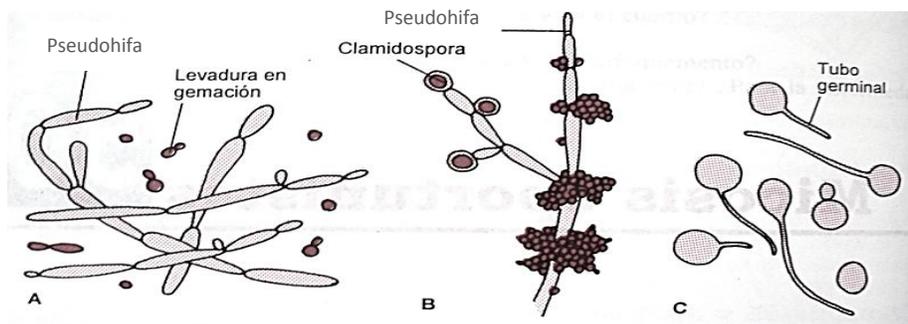
Aproximadamente del 80-90% de la pared celular de *C. albicans* son carbohidratos mientras que aproximadamente del 1 a 7% son lípidos. Entre los carbohidratos destacan tres polisacáridos ( $\beta$ -glucanos, N-acetil-D-glucosamina y polímeros de manosa). Los  $\beta$ -glucanos son polímeros de glucosa ramificados con enlaces 1,3-  $\beta$  y 1,6- $\beta$ . El componente N-acetil-D- glucosamina no forma polímeros ramificados como los glucanos ya que estos presentan enlaces 1,4- $\beta$  glucano-quitina y por último los polímeros de manosa son denominados también mananos los cuales se encuentran asociados a proteínas de membrana y representan aproximadamente del 40% total de polisacáridos en la pared celular y es también el principal componente inmunógeno que es reconocido por el sistema inmune del hospedero. Los polímeros glucano-quitina son el constituyente principal de un 47-60% de la pared celular y estos representan un esqueleto rígido que le proporciona fuertes propiedades físicas a la célula (Ver imagen 1). (Bonifaz, 2010)



**Imagen 1: Modelo propuesto para la estructura de la pared celular de *C. albicans* (Aguilera, 2009)**

### 1.3 MORFOGÉNESIS

La morfogénesis se refiere a la transición entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa del microorganismo, que puede convertirse de forma reversible a células de levaduriformes. *C. albicans* es polimórfica es decir que puede presentar dos morfologías distintas, ya que existe en forma de levadura (blastosporas) o como filamentos (pseudohifa o hifa) (ver imagen 2).



**Imagen 2. Estructura de *Candida albicans*:** A) Pseudohifas y levaduras en gemación, comúnmente en tejidos o exudados. B) Pseudohifas y clamidiosporas en cultivo a 20°C. C) tubos germinales en suero a 37°C (Levinson, 2000).

La pared celular es la estructura responsable del cambio a una morfología determinada, estos cambios morfológicos están determinados por las condiciones del ambiente en el que se encuentre el hongo. La conversión de la forma unicelular de levadura al crecimiento filamentosos es esencial para la virulencia de *C.albicans*, es decir la capacidad de invadir tejidos. Se ha comprobado que el crecimiento de forma filamentosos tiene ventajas sobre la levadura en la penetración de la célula o tejido, y aunque la hifa puede ser idónea para abrir la brecha entre las barreras tisulares, gracias a que su punta es el sitio de secreción de enzimas capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, además de facilitar su infiltración en sustratos sólidos y tejidos (Castrillón, 2005). La morfogénesis de levadura a hifa se revierte conforme avanza la infección y quizá sea el resultado de cambios temporales en señales que el hongo recibe de su medio ambiente, por lo que es legítimo asumir que todas las formas del hongo son necesarias para mantener la infección por *Candida albicans* (Castrillón, 2005).

Particularmente la morfogénesis de *C. albicans* es muy compleja, reflejando dos aspectos importantes. El primero es que este hongo es capaz de prosperar en microambientes muy divergente, el hongo es capaz de integrar numerosos tipos de señales ambientales para evaluar las mejores condiciones que sean favorables para el crecimiento de una morfología celular en particular. Entre las señales más importantes para el cambio morfológico se encuentran parámetros químicos (pH ambiental), la disposición nutrientes (esencialmente carbono, nitrógeno y oxígeno), parámetros físicos (temperatura de 37°) así como algunas hormonas humanas (Calderone, 2002).

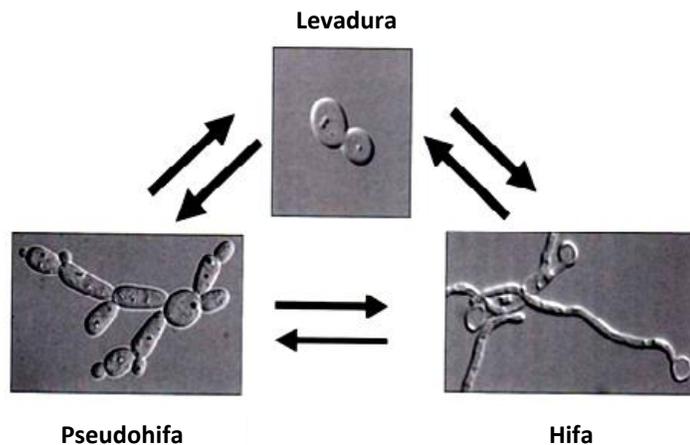


## 1.4 FACTORES DE VIRULENCIA

La capacidad patógena de *Candida* depende principalmente del estado inmunológico del hospedador, sin embargo algunas características del hongo son responsables de su comportamiento como patógeno potencial. Existen múltiples factores de virulencia que se expresan diferencialmente durante los estadios de colonización e invasión, entre los más característicos son la síntesis de receptores y moléculas implicadas en la adhesión, la secreción de enzimas, variabilidad antigénica, cambios fenotípicos y el dimorfismo (Aguilera, 2009).

### 1.4.1 GENÉTICA MOLECULAR Y DIMORFISMO

La capacidad de *C.albicans* de presentar dimorfismo (ver imagen 3) es un switch fenotípico en el que la levadura es capaz de realizar cambios con diferencias morfológicas presentándose como blastoconidia, pseudohifa a hifa en los que se implica también un aumento o disminución en la producción de enzimas y toxinas.



**Imagen 3 Polimorfismo de *Candida albicans*.**

Este proceso tiene excepción en *C.glabrata* que no sufre cambios morfológicos por lo que se considera levadura monomórfica. Estos cambios son estimulados por las condiciones ambientales: temperatura, pH así como factores nutricionales. La expresión diferencial de genes repercute en las cantidades, proporción de componentes de pared, posición y/o tipo de unión establecida entre ellas, resultando en una morfología alternativa, donde la hifa es la forma de adaptación para la adherencia y penetración de los epitelios y células endoteliales.

Para poder realizar este cambio morfológico se requiere la expresión de señales de transcripción. Entre los factores de transcripción implicados en el cambio a una morfología hifal se encuentra el gen EFG1 en *C.albicans* que codifica para un regulador transcripcional el cual esta modulado por una cascada activada por AMPc, que tiene homologación con las proteínas PHD1 y StuA, que son las proteínas que controlan la morfogénesis. Los estudios bioquímicos que establecen las rutas de transducción de señales, que activan la filamentación de *Candida albicans*, concluyen que existen dos rutas principales, una es la cascada de cinasas MAPK que activan al factor Cph1y la segunda está representada por el factor transcripcional EFG1p. Las mutantes que les faltan a ambas rutas no son filamentosas y son avirulentas. (Bonifaz, 2009; Calderone, 2002; Castrillón, 2005; Castrillón, 2010; Ramage, 2005)

Diversas especies de *Candida* tienen una gran adaptación a distintos medios y sustratos; así, la capacidad de soportar cambios del pH se encuentra regido por dos genes (PHR1 y PHR2), estos son activados diferencialmente a diferentes rangos de pH, el primero se activa en  $\text{pH} < 5.5$  o ligeramente básico (cuando se ubica en sangre o piel alcalinizada) y se inactiva en medios ácidos, por el contrario el gen PHR2 en medios ácidos con  $\text{pH} > 4.5$  se favorece la activación del segundo gen. Por otro lado existen factores de transcripción que regulan de manera negativa la formación de hifas, manteniendo la blastospora, entre estos, el más importante es el factor Tup1. (Bonifaz, 2009; Calderone, 2002)

## 1.4.2 ENZIMAS

Las enzimas pueden proponerse como determinantes de virulencia en *Candida*, ya que tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos, así como le permiten introducirse a la célula hospedera e inactivar las moléculas útiles en la defensa del organismo. Las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Candida* son las proteasas, fosfolipasas y lipasas. (Calderone, 2002; Castrillón, 2005)

### 1.4.2.1 PROTEASAS

La actividad proteolítica extracelular juega un papel importante en la patogenicidad de *C. albicans* y se han descrito 10 miembros de una familia de enzimas de secreción aspártico proteinasas (SAP), que han sido bastante estudiadas en estos hongos. En particular, las aspartil proteinasas secretadas (Saps) son codificadas por los genes de la familia SAP, la presencia de los genes de la familia SAP en *C. albicans* proporciona al hongo un sistema proteolítico eficiente y flexible que puede garantizar su éxito como patógeno oportunista. Las aspartil proteinasas secretadas desempeñan un papel importante en la patogénesis de *C. albicans*, ya que se ha demostrado *in vitro* que estas enzimas en general son capaces de hidrolizar proteínas estructurales de la célula hospedera y proteínas del sistema inmune favoreciendo la colonización, persistencia e invasión del hongo. Además de correlacionar la producción de SAP y la virulencia del hongo, ya que se han obtenido mutantes con varios genes SAP alterados y se ha demostrado que SAP1, SAP2, SAP3 y SAP6 son importantes en la infección oral, mientras que solamente SAP1 y SAP2 son importantes en la candidiasis vaginal. En contraste SAP 4, SAP 5 y SAP 6 son esenciales para la invasión en órganos y la manifestación sistémica, ya que cepas carentes de dichos genes para estas SAP's presentaban una capacidad reducida para causar daño al tejido hepático o cualquier otro órgano del parénquima, sobre todo en las cepas mutantes deficientes de SAP-6. También se ha demostrado que los genes que codifican

para las SAP 4, SAP 5 y SAP 6 son expresados significativamente durante el desarrollo de la forma filamentosa (ver cuadro 4 ). Las proteínas que comprenden la familia SAP no se limitan sólo a la especie *C. albicans*, ya que se ha demostrado su presencia en otras como: *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. La presencia de los genes de la familia SAP es única en las especies patógenas de Candida y están ausentes en la levaduras no patógenas como por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, lo cual apoya que estas proteínas están implicadas en su virulencia. (Calderone, 2002; Castrillón , 2005)

**Cuadro 6. Expresión de los genes de la familia SAP**

<b>Proteasa</b>	<b>Expresión</b>
SAP 2	El gen más expresado y es regulado positivamente por proteólisis de péptidos.
SAP1,SAP2	Expresados diferencialmente durante cambios fenotípicos en distintas cepas.
SAP4, SAP6	Expresados exclusivamente durante la formación de hifas, a pH neutro.
SAP9, SAP10	Expresión constitutiva tanto en levaduras como micelios.

(Aguilera, 2009)

Las proteínas SAP tienen funciones especializadas durante el proceso infeccioso e incluyen la digestión de moléculas proteínicas para adquirir nutrientes, digerir o distorsionar las membranas del huésped y facilitar la adhesión, la invasión a tejidos y la digestión de moléculas del sistema inmunitario del hospedador para evitar o resistir el ataque antimicrobiano de éste. (Castrillón, 2010) (Pemán, 2007)

Las proteínas Sap tienen diversas funciones durante el proceso infeccioso, que no incluyen solamente el simple papel de digestión de moléculas para la adquisición de nutrientes sino que también contribuyen a la distorsión de membranas celulares del hospedador para facilitar la adhesión y la invasión de tejidos, y la digestión de células y moléculas del sistema inmunitario del hospedador para evitar o resistir la respuesta inmune. (Aguilera, 2009; Castrillón , 2005; Pemán, 2007)



### 1.4.2.2 FOSFOLIPASAS

La producción de fosfolipasas, está relacionada con la capacidad patógena de *C.albicans*, ya que se observa una correlación entre el carácter virulento y la actividad fosfolipásica.

- 1) La actividad extracelular fosfolipasa fue siempre mayor en cepas aisladas de infecciones clínicas respecto a cepas comensales.
- 2) Un aislado productor de gran actividad fosfolipasa extracelular mostró invasividad en ratones mientras que uno de baja producción no.
- 3) Los niveles de actividad fosfolipasa resultaron predictivos de mortalidad en estudios con animales. (Aguilera, 2009)

Se han identificado cuatro fosfolipasas (PLA, PLB, PLC y PLD1), de las cuales sólo la PLB1 ha demostrado ser necesaria para la virulencia en modelo animal de candidiasis. La PLB1A es una glucoproteína de 84 kDa, el gen PLB1 se encuentra localizado en el cromosoma 6 y presenta una similitud en la secuencia de aminoácidos de 45% comparada con las fosfolipasas de *Saccharomyces cerevisiae*. La enzima PLB1A presenta actividad de hidrolasa y lisofosfolipasatransacilasa. La transcripción del gen PLB1A es detectado en ambas formas celulares (blastospora e hifa) pero se secreta y detecta principalmente en la punta de las hifas durante la invasión a los tejidos, esto se ve reforzado por medio de la experimentación con una cepa mutante de *C.albicans* con la eliminación de este gen, observando una reducción de su nivel de virulencia hasta en un 60% comparada con las células silvestres. (Aguilera, 2009; Calderone, 2002; Castrillón, 2005)



### 1.4.2.3 LIPASAS

Las lipasas secretadas por *C.albicans* se codifican por una familia de genes con, al menos, 10 miembros (LIP1-LIP10). El patrón de expresión se ha investigado en infecciones experimentales y en pacientes que sufren candidiasis oral. Se ha demostrado que la expresión de esos genes depende del estado de infección, más que de la localización del órgano. (Calderone, 2002; Castrillón, 2005)

### 1.4.3 ADHESINAS

Una adhesina se define como una biomolécula que promueve la adherencia de *C. albicans* a las células del hospedador o a sus ligandos específicos. Un atributo de *C.albicans* es que correlaciona de forma positiva a su patogenicidad con la capacidad adherente a las células del huésped. Las cepas adherentes de *C. albicans* son más patógenas que las que tienen fenotipo menos adherente. Se han descrito proteínas de *C.albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV. Existen diferentes tipos de adhesinas en *Candida*, como Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1p (ver cuadro 4). (Castrillón , 2005)

*C. albicans* tiene, además, una superficie celular hidrofóbica que parece jugar un papel importante en la adhesión a materiales como el poliestireno de prótesis y catéteres, la unión es de tipo electrostático y se ha propuesto que también puede participar en la unión del hongo a células epiteliales, favoreciendo la interacción del mismo con proteínas de la matriz extracelular. (Blanco, 2010; Calderone, 2002)

**Cuadro 7. Adhesinas de *C.albicans* e interacción con ligandos de células de mamíferos**

Adhesina	Ligando	Célula
<b>MP-66</b>	Glicoesfingolípidos	Células epiteliales bucales y vaginales
<b>MP-lectina</b>	Fucosil glicoproteína o lipido	Células epiteliales bucales y vaginales
<b>MP-heme</b>	Fibronectina	ND
<b>Int1p</b>	Matriz extracelular	Células epiteliales y endoteliales
<b>Hwp1p</b>	Sustrato de las transglutaminasas	Células epiteliales bucales y vaginales
<b>Ala1p</b>	Fibronectina	Célula endotelial
<b>Mnt1p</b>	ND	Células epiteliales bucales y vaginales
<b>Als1p</b>	Fibronectina, laminina y colágeno tipo IV	Células epiteliales y endoteliales

Nota: ND: no descrito, MP: mananoproteína (Calderone, 2002)

#### 1.4.3.1 Als

Los genes de la familia Als (Aglutinin-Like Sequence) de *C.albicans* codifican glicoproteínas de la superficie celular (Als1p, Als3p, Als5p, Als6p, Als7p, Als2p, Als4p y Als9p) que están relacionadas con el proceso de adhesión a las células del hospedador. Las proteínas Als tienen un dominio central con un motivo repetido en tándem, rico en serina, treonina y prolina que presentan afinidad por fibronectina, laminina y colágeno tipo IV (componentes celulares de mamíferos). Se ha encontrado que los genes Als3 y Als8 únicamente son expresados durante el crecimiento micelial. Los genes Als también se encuentran en otras especies de *Candida* que han sido aisladas de muestras clínicas. Desde su caracterización inicial se notó que el producto traducido del gen Als1 comparte una secuencia con la glucoproteína de adhesión a superficies celulares llamada a-aglutinina, codificada por *Saccharomyces cerevisiae* (AGb1). Esta molécula se requiere para el reconocimiento célula-célula (Aguilera, 2009; Calderone, 2002; Castrillón, 2005).



### 1.4.3.2 Hwp1p

El gen Hwp1 codifica una mananoproteína de la superficie externa de la célula hifal. El carboxilo terminal se integra de manera covalente con el  $\beta$ -glucano de la pared celular. La proteína codificada por este gen (Hwp1) contiene un grupo amino terminal que sirve como sustrato de las transglutaminasas mamíferas, encontrando una enzima en tejido epitelial humano que reconoce dicha proteína provocando la unión de la hifa de *C. albicans* a las células epiteliales. Esta enzima humana es capaz de unirse con pequeñas proteínas ricas en prolina como la proteína N-terminal de *C. albicans*. Estudios realizados en células mutantes con una delección en este gen Hwp1 son menos adherentes en epitelio bucal, además de presentar menor virulencia en modelos murinos (Calderone, 2002; Castrillón, 2005).

### 1.4.3.3 Int1p

La proteína Int1p (Integrin Like protein) es una proteína transmembranal de *Candida albicans*, se ha demostrado su importancia en la adhesión y morfogénesis de este hongo ya que se une a varios ligandos de las proteínas de la matriz extracelular (MEC), que incluyen fibronectina, laminina y colágenas tipo I y IV. Las cepas que tienen delección en los genes Int1 son menos virulentas o se adhieren con más lentitud a las líneas celulares epiteliales. Por lo tanto, el gen Int1 juega un papel importante en la adherencia y filamentación de *C. albicans* (Calderone, 2002; Castrillón, 2005).



#### 1.4.3.4 Mnt1p

Las cepas de *C. albicans* que tienen delección en el gen  $\alpha$ -1,2 manosil transferasa (Mnt1) son menos capaces de adherirse *in vitro* y son avirulentas. La proteína que codifica a este gen o Mnt1p es una proteína de membrana tipo II que se requiere para la manosilación tanto O- y N- en el hongo. Su importancia radica en que la manana es el principal constituyente de la pared celular (Calderone, 2002; Castrillón, 2005).

### 1.5 BIOPELÍCULA

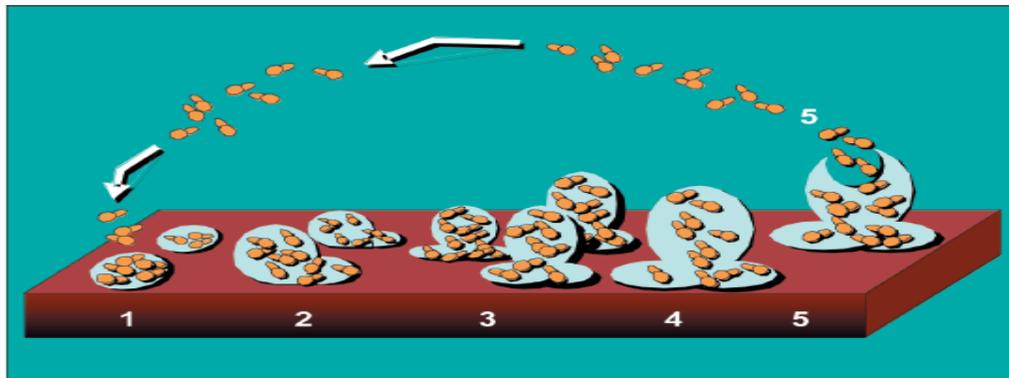
Las especies de *Candida* se reconocen como los principales agentes de infecciones adquiridas en el hospital. Son el tercer o cuarto patógeno aislado de sangre que sobrepasa la frecuencia de los bacilos Gram negativos. Su aparición como patógeno nosocomial es importante, ya que es un factor de riesgo asociado con los procedimientos médicos modernos, sobre todo con el uso de fármacos inmunosupresores o citotóxicos, de antibióticos potentes que suprimen la microbiota bacteriana normal y de los dispositivos implantados de varias clases (Castrillón, 2005; Castrillón, 2010).

La percepción de los microorganismos como formas unicelulares de vida se basa en el modo de crecimiento como cultivo puro; sin embargo, la mayor parte de los microorganismos en la naturaleza persisten unidos a las superficies dentro de un ecosistema estructurado, como biopelículas y no como organismos libres en flotación (planctónico). Las biopelículas son comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización entre los microorganismos, son ubicuas en la naturaleza y responsables de muchas enfermedades. Son consideradas comunidades de microorganismos que crecen embebidas en una matriz de exopolisacárido autoproducido y están adheridas a una superficie inerte o a un tejido vivo (Castrillón, 2010).

Se tienen registros fósiles de la formación de biopelículas desde hace aproximadamente 3200 millones de años, por lo que se considera que esta organización celular representa el modo de crecimiento que permite a las células sobrevivir en ambientes hostiles, dispersarse para formar nuevos nichos y les otorga ventajas significativas de protección frente a fluctuaciones del ambiente como la humedad, temperatura y pH, así como la concentración de nutrientes y la eliminación de desechos (Pemán,2008; Ramage, 2001; Ramage, 2005).

### 1.5.1 FASES DE DESARROLLO DE BIOPELÍCULAS

El desarrollo y la formación de las biopelículas ocurre como un proceso continuo de acuerdo con varias fases de desarrollo que son: a) adhesión, b) acondicionamiento, c) síntesis de matriz extracelular, d) maduración y e) dispersión (ver imagen 4), lo que lleva a la formación de una estructura uniforme en forma de depósitos homogéneos y acumulaciones viscosas celulares rodeados de una matriz de polímeros con canales abiertos para el movimiento de agua (Ramage, 2001; Ramage, 2005).



**Imagen 4. Etapas de desarrollo de una biopelícula:** adhesión (1), acondicionamiento (2), maduración (3), disgregación (4) y dispersión (5). (Pemán, 2008)

Durante la fase de acondicionamiento, los componentes orgánicos del medio ambiente o de los tejidos forman una cubierta que neutraliza la carga excesiva de la superficie (que previene la aproximación entre células bacterianas o de hongos)

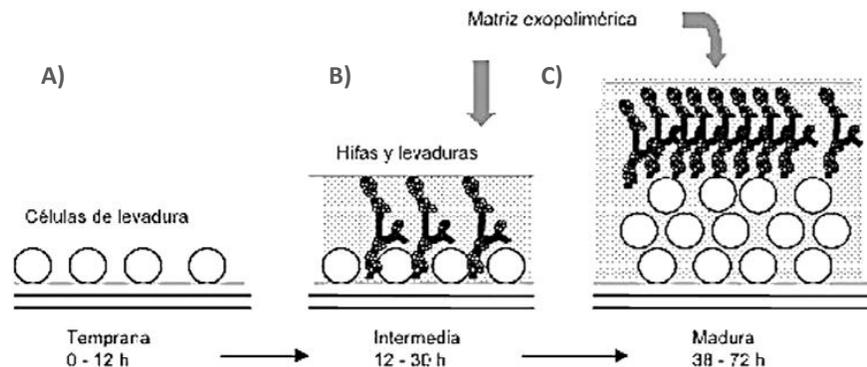
y así se inicia la adhesión, estos compuestos orgánicos pueden servir como nutrientes a estos microorganismos (Castrillón, 2010). Los microorganismos libres (o planctónicos) forman una capa que se adsorbe a la superficie por periodos cortos mediante fuerzas de atracción electrostáticas y se libera de ésta por adsorción reversible. Los microorganismos en suspensión se agregan y ocurre la adhesión de células iguales o diferentes (co-agregación) a la superficie condicionada, este proceso es favorecido por varios componentes bacterianos como los pilis y flagelos, y polímeros superficiales como el lipopolisacárido en bacterias gram negativas y el ácido micólico en las gram positivas, mientras que para *Candida* se favorece la adhesión por medio de los polímeros de manosa que participan en este proceso venciendo las fuerzas de repulsión. La expresión de estas estructuras microbianas puede cambiar dependiendo del ambiente en que se encuentren y, por tanto, modificar la fase de formación de la biopelícula (Castrillón, 2010; Ramage, 2001; Ramage, 2005).

Las propiedades físico-químicas de la superficie pueden ejercer gran influencia en el grado y extensión de la adhesión, los gérmenes se adhieren más rápidamente a superficies hidrófobas, no polarizadas como el teflón y plásticos, en comparación con metales hidrofílicos como el vidrio o el metal. Una vez que se logra la adhesión, dentro de las primeras 6 horas las células presentan gran actividad metabólica, generando su división y la colonización de la superficie y cuando la concentración local de señales químicas producidas por el metabolismo microbiano alcanza un nivel umbral, sugiere que la población microbiana ha alcanzado una densidad mínima, esto condiciona el inicio de cambios fenotípicos en la comunidad acompañado de una mayor presencia de hifas. (Ramage, 2005)

Durante el proceso de colonización de la superficie ocurre un proceso denominado *quorum sensing* o autoinducción el cual es un mecanismo de regulación de la expresión genética colectiva en respuesta a la densidad de población celular debido a la proximidad de otras células y a la recepción de

señales químicas (metabolitos secundarios). Este hecho trae como consecuencia la autoinducción en la síntesis de la matriz extracelular (MEC) o exopolisacárido y se logra así la maduración de la biopelícula con la consecuente formación tridimensional, lo que genera canales acuosos que sirven como microcirculación a la colonia, permitiendo la distribución de agua, nutrientes y productos de desecho, generando que los microorganismos se comporten como grupo. (Castrillón, 2010; Ramage, 2005; Quindós, 2009)

Finalmente, después de la maduración de la biopelícula, ocurre la dispersión por células aisladas o en conglomerados que colonizan nuevas superficies y se inicia un nuevo ciclo de formación de biopelículas. Existen diferencias en las características de las células que se desprenden, ya que las células sésiles (adheridas) pueden conservar la funcionalidad de la biopelícula como lo es la resistencia a antibióticos, en cambio, las células aisladas pueden tener el fenotipo planctónico (libre) y ser susceptible a los mecanismos de defensa del hospedero. (Ramage, 2001; Ramage, 2005).



**Imagen 5. Fases de formación de biopelículas de *Candida sp.*** A) contacto con la superficie o la capa de las células basales. B) formación de la biopelícula: adhesión temprana, crecimiento, proliferación. C) maduración de la biopelícula. (Castrillón, 2005)



## 1.5.2 HETEROGENEIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS

La estructura y heterogeneidad de las biopelículas parece tener propiedades muy similares en casi todos los microorganismos capaces de formar dicha película. El estudio de estas biopelículas ha demostrado que se componen de 97% de agua, el resto son células microbianas y productos derivados de éstas. La matriz extracelular está formada por hidratos de carbono, proteínas, hexosamina, fósforo y ácidos nucleicos, está altamente hidratada y confiere a la biopelícula un aspecto gelatinoso, siendo la matriz extracelular el soporte principal de la biopelícula y su producción aumenta con el tiempo de maduración. (Quindós, 2009)

El contenido de proteínas totales (PT) y carbohidratos totales (CT) en la MEC varía según su estado de desarrollo en el que se encuentre, el contenido de CT es significativamente menor en la MEC de las fases tempranas, al compararlo con el contenido de CT de la biopelícula en estados maduros (96.4mg/g contra 153mg/g, respectivamente). Su composición varía también según la especie: así, en las biopelículas de *C. albicans* está presente de forma mayoritaria la glucosa (32%), mientras que en las de *C. tropicalis* abunda la hexosamina (27%). Con respecto a la síntesis de aminoácidos y proteínas se ha identificado grupos de genes que codifican para la biosíntesis de aminoácidos, además se ha demostrado que un regulador del metabolismo de aminoácidos (Gen4p) se requiere para el crecimiento y formación normal de la biopelícula. (Pranab, 2004)

Se ha reportado que las biopelículas son estructuras heterogéneas con tres patrones químicos, que corresponden a diferencias en gradientes de concentraciones desde el exterior al interior de la biopelícula. El patrón de sustrato metabólico determina mayor concentración en el exterior y menor en el interior, el

patrón de producto metabólico es inverso al anterior y el patrón de intermediarios metabólicos muestra mayor concentración entre la parte limítrofe de la biopelícula que en la fase acuosa. Estos patrones traen como consecuencia que dentro de estas estructuras se establezcan diferencias de gradientes de pH y oxigenación, lo que permite que se instalen poblaciones microbianas aerobias, anaerobias o facultativas dentro de los diferentes estratos de la biopelícula, así como poblaciones microbianas que pueden considerarse para entender las diferencias de susceptibilidad al tratamiento con antibióticos, ya que es diferente la respuesta a las formas libres (planctónicas) que a las adheridas (sésiles) (Castrillón, 2010; Ramage, 2001). En consecuencia, las principales características de las biopelículas son: adherencia, heterogeneidad, resistencia a diferentes microambientes (pH, oxígeno, concentración de iones, carbono, nitrógeno, etcétera), sistema circulatorio primitivo (canales de agua), resistencia a la defensa del hospedero así como a agentes antimicrobianos o biocidas y autoinducción (*quórum sensing*). (Ramage, 2001)

La formación de biopelículas se manifiesta en tres fases: temprana (0 a 11 horas), intermedia (12 a 30 horas) y madura (38 a 72 horas). Después de 48 horas de incubación la estructura detallada de las biopelículas formadas por *Candida*, consiste en una convivencia de diferentes formas celulares (levaduras, hifas y pseudohifas) con un sistema de comunicación intracelular (*quorum sensing*) que modula su desarrollo y permite el crecimiento y la dispersión celular (ver Imagen 4). Moléculas, como tirosol y farnesol, actúan como mensajeros en esta comunicación entre células. El tirosol favorece la formación de las hifas y la biomasa de la biopelícula en las etapas iniciales (1-6h). Se ha comprobado que las células sésiles producen cantidades significativamente mayores de tirosol que las planctónicas (Calderone, 2002). El farnesol inhibe la formación de hifas, evita el desarrollo excesivo de la biopelícula madura y favorece la dispersión celular a otras localizaciones. La mezcla de levaduras, hifas y material de matriz no se ha visto cuando el organismo crece en medio líquido o en una superficie de agar, lo que sugiere que la morfogénesis se dispara cuando un organismo hace contacto

con la superficie y que las células de la capa basal pueden tener un papel importante en el anclaje de la biopelícula a la superficie. (Castrillón, 2010; Quindós, 2009)

## 1.6 TRATAMIENTO PARA CANDIDIADIS

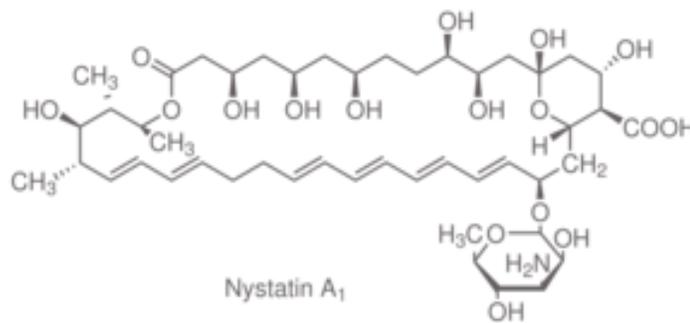
La candidiasis en décadas anteriores se han asociado con porcentajes elevados de mortalidad que oscilaba entre 30 y 80%, pero la introducción de fármacos antifúngicos ha llevado consigo una disminución significativa de estos porcentajes. Los fármacos antifúngicos generalmente actúan sobre moléculas presentes en los hongos y ausentes en las células de mamíferos, el ergosterol por ejemplo se encuentra presente en la membrana plasmática de las células fúngicas, en lugar de colesterol presente en células animales. (Aguilera, 2009)

El tratamiento dependerá del tipo de infección y del factor predisponente al que esté ligado, por lo tanto la terapia a veces es muy sencilla y solo requiere tratamientos tópicos, mientras que en otras situaciones es necesario que sea por vía sistémicas y por tiempo prolongado. (Bonifaz, 2010)

### 1.6.1 POLIENOS

**1.6.1.1 Nistatina:** Pertenece al grupo de los polienos los cuales fueron los primeros antifúngicos descubiertos, los 2 polienos más relevantes son nistatina y anfotericina B. la nistatina es un fármaco derivado poliénico, el cual es producido por una bacteria Gram positiva *Streptomyces noursei*, este polieno se une de manera irreversible a los esteroides de membrana presentes en las especies susceptibles de Candida. Este fármaco presenta mayor afinidad por los esteroides fúngicos (incluyendo el ergosterol) que por los esteroides humanos, lo que permite una toxicidad selectiva relativa. Esta unión irreversible altera la permeabilidad de la membrana y posibilita la salida de componentes intracelulares

esenciales, generando la muerte celular. En bajas concentraciones este fármaco tiene actividad fungistática, en altas concentraciones adquiere actividad fungicida. Este fármaco no se absorbe en piel o mucosas por lo que su presentación en tabletas es útil solo en candidosis gastrointestinal; para las lesiones mococutáneas se usa en forma tópica como óvulos, cremas vaginales y geles. Presenta gran actividad contra candidosis en piel, mucosas y tracto gastrointestinal. (Bonifaz, 2010; Klaus, W. et al, 2009; González, 2004).

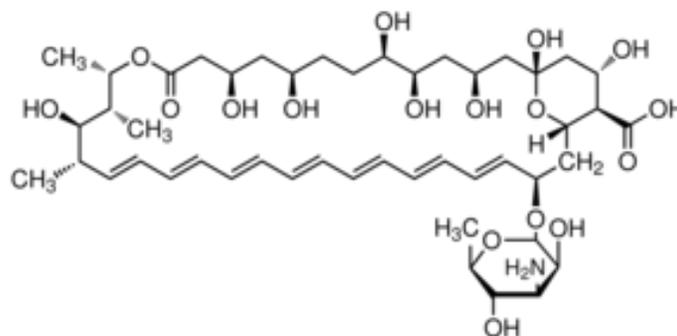


**Imagen 6. Nistatina: estructura química**

**1.6.1.2 Anfotericina B:** de igual manera que la nistatina este fármaco pertenece al grupo de los polienos el cual es producido por una bacteria gram positiva *Streptomyces nodosus*. Este fármaco es un macrolido heptaeno con actividad anfipática, con una porción hidrofílica de varios carbonos hidroxilados y una porción hidrófoba que consta de siete átomos de carbono unidos por dobles enlaces. Su actividad antifúngica es mediante la generación de poros en la membrana celular fúngica, la región lipófila se une inicialmente al ergosterol y el centro hidrófilo forma un conducto transmembrana, que interfiere con la permeabilidad consiguiendo la perdida de iones (principalmente K<sup>+</sup>) y constituyentes celulares provocando una importante alteración osmótica, además de la producción de un daño oxidativo directo en la membrana, culminando en la muerte celular. Este fármaco presenta un amplio espectro de actividad; la mayoría de los hongos son sensibles a este fármaco, sin embargo entre las levaduras

suele haber algunas especies resistentes a la anfotericina B por ejemplo *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* y *C. glabrata*. (Ausina, et al. 2005; Catalán, 2006)

Este fármaco se emplea para las candidosis sistémicas y profundas sobretodo en casos donde no responden a tratamientos azólicos. También presenta actividad contra criptococosis, aspergilosis, histoplasmosis, entre otras. La dosis utilizada para su presentación clásica (desoxicolato) es de 0.5-1.5mg/kg/día. Debido a los importantes efectos adversos (alteración en función renal, náuseas y disminución de la producción de eritropoyetina) que puede generar la utilización de la anfotericina B desoxicolato se han buscado nuevas presentaciones con menor toxicidad. En la actualidad se han desarrollado tres formas liposomales de este fármaco, que comparten el mismo mecanismo de acción pero presentan una mejor solubilidad y una toxicidad menor pues limitan la exposición de las células del hospedero, especialmente las renales, para este tipo de presentación la dosis recomendada es de 5mg/kg/día. (Ausina, et al. 2005; Bonifaz, 2010; Velázquez, 2008)



**Imagen 7 Anfotericina B: estructura química**

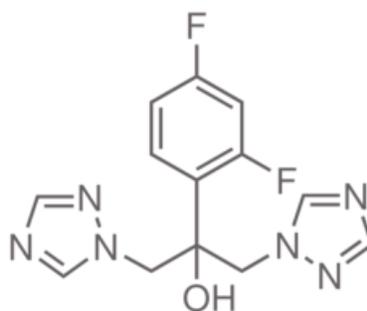


## 1.6.2 AZOLES

Los antifúngicos azoles son un grupo de fármacos fungistáticos sintéticos que se caracterizan por poseer un anillo imidazólico libre unido mediante enlace C-N a otros anillos aromáticos. La naturaleza de estos anillos modifica las propiedades fisicoquímicas, efecto terapéutico, toxicidad etc. En función del número de nitrógenos que posee el anillo imidazólico se dividen en imidazoles (miconazol) y triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol). (Catalán, 2006)

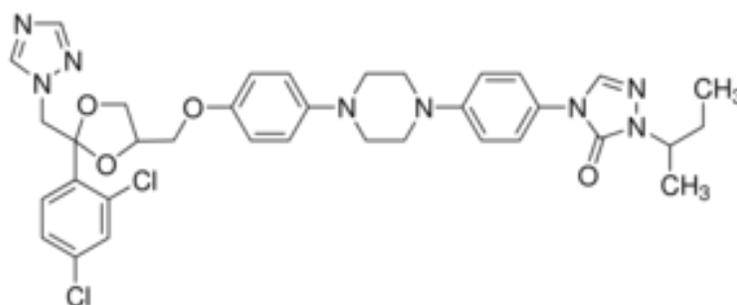
Son la terapia de elección en la mayoría de las candidosis exceptuando en casos de *C. krusei* y *C. glabrata* ya que son habitualmente resistentes a los compuestos azólicos y su hallazgo como agentes infecciosos involucrados en enfermedades sistémicas intrahospitalarias ha aumentado en los últimos años.

**1.6.2.1 Fluconazol:** es uno de los medicamentos más activos contra candidosis. El fluconazol actúa inhibiendo a la 14- $\alpha$ -desmetilasa, una enzima del citocromo P<sub>450</sub> ubicada en la membrana fúngica, la 14- $\alpha$ -desmetilasa es necesaria para la conversión del lanosterol en ergosterol, que es el principal componente de la membrana celular del hongo. En consecuencia la acumulación de 14- $\alpha$ -metilesteroles conduce a la alteración de la permeabilidad de la membrana, evitando la proliferación del hongo. Además producen la acumulación de peróxido de hidrógeno capaz de lesionar la estructura de los organelos intracelulares del hongo (Klaus, 2009). La dosis recomendada oscila entre 100-150mg/dosis única en adultos normales, en casos con inmunosupresión se utilizan 150mg/día. Este fármaco también es posible administrarse de manera intravenosa, cabe señalar que existen casos de cepas de *Candida sp* resistentes al fluconazol, principalmente cepas de las especies *C. krusei* y *C. glabrata*. (Bonifaz, 2010; Catalán, 2006)



**Imagen 8. Fluconazol: estructura química**

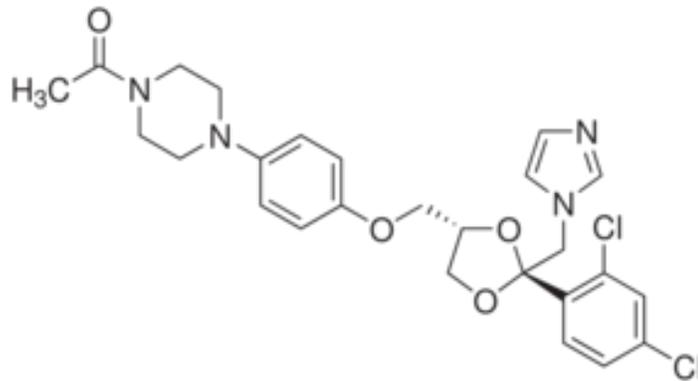
**1.6.2.2 Itraconazol:** Este fármaco al igual que el fluconazol inhibe a la 14- $\alpha$ -desmetilasa, tiene una excelente actividad frente a la gran mayoría de especies de Candida, incluidas aquellas resistentes al fluconazol. La dosis en adultos es de 100-200mg/día y en casos de candidosis vaginal se puede doblar la dosis, se aplica de manera similar al ketoconazol durante tres a cinco días y sus efectos secundarios son menores con respecto al medicamento anterior y presenta mayor eficacia en onicomicosis por Candida. (Bonifaz, 2010; Catalán, 2006)



**Imagen 9. Itraconazol: estructura química**

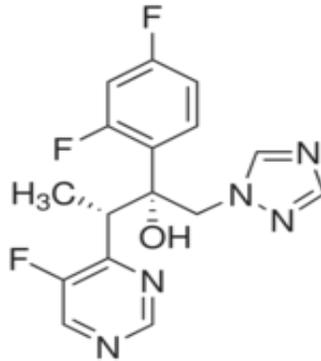


**1.6.2.3 Ketoconazol:** Es un imidazol activo por vía oral este fármaco la dosis de 200-400mg/día se recomienda en infecciones de piel y mucosas, en el caso de vaginitis se recomienda la concentración más alta por cinco días y en caso de diabéticos e inmunocomprometidos es necesario administrar más días, sus efectos secundarios más comunes son cefalea y gastritis. (Bonifaz, 2010)



**Imagen 10. Ketoconazol: estructura química**

**1.6.2.4 Voriconazol:** es el triazol con mayor espectro antifúngico. Es activo frente a todas las especies de Candida, incluidas *C. glabrata*, *C. krusei*, *Candida parapsilosis* y *C. tropicalis*, muy útil en casos graves de candidosis o en casos de cepas resistentes a fluconazol. Su dosificación varía de acuerdo al caso, pero de manera general se utiliza por vía intravenosa a una dosis de 6mg/kg cada 12 horas. Este fármaco además se utiliza de manera profiláctica en pacientes inmunodeprimidos por VIH o con trasplantes. (Bonifaz, 2010; Castañón, 2012; Catalán, 2006)

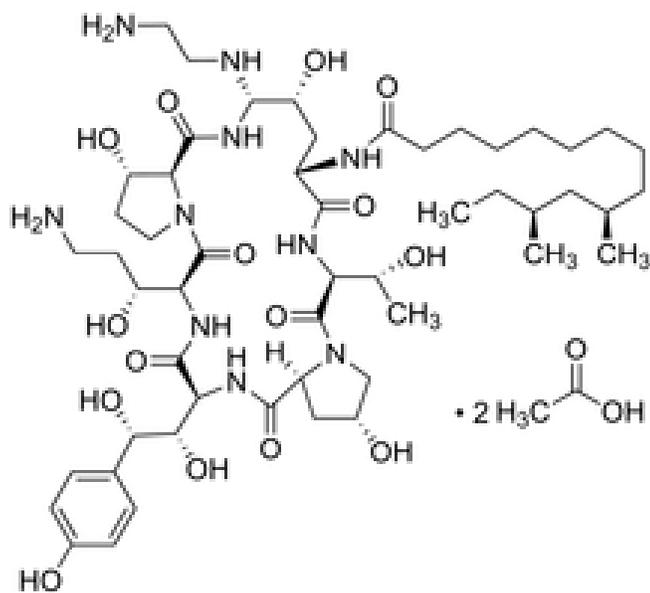


**Imagen 11. Voriconazol: estructura química**

### 1.6.3 Equinocandinas

A pesar del importante aporte de los anteriores fármacos mencionados los índices de fracaso en el tratamiento suelen ser elevados debido a la presencia de efectos adversos significativos y la emergencia de especies fúngicas intrínsecamente o secundariamente resistentes, son problemas crecientes que fomentaron la aparición de esta nueva clase terapéutica.

**1.6.3.1 Caspofungina:** es un compuesto lipopeptídico cíclico semisintético con una cadena lateral N-acil (equinocandina), sintetizado a partir de un producto de fermentación de *Glarea lozoyensis*, este fármaco ejerce su actividad antifúngica inhibiendo la enzima 1,3-β-D-glucano sintetasa de la pared celular, teniendo como consecuencia una disminución en las glucanas las cuales son un componente básico de la pared de diversos hongos. Dado que las células de mamíferos carecen de pared celular, este blanco de acción es óptimo para los antifúngicos. Es un derivado de espectro moderado y muy activo frente especies de *Candida sp.* Se recomienda en casos de candidosis invasiva y orofaríngea, muy útil en pacientes neutropénicos e inmunodeficientes sin respuesta a la terapia convencional. Se utiliza por vía intravenosa y se recomienda una dosis de 50mg/día. (Bonifaz, 2009; Catalán, 2006; Mendoza, 2008; Diomedi, 2004)



**Imagen 12. Caspofungina: estructura química**

**Cuadro 8. Mecanismos de acción de antifúngicos e implicaciones para su eficacia**

Agente antifúngico	Sitio de acción en la célula antifúngica	Actividad	Implicaciones clínicas
<b>Polienos</b>	Membrana	Se une al ergosterol causando la muerte celular	Potente actividad antifúngica de amplio espectro
<b>Azoles</b>	Membrana	Inhibe la enzima CYP 45 responsable de la síntesis de ergosterol, daña la membrana citoplasmática	Actividad fungistática de potencia y espectro variable
<b>Equinocandinas</b>	Pared celular	Inhibe la síntesis de glucano, destruye la estructura de la pared celular causando lisis fúngica	Potente actividad antifúngica de amplio espectro. Potencial efecto aditivo en terapias combinadas

(Diomedi, 2004)

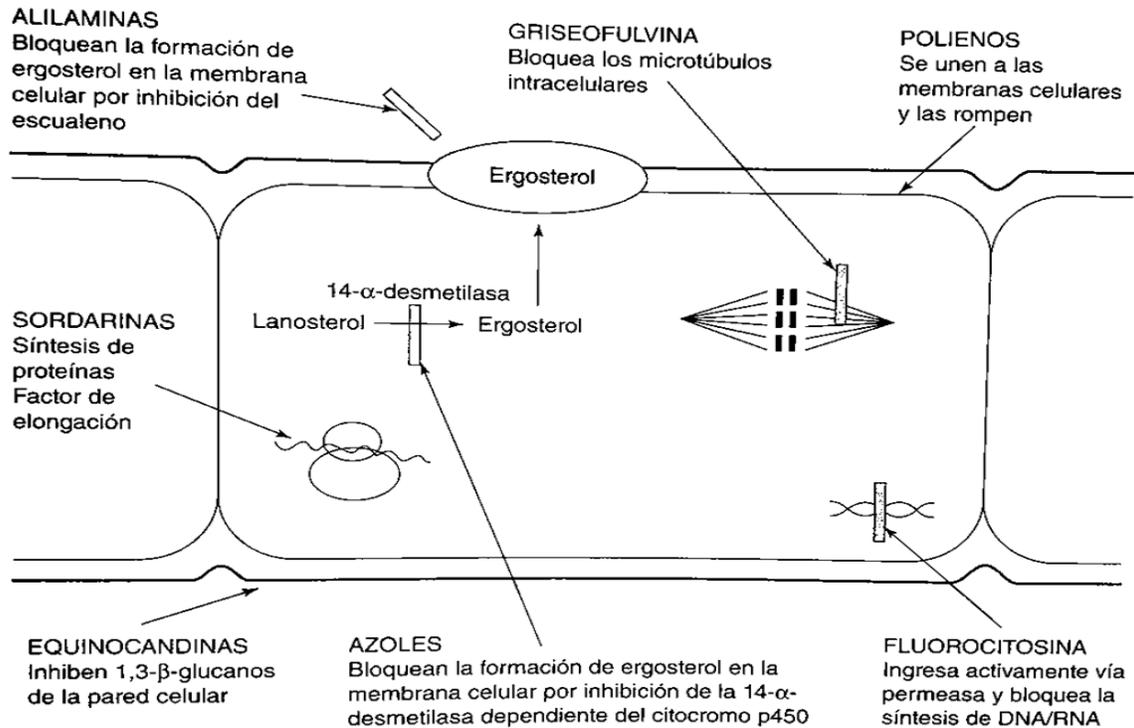


Imagen 13. Mecanismo de acción de diversos antimicóticos (Bonifaz, 2010)

## 1.7 RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

La resistencia clínica se define como la persistencia o progresión de una infección, a pesar del tratamiento antimicrobiano apropiado. Muchas de las micosis más resistentes al tratamiento se asocian a la colonización y la formación de biopelículas dado a que exhiben una reducción significativa contra los antifúngicos comúnmente utilizados (Catrillón, 2010; Pranab, 2004; Quindós, 2009). En el cuadro 4 se muestra la actividad de diversos antifúngicos frente a distintos estadios de *Candida*, mostrando menor actividad de estos fármacos contra las biopelículas. La mayoría de los antifúngicos convencionales (anfotericina B, nistatina, clorhexidina y fluconazol), los nuevos azoles (voriconazol y ravuconazol) e incluso formulaciones lipídicas de nistatina no tienen actividad en las biopelículas fúngicas. (Pranab, 2004)



La resistencia a antibióticos frente a las biopelícula se sabe que es un evento multifactorial pero se le atribuye principalmente a:

- 1) Penetración restringida a través de la matriz polimérica de la biopelícula, actuando como una barrera física.
- 2) Cambios de fenotipo dentro de la biopelícula que ocasionan disminución del crecimiento con menor actividad metabólica.
- 3) Expresión de genes inducidos por el contacto con la superficie, asociados a la resistencia a los antifúngicos. (Catrillón, 2010)

**Cuadro 9. Criterios de sensibilidad y resistencia de distintos antifúngicos (planctónico)**

Antifúngico	Sensible (µg/mL)	Sensible-dosis dependiente (µg/ mL)	Resistente (µg/ mL)
Itraconazol	< 0.25	0.25 – 0.5	≥1
Fluconazol	≤8	16-32	≥64
Voriconazol	≤1	2	≥4
Anfotericina B	-	-	≥2
Caspofungina	≤2	-	-
Nistatina	≤0.125	0.25-0.5	1
Anidulafungina	≤2	-	-

(López, 2004)

**Cuadro 10. Actividad de distintos antifúngicos contra especies de *Candida* en estado planctónico y biopelículas.**

Antifúngicos	Organismo	MIC biopelícula (µg/mL)	MIC planctónica (µg/mL)
AmB	<i>C. albicans</i>	8	0.5
	<i>C. parapsilosis</i>	4	0.25
FLU	<i>C. albicans</i>	>256	1
	<i>C. parapsilosis</i>	>256	8
VORI	<i>C. albicans</i>	>256	0.5
	<i>C. parapsilosis</i>	128	0.125
RAVU	<i>C. albicans</i>	128	0.1
	<i>C. parapsilosis</i>	ND	0.125
NYT	<i>C. albicans</i>	16	2
	<i>C. parapsilosis</i>	16	0.5
CHX	<i>C. albicans</i>	32	8
	<i>C. parapsilosis</i>	16	8
CAS	<i>C. albicans</i>	0.25	0.125
	<i>C. parapsilosis</i>	0.125	1
MICAF	<i>C. albicans</i>	0.25	0.001
	<i>C. parapsilosis</i>	0.125	0.25
LAmB	<i>C. albicans</i>	0.25	0.5
	<i>C. parapsilosis</i>	1	0.06
ABLC	<i>C. albicans</i>	0.25	0.25
	<i>C. parapsilosis</i>	0.25	0.06
LNYT	<i>C. albicans</i>	8	0.5
	<i>C. parapsilosis</i>	32	0.5
TERB	<i>C. albicans</i>	128	32
	<i>C. parapsilosis</i>	ND	4

*Nota:* (ABD): anfotericina B desoxicolato; (FLU): fluconazol; (VORI): voriconazol; (RAVU): ravuconazol; (NYT): nistatina; (CHX): clorhexidina; (CAS): caspofungina; (MICAF): micafungina; (LAmB): formulaciones lipídicas de anfotericina B; (ABLC): complejos lipídicos de anfotericina B; (LNYT): complejos lipídicas de nistatina; (TERB): terbinafina. (ND): no determinado; (MIC): concentración mínima inhibitoria. (Pranab, 2004)

Por lo que se refiere a la penetración restringida de los antimicóticos dentro de la biopelícula de Candida, se ha sugerido que la matriz extracelular excluye o limita el acceso de los medicamentos a los organismos inmersos en zonas más profundas de la biopelícula. Muchos estudios indican que la matriz no forma una barrera para la difusión, aunque para ciertos compuestos se retrasa la penetración. Se ha propuesto que el glicocalix causa la disminución de la difusión o secuestro de los antimicrobianos. Sin embargo, se ha demostrado que al disgregar las biopelículas y realizar pruebas de susceptibilidad a las células liberadas presentan resistencia a los antifúngicos aun después de la resuspensión. Lo anterior sugiere que la integridad de la estructura de la biopelícula y el glicocalix no confieren en su totalidad un efecto de resistencia, pero contribuye en cierto grado a mantener la supervivencia celular. (Ibarra, 2012; Pemán, 2008; Ramage, 2005)

Las biopelículas crecen poco a poco porque los nutrientes están limitados, lo que ocasiona disminución del metabolismo de los microorganismos. Con frecuencia, la lenta velocidad de crecimiento se asocia con la adopción de diferentes fenotipos por los microorganismos, así mismo se asocia a cambios en la cubierta celular (principalmente en el contenido de esteroides). Debido a que los niveles de ergosterol en las biopelículas maduras presentan una reducción de este entre un 41 y 50%, comparado con el contenido de ergosterol en las fases iniciales de la biopelícula, los antifúngicos que presentan un mecanismo de acción basado en la inhibición de la síntesis de la pared celular presentan una disminución en su actividad contra las biopelículas. (Pranab, 2004)

La velocidad de crecimiento es un parámetro importante en la adquisición de resistencia a los antifúngicos, por lo que se han analizado y comparado la susceptibilidad a la anfotericina B de las células de la biopelícula contra la de las células planctónicas que crecían a la misma velocidad (Pemán, 2008). Encontrando que las células de la biopelícula son resistentes al fármaco a todas las velocidades de crecimiento probadas, mientras que las planctónicas fueron

resistentes sólo a bajas velocidades de crecimiento. Por lo tanto, se ha observado que la resistencia a antibióticos depende de varios factores que influyen en mayor o en menor medida para brindarle a la célula protección contra dichos fármacos, además de estar relacionado con la expresión de genes inducidos por contacto, para adquirir otras propiedades y mediante el cual se adquiere la resistencia a los antibióticos. (Ramage, 2005) (Valentín, 2007)

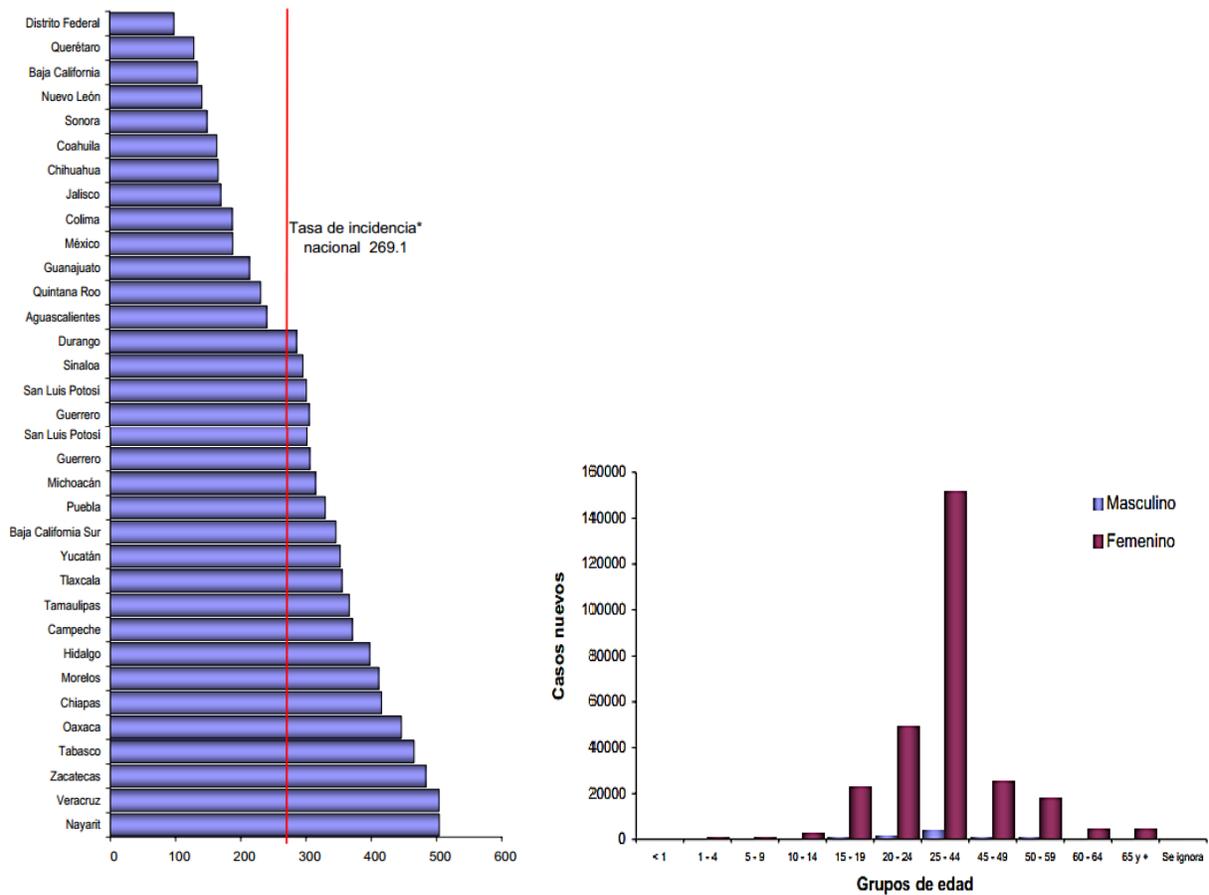
Durante la formación de la biopelícula en las células existe una sobre expresión de bombas de eflujo contra fármacos, cambios en el metabolismo celular y cambios en la composición de la pared celular. Los genes que codifican a las bombas de eflujo multifármacos, su regulación resulta en un fenotipo resistente a varios agentes. Hay reportes que demuestran que el microorganismo al unirse a la superficie y forma una biopelícula expresa un fenotipo alterado, por ejemplo *C. albicans* y *C. dubliniensis* poseen dos diferentes tipos de bombas de eflujo: unión adenosin trifosfato cassette (ABC), transportadores que codifican los genes CDR (CDR1 y CDR2), y los facilitadores codificados por los genes MDR. Ambos tipos de genes se regulan durante la formación y desarrollo de las biopelículas. Sin embargo, las cepas mutantes que llevan delección simple o doble de estos genes son susceptibles al fluconazol cuando crecen de forma planctónica, pero retienen su fenotipo de resistencia cuando crecen en biopelículas. Por lo tanto, el mecanismo de resistencia es un proceso que no puede explicarse por un solo tipo de mecanismo molecular. (Castrillón, 2010; Pranab, 2004; Ramage, 2001; Valentín, 2007)

A pesar de la resistencia a múltiples fármacos que se presentan en las biopelículas formadas por especies de *Candida* existen formulaciones liposomales de anfotericina B y algunas equinocandinas (casposfungina, micafungina y anidulafungina) muestran actividad contra las biopelículas de diferentes especies de *Candida*. (Quindós, 2009; Pranab, 2004)



## 1.8 IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA: CANDIDIASIS

En el año 2009 de acuerdo a la información publicada en el anuario ejecutivo de información epidemiológica de morbilidad a cargo de la Secretaria de Salud y la Secretaria de Prevención y Promoción de la Salud se catalogó a la candidiasis urogenital como una de las 20 principales causas de enfermedades transmisibles. Mostrando que presenta mayor afectación en la población femenina obteniendo una razón mujer– hombre de 31.5 y presentándose la infección predominantemente entre los 25 y 44 años de edad. Presentó una tasa de incidencia por cien mil habitantes a nivel nacional de 269.1, y las entidades más afectadas por este padecimiento fueron Nayarit con 504.3 casos por cien mil habitantes, seguido de Veracruz (503.8) y Zacatecas (483.5); la ciudad menos afectada fue el DF con una tasa anual de incidencia de 98.3 por cien mil habitantes. (Subsecretaría de prevención y promoción de la salud, 2009)



**Imagen 14. Candidiasis urogenital:** A) Tasa de incidencia por 100,000 habitantes en México según entidad federativa, 2009. B) Número de casos nuevos de acuerdo a grupos de edad y sexo, 2009.

La importancia reciente de las biopelículas como fuente y persistencia de infecciones se refleja en las estadísticas: para el año 2008 se reportaron en Estados Unidos 1.7 millones de procesos infecciosos asociados; y en la Comunidad Europea se informaron 3 millones de pacientes con infecciones en las vías urinarias (32%), diversos sitios infectados (22%), neumonías (15%) y septicemias (14%). En México a pesar de tener informes sobre la candidiasis urogenital aún no existen reportes que permitan la asociación de estas infecciones con la formación de biopelículas, a pesar de esto ya se ha demostrado que una

fuente de infección importante son las nosocomiales, derivadas de catéteres infectados por biopelículas. (Castrillón, 2010)

Se estima que entre el 10 y el 30% de los catéteres urinarios se asocia a la presencia de infección y formación de biopelículas, y lo mismo ocurre con el 5-10% de los materiales de fijación de fracturas óseas, el 3-8% de los catéteres venosos centrales, el 1-7% de los marcapasos, injertos vasculares, prótesis articulares y válvulas cardíacas mecánicas. La formación de biopelículas es muy frecuente en prótesis dentales y laríngeas y en cualquier otro aparato o dispositivo biomédico empleado en contacto con las superficies cutáneas y mucosas. (Quindós, 2009)

## 1.9 MÉTODOS DE ESTUDIO SOBRE BIOPELICULAS

La evolución de los métodos analíticos de los estudios de imagen ha permitido diseñar diferentes estrategias para el estudio de las biopelículas analizando la cuantificación y crecimiento del microorganismo mediante la evaluación de: peso seco, incorporación de isótopos radioactivos, reducción de sal de tetrazolio XTT, bioluminiscencia ATP, modelos de crecimiento en discos de catéter, tiras de acrílico, placas de microtitulación entre otros. (Ibarra, 2012; Ramage, 2005; Valentín et al, 2007)

Estos ensayos se acompañan de estudios de ultraestructura microscópica, como la electrónica de barrido que permiten ver en tercera dimensión la formación de biopelículas, lo que ha permitido la descripción de diferentes modelos de organización entre ellos. Recientemente se desarrollaron estudios *in vivo* para la detección temprana de infección en tejidos e implantes biomédicos. (Ibarra, 2012)

### 1.9.1 Ensayo de reducción XTT

El ensayo de proliferación celular XTT fue descrito por primera vez en 1988 por Scudiero et al como un método eficaz para medir el crecimiento celular y la sensibilidad a los fármacos en las líneas celulares tumorales. Este ensayo se ha adaptado a otras metodologías con el mismo fin de determinar la viabilidad y crecimiento celular sobretodo en ensayos de biología celular, citotoxicidad, apoptosis y recientemente a la determinación de biopelículas de diversos microorganismos. (American Type Culture Collection, 2011)

Esta sal de tetrazolio (2, 3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-hidroxido de tetrazolio) es un compuesto incoloro o ligeramente amarillo que cuando se reduce se vuelve de color naranja brillante (Imagen 7). Este cambio de color se lleva a cabo por romperse el anillo de tetrazol cuaternario cargado positivamente. El producto de la reducción es soluble dándole la propiedad de determinarse espectrofotométricamente y se puede utilizar en ensayos en tiempo real. (American Type Culture Collection, 2011)



**Imagen 15. Reducción del XTT para la formación de un derivado de formazán colorido.** (American Type Culture Collection, 2011)

Se tiene propuesto que el XTT es incapaz de entrar en las células por su carga negativa, sugiriéndose que la reducción de colorante se produce en la superficie celular facilitada por un transportador de electrones transmembranal. Se cree que Oxidorreductasas mitocondriales contribuyen sustancialmente con sus reductores que se transfieren a la membrana plasmática. (American Type Culture Collection, 2011)

Los ensayos con XTT pueden ser utilizados solo como una reacción de detección, pero los resultados no son óptimos. Los resultados del ensayo XTT se mejoran en gran medida cuando se utiliza en conjunto con un aceptor de electrones intermedio, tal como la menadiona (vitamina K3) la cual es una vitamina liposoluble capaz aceptar los electrones que pierde la sal de tetrazolio en su reducción dando lugar a una mayor capacidad de formación del producto pigmentado. (American Type Culture Collection, 2011)



## JUSTIFICACIÓN

El número de infecciones vaginales por levaduras cada vez tiene mayor incidencia, siendo de las 20 principales causas de enfermedades más frecuentes en México, donde el género *Candida* es el más comúnmente aislado; muchas de las complicaciones vaginales están relacionadas con una serie de factores de virulencia que actúan de manera coordinada, uno de los principales factores es la capacidad de la colonización y formación de biopelículas, dicha propiedad se presenta cuando existe una asociación comunitaria de las levaduras al adherirse a una superficie y mantenidos en una matriz extracelular, dichas biopelículas se adhieren tanto en superficies inertes (implantes, tubos endotraqueales, marcapasos y varios tipos de catéteres) y diversos sitios anatómicos (cavidad oral, vías respiratorias bajas y altas, tracto gastrointestinal y urinario además de heridas)

La formación de biopelículas está asociada a una mayor resistencia a la terapia antifúngica y la capacidad de las células dentro de las biopelículas para resistir las defensas del huésped, además de que, puede servir para diseminar la infección a otros sitios. Debido a estas cualidades que presentan las biopelículas es importante evaluar su capacidad de formación en cepas de *Candida* provenientes de casos con vulvovaginitis, así como determinar la concentración mínima inhibitoria en los estadios planctónico y de biopelícula conociendo las diferencias y similitudes en la capacidad de formación de biopelícula y la resistencia que presenten las especies de *Candida*.



## HIPÓTESIS

Las especies de *Candida* aisladas a partir de muestras clínicas de vulvovaginitis con infección combinada será principalmente *C.albicans* como agente causal y al menos una de las cepas de cada caso será capaz de formar biopelícula, dichas biopelículas presentarán una mayor resistencia a los antimicóticos en comparación con los estadios planctónicos.

## OBJETIVO GENERAL

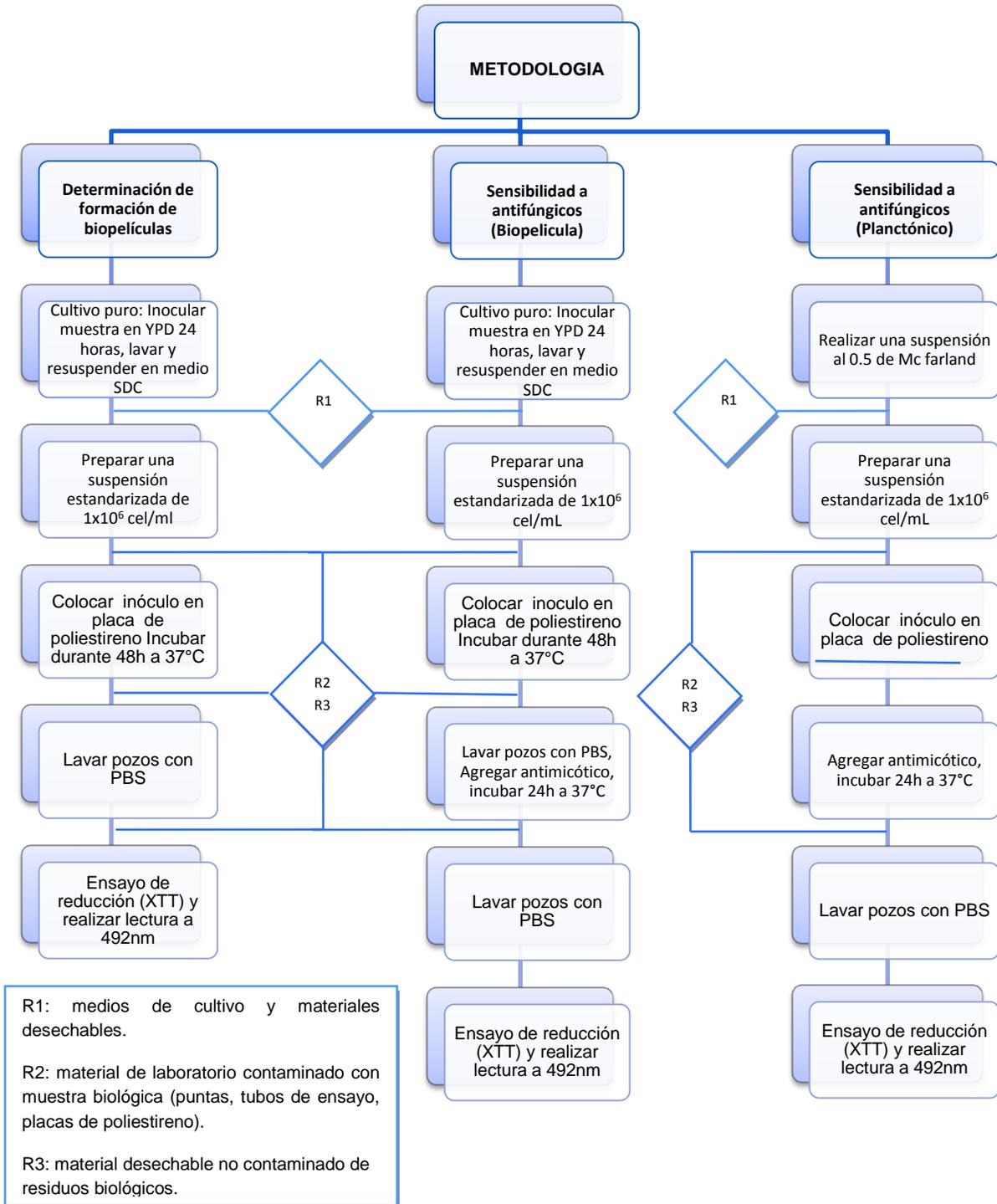
Evaluar la formación de biopelículas de cepas de *Candida* aisladas de casos clínicos de vulvovaginitis con candidiasis combinada utilizando la técnica de reducción con XTT, así como determinar la concentración mínima inhibitoria 50 en los estadios planctónico y de biopelícula, evaluando las diferencias y similitudes en la capacidad de formación de biopelícula y la resistencia que presenten las especies de *Candida* frente a diversos antimicóticos.



## OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la recolección e identificación de muestras clínicas con diagnóstico presuntivo de candidiasis vaginal.
- Lograr la estandarización de la técnica de reducción con XTT para la identificación de la actividad metabólica en biopelículas de *Candida*.
- Lograr la identificación de cepas bajas, medianas, altas y no formadoras de biopelículas en especies de *Candida* que se encuentran dentro de la misma infección vaginal.
- Evaluar la capacidad de resistencia o sensibilidad de las levaduras en estado planctónico y biopelícula al ser retadas contra antimicóticos de diversos grupos (Nistatina, Fluconazol y Caspofungina) encontrando la concentración mínima inhibitoria requerida para ambos estadios.
- A partir de los fármacos utilizados identificar cual presenta mayor eficacia para lograr la eliminación de las biopelículas de las diferentes especies de *Candida*.

## METODOLOGIA



**Diagrama 1.** Estrategia experimental para la estandarización de la determinación de biopelículas en especies de Candida.



## MATERIAL Y METODOS

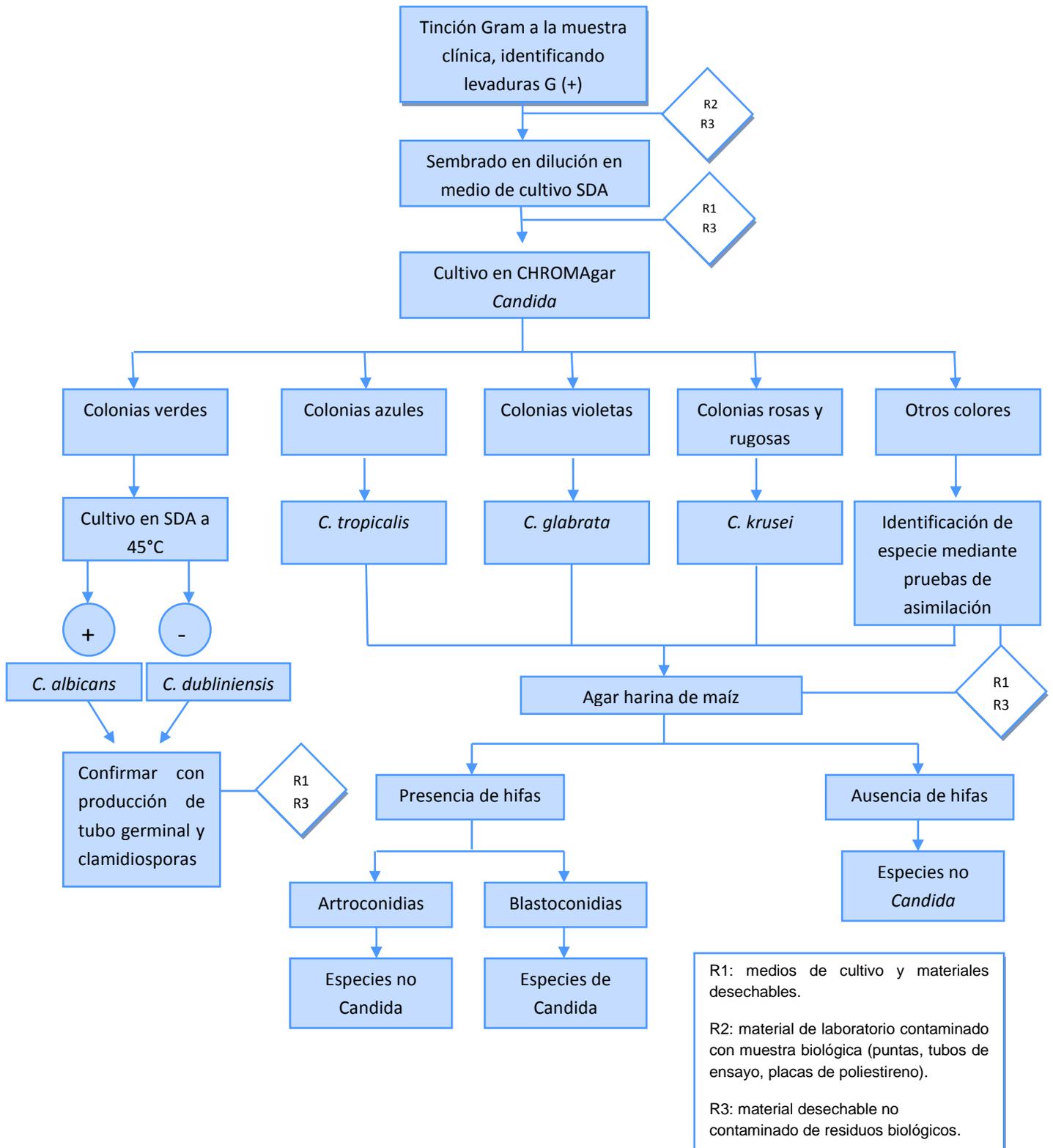


Diagrama 2. Estrategia experimental para la identificación de especies de *Candida*

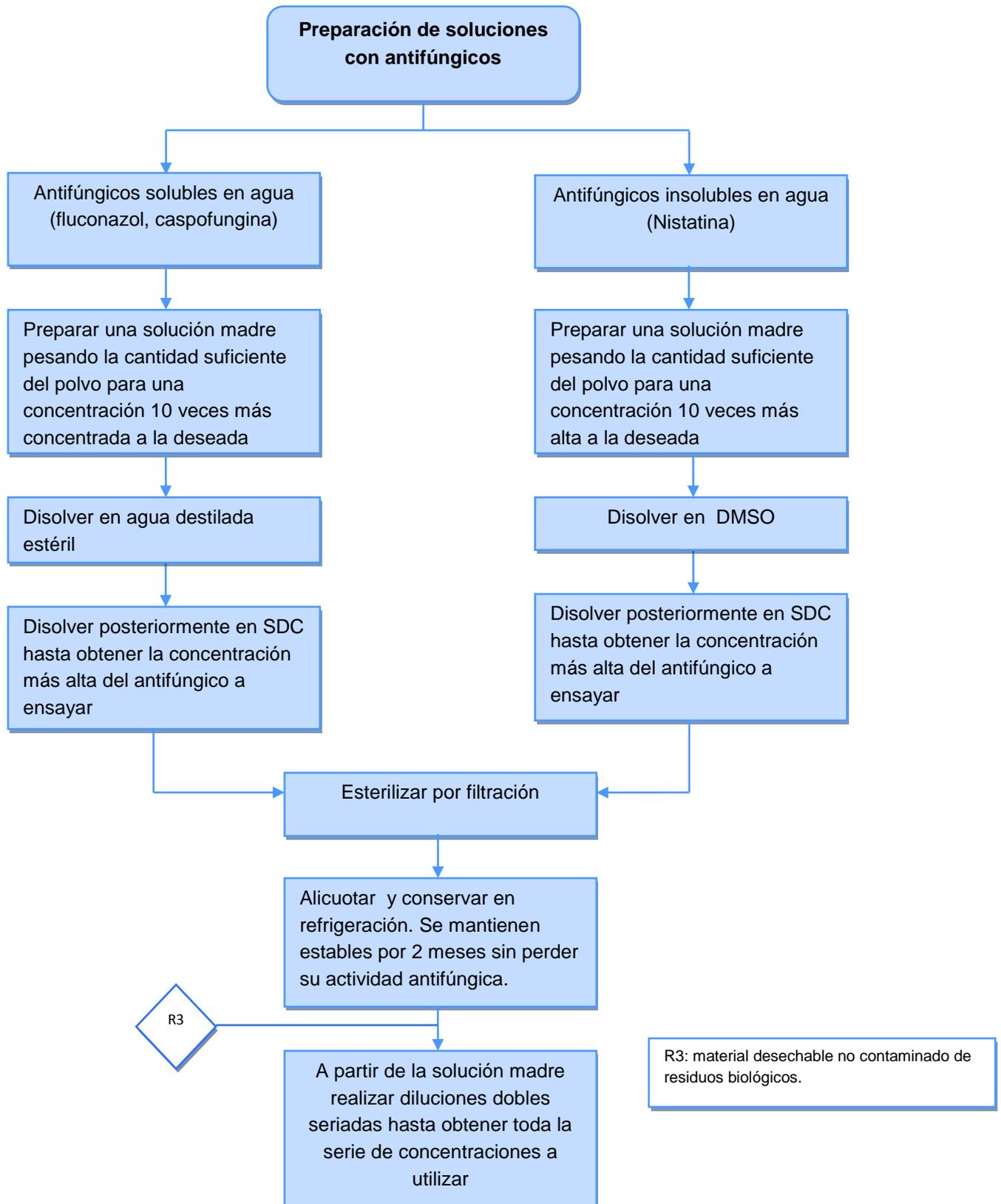


Diagrama 3. Diagrama de preparación de soluciones con antifúngicos



## Preparación de soluciones con antifúngicos

La preparación de las soluciones de antifúngicos fue dependiente de su capacidad de solubilizarse en agua. En los insertos de los antifúngicos se encontró que los fármacos solubles eran Fluconazol <sup>®</sup>SIGMA-ALDRICH y Caspofungina <sup>®</sup>SIGMA-ALDRICH, pesando la cantidad necesaria de los antifúngicos para obtener 10 veces la concentración más alta del antifúngico por ensayar y disolverlo en agua. En el caso de fluconazol se prepararon 50mL a una concentración de 10, 240 µg/mL, mientras que para caspofungina se prepararon 50ml a una concentración de 80 µg/ mL.

Para el caso de los antifúngicos insolubles en agua como la nistatina <sup>®</sup>SIGMA-ALDRICH igualmente se pesó la cantidad necesaria del antifúngico para obtener 10 veces la concentración más alta del antifúngico por ensayar, posteriormente se disolvió en Dimetilsulfoxido (DMSO) <sup>®</sup>SIGMA-ALDRICH. Las soluciones madre de todos los antifúngicos se esterilizaron por filtración utilizando membranas de filtración de nitrato de celulosa con un ancho de poro de 0.22 µm <sup>®</sup>Whatman, posteriormente se alicuotaron y conservaron en congelación hasta su utilización (se mantiene estable 2 meses sin perder su actividad antifúngica).

El día de su utilización se descongelaron los antifúngicos a temperatura ambiente, después se realizaron las diluciones respectivas en medio SDC para obtener las concentraciones mostradas en la Cuadro No. 6

Cuadro No.11 serie de diluciones de antifúngicos en medio SDC

<b>Nistatina</b>	8	4	2	1	0.5	0.25
<b>Fluconazol</b>	1024	256	64	16	4	1
<b>Caspofungina</b>	4	2	1	0.5	0.25	0.125

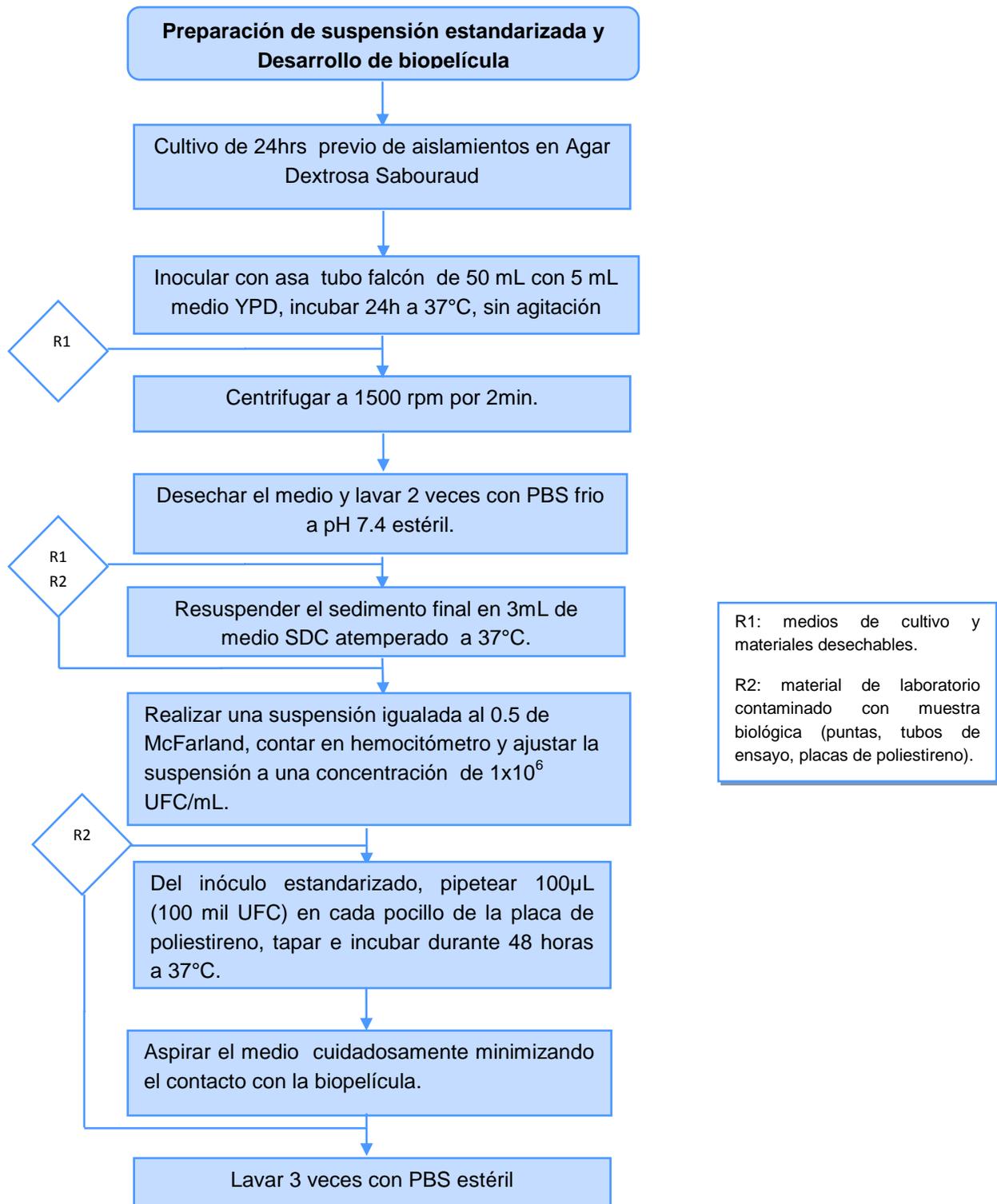
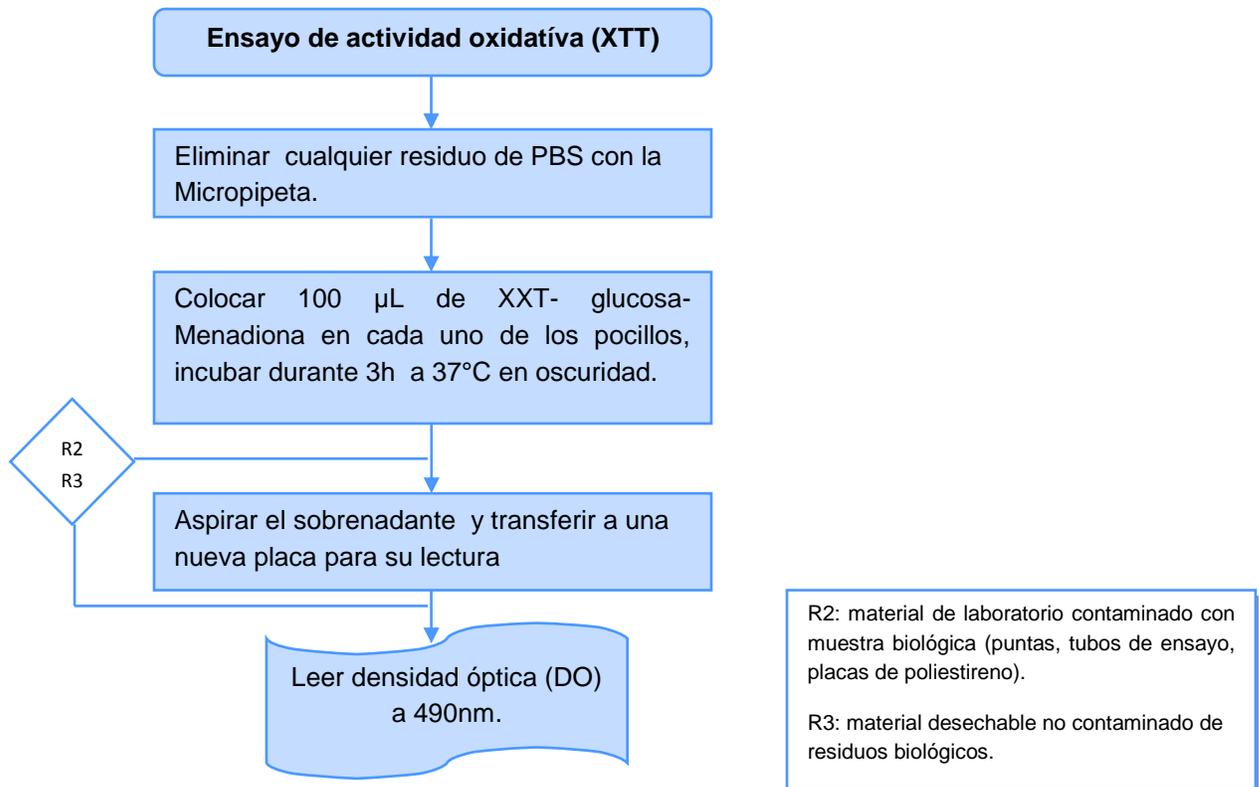


Diagrama 4. Diagrama de preparación de suspensión estandarizada de y desarrollo de biopelícula



## **Desarrollo de biopelícula en especies de Candida**

La formación de biopelículas de especies de Candida se realizó agregando alícuotas de 100µL de la suspensión de levaduras estandarizada ( $10^6$  células/mL) en una placa de poliestireno estéril con 96 pozos de fondo plano, una vez agregada la suspensión se mantuvo la placa en incubación durante 48 horas a 37°C sin agitación. Una vez transcurridas las 48 horas de incubación el medio contenido en el pozo se retiró gentilmente, la biopelícula fue lavada por duplicado utilizando 200 µL de PBS®SIGMA-ALDRICH estéril (pH 7.4), cuidando que en el último lavado el pozo de la placa quedara sin residuos de PBS.



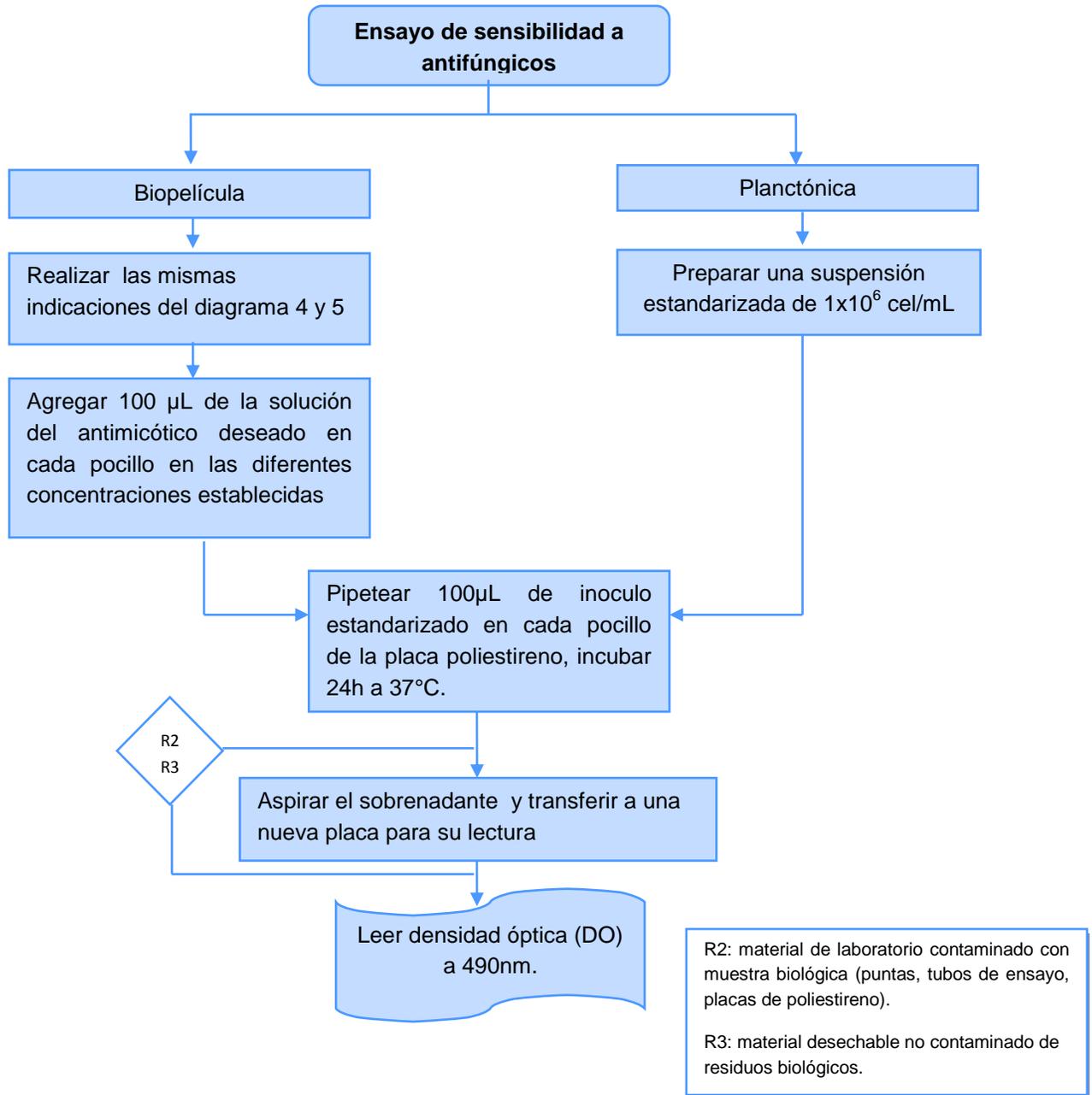
**Diagrama 6.** Proceso experimental para la determinación de formación de biopelículas en especies de Candida.

### Ensayo de actividad oxidativa (XTT)

Previamente se preparó una solución de 2, 3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-hidroxido de tetrazolio ®SIGMA-ALDRICH (XTT) disolviendo 0.5g/L esta sal de tetrazolio en PBS estéril y adicionado con 200mM de glucosa, esta solución de XTT-glucosa se esterilizo por medio de filtración usando un filtro con poros de 0.22µm. Posteriormente se almacenó en alícuotas de 10mL a 0°C en frascos ámbar (previamente esterilizados) envueltos en papel aluminio, estas alícuotas se mantuvieron en estas condiciones hasta el día de su utilización. De igual manera se preparó una solución de Menadiona en

acetona a una concentración de 10mM, la cual también se almacenó en alícuotas de 1mL a 0°C.

Anticipándose a las 48 horas de incubación se descongelaron alícuotas de XTT-glucosa y Menadiona<sup>®</sup>SIGMA-ALDRICH, una vez descongelados los reactivos se mezclaron en una proporción de volumen 10:1 respectivamente, mezclando perfectamente la solución final. Una vez que se lavaron las biopelículas con PBS<sup>®</sup>SIGMA-ALDRICH con la finalidad de remover a las células no adheridas al poliestireno de la placa se añadieron 100µl de la solución recién preparada (XTT-glucosa-menadiona). La placa se cubrió con aluminio y se incubó en oscuridad a 37°C durante 3 horas debido a que reportes anteriores sugieren que este es el tiempo óptimo para permitir la reducción del XTT. Finalizado este tiempo la solución es transferida con mucho cuidado a una nueva placa de poliestireno con 96 pozos. Los cambios colorimétricos se determinaron espectrofotométricamente usando un lector de placas a una longitud de onda de 492nm.



**Diagrama 7.** Proceso experimental para el ensayo de sensibilidad a antifúngicos contra biopelículas y células planctónicas.

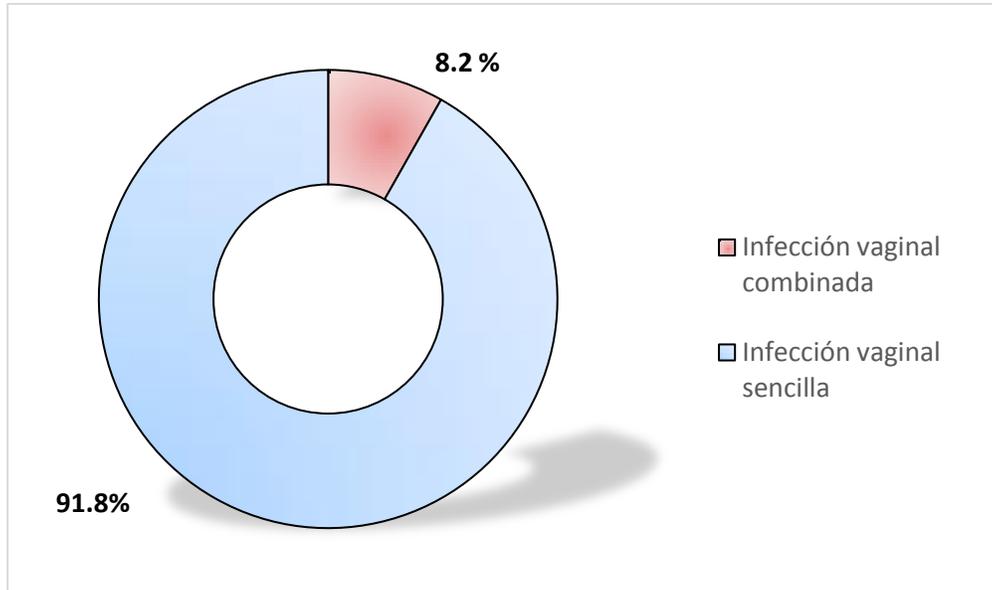
## RESULTADOS

A partir de 61 casos de candidiasis vulvovaginal muestreados en 4 diferentes hospitales y unidades medico familiares del Estado de México se identificaron 5 casos con un aislamiento de infección combinada causado por dos especies de Candida. En el cuadro 7. Se muestra el número de aislamientos totales recibidos de cada uno de los hospitales y unidades medico familiares, así como el número de aislamientos que presentaron una infección combinada por dos especies de Candida.

**Tabla 1. Hospitales y Clínicas donadores de muestras clínicas**

Institución	Dirección	Muestras con infección sencilla	Muestras con infección combinada	Total de muestras
IMSS: UMF-52	Avenida nevado de Toluca num.29, Infonavit norte, 54720, Cuautitlán Izcalli, Estado de México	28	1	29
IMSS: UMF-62	Cda.16 de Septiembre 39, Entre. Ignacio Ramírez y Maestro Alfonso Reyes, 54800, Cuautitlán de Romero Rubio, Estado de México.	23	2	25
IMSS: UMF-63	Jaime Nunó 1, San Ildefonso, entre Mirador y Puente, San Ildefonso, 54400, Villa Nicolás Romero, Estado de México.	4	1	5
ISEM: HG - Vicente Villada	Alfonso Reyes esq. Venustiano Carranza S/N, Col. Santa María, Cuautitlán de Romero Rubio, Estado de México.	1	1	2
<b>Total</b>		<b>56</b>	<b>5</b>	<b>61</b>
<b>Porcentaje</b>		<b>91.8</b>	<b>8.2</b>	<b>100</b>

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social, UMF: Unidad Medico Familiar, ISEM: Instituto De Salud Del Estado De México, HG: Hospital General



**Gráfico 1. Porcentaje de aislamiento de infecciones vaginales sencillas y combinadas causadas por especies de *Candida***

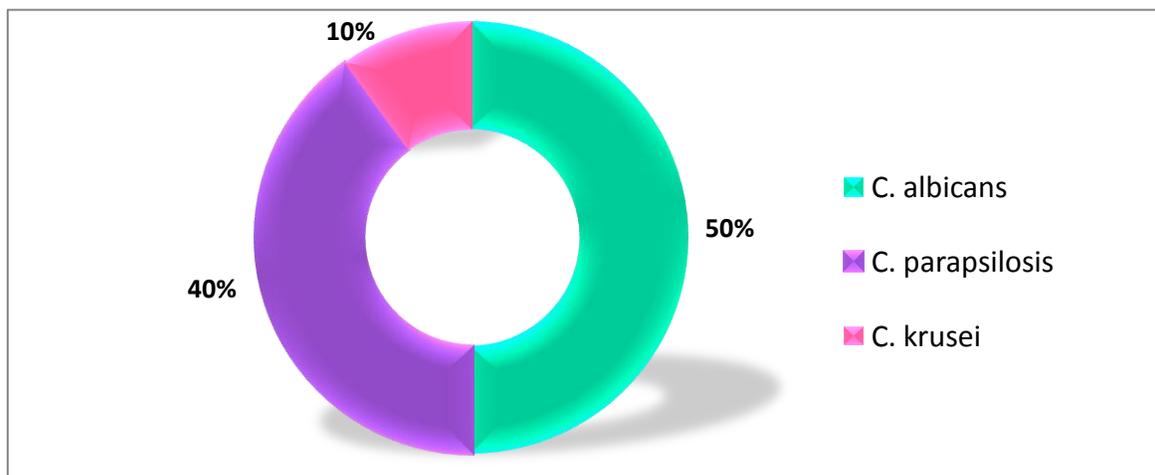
Al realizar la identificación de las muestras con las metodologías antes mencionadas se encontró que el 91.8% de las muestras presentaron una infección vaginal causada por una sola especie de *Candida*, mientras que el 8.2% de las muestras en el proceso de identificación presentaron dos especies de *Candida* dentro de la misma infección vaginal (Gráfico 1).

**Tabla 2. Especies de *Candida* aisladas en infecciones combinadas**

Muestra	Especie
Muestra combinada 1	• <i>Candida albicans</i>
	• <i>Candida parapsilosis</i>
Muestra combinada 2	• <i>Candida albicans</i>
	• <i>Candida parapsilosis</i>
Muestra combinada 3	• <i>Candida albicans</i>
	• <i>Candida parapsilosis</i>
Muestra combinada 4	• <i>Candida albicans</i>
	• <i>Candida parapsilosis</i>
Muestra combinada 5	• <i>Candida albicans</i>
	• <i>Candida krusei</i>



A partir de las 5 muestras con infección combinada se aislaron 3 especies del genero Candida (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C.krusei*), los aislamientos correspondientes a cada muestra se encuentran representadas en la Tabla 2. De las 10 cepas encontradas en las infecciones vaginales combinadas 5 de ellas pertenecen a la especie *C.albicans*, 4 cepas corresponden a *C. parapsilosis* y solamente una cepa fue *C. krusei*. En el Grafico No.2 se representa esta proporción de aislamientos en porcentaje.



**Gráfico 2. Porcentaje de especies aisladas en infecciones vaginales donde se identificaron dos especies en la misma muestra.**

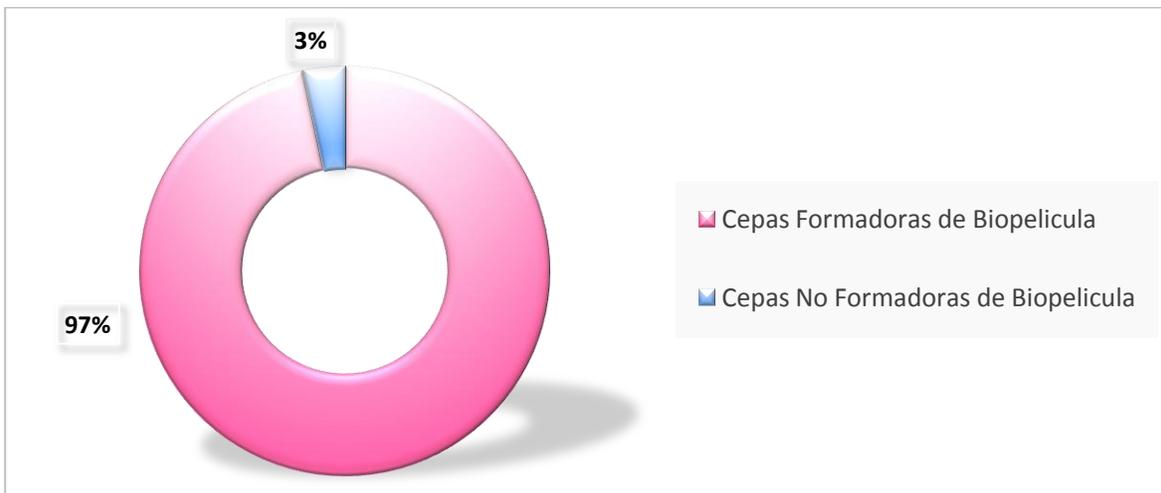
Una vez identificadas las especies correspondientes de cada caso se realizó el ensayo de reducción con XTT a las 61 muestras para determinar la formación de biopelícula con 48 horas de maduración en una superficie de poliestireno mantenidas en un sistema estático estandarizado previamente utilizando la cepa de referencia ATCC 32354 *C. albicans* formadora positiva para biopelícula, a partir de un análisis estadístico y las referencias consultadas (Valentín, 2007) se clasificaron a las cepas en diversos criterios representados en la tabla No 3.



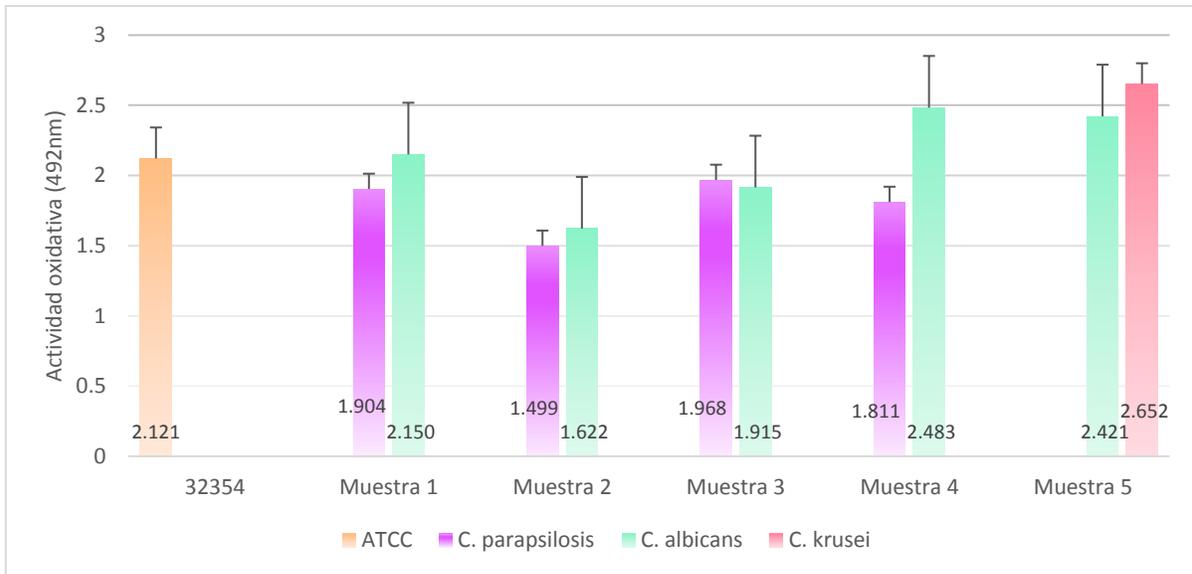
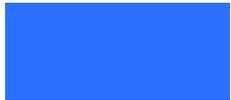
**Tabla3. Criterios de clasificación en la formación de biopelículas**

Valor	Criterio	Absorbancia (492nm)
0	cepas no formadoras de biopelícula	(0.0-0.200)
1+	bajos formadores de biopelícula	(0.201-0.926)
2+	medios formadores biopelícula	(0.927-1.799)
3+	altos formadores de biopelícula	(1.800-2.673)
4+	muy altos formadores de biopelícula	( $\geq 2.674$ )

A partir de estos criterios de clasificación se encontró que únicamente el 3.3 % de las cepas es incapaz de formar biopelículas, mientras que el 96.7% presentaron actividad para la formación de biopelículas (Grafico 3). Para el caso de las cepas presentes en infecciones combinadas en su mayoría obtuvo un valor de 3+ excepto las cepas presentes en la muestra 2 las cuales obtuvieron un rango de 2+. La actividad de las biopelículas con 48 horas de maduración de las cepas presentes en infecciones vaginales combinadas se representa en el gráfico 3.



**Grafico 3. Porcentaje de cepas formadoras de biopelículas aisladas a partir de casos con CVV.**



**Gráfico 4. Actividad oxidativa de biopelículas con 48h de maduración a partir de muestras con infección combinada de especies de *Candida*.**

Una vez comprobada la capacidad de formación de biopelículas a las 48 horas de las 10 cepas presentes en infecciones vaginales combinadas se procedió a determinar su concentración mínima inhibitoria 50 (CMI<sub>50</sub>) de dichas cepas en su estadio planctónico y biopelícula utilizando la misma metodología (XTT) para determinar la viabilidad de las cepas al enfrentarse a diversas concentraciones de antimicóticos (Nistatina, Fluconazol y Caspofungina).

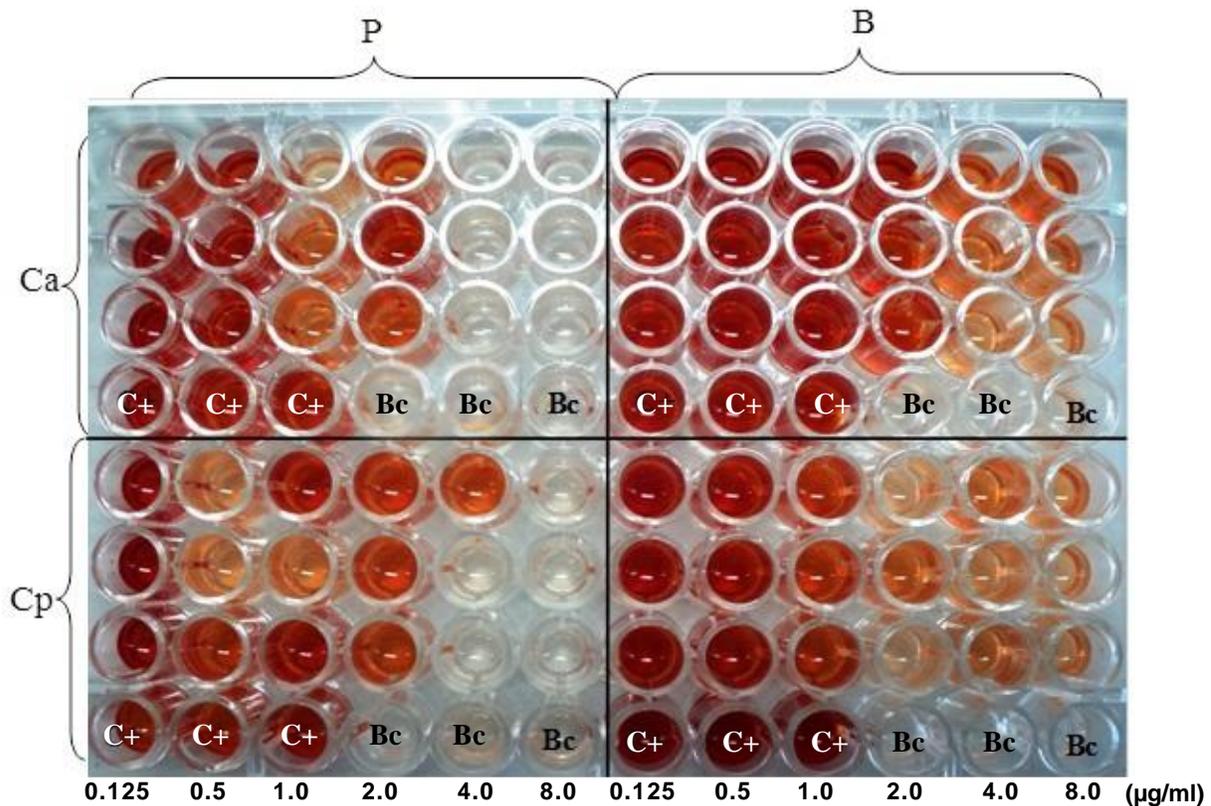


Imagen 16. Ensayo de sensibilidad *in vitro* a antifúngicos (Nistatina): P: Células planctónicas, B: Biopelículas (48h de maduración), C+: Control positivo, Bc: Blanco de reactivo. Ca: *C.albicans*, Cp: *C.parapsilosis*. Las concentraciones de Nistatina para cada columna se encuentran representadas en la parte inferior de la imagen ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

En la Imagen 15. Se muestra una placa de microtitulación de 96 pozos donde se realizó el ensayo de reducción con XTT que permite la detección de la actividad metabólica de las células vivas, comparando la resistencia de las especies de *Candida* contra nistatina en células planctónicas (P) y su homologas biopelículas (B) con 48 horas de maduración. Para cada muestra se le realizó el ensayo de sensibilidad a antifúngicos por triplicado. En cada placa de prueba se colocaron pocillos de control de esterilidad (Bc) y control de crecimiento (C+) por triplicado para asegurar la esterilidad y funcionamiento de la prueba.

El producto de la reducción del XTT se determinó espectrofotométricamente en el lector de microplacas (Awareness Technology Stat Fax® 3200 Microplate Reader) a una longitud de onda de 492nm. La técnica de reducción del XTT para determinar la CMI<sub>50</sub> también se realizó por triplicado para cada caso utilizando nistatina, fluconazol y caspofungina como agentes inhibitorios en las células en estado planctónico y en la biopelícula madura con 48h de incubación. Los resultados obtenidos se les realizó un tratamiento estadístico para la obtención de la CMI<sub>50</sub> a las cuales se encuentran representadas en la Tabla 4.

**Tabla 4. Actividad in vitro (µg/mL) de Nistatina, Fluconazol y Caspofungina sobre células planctónicas y biopelículas procedentes de cepas presentes en infecciones combinadas por especies de *Candida*.**

**Concentración Mínima Inhibitoria 50**

		Nis		Flu		Cas	
		<u>P</u>	<u>B</u>	<u>P</u>	<u>B</u>	<u>P</u>	<u>B</u>
<b>MC1</b>	<i>C. albicans</i>	0.5	0.5	256	>1024	0.06	0.25
	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	4	64	1024	0.06	0.25
<b>MC2</b>	<i>C. albicans</i>	1	4	256	>1024	0.06	0.5
	<i>C. parapsilosis</i>	0.25	0.5	256	>1024	0.12	0.5
<b>MC3</b>	<i>C. albicans</i>	1	4	256	>1024	0.03	0.06
	<i>C. parapsilosis</i>	2	2	>1024	>1024	0.06	0.12
<b>MC4</b>	<i>C. albicans</i>	4	4	256	256	0.03	0.03
	<i>C. parapsilosis</i>	2	8	256	256	0.03	0.06
<b>MC5</b>	<i>C. albicans</i>	1	4	256	256	0.03	0.03
	<i>C. krusei</i>	2	2	256	1024	0.03	0.12
<b>MG</b>		<b>1.071</b>	<b>2.462</b>	<b>256.0</b>	<b>675.5</b>	<b>0.045</b>	<b>0.121</b>

Nis: Nistatina, Flu: Fluconazol, Cas: Caspofungina. P: células planctónicas, B: biopelículas. MG: Media geometría, Concentración Mínima Inhibitoria 50: concentración del fármaco (µg/mL) para lograr una reducción igual o mayor al 50% de la densidad óptica comparada con el control positivo.



## DISCUSIÓN

Las infecciones de origen micótico cada vez más adquieren mayor importancia médica y el género *Candida* destaca dentro del grupo de las levaduras ya que en los últimos años se ha incrementado la incidencia de casos de candidiasis vulvovaginal (CVV) afectando a millones de mujeres en todo el mundo, siendo el tipo de vaginitis más común en Europa, Estados Unidos y en los países tropicales. (Luciene 2012) En México En el año 2009 la Secretaria de Salud catalogó a la candidiasis urogenital como una de las 20 principales causas de enfermedades transmisibles.

Debido a estudios recientes se sabe que las infecciones causadas por especies del género *Candida* están asociadas con la capacidad para formar biopelículas en una gama de diversos sitios anatómicos principalmente en el tracto urogenital femenino, a partir de esto se planteó inicialmente evaluar la capacidad de las levaduras para formar biopelículas como un factor contribuyente para la presencia y/o persistencia de CVV (Castrillón 2010; Ramage *et al* 2001; Douglas 2002)

Se recolectaron 61 muestras clínicas provenientes de unidades médicas y hospitales del Estado de México con diagnóstico presuntivo de candidiasis vaginal, dichas muestras fueron identificadas siguiendo la metodología del Diagrama 2. Dentro de este proceso se encontró que el 91.8% de las muestras presentaron una infección vaginal causada por una sola especie de *Candida* mientras que el restante 8.2% de las muestras presentaban dos especies de *Candida* como agentes causales de la infección (Grafico 1).

En trabajos realizados previamente con Torres Ma. L. (2014). En su proyecto de tesis: Determinación de la producción de biopelículas a partir de *Candida* aisladas de casos clínicos humanos, se estandarizó la técnica para la determinación de biopelículas, realizando modificaciones al método propuesto por Ramage *et al* (2001).

Las modificaciones se realizaron con la finalidad de obtener una técnica confiable y a un menor costo. Los cambios más notorios son la sustitución del medio de crecimiento RMPI-1640 por SDC demostrando que al sustituir dicho medio la formación de biopelícula no se ve afectada, así mismo se sustituyó el tipo de sistema de incubación fluido o con agitación por un sistema estático coincidiendo con lo descrito por Douglas (2002) en que la formación de una biopelícula no exhibe diferencias significativas en presencia o ausencia de la agitación (Douglas 2002).

En el proceso de determinación de biopelículas se encontró que el 96.7% de las cepas provenientes de muestras clínicas presenta la capacidad para formar una biopelícula sobre las placas de microtitulación de poliestireno (Gráfico 3) atribuido sus diversos factores de virulencia, principalmente a las adhesinas de las levaduras que permiten la interacción con mayor facilidad a superficies hidrófobas, no polarizadas como los plásticos (Castillón, 2010) (Blanco 2010).

En el proyecto de tesis realizado en conjunto con Torres (2014) se evaluó la viabilidad a las 24, 48 y 72 h de ensayo utilizando la cepa referencia *Candida albicans* ATCC 32354 como control positivo para la formación de biopelículas. Determinando que las 48 h es el tiempo óptimo para evaluar la viabilidad de la biopelícula madura, coincidiendo en la literatura que a las 24 h las biopelículas no alcanzan la madurez necesaria, y por el contrario se le atribuye una disminución en la viabilidad a las 72 h pudiéndose presentar la fase de dispersión donde las células adheridas en la biopelículas empiezan a desprenderse para iniciar un nuevo ciclo de colonización. (Castillon2005; Peman, 2008; Wander, 2008)

Este método de reducción con XTT demostró ser eficaz y reproducible, en el cual se forman biopelículas sobre microplacas estériles de poliestireno con fondo plano de 96 pozos. Permite un análisis semicuantitativo y colorimétrico de la actividad metabólica de las células, utilizando una sal de tetrazolio (XTT) el cual es un compuesto incoloro o ligeramente amarillo que únicamente es reducido por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas inmersas dentro de la biopelícula.

Este cambio de color se lleva a cabo por romperse el anillo de tetrazol cuaternario cargado positivamente (Imagen 14). La forma reducida del XTT presenta una coloración naranja soluble en agua dándole la propiedad de determinarse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 492nm y se puede utilizar en ensayos en tiempo real. (American Type Culture Collection, 2011; Valentín, 2007).

Una vez identificadas las muestras clínicas y corroborando que la gran mayoría fue capaz de formar biopelículas se procedió a trabajar exclusivamente con las 5 muestras que presentaron dos especies como agentes causales de la infección. Como se muestra en la Tabla 2, se logró el aislamiento de 3 especies del genero *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*), llamando la atención que en cada caso se encontraba *C. albicans* asociado con otra especie no albicans ya sea *C. parapsilosis* (Muestras 1 a 4) o con *C. krusei* (Muestra 5) que en los últimos años dichas especies no-albicans han emergido como agentes importantes con una incidencia de aislamientos cada vez mayor. (Douglas, 2002)

Con respecto a la presencia de la especie *C. albicans* en todos los casos con infección combinada se coincide con varios autores al mencionar que *C.albicans* es actualmente una de las infecciones más frecuentes causada por hongos debido la presencia de varios factores de virulencia que le confieren la capacidad de colonizar y ocasionar daño al hospedero. Dado a nuestro elevado número de aislamientos de la especie *C. albicans* se coincide con Castañón (2012) mencionando a *C. albicans* como es la especie más comúnmente asociada a cuadros clínicos infecciosos con una incidencia igual o superior al 50% del total de casos (Gráfico 2), siendo reconocida como la especie más patogénica dentro de este género, además se ha demostrado en trabajos previos que su capacidad de formación de hifas y pseudohifas de dicha especie favorece la formación, desarrollo y mantenimiento de biopelículas. (Castrillón, 2005)

Cada una de las especies implicadas en las infecciones combinadas fueron sometidas método de reducción XTT a determinar su capacidad de formación de biopelículas de manera individual encontrando que todas presentan capacidad de formación de biopelícula a las 48h de incubación (Gráfico 4), identificando que la gran mayoría de las cepas presentaron una alta producción de biopelícula, únicamente las cepas pertenecientes a la muestra 2 (*C. albicans*, *C. parapsilosis*) presentaron una capacidad media para la formación de biopelículas. Este resultado tan positivo se esperaba encontrar ya que como menciona Peman (2006) se estima que aproximadamente un 65% de las infecciones humanas están relacionadas con la formación de biopelículas, siendo *C. albicans* y *C. parapsilosis* las especies que más frecuentemente forman biopelículas.

Una vez comprobada la capacidad de formación de biopelículas a las 48 horas de las 10 cepas presentes en infecciones vaginales combinadas se procedió evaluar la capacidad de resistencia y/o sensibilidad de las cepas en estado planctónico y biopelícula dado a que una de las más importantes consecuencias que conlleva el desarrollo de la biopelícula es la resistencia a diversos agentes antifúngicos al ser retadas contra antimicóticos de diversos grupos utilizando la misma metodología (XTT) para determinar la viabilidad de las cepas al enfrentarse a diversas concentraciones de antimicóticos (Nistatina, Fluconazol y Caspofungina) los cuales fueron elegidos por varios motivos como:

- Nistatina y Fluconazol son de los antifúngicos más utilizados para el tratamiento de candidosis.
- La caspofungina es una equinocandina de nueva generación
- Pertenecen a diferentes grupos de antifúngicos presentando mecanismos de acción diferentes para la erradicación de las levaduras
- correlacionar la actividad antifúngica y antibiopelícula con el mecanismo de acción que presentan los fármacos.

Para determinación de la resistencia a los antimicóticos de las cepas antes mencionadas se buscó la concentración más baja del fármaco ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) requerida para lograr una reducción igual o mayor al 50% de la densidad óptica comparada con el control positivo (incubación de levaduras en ausencia de antimicóticos), esto equivale a una concentración mínima inhibitoria 50 ( $\text{CMI}_{50}$ ) ya que se logra la eliminación del 50% del total de la población de células inmersas en la biopelícula comparadas con el control positivo. (Kuhn, 2002)

En el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos en las células planctónicas y biopelículas se realizó utilizando la metodología de reducción XTT apegándonos a lo estipulado por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) en el documento M27-A2 (Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts). La determinación se realizó por triplicado para cada concentración de antifúngico probado incluyendo siempre pocillos de control de esterilidad y control de crecimiento.

La actividad *in vitro* presentada por las biopelículas con 48h de maduración de las 10 cepas exhibieron una mayor resistencia contra los tres antifúngicos utilizados, presentando una  $\text{CMI}_{50}$  igual o superior con respecto al estadio planctónico (tabla 4).

La nistatina es uno de los principales agentes antifúngicos utilizados en el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal (Fernández, 2001) siendo esta una de las razones principales para probar su eficacia contra los diferentes estadios de *Candida*. Respecto a los resultados de sensibilidad *in vitro* con nistatina sobre las células planctónicas la  $\text{CMI}_{50}$  obtenida oscilo entre 0.25 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  obteniendo una media geométrica (MG) de 1.071  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , dichos resultados obtenidos son muy similares encontrados por Kuhn, 2002 (0.5 a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y Fernández (2001) (0.5-8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), estos resultados no indican que la nistatina a pesar de ser uno de los primeros fármacos utilizados continua siendo eficaz contra las levaduras en estado planctónico.

Para el caso de la actividad *in vitro* de nistatina contra las biopelículas de *Candida* con 48h de maduración los valores de la CMI<sub>50</sub> oscilaron entre 0.5 y 8 µg/mL con una MG de 2.462 µg/mL requiriendo una concentración 2.2 veces más alta para lograr la eliminación del 50% del total de la población de células inmersas en la biopelícula, exhibiendo un efecto inhibitor dependiente de la concentración en para la eliminación de las biopelículas de *Candida*. Esta resistencia es atribuida a varios factores, uno es la penetración restringida del polieno a través de la matriz extracelular de la biopelícula, actuando como una barrera física que impide el contacto del antimicótico con las células de *Candida*.

Por consiguiente la nistatina no tendría el efecto deseado sobre las levaduras ya que su mecanismo de acción se basa en la unión irreversible a los esteroides (ergosterol) de membrana de *Candida* para generar inestabilidad en la célula. Además otros autores han mencionado que la formación de biopelículas se asocia con la adopción de diferentes fenotipos algunos de estos relacionados con una disminución de ergosterol entre un 41 y 50%, comparado con el contenido presente en las fases iniciales de la biopelícula, teniendo como consecuencia una disminución en la actividad antifúngica de la nistatina contra las biopelículas. (Pranab, 2004)

Los azoles son un grupo de fármacos fungistáticos en donde uno de los más utilizados contra candidosis es el Fluconazol el cual se probó su actividad *in vitro* contra las células planctónicas de *Candida* encontrando una CMI<sub>50</sub> que oscila entre 64 y >1024 µg/mL con una MG de 256 µg/mL, dichas cepas presentan una resistencia intrínseca al fluconazol, catalogándolas así de acuerdo a lo mencionado por López (2004) el cual estipula que las cepas son resistentes al fluconazol con valores por encima de ≥64 µg/mL. Las concentraciones obtenidas en el experimento se encuentran muy por encima al ser comparados con lo encontrado con otros autores (8 µg/mL). Concordando en este caso con el trabajo reportado por Perea, al encontrar un gran porcentaje de aislamientos de *Candida*

resistentes al fluconazol que en el caso del autor antes mencionado fue del 22% de los pacientes evaluados. Estos casos de resistencia se propone que son por alteraciones en la enzima diana (14-a-esterol desmetilasa), derivadas tanto de la sobreexpresión y mutación de los genes que la codifican (*ergG11*), originando sustituciones en aminoácidos, disminuyendo con ello la afinidad de la enzima por los azoles así como también propone una sobreexpresión de transportadores activos de membrana que disminuyen la concentración intracelular de los azoles. (Gonzalez, 2010; Perea, 2000)

Con respecto a la actividad *in vitro* del fluconazol contra las biopelículas se identificó que la  $CMI_{50}$  se encuentra entre 256 y >1024  $\mu\text{g/mL}$  con una MG de 675.5, requiriéndose una concentración 2.6 veces más alta para lograr el mismo efecto antifúngico en comparación con sus homologas en estado libre. En donde además de la resistencia intrínseca de las levaduras, la biopelícula actúa de igual modo como se mencionó anteriormente al ser una barrera que impide el acceso del fluconazol a las levaduras, dado a que el efecto del fluconazol es fungistático como la gran mayoría de los azoles es de esperarse que la biopelícula logre mantener su arquitectura y viabilidad aunque con ligera afectación de las células inmersas en esta, siendo este fármaco poco eficaz contra las cepas retadas en estadio planctónico y biopelículas. (Wander, 2012)

Las equinocandinas son el más reciente grupo de antifúngicos sintetizados, por lo cual es importante evaluar su capacidad de eliminar tanto a las células planctónicas como a las biopelículas, dichos antifúngicos son lipopéptidos sintéticamente modificados, dentro de los más destacados de este grupo se encuentra la anidulafungina y las caspofungina, siendo este último el fármaco utilizado en el desarrollo experimental, el cual obtuvo una  $CMI_{50}$  que osciló en una concentración de 0.003 y 0.12  $\mu\text{g/mL}$  con una MG de (0.045  $\mu\text{g/mL}$ ), obteniendo muy buenos resultados, siendo que las 10 cepas probadas presentaron una sensibilidad para este fármaco de acuerdo con lo estipulado por Lopez (2004) el

cual menciona a las cepas son sensibles a caspofungina con una concentración  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ .

Para el caso de la actividad *in vitro* de la caspofungina contra las biopelículas de *Candida* se obtuvo que la  $\text{CMI}_{50}$  se encuentra entre 0.003 y 0.5  $\mu\text{g/mL}$  con una MG de 0.121  $\mu\text{g/mL}$ , requiriéndose una concentración 2.6 veces más alta para lograr el mismo efecto antifúngico en comparación con sus homologas en estado libre. Como era de esperar se también se requirió una concentración más elevada del antifúngico para tener un efecto contra las células inmersas en la biopelícula, pero en este caso aun esta concentración de la MG (0.121  $\mu\text{g/mL}$ ) continua siendo por debajo de los 2  $\mu\text{g/mL}$  lo cual indica que todas las cepas formadoras de biopelículas con 48h de maduración aún son sensibles a la actividad antifúngica de la caspofungina.

Dicho efecto positivo contra las biopelículas de *Candida* se podría deber en cierto sentido a su mecanismo de acción, este fármaco ejerce su actividad antifúngica inhibiendo la enzima 1,3- $\beta$ - D- glucano sintetasa de la pared celular, teniendo como consecuencia una disminución en las glucanas las cuales son un componente básico de la pared de diversos hongos, provocando como consecuencia la lisis de la célula. Dado que el sitio diana de la nistatina y el fluconazol es esencialmente sobre la membrana celular al inhibir o evitar la formación de ergosterol no ejercen la misma actividad fungicida como es el caso de la caspofungina que actúa sobre los componentes de la pared celular (glucanas) siendo esta la estructura que confiere mayor estabilidad y rigidez a las levaduras en comparación con la membrana celular, encontrando así comprensible que la equinocandina tenga mejor resultado a menores concentraciones. (Bonifaz, 2009; Catalán, 2006; Diomedi, 2004; Mendoza, 2008)

Además de que se ha comprobado en trabajos realizados por Kuhn que en la matriz extracelular (MEC) de las biopelículas de *Candida* el contenido de carbohidratos totales es de aproximadamente 153mg/g y llega a contener polisacáridos provenientes de la pared celular, por lo que se plantea la hipótesis de que el fármaco actué también alterando la estabilidad de la biopelícula al proporcionar menos carbohidratos a la MEC.

A partir de los datos arrojados de la sensibilidad *in vitro* contra las biopelículas con 48h de maduración y células planctónicas podemos decir que la nistatina tiene una buena actividad contra las levaduras en estado planctónico al requerir 1.071 µg/ml para alcanzar la CMI<sub>50</sub>, sin embargo se requirió una concentración mucho más elevada para lograr la CMI<sub>50</sub> contra las biopelículas, teniendo en este caso una actividad media antibiopelícula.

Para el caso del fluconazol mostró tener poca o nula actividad antifúngica y antibiopelícula contra las 10 cepas retadas al fármaco, siendo que en algunos casos no se logró alcanzar la CMI<sub>50</sub> ni siquiera a la concentración más alta a la que se expusieron las biopelículas (>1024 µg/mL). Con lo que podemos afirmar que este fármaco no una opción viable para la eliminación de *Candida* ya que la utilización de este fármaco a tan elevadas concentraciones podría dar pie a que se presenten efectos adversos en el paciente y el más importante de estos es el daño hepático con complicaciones de toxicidad severa. No solamente el fluconazol ha mostrado tener poco efectos contra las biopelículas ya que en trabajos reportados por Kuhn (2002) demuestran que en general los azoles carecen de actividad fungicida para eliminar las biopelículas de *Candida*. Dado a que los azoles es un grupo de fármacos muy utilizados contra candidosis da pie a que en algunos casos de candidiasis vulvovaginal se presente una persistencia al tratamiento y pueda darse casos de candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR).

La caspofungina presento una muy buena actividad antifúngica y antibiopelícula contra las 10 cepas retadas siendo el 100% de estas sensibles al fármaco aun en las biopelículas maduras con 48h de incubación, siendo una nueva alternativa para el tratamiento de las candidiasis que promete ofrecer resultados alentadores contra la CVV que cada vez adquiere mayor importancia medica ya que en últimos años se ha incrementado su incidencia siendo que cerca del 40% de CVV vuelve a presentar otro episodio en el futuro, además el 5% desarrolla candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR). (Luciene, 2012)

Las CVV causadas por dos especies diferentes de Candida, representaron un porcentaje bajo pero no por eso carente de importancia pues esta podría ser un posible factor para presentar el cuadro clínico de vaginitis, así como una reincidencia o resistencia de la infección al tratamiento.



## CONCLUSIONES

A partir de la recolección e identificación de 61 muestras clínicas provenientes de clínicas y hospitales del Estado De México con diagnóstico presuntivo de candidiasis vaginal, se identificó que el 8.2% de las muestras presentaron una infección combinada por dos especies de *Candida*.

La capacidad de producir biopelículas se presentó en el 97% de los aislamientos clínicos con diferencia en su capacidad de formación de dicha estructura, demostrando que las infecciones vulvovaginales causadas por el género *Candida* están relacionadas con la capacidad de formación de biopelícula.

Las cepas provenientes de una infección combinada con dos especies de *Candida* presentaron una alta producción de biopelículas a las 48 de incubación. Presentándose la especie *C.albicans* en todos los casos en combinación con otra especie.

En el presente estudio se logró demostrar que la formación in vitro de biopelículas con 48h de maduración es un factor que confiere mayor resistencia contra los agentes antifúngicos ensayados (Fluconazol, Nistatina y Caspofungina) en comparación con el estadio planctónico. Siendo el Fluconazol el antifúngico de menor eficacia contra la biopelícula aun en las concentraciones más elevadas del ensayo (>1024µg/mL).

La nistatina a pesar de ser uno de los antifúngicos más antiguos exhibe un efecto inhibitor contra la biopelícula logrando su eliminación a una concentración aproximada de 2.462 µg/mL.

El estudio de sensibilidad *in vitro* demostró que la Caspofungina fue el fármaco que presentó mejor actividad antifúngica y antibiopelícula alcanzando la CMI<sub>50</sub> de las biopelículas maduras con 48h de incubación en el 100% de los casos a una concentración de 0.121 µg/mL, encontrándose por debajo del rango de resistencia (2 µg/mL) y a una menor concentración comparado con los demás antifúngicos ensayados, siendo las equinocandinas una nueva opción terapéutica para el tratamiento de las CVV sobre todo en aquellas que presenten resistencia a los fármacos convencionales.

## Bibliografía

1. American Type Culture Collection. (2011). XTT Cell Proliferation Assay Kit. [En línea] Consultado: [17, Mayo, 2013]. Disponible en: <http://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>.
2. Aguilera, L. (2009). Estudio de Pga26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. Tesis doctoral no publicada. Universidad de Valencia, Departamento De Microbiología y Ecología, España.
3. Arenas R. (2011). Micología Médica Ilustrada, México: Mc Graw Hill.
4. Ausina, V. Moreno, S., (2005). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 1st ed. Buenos Aires: Medica Panamericana.
5. Blanco, Ma. T. et al. (2010). La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulencia en *Candida albicans*. Revista Iberoamericana de Micología. 27 (4), 195-199.
6. Bonifaz A. (2010). Micología Médica, México: Mc Graw Hill. pp. 279-300.
7. Calderone R. (2002). *Candida and Candidiasis*. ESM Press. Washington, D.C
8. Castañón Olivares L. (2012). Candidiasis ó Candidosis, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Recuperado el día 10 de abril Del 2013.

9. Castrillón Rivera, L. E., Palma Ramos, A., & Padilla Desgarenes, C. (2005), Factores de Virulencia de Candida sp. Revista Mexicana de Dermatología, 49 (1), 12-27.
10. Castrillón Rivera, L. E., Palma Ramos, A., & Padilla Desgarenes, M. (2010). Importancia de las Biopelículas en la Práctica Médica. Revista Mexicana de Dermatología. 54 (1), 14-24.
11. Catalán, M. Montejo, J.C, (2006). Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. Revista Iberoamericana de Micología. 39 (23), pp.39-49.
12. Diomedi, A, (2004). Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. Revista Chilena De Infectología. 21 (2), pp.89-101.
13. Douglas J, L. (2002) Medical importance of biofilms in Candida infections. Revista Iberoamericana de Micología. 19: 139-143.
14. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Fluconazol. [En línea]. Consultado: [05, enero, 2014]. Disponible en: [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/Fluconazol.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Fluconazol.htm)
15. Fernández, C. (2001). Sensibilidad in vitro a la nistatina de aislamientos vaginales de Candida spp. Revista Cubana de Medicina Tropical. 53(3):194-198.
16. González, M.a. et al, (2004). Fundamentos de Medicina: Manual de Terapéutica. 11a ed. Colombia: Corporación de Investigaciones Biológicas.
17. Gómez, C. (2010). Resistencia de levaduras del género Candida al fluconazol. Revista Infectio. 14(2):172-180.

18. Ibarra, C. Villar, M. (2012). Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Revista Iberoamericana de Micología. 2 (3), pp.1-9.
19. Klaus Wolff et.al, (2009). Dermatología en Medicina General. 7th ed. Buenos Aires: Medica Panamericana.
20. Koneman, E. et al. (2008) Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color. (6Ed) Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. p. 1171.
21. Kuhn, D. (2002). Antifungal Susceptibility of Candida biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and equinocandins. Antimicrobial agents and chemotherapy. 46 (6), 1773-1780.
22. Levinson, W., Jaewtz, E, (2000). Microbiología e Inmunología: Autoevaluación y Repaso. 2nd ed. México: El Manual Moderno.
23. López Martínez, R, (2004). Micología Medica: Procedimientos Para El Diagnóstico de Laboratorio. 2nd ed. México: Trillas.
24. Lucile, C. et al. (2012). Assessment of in vitro biofilm formation by Candida species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. Micron. 43, 497-502.
25. Mendoza Patiño, N. (2008). Farmacología médica. México: Medica Panamericana.
26. Pemán J. (2007) Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Revista Iberoamericana de Micología, cap 11.27.
27. Pemán J. Cantón, E. & Valentín A. (2008). Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de Candida. Revista Iberoamericana de Micología 25, 124-128.

28. Perea, S. (2000). Resistencia de *Candida albicans* a los azoles. *Revista Española de Quimioterapia*. 13 (3). [En línea]. Consultado: [17, Mayo, 2013]. Disponible en: [http://www.seq.es/seq/html/revista\\_seq/0300/short1.html](http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0300/short1.html)
29. Pranab K. Mukherjee. (2004) *Candida* biofilm resistance. *Drug Resistance Updates*. 7, 301-309.
30. Quindós G, & Villar M. (2009). Actividad de la micafungina contra las biopelículas de *Candida*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26 (1), 49-95.
31. Ramage G., & Vande Walle, K. (2001) Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 18, 163-170.
32. Ramage G., & Saville, S. (2005) *Candida* Biofilms: an Update. *American Society for Microbiology*. 4 (4), 633- 638.
33. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Información Epidemiológica De Morbilidad: Anuario 2009. [En línea]. Consultado: [31, Enero, 2013]. Disponible en: [http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/ANUARIOS/INF\\_EP\\_ID\\_MORBI\\_2009\\_VER\\_EJEC.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/ANUARIOS/INF_EP_ID_MORBI_2009_VER_EJEC.pdf).
34. Torres Ma. L. (2014). Determinación de la producción de biopelículas a partir de *Candida* aisladas de casos clínicos humanos. Tesis no publicada. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
35. Valentín, A., & Cantón, E. (2007). Actividad in vitro de la anfotericina B y la anidulafungina sobre Biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24, 272-277.

36. Velázquez, L. (2008). Farmacología Básica y Clínica. 18th ed. Buenos Aires: Medica Panamericana.

37. Wander, J. et al. (2012). Exopolisaccharide matrix of developed *Candida albicans* biofilms after exposure to antifungal agents. Brazilian Dental Journal. 23 (6), 716-722.

# Anexos

## 11.1 Anexo 1: Medios de cultivo y conservación de hongos

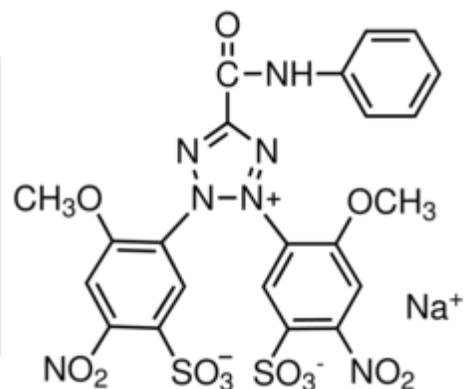
<p><b>Agar Dextrosa Sabouraud® BDBioxon</b> Fórmula aproximada para 1000 mL de agua purificada.</p> <table border="0"> <tr><td>Agar</td><td>15.0 g</td></tr> <tr><td>Dextrosa</td><td>40.0 g</td></tr> <tr><td>Peptona de carne</td><td>5.0 g</td></tr> <tr><td>Peptona de caseína</td><td>5.0 g</td></tr> </table> <p>pH final 5.6 ± 0.2</p>	Agar	15.0 g	Dextrosa	40.0 g	Peptona de carne	5.0 g	Peptona de caseína	5.0 g	<p><b>Caldo Dextrosa Sabouraud</b> Fórmula aproximada para 1000 mL de agua purificada.</p> <table border="0"> <tr><td>Dextrosa®BDBioxon</td><td>40 g</td></tr> <tr><td>Peptona de carne ®BDBioxon</td><td>5.0 g</td></tr> <tr><td>Peptona de caseína ®BDBioxon</td><td>5.0 g</td></tr> </table> <p>pH 5.6 ± 0.2</p>	Dextrosa®BDBioxon	40 g	Peptona de carne ®BDBioxon	5.0 g	Peptona de caseína ®BDBioxon	5.0 g		
Agar	15.0 g																
Dextrosa	40.0 g																
Peptona de carne	5.0 g																
Peptona de caseína	5.0 g																
Dextrosa®BDBioxon	40 g																
Peptona de carne ®BDBioxon	5.0 g																
Peptona de caseína ®BDBioxon	5.0 g																
<p><b>YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)</b> Formula aproximada para 1000 mL de agua purificada.</p> <table border="0"> <tr><td>Extracto de levadura ®DIFCO</td><td>10 g</td></tr> <tr><td>Peptona bacteriológica ®DIFCO</td><td>20 g</td></tr> <tr><td>Dextrosa®BDBioxon</td><td>20 g</td></tr> </table> <p>pH 7.4 ± 0.2</p>	Extracto de levadura ®DIFCO	10 g	Peptona bacteriológica ®DIFCO	20 g	Dextrosa®BDBioxon	20 g	<p><b>CHROMagar Candida ®Becton, Dickinson and Company</b> Fórmula: gramos por litro de agua.</p> <table border="0"> <tr><td>Cromopeptona</td><td>10.0g</td></tr> <tr><td>Glucosa</td><td>20.0g</td></tr> <tr><td>Mezcla cromógena</td><td>2.0g</td></tr> <tr><td>Cloramfenicol</td><td>0.5g</td></tr> <tr><td>Agar</td><td>15.0g</td></tr> </table> <p>pH 5.9± 0.2</p>	Cromopeptona	10.0g	Glucosa	20.0g	Mezcla cromógena	2.0g	Cloramfenicol	0.5g	Agar	15.0g
Extracto de levadura ®DIFCO	10 g																
Peptona bacteriológica ®DIFCO	20 g																
Dextrosa®BDBioxon	20 g																
Cromopeptona	10.0g																
Glucosa	20.0g																
Mezcla cromógena	2.0g																
Cloramfenicol	0.5g																
Agar	15.0g																
<p><b>Infusión de cerebro y corazón® BIDICO</b> Formula: Gramos por litro de Agua destilada</p> <table border="0"> <tr><td>Cloruro de sodio</td><td>5.0 g</td></tr> <tr><td>Dextrosa</td><td>2.0 g</td></tr> <tr><td>Fosfato disodico</td><td>2.5 g</td></tr> <tr><td>Infusión de cerebro de ternera</td><td>7.7 g</td></tr> <tr><td>Infusión de corazón de res</td><td>9.8 g</td></tr> <tr><td>Peptona de gelatina</td><td>10.0 g</td></tr> </table> <p>pH 7.4 ± 0.2</p>	Cloruro de sodio	5.0 g	Dextrosa	2.0 g	Fosfato disodico	2.5 g	Infusión de cerebro de ternera	7.7 g	Infusión de corazón de res	9.8 g	Peptona de gelatina	10.0 g					
Cloruro de sodio	5.0 g																
Dextrosa	2.0 g																
Fosfato disodico	2.5 g																
Infusión de cerebro de ternera	7.7 g																
Infusión de corazón de res	9.8 g																
Peptona de gelatina	10.0 g																



## 11.2 Anexo 2: Reactivos

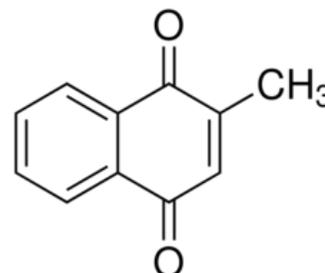
### XTT Sal de sodio ®SIGMA-ALDRICH

<b>Sinónimo:</b> 2,3-Bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida	<b>Formula:</b> C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>13</sub> S <sub>2</sub>
<b>Peso molecular:</b> 673.52	<b>Pureza:</b>



### Menadiona ®SIGMA-ALDRICH

<b>Sinónimos:</b> 2-metil-1,4-naftoquinona, Vitamina K3	<b>Formula:</b> C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
<b>Peso molecular:</b> 172.18	<b>Pureza:</b> ≥ 97.0%



### Phosphate Buffered Saline ®SIGMA-ALDRICH

<b>Sinónimos:</b> PBS	Disolver una tableta en 200mL de agua desionizada Buffer de fosfatos                      0.01 M Cloruro de potasio                      0.0027 M Cloruro de sodio                         0.137 M
	pH 7.4, a 25 °C.



## 11.3 Anexo 3: Equipos

### Lector de microplacas 3200: Awareness Technology Stat Fax®

**Especificaciones:** Unidad de lectura completamente automático equipado con lentes bicromaticos. El lector es ideal para uso en diagnóstico in-vitro, ya que calcula los resultados de ensayos colorimétricos de punto final.

Pantalla	128x64 pixel- graphic LCD display
Requerimientos de energía	115V o 230V AC-50-60Hz (seleccionable por interruptor)
Medición	-0,20 A 3,0 unidades de absorbancia (A)
Precisión fotométrica	+ / - 1 por ciento o mejor
Fuente de luz	Lámpara de tungsteno con modo ahorro de energía
Longitudes de onda	405 a 450 - 492 y 630 nm
Dimensiones	17 x 14.5 x 7
Peso	22 libras

### 16M Microcentrifuga: Spectrafuge™

**Especificaciones:** Microcentrifuga compacta de alta velocidad, un flujo continuo de aire ambiente a través de la cámara del rotor mantiene el rotor y las muestras frescas. Para aplicaciones que requieren temperaturas sub-ambiente, el™ 16M Spectrafuge puede ser operado en una habitación fría.

Rango de velocidad	1.000 rpm a 14.000 rpm
Máximo RCF	16.000 xg
Número máximo	18 tubos de 1.5/2.0 mL
Timer	1-30 min o botón continuo, "rápido" para la operación momentánea
Radio de acción ambiental	4 ° a 35 ° C
Dimensiones (W x D x H)	8.25 x 8.9 x 7.6 in/21 x 23 x 19.3 cm
Peso	10 lb/4.5 kg
Eléctrico	~ 230V o 120V ~, 50/60 Hz



## 11.4 Anexo 4: Disposición de residuos

### R1: medios de cultivo y materiales desechables

Esterilizar el material por medio de calor húmedo en bolsas bien cerradas, utilizando autoclave, sometiendo los materiales a 121°C con 15 libras de presión durante 30 minutos- las cajas petri y otros dispositivos de plástico no reusables quedaran “irreconocibles”, una vez en esta condición se podrán disponer en la basura común.

### R2: material de laboratorio contaminado con muestra biológica (puntas, tubos de ensayo, placas de poliestireno)

Colocar durante 1 hora en un recipiente con benzal al 1%, posteriormente esterilizar el material por medio de calor húmedo en bolsas bien cerradas, utilizando autoclave, sometiendo los materiales a 121°C con 15 libras de presión durante 15 minutos, transferir el material a un recipiente con hipoclorito de sodio durante 1 hora, lavar finalmente con detergente y almacenarlo.

### R3: material desechable no contaminado de residuos biológicos (guantes, toallas). Disponer dicho material en la basura común identificado con bolsas negras.