



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTILÁN**

**COMPARACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE  
AISLADOS CLÍNICOS DE *Candida albicans* RECUPERADOS DE  
VARIAS ZONAS ANATÓMICAS EMPLEANDO LAS TÉCNICAS DE  
MICROSCOPIA, VIABILIDAD CELULAR Y CRISTAL VIOLETA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
PRESENTA:**

**JOSÉ ROBERTO HERNÁNDEZ PÉREZ**

Asesor: Dra. María Leonor Quintero Mora  
Coasesor: Dr. Carlos Gerardo García Tovar

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



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.



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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
 PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
 Jefa del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS

Comparación de la formación biopelículas de aislados clínicos de Candida albicans recuperadas de varias zonas anatómicas empleando las técnicas de Microscopía: viabilidad celular y cristal violeta

Que presenta el pasante: José Roberto Hernández Pérez  
 Con número de cuenta: 40606477-6 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE  
 “POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”  
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de diciembre de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	Dra. María Leonor Quintero Mora	
1er SUPLENTE	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	
2do SUPLENTE	MVZ. Socorro Sandra Martínez Robles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
 HHA/pm

## 2. ÍNDICE GENERAL

	Página
1. ÍNDICE GENERAL	I
2. RESUMEN	IV
3. ÍNDICE DE TABLAS	V
4. LISTA DE FIGURAS	VI
5. LISTA DE ABREVIATURAS	VII
6. INTRODUCCIÓN	1
6.1 Características de <i>Candida albicans</i> .	3
6.2 Identificación de <i>Candida albicans</i> .	4
6.3 Enfermedades producidas por <i>Candida albicans</i> .	7
6.4 Datos epidemiológicos.	10
6.5 Factores de virulencia.	11
6.6 Biopelículas.	11
6.7 Cuantificación de biopelículas con Cristal Violeta y viabilidad celular (reducción del XTT).	13
7. JUSTIFICACIÓN	16
8. HIPÓTESIS	17
9. OBJETIVO GENERAL	17
10. OBJETIVOS PARTICULARES	18
11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19

<b>12.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
	<b>12.1</b> Cepas empleadas.	<b>20</b>
	<b>12.2</b> Cultivo de <i>Candida albicans</i> .	<b>21</b>
	<b>12.3</b> Formación de biopelículas.	<b>21</b>
	<b>12.4</b> Evaluación con cristal violeta.	<b>22</b>
	<b>12.5</b> Evaluación por microscopía.	<b>22</b>
	<b>12.6</b> Ensayo de viabilidad celular (reducción del XTT).	<b>23</b>
	<b>12.7</b> Análisis estadístico.	<b>25</b>
<b>13.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>27</b>
	<b>13.1</b> Evaluación por microscopía.	<b>27</b>
	<b>13.2</b> Evaluación por cristal violeta.	<b>32</b>
	<b>13.3</b> Ensayo de viabilidad celular (reducción del XTT).	<b>35</b>
<b>14.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
<b>15.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>46</b>
<b>16.</b>	<b>ANEXO</b>	<b>47</b>
	<b>16.1</b> Preparación del cristal violeta.	<b>47</b>
	<b>16.2</b> Preparación de medio YPD.	<b>47</b>
	<b>16.3</b> Preparación de PBS.	<b>47</b>
<b>17.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>48</b>

## 1. RESUMEN

Muchas de las candidiasis se encuentran asociadas a la formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis dentales, prótesis de válvulas cardíacas y otros dispositivos biomédicos. Para *Candida albicans* éste se considera un importante factor de virulencia. Comprender mejor el comportamiento de las biopelícula es de gran importancia para desarrollar medidas preventivas eficaces y diseñar fármacos más efectivos.

El objetivo de este trabajo fue comparar la formación de biopelículas de 27 cepas de *Candida albicans* empleando las técnicas de microscopía óptica, viabilidad celular (reducción del XTT) y cristal violeta, con la finalidad de evaluar por un lado, si esta capacidad está relacionada con el sitio anatómico del que proviene y por otro lado, nos permitirá clasificar las cepas de acuerdo a su capacidad (alta, baja y media) de formación de biopelículas.

En este trabajo se logró estandarizar el crecimiento de biopelículas empleando como soporte placas de poliestireno de 96 pozos. La capacidad de formación de biopelículas de cada cepa fue evaluada por los tres métodos mencionados, encontrando que de las 27 cepas analizadas 7 fueron clasificadas con alta capacidad de formación de biopelículas al igual que la cepa de referencia, 10 con media capacidad y 10 con baja.

En ninguno de los tres métodos se logró demostrar relación alguna entre el origen anatómico y la capacidad para formar biopelícula.

### 3. ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>PÁGINA</b>
Tabla 1	Principales aportaciones en el estudio de <i>Candida albicans</i>	2
Tabla 2	Clasificación Taxonómica de <i>Candida albicans</i>	3
Tabla 3	Características fisiológicas para la identificación de <i>Candida</i>	6
Tabla 4	Cepas empleadas y origen anatómico	20
Tabla 5	Datos de la curva de calibración para el ensayo con XTT	24
Tabla 6	Capacidad relativa de las cepas de <i>Candida albicans</i> para formar biopelícula por el método de microscopía	29
Tabla 7	Capacidad relativa de las cepas de <i>Candida albicans</i> para formar biopelícula por el método de CV	33
Tabla 8	Capacidad relativa de las cepas de <i>Candida albicans</i> para formar biopelícula por el método de XTT	36

## 4. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
Figura 1	Morfología colonial característica de <i>Candida albicans</i> al crecer sobre medio SDA	4
Figura 2	Cuadro de la clasificación de la candidiasis	8
Figura 3	Reacción de reducción del XTT a formazán	15
Figura 4	Fotografía de una biopelícula con una cuadrícula de 25x25	23
Figura 5	Curva de calibración para el ensayo de XTT	25
Figura 6	Fotografías representativas de las diferentes capacidades para formar biopelícula	28
Figura 7	Comparación del porcentaje de superficie cubierta de las cepas ordenadas de mayor a menor.	31
Figura 8	Comparación del porcentaje de superficie de superficie cubierta de las cepas. Ordenadas de acuerdo al origen anatómico.	31
Figura 9	Comparación de la capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula por el método de CV ordenadas de mayor a menor.	34
Figura 10	Comparación de la capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula por el método de CV. Ordenadas por origen anatómico.	34
Figura 11	Comparación de la capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula por el método de reducción del XTT. Ordenadas de mayor a menor.	37
Figura 12	Comparación de la capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula por el método de reducción de XTT ordenadas por origen anatómico.	37
Figura 13	Ensayo de reducción del XTT en microplaca	38
Figura 14	Comparación de los 3 métodos respecto al porcentaje de cepas clasificadas en cada grupo.	39



## 5. LISTA DE ABREVIATURAS

Abs :	Absorbancia
ATCC :	Colección de Cultivos Tipo de E.U. (del inglés American Type Culture Collection)
CV :	Cristal violeta
ELISA :	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
EtOH :	Etanol
MI :	Microscopio Invertido
XTT :	Ácido (sodio 3'-{(1-fenilamino-carbonil)-3,4-tetrazolio}-bis (4-metoxi-6-nitro) bencenosulfónico hidrato).
PBS :	Solución amortiguadora de fosfatos
YPD :	Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa
RPMI :	Medio del Roswell Park Memorial Institute (del inglés Roswell Park Memorial Institute medium)
SFB :	Suero Fetal Bovino
VC :	Viabilidad Celular
UIM :	Unidad de Investigación Multidisciplinaria
FESC :	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

## 6. INTRODUCCIÓN

Desde la época de Hipócrates se han estudiado diversas enfermedades de las cuales la levadura *Candida* es el agente causal, pero se empieza a estudiar este microorganismo a partir de 1940. En la siguiente tabla se muestran los principales hallazgos en torno a *Candida*:

Año	Aportación
460 a 377 a.C.	Hipócrates describió placas blanquecinas en la boca en pacientes debilitados y en recién nacidos
130 a 200	Observó placas blanquecinas en niños enfermizos
1835	Verón en su "Memorie sur le muguet" postuló la transmisión intrauterina y describió el primer paciente con candidiasis esofágica
1841	Berg demostró el origen fúngico de las lesiones bucales y reprodujo el padecimiento en niños sanos
1842	Gruby lo presentó como "el verdadero muguet de los niños" y postuló la transmisión intruterina
1844	Bennett aisló el hongo conocido hoy como <i>C. albicans</i> en el esputo de un paciente tuberculoso
1846	Berg reconoció a las enfermedades debilitantes como el principal factor predisponente para este tipo de infecciones.
1849	Wilkinson describió la localización vaginal
1853	Robin denominó al hongo <i>Oidium albicans</i>
1861	Zenker observó un sujeto con infección cerebral por diseminación hematógena
1875	Hausmann notó el vínculo entre candidiasis vaginal de la madre y bucal del recién nacido
1877	Parrot describió la forma pulmonar en lactantes
1877	Granitz describió la morfología de <i>C. albicans</i>
1890	Zopf aceptó como agente del algodoncillo un hongo del genero <i>Monilla</i>
1890	Schmorl informó de la afección mucocutánea
1904	Dubendorfer informó de la afección inguinal
1907	Jacobi informó de la afección cutánea
1909	Forbes describió el primer caso mucocutáneo crónico
1923	Berkhoutr transfirió las especies al género <i>Candida</i>
1954	En el Octavo Congreso de Botánica, se aceptó oficialmente el género <i>Candida</i>
1955	Sullivan identificó <i>C. dubliniensis</i> en candidiasis oral en pacientes con infección por VIH
1958	Bernirshke y Raphael comunicaron por primera vez la candidosis congénita

Tabla 1. Principales aportaciones en el estudio de *Candida albicans* (Webster 2007, Calderone 2002, Arenas)

## 6.1 Características del género *Candida*

El filo *Ascomycota* (comúnmente llamado ascomycetes) es por mucho el grupo más grande de hongos, se estima que incluye más de 32000 especies en 3400 género (Kirk 2001).

Este nombre es derivado de las palabras griegas *askos* (un saco de cuero, un bolso o una vejiga) y *mykes* (hongos), es decir, saco de hongos (Webster 2007).

El género *Candida* comprende más de 150 especies de las cuales se ha demostrado que las de mayor importancia son: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. torulopsis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* y *C. dubliniensis* (Villar 2011, Pemán 2008).

Actualmente su clasificación taxonómica es la siguiente:

Súper reino	<i>EUKARYOTA</i>
Reino	<i>FUNGI</i>
Subreino	<i>Dikarya</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Subfilo	<i>Saccharomycotina</i>
Clase	<i>Saccharomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>albicans</i>

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Candida albicans* (www.ncbi.nlm.nih.gov)

## 6.2 Identificación de *Candida albicans*

*C. albicans* es dimórfica; además de las levaduras y pseudohifas, también puede producir hifas verdaderas. En cultivo o en tejidos las especies de *Candida* crecen como levaduras ovoides en gemación (3 a 6  $\mu\text{m}$  de tamaño). También forman pseudohifas cuando las yemas continúan su crecimiento, pero sin desprenderse, para generar cadenas de células alargadas, pinzadas o constreñidas en los tabiques entre las células (Brooks 2008).

Sobre medio Sabouraud, en las primeras 24 h a 37 °C o temperatura ambiente, las especies de *Candida* producen colonias lisas, blandas, brillantes de color cremoso con olor a levadura como se muestra en la figura 1. Las pseudohifas se manifiestan como crecimiento bajo la superficie del agar (Arenas 2003).

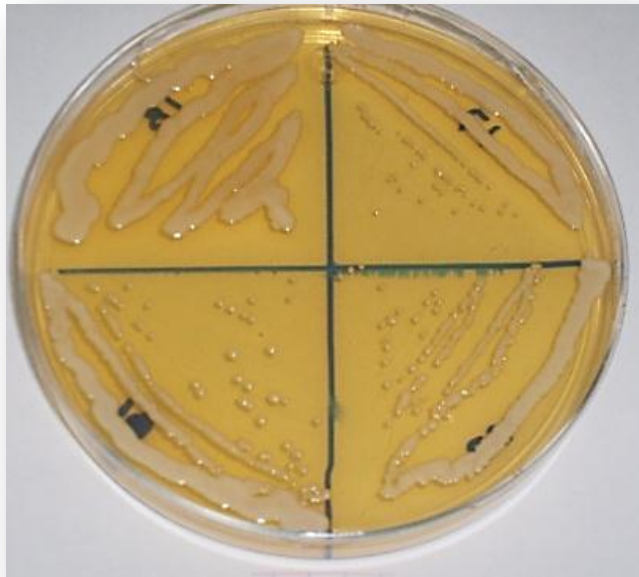


Figura 1. Morfología colonial característica de *Candida albicans* al crecer sobre medio SDA

Dos pruebas morfológicas simples diferencian a *C. albicans* de otras especies de *Candida*: después de la incubación en suero durante 90 min a 37 °C, las células de *C. albicans* empiezan a formar hifas verdaderas o tubos germinativos y en un medio nutrimentalmente insuficiente *C. albicans* produce clamidosporas grandes y esféricas. Un tubo germinativo se define como una extensión filamentosa de una levadura que tiene un ancho de alrededor de la mitad y una longitud de tres a cuatro veces el diámetro de la célula madre (Koneman 2003).

El examen directo se practica a partir de exudado, esputo, escamas, raspado de uñas o centrifugado de orina y se realiza con hidróxido de potasio, solución de lugol o fisiológica. También se pueden realizar frotis y teñirse con Gram, azul de metileno, Giemsa o Wright. En estas condiciones se observan abundantes esporas redondeadas u ovals de 2 a 4 micras de diámetro, blastosporas y pseudohifas, o hifas verdaderas (Arenas 2003).

*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. zeylanoides* y *C. parapsilosis* son sensibles a la ciclohexamida (0.5g/100mL) adicionada a medio Sabouraud.

En la tabla 3 se muestra un resumen de las características bioquímicas-fisiológicas empleadas en la identificación de *C. albicans*.

	Auxograma		Zimograma						Otros caracteres			
	Indispensable	Electivo	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Ureasa	Reducción de Tetrazolio	Resistencia ciclohexamida	Utilización de KNO <sub>3</sub>
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	±	+	-	-	-	B	+	-
<i>C. stellatoidea</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	R	+	-
<i>C. tropicalis</i>	+	V	+	+	+	+	-	-	-	Vi	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	R	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	B	-	-
<i>C. pseudo-tropicalis</i>	+	V	+	-	+	+	+	+	-	R	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	R	+	-
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	V	R	-	-

+ = positivo; - =negativo; ±=casi siempre positivo; V = Variable; B = blanco; R = rosado; Vi = Violeta;

Tabla 3. Características metabólicas o bioquímicas fisiológicas para la identificación de *Candida* (Arenas 2003)

### 6.3 Enfermedades producidas por *Candida albicans*

Sinonimia: Candidiasis, moniliasis, muguet, algodoncillo.

Definición: la candidiasis es una micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida*, especialmente *C. albicans*. Las manifestaciones clínicas pueden ser localizadas, diseminadas o sistemáticas afectando piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o granuloma. La evolución es aguda, subaguda o crónica (Arenas 2003, Willard 1990). Los pacientes con defensas comprometidas son susceptibles a los hongos ubicuos que no producen daño en personas sanas. En pacientes con SIDA, la susceptibilidad y la incidencia de micosis oportunistas se correlacionan inversamente con la cuenta de linfocitos CD4 (Brooks 2008). La infección también puede venir de fuentes exógenas, como puede ser con el uso de catéteres intravenosos o prótesis cardíacas, sobre todo cuando se aplican en pacientes inmunosuprimidos (Arenas 2003).



En la figura 2 se muestra un cuadro de la clasificación de las candidiasis, las cuales pueden recibir su nombre de acuerdo al lugar en que se establecen o al daño causado.

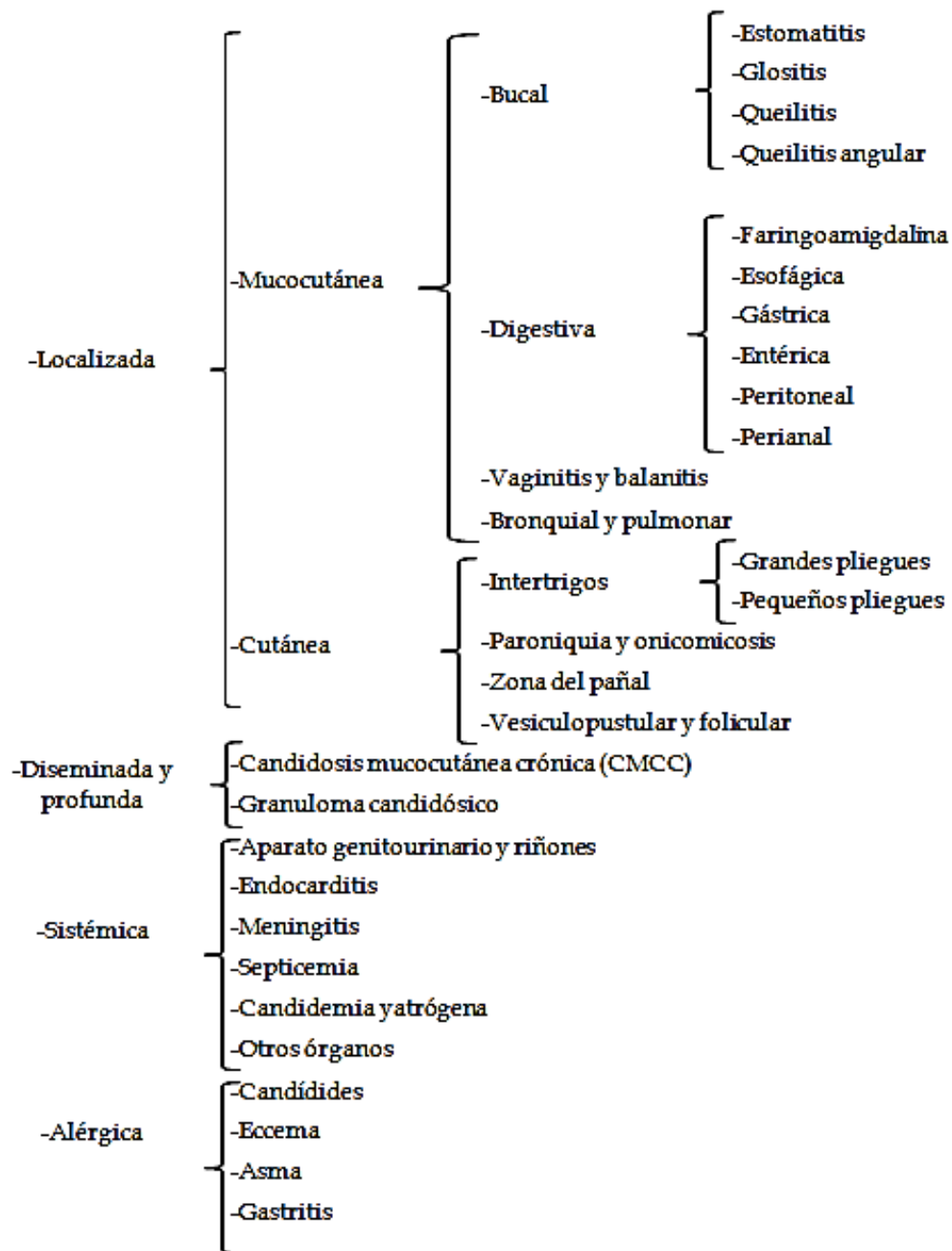


Figura 2. Cuadro de la clasificación de las candidiasis (Calderone 2003)

La candidiasis superficial (cutánea o mucosa) se establece a consecuencia de un incremento en la población local de *Candida* y del daño a la piel o el epitelio, que permite la invasión por la forma levaduriforme y las pseudohifas (Calderone 2003).

La candidiasis sistémica se presenta cuando la levadura penetra al torrente sanguíneo y las defensas fagocíticas del huésped son inadecuadas para contener su crecimiento y diseminación. Ya en el torrente circulatorio *Candida* puede infectar los riñones, fijarse a las prótesis valvulares cardíacas o producir infección candidiásica casi en cualquier parte (p. ej., artritis, meningitis, endoftalmitis). La histología local de las lesiones cutáneas o mucocutáneas se caracterizan por reacciones inflamatorias que varían desde abscesos piógenos hasta granulomas crónicos. Las lesiones contienen abundantes levaduras gemantes y pseudohifas (Calderone 2003).

## 6.4 Datos epidemiológicos

Las infecciones oportunistas causadas por especies de *Candida* han tenido un incremento substancial en los últimos 30 años. Si bien la incidencia global de las infecciones nosocomiales se ha incrementado en los últimos años, la candidemia es la infección por levaduras más frecuente en nuestro medio. Se estima que el 5% de los pacientes hospitalizados desarrollan una infección nosocomial y, de éstas, el 5% son causadas por alguna especie de *Candida*. (Salavert 2006, Ortega 2011).

La candidemia es la cuarta causa más común de infección en el torrente sanguíneo, y es causa de una significativa morbilidad y mortalidad (Barnejee 1991, Jarvis 1995, Salavert 2006, Jaffar 2007). La candidemia trae consigo una elevada mortalidad, del 40% y una prolongada hospitalización (Puzniak 2004).

En conjunto las especies de *Candida* representan casi el 80% de todos los hongos patógenos causantes de infecciones nosocomiales, y la incidencia de candidemia oscila entre 0.2 y 0.46 por cada 10000 pacientes al día (Salavert 2006).

Se considera que hasta un 90% de los individuos infectados por VIH sufrirán al menos un episodio de candidiasis orofaríngea (Aguirre 2002).

Se estima que 75% de las mujeres padecen al menos un episodio de candidiasis vulvovaginal durante su vida, y del 40 al 50% desarrollan infección vaginal recurrente por *Candida albicans*, adicionalmente en 5% de las mujeres adultas se presentan episodios de candidiasis vulvovaginal recurrente refractaria al tratamiento (Llovera 2004).

## 6.5 Factores de virulencia

Dentro de los factores dependientes del microorganismo sabemos que la virulencia de *C. albicans* se debe a un conjunto de factores relacionados con su capacidad para evadir los mecanismos de defensa del hospedador y el tratamiento antifúngico lesionando células y tejidos. El principal factor de virulencia parece ser la capacidad para persistir en los epitelios, a lo que contribuyen un grupo de factores como la adherencia, el dimorfismo, el sinergismo con ciertas bacterias orales, enzimas que tienen la capacidad de dañar la membrana celular de las células del hospedador al degradarlos lípidos que la constituyen etc. (Aguirre 2002, Echeverría 2002).

## 6.6 Biopelículas

Las biopelículas constituyen otro importante factor de virulencia de *Candida albicans*. Son comunidades microbianas embebidas en una matriz extracelular fundamentalmente polisacárida, altamente hidratada, con comunicación al exterior mediante canales de agua, se pueden adherir y desarrollar sobre superficies biológicas e inertes (Durán 2007).

Las levaduras del género *Candida* tienen la capacidad de adherirse a las superficies de plástico, lo que facilita la producción de biopelículas en los catéteres y las prótesis. Esta adherencia se basa en las fuerzas hidrófobas y electrostáticas que se

producen entre las levaduras y las superficies de plástico. La hidrofobicidad de la superficie varía de forma considerable entre los microorganismos aislados de la especie *C. albicans* (Joklik 1998). Las biopelículas de *Candida albicans* consisten en microcolonias de levaduras e hifas (Alem 2004).

Esta forma de vida de los microorganismos adheridos a superficies se conoce desde hace mucho tiempo, pero no ha sido sino hasta hace poco, cuando se ha visto su gran impacto médico e industrial (Valentín 2007).

En general, el desarrollo de una biopelícula conlleva cuatro pasos secuenciales: primero, la adhesión de los microorganismos a una superficie específica biótica o abiótica, en segundo lugar, la formación discreta de la colonia, y la organización de las células; la tercera parte, la secreción de matriz extracelular de polisacárido y la maduración en un arreglo tridimensional; finalmente, la diseminación de las células de la progenie de la biopelícula. Esta descripción se basa en el crecimiento, observaciones cinéticas y microscópicas realizadas tras desarrollar biopelículas en una superficie inerte (Seneviratne 2009).

Las levaduras en las biopelículas poseen características diferentes de sus homólogas planctónicas (en suspensión), como son la comunicación intercelular o *quorum sensing*, y el incremento de la resistencia a las defensas inmunológicas y a la acción de los antimicrobianos (Valentín 2007).

Muchas de las candidiasis se encuentran asociadas a la formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis dentales, válvulas cardíacas protésicas y otros dispositivos biomédicos. La mayor resistencia de las biopelículas de *Candida* al tratamiento

antifúngico convencional hacen necesario retirar los dispositivos en numerosas ocasiones, con las serias implicaciones que esto conlleva (Valentín 2007, Mukherjee 2006).

En las últimas décadas, se han descrito un amplio rango de modelos para el estudio *in vitro* de la formación de las biopelículas. En la mayoría de estos modelos la formación de biopelículas se logra mediante técnicas de cultivo convencionales, lo que representa una labor intensa y lenta.

Existen diversos ensayos para la cuantificación de biopelículas en microplacas (Peeters 2008): los métodos directos consisten principalmente en técnicas microscópicas, que permiten la visualización de la biopelícula; los métodos indirectos estiman el número de microorganismos adheridos *in situ*, o requieren la separación del sustrato y su posterior cuantificación (Durán 2007).

## **6.7 Cuantificación de biopelículas con Cristal Violeta y viabilidad celular (reducción del XTT)**

Dentro de los métodos indirectos tenemos a los espectrofotométricos, los cuales nos permiten cuantificar la formación de las biopelículas e incluyen la tinción con cristal violeta (CV) y el ensayo de reducción del XTT (sal interna de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) (Li 2003).

El CV es un tinte básico, que se une a las superficies cargadas negativamente de moléculas y polisacáridos en la matriz extracelular (Peeters 2008). Para su cuantificación, las biopelículas son teñidas con CV y desteñidas con una solución decolorante la cual será medida espectrofotométricamente. El CV tiñe todas las células presentes en la biopelícula, independientemente de su viabilidad.

En contraste, el ensayo por reducción del XTT mide la actividad metabólica de las células que forman parte de la biopelícula, por lo que es un método empleado con mucha frecuencia para determinar la viabilidad celular, sin embargo, también se ha demostrado que esta actividad metabólica es directamente proporcional a la formación de biopelículas por lo que en los últimos años ha sido frecuentemente empleado para este fin (Durán 2007, Hasan 2009, Melo 2011, Ibarra 2012).

En lo que respecta a las bacterias, el XTT es reducido por enzimas de la cadena respiratoria que están localizadas en la membrana plasmática, mientras que, en las levaduras, esta sal se reduce por deshidrogenasas mitocondriales (figura 3). A pesar de la popularidad de este método, se ha observado variabilidad inter e intra-especies que pudieran disminuir la validez de estos resultados (Peeters 2008).

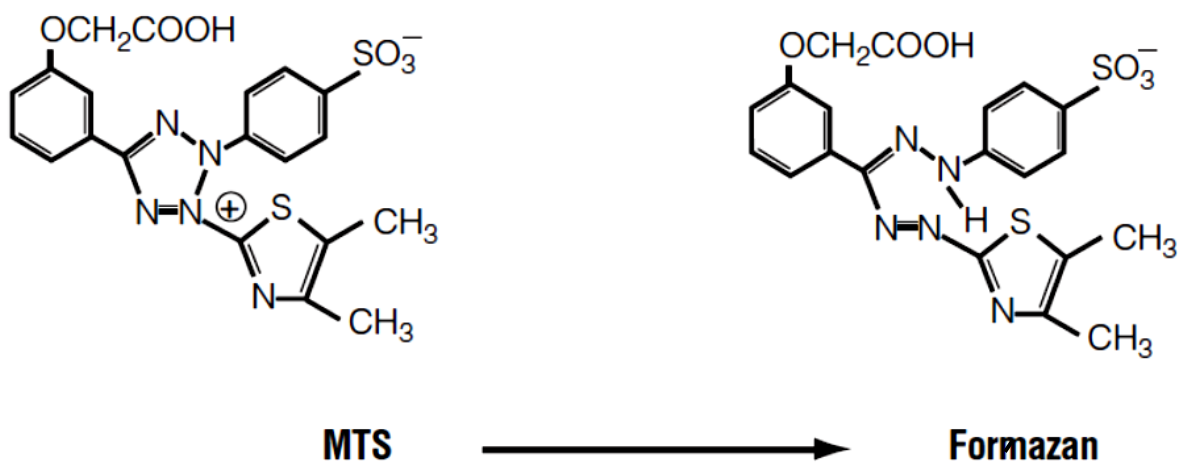


Figura 3. Reacción de reducción del XTT a formazán. El cambio de color va de amarillo a marrón oscuro



## 7. JUSTIFICACIÓN

*Candida albicans* y otras especies estrechamente relacionadas del género *Candida*, son la cuarta causa más común de infecciones del torrente circulatorio. Muchas de las candidiasis se encuentran asociadas a la formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis dentales, válvulas cardíacas protésicas y otros dispositivos biomédicos. La mayor resistencia de las biopelículas al tratamiento antifúngico convencional hace necesario retirar los dispositivos en numerosas ocasiones, con las serias complicaciones que esto conlleva.

Comprender el mecanismo de formación de este tipo de crecimiento permitirá tener mejores medidas de prevención y de tratamiento.

Con la finalidad de profundizar en el estudio de los genes involucrados en la formación de biopelículas de *C. albicans*, en este trabajo se estandarizó la metodología para formación de las mismas en microplacas de 96 pozos y se compararon tres métodos de cuantificación. Por otro lado, se analizaron 27 cepas provenientes de aislados clínicos y se clasificaron de acuerdo a su capacidad de producción de biopelículas evaluando si había o no relación con su origen anatómico.

Esto, en un futuro, permitirá analizar los niveles de expresión de genes relacionados con este proceso en cepas con alta, media o baja capacidad de formación de biopelículas.

## **8. HIPÓTESIS**

El análisis de la capacidad de formación de biopelículas de aislados de *C. albicans* provenientes de diferentes orígenes anatómicos nos proporcionará cepas con alta, media y baja capacidad de producción de biopelículas, esperando que haya relación con el origen anatómico del que provienen.

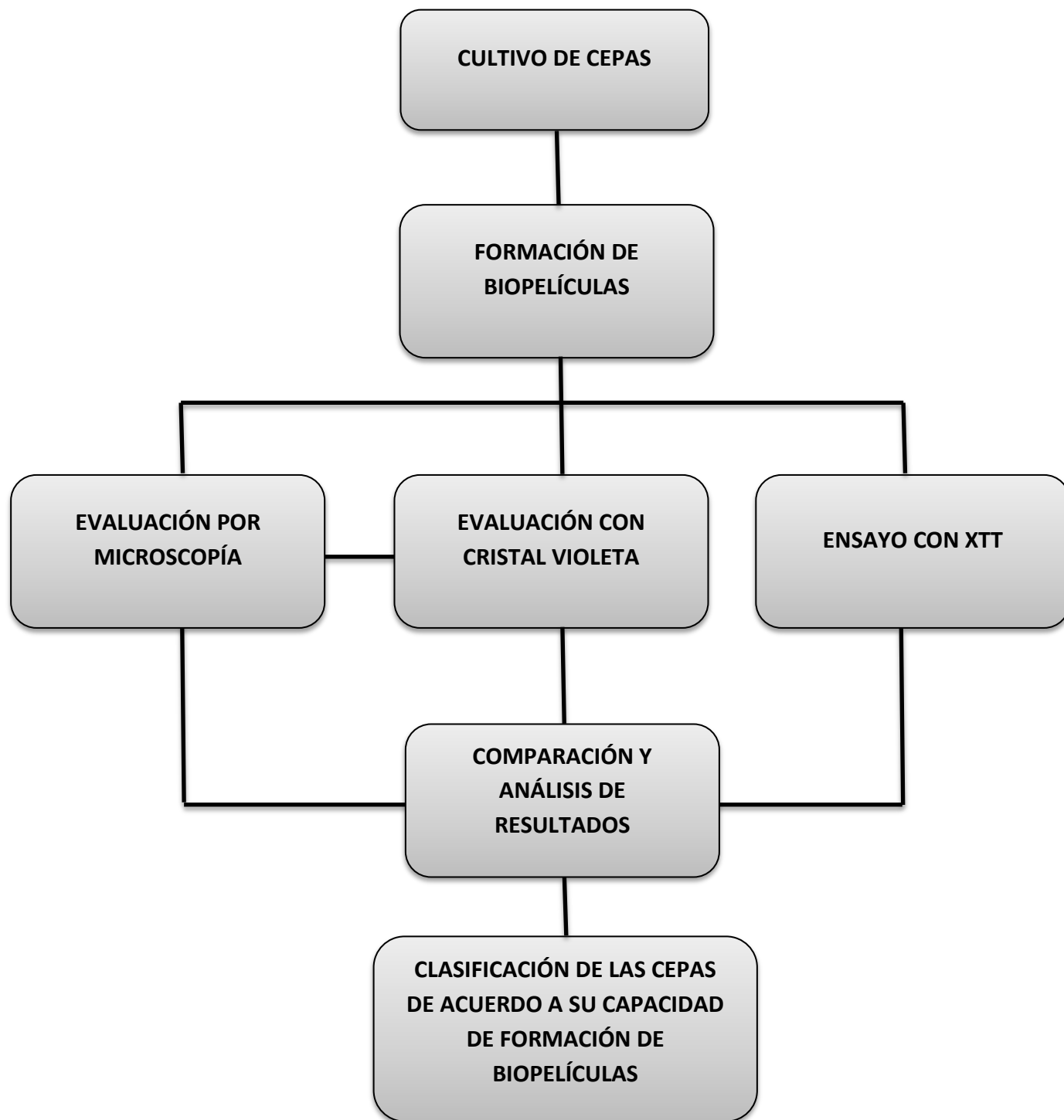
## **9. OBJETIVO GENERAL**

Comparar la capacidad de formación de biopelículas de 27 aislados clínicos de *Candida albicans* y la cepa de referencia ATCC10231 empleando las técnicas de microscopía óptica, viabilidad celular (reducción del XTT) y cristal violeta, con la finalidad de evaluar si esta capacidad está relacionada con el sitio anatómico del que proviene.

## 10. OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar una técnica de formación de biopelículas de *C. albicans*.
- Comparar tres métodos de cuantificación de biopelículas: microscopía óptica, CV y reducción de XTT.
- Evaluación de la capacidad de formación de biopelículas de 27 cepas de aislados clínicos de diferentes orígenes anatómicos mediante las tres técnicas mencionadas anteriormente.
- Clasificación de las cepas estudiadas de acuerdo a su capacidad de formación de biopelículas en baja, media y alta.

## 11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 12. MATERIAL Y MÉTODOS

### 12.1 Cepas empleadas

Se empleó la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 10231 y 27 cepas de *C. albicans* aisladas de muestras clínicas e identificadas por métodos tradicionales (filamentación en suero, producción de clamidioconidios en agar harina de maíz, crecimiento en CHROMagar Candida, asimilación de carbohidratos con el sistema API-20-AUX) que fueron proporcionadas amablemente por la M. en C. Patricia Manzano Gayosso del laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina UNAM.

A las cepas se les dio la siguiente asignación para su identificación:

1.	10231	ATCC	15.	112 U	Uñas
2.	27	Uñas	16.	684	Boca
3.	676	Boca	17.	27 U	Uñas
4.	642	Uñas	18.	398	Uñas
5.	520	Boca	19.	FM5104	Uñas
6.	402	Uñas	20.	1463	Sangre
7.	1423	sangre	21.	627-05	Piel
8.	543	Boca	22.	553	Aspirado bronquial
9.	533 VCI	Piel	23.	409	Boca
10.	26 DM	orina	24.	547	Boca
11.	1039	Boca	25.	150UV	Uñas
12.	1312 b	sangre	26.	1389	Sangre
13.	518	Piel	27.	638	Uñas
14.	7 CM	Boca	28.	684	Boca

Tabla 4. Cepas empleadas y origen anatómico

## 12.2 Cultivo de *C. albicans*

Las levaduras se mantuvieron en medio SDA hasta su uso. Para los estudios de formación de biopelículas las muestras fueron crecidas en 4mL de medio YPD durante 24 horas a 37°C (Li 2003, Valentín 2007) y a partir de este cultivo se desarrollaron las biopelículas.

## 12.3 Formación de biopelículas

El paquete celular se recuperó por medio de centrifugación a 6000 rpm durante 5 min, se desechó el medio y se resuspendió el paquete celular en 3mL de PBS.

Se leyó la absorbancia y considerando que  $Ab_{S600nm} = 1$  es equivalente a  $3 \times 10^7$  células por mL, se prepararon 1.5 mL de una suspensión de  $1 \times 10^7$  células por mL en PBS. Se emplearon microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Costar No. Catálogo 3596) y en ellas se colocaron 100 $\mu$ L por pozo de la suspensión de levaduras. Para promover la adhesión de las levaduras la microplaca se incubó en agitación a 75 rpm durante 90 minutos a 37°C, transcurrido este tiempo el medio fue aspirado y se hicieron 2 lavados a cada pozo con PBS para retirar las células no adheridas. Posteriormente se agregaron 150  $\mu$ L de medio (preparado con 70% de medio RPMI, 25% de PBS y 5% de SFB) y se incubó en agitación a 75rpm, 37°C por 48 horas. Una vez formada la biopelícula se descartó el medio y se lavaron los pozos con con PBS.

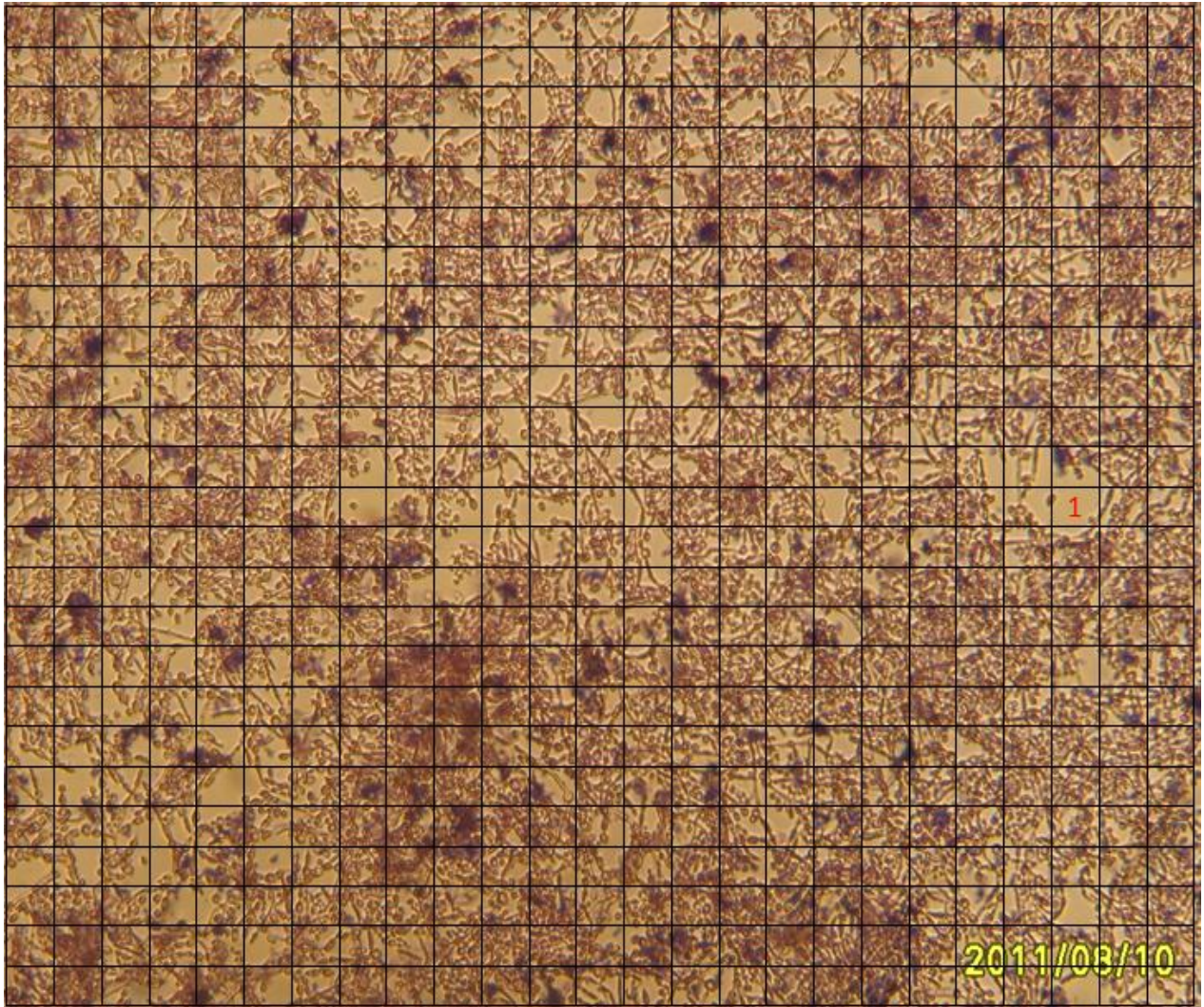
## **12.4 Evaluación de formación de biopelículas con Cristal Violeta**

Se consideró el protocolo descrito por Li (2003) y se realizaron algunas modificaciones. Brevemente, las biopelículas se fijaron con etanol al 96% durante 15 minutos, se retiró el etanol y se colocaron 100  $\mu$ L de CV al 0.5% durante 15 minutos. Se lavó el exceso de colorante con PBS 3 veces y se destiñeron las células colocando en cada pozo 300  $\mu$ L de etanol al 96% durante 15 minutos. Se recuperaron 250  $\mu$ L y se transfirieron al pozo correspondiente de una placa nueva. Finalmente se realizó la lectura en un lector de ELISA a 595 nm .

## **12.5 Evaluación de formación de biopelículas por microscopía óptica.**

Después de haber realizado la tinción con CV la microplaca fue observada al microscopio y se tomaron fotografías de la biopelícula producida por cada cepa, haciendo la observación con el objetivo de 40 x de un microscopio invertido. Con la finalidad de hacer cuantitativa esta observación evaluamos el porcentaje de la superficie cubierta por la biopelícula. Para lo anterior, cada fotografía se dividió en una cuadrícula que permitiera apreciar pequeños grupos de células (25 renglones x 25 columnas), de esta manera se procedió a contar el número de cuadros vacíos o en los cuales no aparecía al menos una levadura completa o una hifa de un lado a otro, se restaron estos cuadros vacíos al total de cuadros (625) y se obtuvo el porcentaje, que corresponde a la superficie cubierta.

La figura 4 muestra un ejemplo de cómo se realizó el conteo: los números rojos corresponden a cuadros vacíos. Para evaluar el porcentaje de superficie cubierta con la biopelícula en esta imagen se cuenta 1 cuadro vacío, el porcentaje de superficie cubierta sería igual a  $100\% - [(1 \div 625) \times 100] = 99.84\%$



**Figura 4. Fotografía de una biopelícula con una cuadrícula de 25 x 25 (tomada con el objetivo de 40X).**

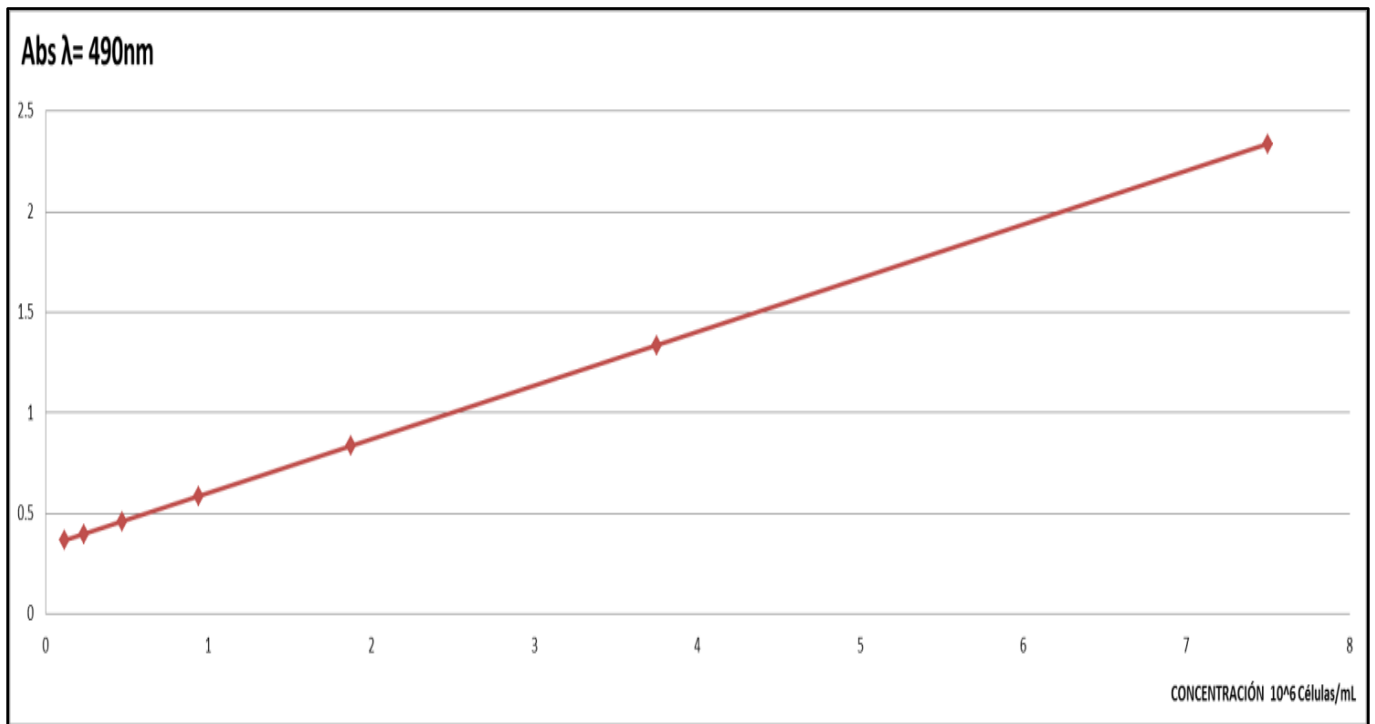


## 12.6 Ensayo de viabilidad celular (reducción del XTT)

Para la evaluación de formación de la biopelícula por el método de XTT, después de las 48 hrs de incubación, se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de medio (preparado con de medio RPMI al 70%, 25% de PBS y 5% de SFB) y 20  $\mu\text{L}$  de reactivo Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Se tomó una lectura inicial y cada hora durante 2 horas en un lector de ELISA con filtro de 490 nm. Se empleó un cultivo de 24 horas de la cepa ATCC 10231 para realizar una curva patrón con cantidades conocidas de la levadura.

Concentracion $10^6$ células/mL	Abs $\lambda= 490\text{nm}$	$m= 2.6692*10^{-7}$
7.5	2.3379	$b= 0.336$
3.75	1.3369	$r= 0.99$
1.875	0.8364	
0.9375	0.5862	
0.4687	0.4611	
0.2343	0.3985	
0.1171	0.3672	

Tabla 5. Datos de la curva de calibración para el ensayo con XTT



**Figura 5. Curva de calibración para el ensayo de XTT. (El eje X corresponde al número de células por mL con base  $10^6$ )**

## 12.7 Análisis estadístico

De acuerdo a la distribución de frecuencias agrupadas en estadística (Dawson 2002, Montgomery 2003), se agruparon los valores en intervalos con la misma amplitud denominados clases, para este estudio se requirieron 3 clases: alta capacidad para formar biopelícula, media capacidad para formar biopelícula y baja capacidad para formar biopelícula.

Cualquier tabla de frecuencias agrupadas debería poseer las tres características siguientes (Weimer 1998):

1. Uniformidad: cada clase debería tener la misma amplitud.
2. Unicidad: dos clases no se traslapan
3. Completez: cada uno de los datos debe pertenecer a alguna clase

Se siguieron las siguientes reglas, tomando como ejemplo los resultados de la técnica de microscopía:

1. Se expresan los datos como porcentaje en función del valor máximo.
2. Se localizan los valores mayor y menor de la distribución (Ver tabla 5. En este caso 100 y 42.88)
3. Se restan y se busca un número entero un poco mayor que la diferencia y que sea divisible por el número de intervalos que queramos establecer. En este caso  $100 - 42.88 = 57.12$ , incrementamos el número hasta 60: 3 intervalos de amplitud=20.

Se forman los intervalos teniendo presente que el límite inferior de una clase pertenece al intervalo, pero el límite superior no pertenece al intervalo, se cuenta en el siguiente intervalo.

4. Intervalos:

Alta capacidad para formar biopelícula: porcentaje de superficie cubierta  $\geq 80$

Media capacidad para formar biopelícula:  $80 > \text{porcentaje de superficie cubierta} \geq 60$

Baja capacidad para formar biopelícula:  $60 > \text{porcentaje de superficie cubierta} \geq 40$

([http://es.wikipedia.org/wiki/Distribuci%C3%B3n\\_de\\_frecuencias](http://es.wikipedia.org/wiki/Distribuci%C3%B3n_de_frecuencias))

## 13. RESULTADOS

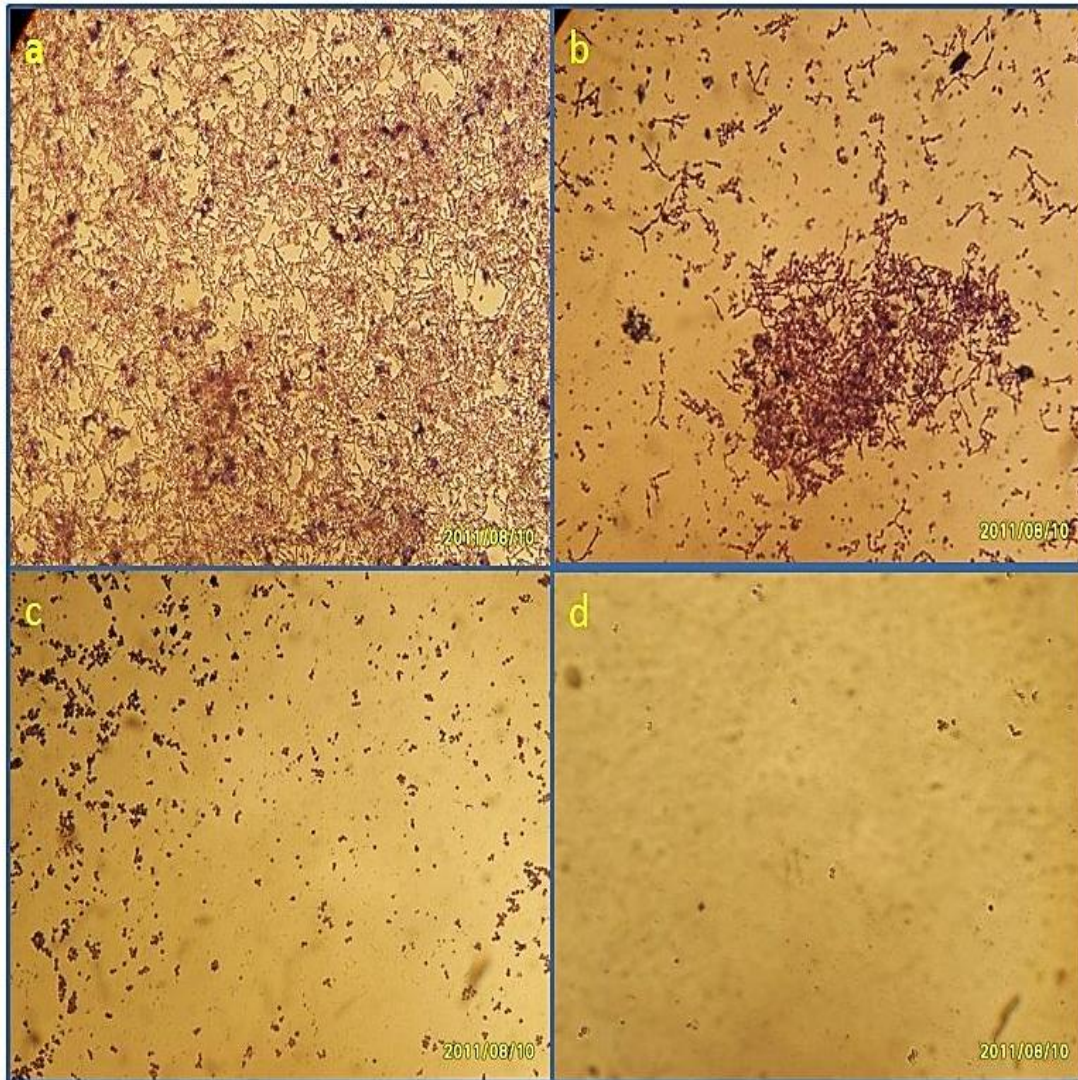
### 13.1 Evaluación de formación de biopelículas por microscopía óptica

Para la evaluación de formación de biopelículas por medio de microscopía óptica se consideró que las levaduras que se colocaron inicialmente se hubieran adherido, proliferado y formado hifas y pseudohifas para dar origen a una estructura tridimensional de biopelícula en la que incluso fué difícil observar células independientes (presente en cepas con alta y media capacidad de formación de biopelículas). En las cepas correspondientes a baja capacidad se observaron formas levaduriformes, y algunas presentaban hifas, pero no se alcanzó a producir la estructura tridimensional característica de una biopelícula a pesar de incubarse bajo las mismas condiciones (Bruzual, 2007).

Con la finalidad de tener una forma cuantitativa de evaluar la formación de biopelículas por medio de microscopía óptica se determinó el porcentaje de la superficie cubierta.

A continuación se muestran las fotografías correspondientes a una cepa con alta, otra con media, una más con baja capacidad para formar biopelícula y un pozo control en el cual no se colocó ninguna cepa (figura 6).

Estas imágenes corresponden a biopelículas desteñidas después de usar el CV, esto es debido a que una vez que se lleva a cabo la fijación, la biopelícula prevalece y se observa mejor que cuando no es teñida.



**Figura 6. Fotografías representativas de las diferentes capacidades para formar biopelícula evaluadas por microscopía óptica. a) Cepa con alta capacidad para formar biopelícula, b) media capacidad, c) baja capacidad, y d) un pozo control en el cual no se colocó ninguna cepa.**

En la tabla 6 se muestran los resultados del porcentaje de superficie cubierta de cada una de las cepas con el método de microscopía óptica.

**Tabla 6. Capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula por el método de microscopía. (Las cepas están ordenadas de mayor a menor, se muestra además el origen anatómico)**

Capacidad relativa para formar biopelícula	Cepa/origen anatómico		Porcentaje de superficie cubierta
<b>Alta Capacidad: porcentaje de superficie cubierta <math>\geq</math> 80</b>	5	boca	100
	18	uñas	100
	19	uñas	100
	1	referencia	99.99
	25	uñas	98.72
	27	uñas	98.56
	8	boca	98.24
	10	orina	98.08
	6	uñas	96.48
	28	boca	96.16
	26	sangre	96
	9	piel	92.96
	14	boca	91.84
	24	boca	91.36
	2	uñas	88.8
	22	aspirado bronquial	88.32
	13	piel	86.72
	12	sangre	85.76
23	boca	83.84	
<b>Media Capacidad: 80 &gt; porcentaje de superficie cubierta <math>\geq</math> 60</b>	4	uñas	79.04
	7	sangre	75.04
	11	boca	74.24
	16	boca	62.24
<b>Baja Capacidad 60 &gt; porcentaje de superficie cubierta <math>\geq</math> 40</b>	3	boca	56.96
	15	uñas	54.56
	21	piel	51.04
	20	sangre	50.08
	17	uñas	42.88

Se encontró que de las 27 cepas de aislados clínicos y la cepa de referencia, 19 cepas presentaron alta capacidad de formación de biopelícula, con valores de capacidad relativa  $\geq 80$ , 4 cepas con capacidad media y valores de capacidad relativa entre 60 y 80 y finalmente 5 cepas con baja capacidad con valores entre 40 y 60.

En la tabla 6 se resume la capacidad relativa de formación de biopelícula de cada una de las cepas evaluadas con el método de microscopía óptica.

En la figura 7 se representan estos resultados en forma gráfica y en orden descendente.

En la figura 8 se presentan los resultados clasificados en base a su origen anatómico y como se puede observar no hay ninguna relación entre la capacidad de formación de biopelículas y el sitio de donde se aisló la muestra.

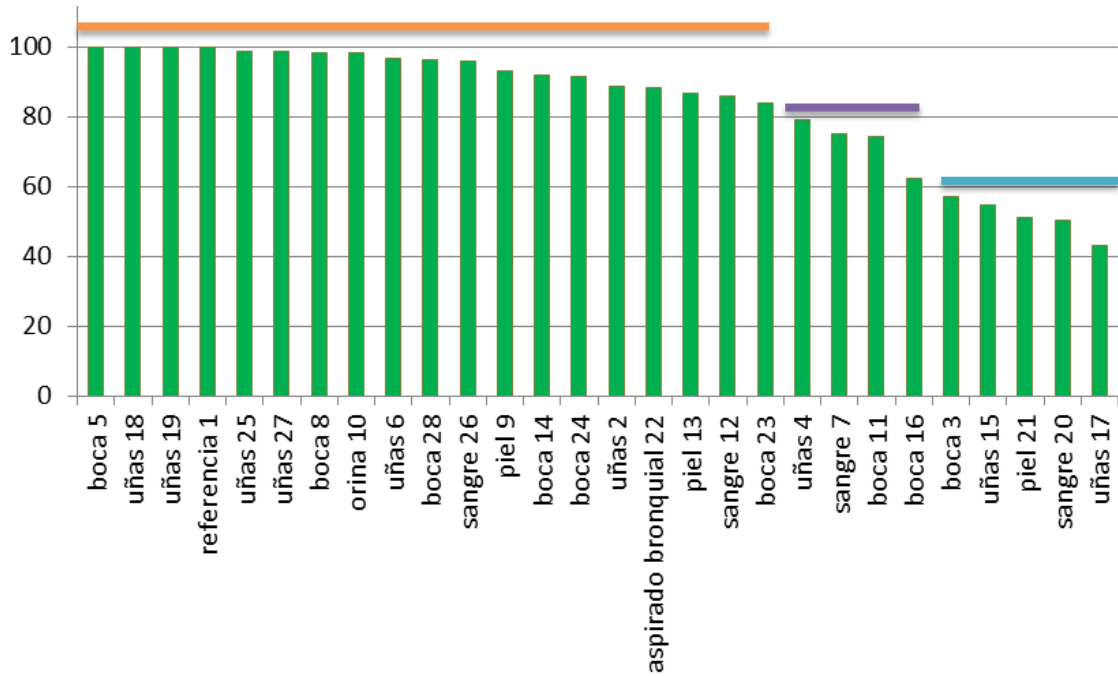


Figura 7. Comparación del porcentaje de superficie cubierta de las cepas ordenadas de mayor a menor. (La línea naranja indica las cepas con alta capacidad, la línea morada las de media capacidad y la línea azul las de baja capacidad). Valores promedio de tres experimentos independientes.

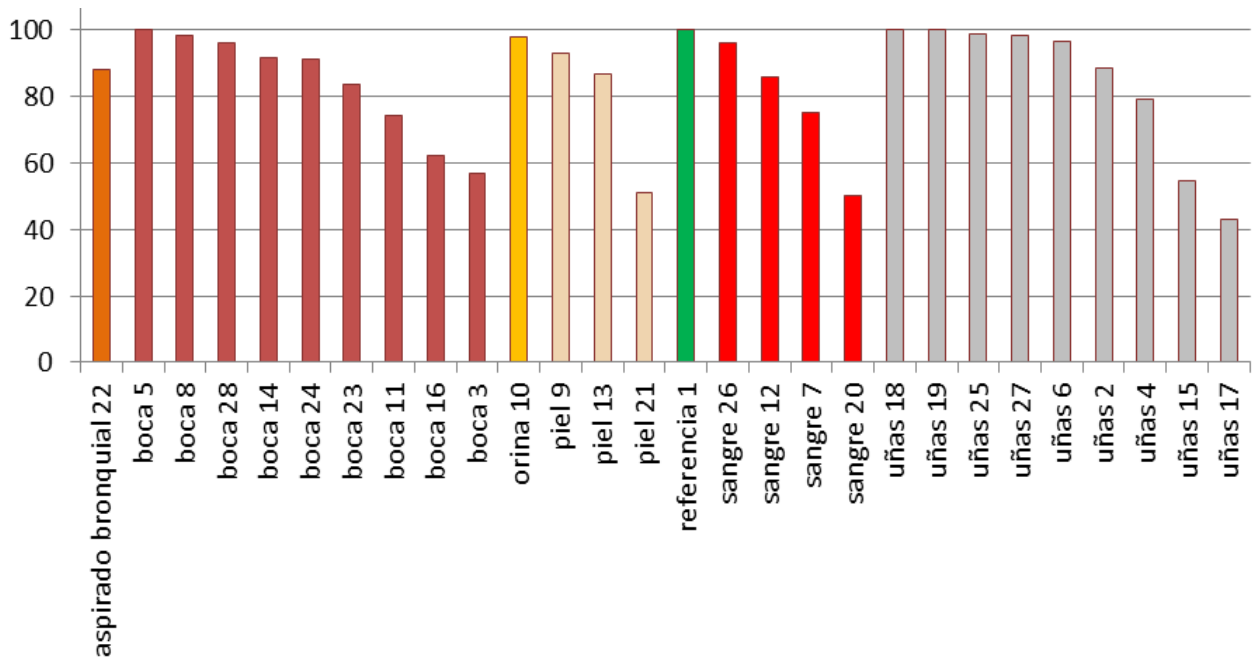


Figura 8. Comparación del porcentaje de superficie de superficie cubierta de las cepas. Ordenadas de acuerdo al origen anatómico. (Valores promedio de tres experimentos independientes)



## 13.2 Evaluación de formación de biopelículas por Cristal Violeta

Después de un periodo de incubación de 48 hrs, las 27 cepas provenientes de aislados clínicos y la cepa de referencia fueron fijadas, teñidas con cristal violeta y posteriormente desteñidas, recuperando con alcohol el colorante que se había adherido a las células y midiendo la absorbancia correspondiente. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los valores que se muestran corresponden a los promedios de las lecturas en el espectrofotómetro a una  $\lambda$  de 595 nm.

Se encontró que de las 27 cepas de aislados clínicos y la cepa de referencia, 8 cepas presentaron alta capacidad de formación de biopelícula, con valores de capacidad relativa  $\geq 71$ , 10 cepas con capacidad media y valores de capacidad relativa entre 42 y 71 y finalmente 10 cepas con baja capacidad con valores entre 13 y 42.

En la tabla 7 se resume la capacidad relativa de formación de biopelícula de cada una de las cepas evaluada con el método de CV.

En la figura 9 se representan estos resultados en forma gráfica y en orden descendente.

En la figura 10 se presentan los resultados clasificados en base a su origen anatómico y como se puede observar no hay ninguna relación entre la capacidad de formación de biopelículas y el sitio de donde se aisló la muestra.

**Tabla 7. Capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula evaluada por el método de CV. (Ordenadas de mayor a menor, se escribe además el origen anatómico)**

Capacidad relativa para formar biopelícula	Cepa/origen anatómico		Absrelativa a $\lambda=595$
<b>Alta Capacidad: Abs relativa <math>\geq 71</math></b>	1	Referencia	100
	19	Uñas	97.78
	5	Boca	95.35
	18	Uñas	90.59
	2	Uñas	87.23
	8	Boca	86.29
	27	Uñas	84.77
	9	Piel	76.26
<b>Media Capacidad: 71 &gt; Abs relativa <math>\geq 42</math></b>	22	Aspirado bronquial	67.22
	24	Boca	59.5
	28	Boca	58.87
	6	Uñas	57.91
	14	Boca	51.067
	4	Uñas	48.31
	13	Piel	46.19
	7	Sangre	46.16
	10	Orina	44.22
	25	Uñas	43.43
<b>Baja Capacidad: 42 &gt; Abs relativa <math>\geq 13</math></b>	23	Boca	29.44
	17	Uñas	28.47
	26	Sangre	25.22
	12	Sangre	25.17
	11	Boca	24.07
	16	Boca	23.59
	3	Boca	23.44
	20	Sangre	17.96
	21	Piel	17.87
	15	Uñas	14

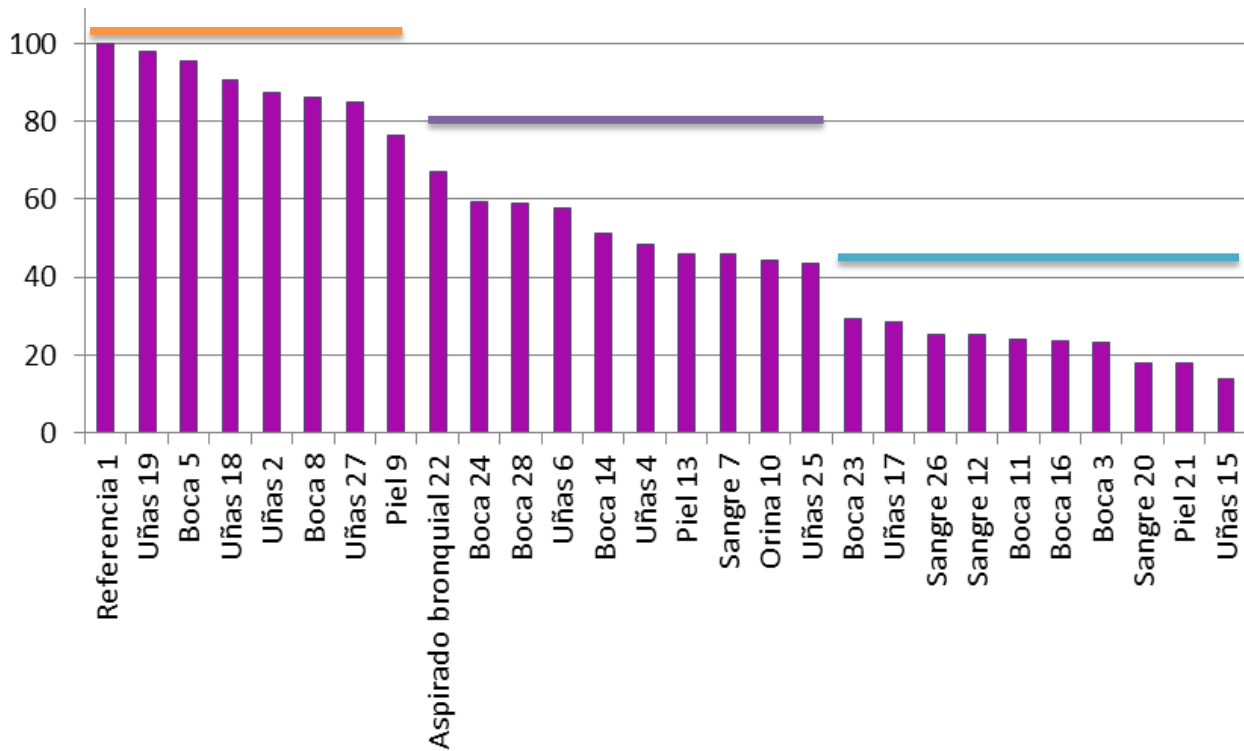


Figura 9. Comparación de la capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula por el método de CV ordenadas de mayor a menor. (La línea naranja indica las cepas con alta capacidad, la línea morada las de media capacidad y la línea azul las de baja capacidad). Valores promedio de tres experimentos independientes.

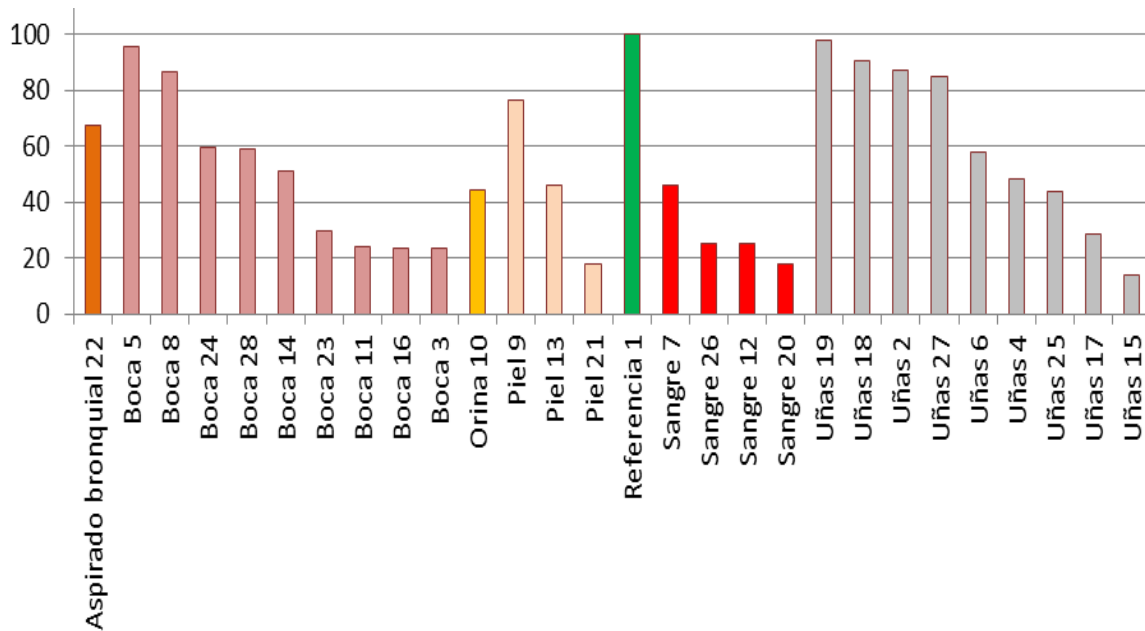


Figura 10. Comparación de la capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula por el método de CV. Ordenadas por origen anatómico. (Nótese que el origen anatómico no está relacionado con la absorbancia relativa). Valores promedio de tres experimentos independientes.

### **13.3 Evaluación de formación de biopelículas por medio de viabilidad celular (reducción del XTT)**

Tras llevar a cabo el ensayo se obtuvieron los siguientes resultados. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los valores que se muestran corresponden a los promedios de las lecturas en el espectrofotómetro a una  $\lambda$  490 nm.

En la tabla 8 se resume la capacidad relativa de formación de biopelícula de cada una de las cepas evaluada con el método de reducción del XTT.

En la figura 11 se representan estos resultados en forma gráfica y en orden descendente.

En la figura 12 se presentan los resultados clasificados en base a su origen anatómico y como se puede observar no hay ninguna relación entre la capacidad de formación de biopelículas y el sitio de donde se aisló la muestra, al igual que en los otros dos métodos.

**Tabla 8. Capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula por el método de XTT, ordenadas de mayor a menor, se escribe además el origen anatómico.**

Capacidad relativa para formar biopelícula	Origen anatómico/Cepa		Concentración relativa
<b>Alta capacidad: Concentración relativa <math>\geq 68</math></b>	22	Aspirado bronquial	100
	11	Boca	81.01
	8	Boca	78.64
<b>Media capacidad: 68 &gt; Concentración relativa <math>\geq 36</math></b>	13	Piel	41.35
	1	Referencia	38.16
<b>Baja capacidad: 36 &gt; Concentración relativa <math>\geq 4</math></b>	4	Uñas	33.89
	23	Boca	32.94
	16	Boca	28
	21	Piel	27.86
	26	Sangre	24.57
	3	Boca	23.35
	5	Boca	22.16
	24	Boca	20.23
	2	Uñas	15.55
	9	Piel	14.91
	14	Boca	8.81
	12	Sangre	8.5
	27	Uñas	7.05
7	Sangre	6.54	

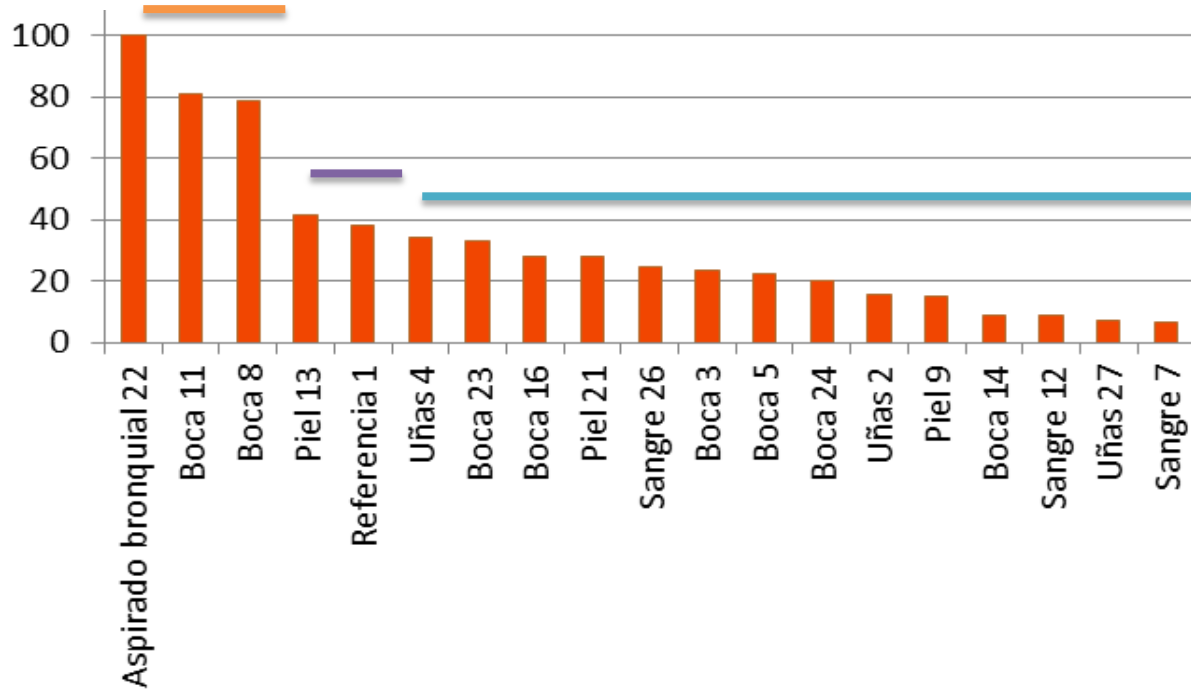


Figura 11. Comparación de la capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula por el método de reducción del XTT. Ordenadas de mayor a menor. (La línea naranja indica las cepas con alta capacidad, la línea morada las de media capacidad y la línea azul las de baja capacidad. Valores promedio de tres experimentos independientes.)

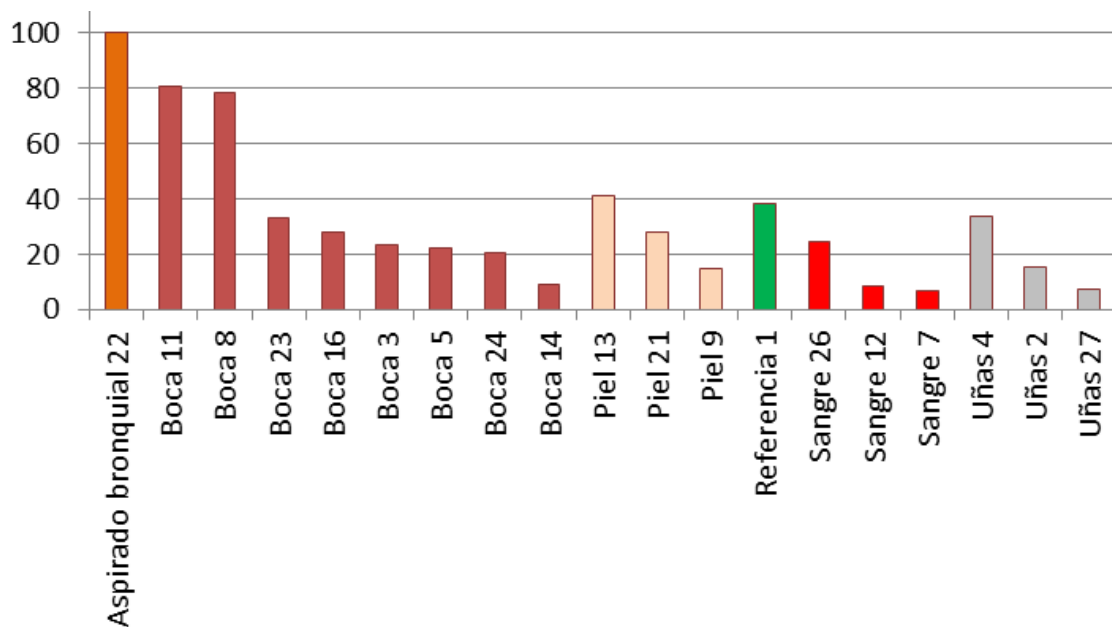
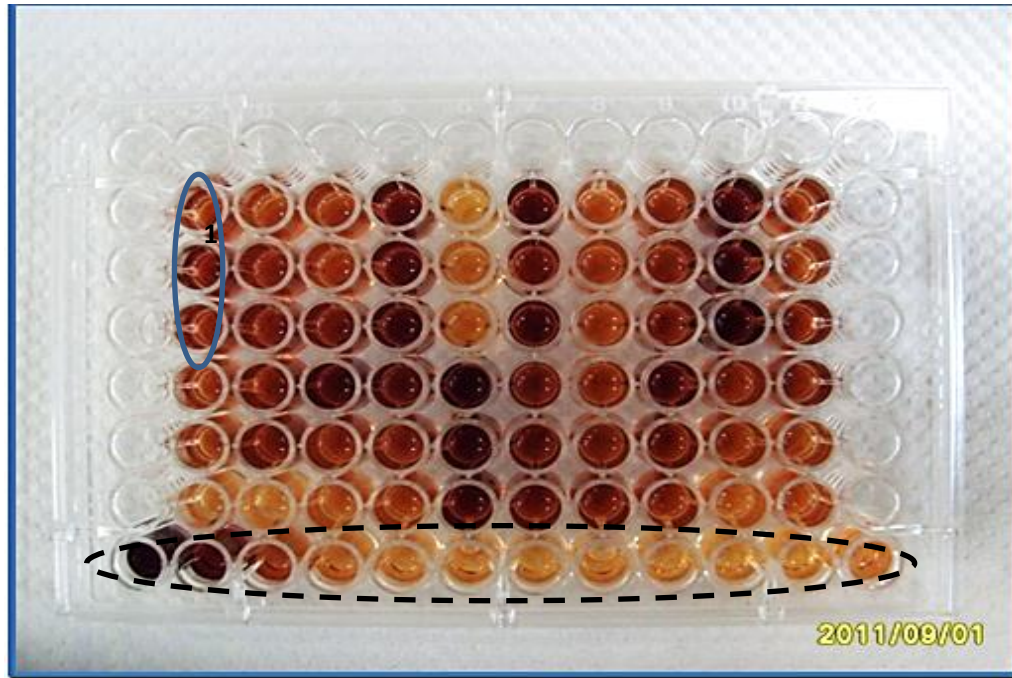


Figura 12. Comparación de la capacidad relativa de las cepas para formar biopelícula por el método de reducción de XTT ordenadas por origen anatómico. (Valores promedio de tres experimentos independientes)



**Fig. 13** Ensayo de reducción del XTT en microplaca. (La fila inferior rodeada por guiones corresponde a la curva patrón, y las cepas están acomodadas por triplicado de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha tal como indica la elipse de línea continua situada en este ejemplo sobre la cepa 1)

En la figura 14 se comparan los resultados obtenidos con los tres métodos: microscopía óptica, cristal violeta y reducción del XTT. Si bien las tres metodologías fueron reproducibles considerando las tres veces que se repitió cada ensayo, podemos ver que hubo variaciones importantes en cuanto a la clasificación de las cepas que proporcionó cada método.

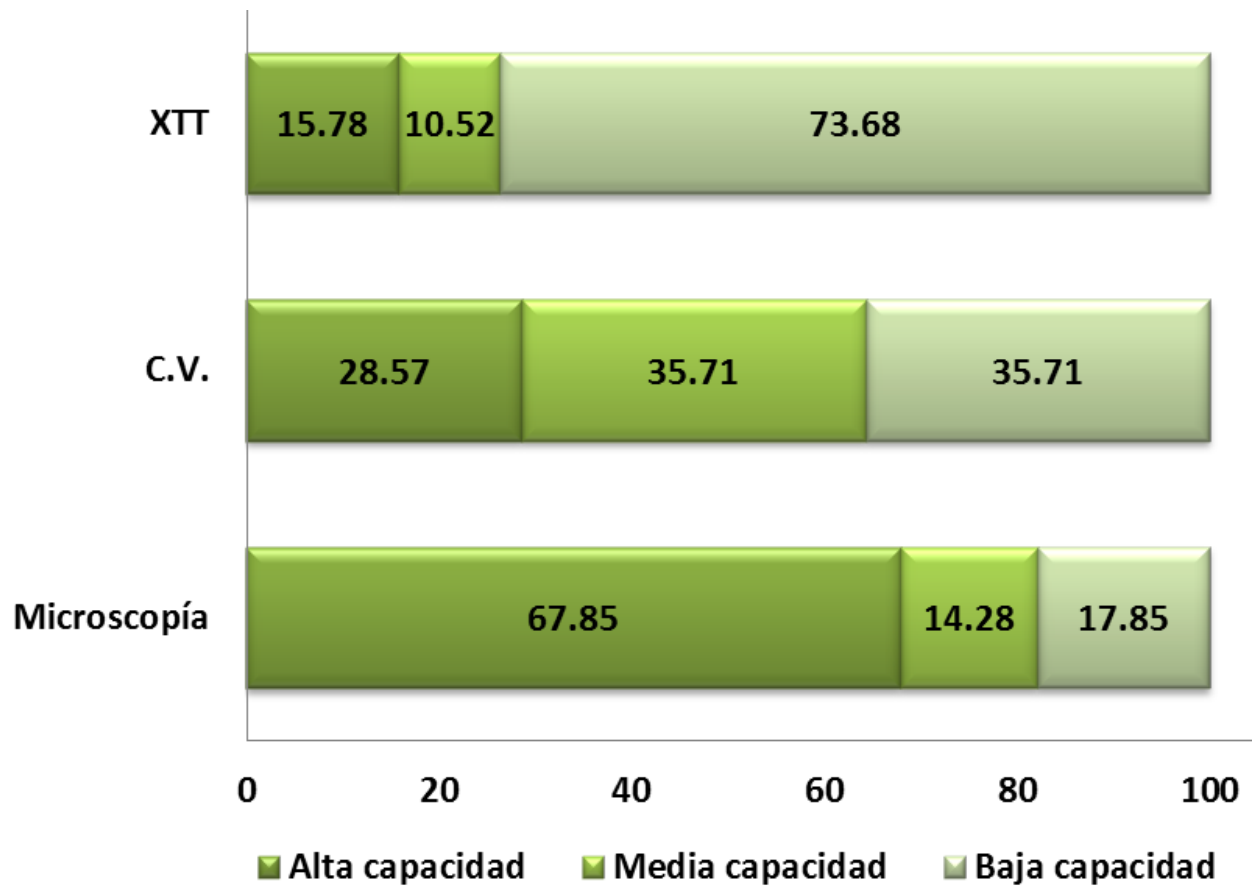


Figura. 14 Comparación de los 3 métodos respecto al porcentaje de cepas clasificadas en cada grupo. (Alta, media y baja capacidad para formar biopelícula).



## 14.DISCUSIÓN

*Candida albicans* y otras especies del género *Candida*, son la cuarta causa más común de infecciones del torrente circulatorio. Muchas de las candidiasis se encuentran asociadas a la formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis dentales, válvulas cardíacas protésicas y otros dispositivos biomédicos (Barnejee 1991, Jarvis 1995, Salavert 2006, Jaffar 2007).

La adherencia de *C. albicans* a las células del huésped o a biodispositivos constituye el primer paso para la colonización y desarrollo de la infección. Una vez que las células se han adherido son capaces de formar una estructura tridimensional de levaduras e hifas envueltas en una matriz exopolimérica estableciendo así, un sistema de vida que las hace más resistentes tanto a los mecanismos de defensa del huésped como a los antifúngicos.

Por otra parte, se ha demostrado que la hidrofobicidad de las levaduras es un factor importante para que puedan adherirse a diversas superficies y ésta característica es directamente proporcional a la producción de biopelículas (Blanco, 2010).

Debido a que estas infecciones son difíciles de tratar, en los últimos años se ha incrementado el número de investigaciones enfocadas en entender los aspectos genéticos y bioquímicos de la formación de biopelículas y sus características de resistencia a los antifúngicos. En este sentido, en nuestro laboratorio tenemos especial interés en profundizar en los genes implicados en este proceso. Para abordar estos

estudios necesitamos contar con cepas que presenten diferentes capacidades de formación de biopelículas y es esta la aportación del presente trabajo de tesis, en el cual se ha estandarizado la metodología para lograr este tipo de crecimiento y evaluado la formación de biopelículas por tres métodos distintos que fueron observación directa por medio de microscopía óptica, viabilidad celular (reducción del XTT) y tinción con cristal violeta (CV). Por medio de estas técnicas fue posible clasificar cepas de *C. albicans* provenientes de aislados clínicos en alta, media y baja capacidad de formación de las mismas.

A pesar de que existen diversos métodos para la producción *in vitro* de biopelículas de *C. albicans*, las placas de poliestireno han resultado de gran utilidad debido a que promueven la adherencia de las levaduras, incluso, han sido consideradas como la técnica de elección para llevar a cabo este proceso (Ramage 2005).

En este trabajo se estandarizaron las condiciones para obtener biopelículas maduras en placas de poliestireno de 96 pozos. Una de las etapas claves de este proceso fue la fase previa de adhesión de la levadura a la placa empleando PBS, lo que incrementó el número de células adherentes y favoreció la etapa de formación de la biopelícula.

Se han reportado diferentes condiciones de crecimiento para la obtención de biopelículas maduras que incluyen variantes en los medios de cultivo empleados, temperaturas y tiempos de incubación. Se ha demostrado que el uso del medio RPMI

1640 es el más adecuado ya que origina levaduras con carácter hidrofóbico lo que posibilita su adherencia a las placas de poliestireno (Blanco, 2010).

Para poder comparar la formación de biopelículas es indispensable tener un método eficiente y reproducible para cuantificación. Dentro de los métodos que se emplean con mayor frecuencia se encuentran la cuantificación de biopelículas por medio de reducción del XTT y la evaluación con cristal violeta (Shin 2002, Melo 2003, Li 2003, Valentin 2007, Melo 2011, Villar 2011, Taff 2012). En este trabajo se compararon estos dos métodos indirectos con un método directo que fue la microscopía óptica.

La evaluación por microscopía, por ser un método en el que se observan de manera directa las células presentes en la biopelícula, nos permite ver la estructura y morfología que presenta cada cepa. Se considera que hay una eficiente formación de biopelícula cuando se observan levaduras, hifas y pseudohifas rodeadas de una matriz exopolimérica formando una estructura tridimensional. Se observó que había una gran diversidad en la formación de biopelículas de las diferentes cepas por lo que decidimos recurrir a medir el porcentaje de superficie cubierta.

A pesar de las bondades de la observación directa, resulta un trabajo intenso cuando se desea evaluar la capacidad para formar biopelículas de un gran número de cepas y tiene la desventaja de que depende de la apreciación del observador.

Respecto a la tinción con cristal violeta es un método que tiñe tanto células metabólicamente activas así como las matrices extracelulares en las biopelículas maduras, y a pesar de que se usa más frecuentemente para el estudio de biopelículas

bacterianas Li y colaboradores (2003) mencionan que existe una correlación alta con el método de XTT al igual que Peeters (2008). Melo (2011) menciona que esta correlación entre ambos métodos se mantiene incluso comparándolo con el análisis de la biopelícula por medio de microscopía electrónica de barrido. Dentro de las ventajas adicionales de este método está su sencillez, rapidez y bajo costo.

Pannanusorn (2012) reporta que hay una relación directa entre el método de XTT y la observación directa al microscopio de las biopelículas.

En este trabajo, comparando las figuras 7, 9 y 11, encontramos que el método de reducción de XTT fue el que más se alejó de lo que se observó en la microscopía óptica, mostrando que el método del cristal violeta permite distinguir mejor variaciones de la capacidad de formación de biopelículas entre cepas de aislados clínicos sobre todo cuando estas variaciones son pequeñas.

Como se observa en la figura 14 el porcentaje de cepas asignado a cada grupo varía de manera importante dependiendo del método empleado.

Entre las características del método de XTT se encuentra su alto costo, un tiempo mayor para obtener resultados respecto al CV, sin embargo, puede discernir entre las células metabólicamente activas y las que no lo están. Por su parte, el método de CV tiñe células activas y matrices extracelulares. Melo (2011) y Li (2003) reportan diferencias entre el método de CV respecto al de XTT, llegando a considerar el de CV como el más apropiado para discernir entre cepas de alta, baja o media capacidad para producir biopelículas lo que está de acuerdo con nuestros resultados. Melo, Li y Valentín 2007,

sugieren emplear el método de XTT preferentemente para evaluar la actividad de antifúngicos en una sola cepa. No obstante, Taff 2012 considera que el método de reducción del XTT es el más eficiente y reproducible permitiendo detectar diferencias muy pequeñas entre la capacidad de formación de biopelículas.

Por otra parte, en ninguno de los tres métodos se logró demostrar relación alguna entre el origen anatómico y la capacidad para formar biopelículas, pues como se puede observar en las tablas de resultados, las cepas de determinado origen anatómico, por ejemplo uñas, se encuentran caracterizadas con alta, media y baja capacidad. Esto se puede observar en las figuras 8, 10 y 12.

Existen trabajos previos donde se analiza la relación entre la formación de biopelículas y el origen del aislamiento y los resultados son contradictorios: Kuhn (2002) y colaboradores sugieren que aislamientos de *C. albicans* recuperados de fuentes invasoras presentan una mayor capacidad de formación de biopelículas, sin embargo, autores como Jin (2003), Li (2003), Shin (2002) y Durán (2007) no pudieron establecer diferencias en la formación de biopelículas entre aislamientos provenientes de diferentes muestras clínicas y las diferencias parecen deberse a diferencias en las metodologías y el número de cepas empleadas. Incluso, Villar (2011) sugiere que los resultados se ven influenciados por el origen geográfico de los aislados tal y como sucede con la expresión de otros factores de virulencia y las susceptibilidades a antifúngicos en ensayos *in vitro*.

Respecto a la cepa de referencia empleada (*C. albicans* ATCC 10231) presenta bajos niveles de hidrofobicidad, adherencia a plástico y formación de biopelículas (Blanco 2010).

La importancia del presente trabajo reside en que se apoyará a futuras investigaciones al establecer condiciones óptimas para la formación de biopelículas de *Candida albicans* y la clasificación de cepas en cuanto a su capacidad formadora. Con estos datos se espera profundizar en la importancia de algunos genes en el desarrollo de las biopelículas.

## 15.CONCLUSIONES

- Se lograron estandarizar las condiciones para formación de biopelículas en microplacas de poliestireno de 96 pozos con medio RPMI (70%), PBS (25%) y suero (5%) y un periodo de incubación previa de 90 minutos en PBS para favorecer la adhesión.
- Se comparó la técnica directa de microscopía con los métodos indirectos de CV y reducción de XTT, encontrando diferencias importantes entre los resultados de cada una de estas técnicas, permitiendo proponer al CV como una mejor alternativa al método de observación al microscopio
- La comparación de la formación de biopelículas de 27 aislados clínicos de *Candida albicans* y la cepa de referencia ATCC 10231, empleando las técnicas de microscopía, viabilidad celular y cristal violeta, demostró que no hay relación con el sitio anatómico del que proviene la cepa.
- Estos resultados permitieron establecer diferencias en la capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Candida albicans*, lo que nos permitirá utilizarlas para el estudio de la expresión de genes involucrados en este proceso.

## 16. ANEXO

### 16.1 Cristal Violeta al 0.5%

Cristal violeta	0.5 g
Etanol de 95°	20 mL
Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80 mL

Preparación: Disolver el CV en el etanol y el oxalato de amonio en agua, mezclar las 2 soluciones.

### 16.2 Preparación de medio YPD

-Extracto de Levadura 1g

-Peptona 2g

-Dextrosa 1g

-(Agar 1.5g.)

Disolver con 100 mL agua destilada y esterilizar por autoclave (15', 15Lb, 121°C)

### 16.3 PBS (solución amortiguadora de fosfatos)

-0.14 M NaCl

-2.7 mM KCl

-4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

-1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Ajustar la solución a pH 7



## 15.REFERENCIAS:

AGUIRRE JM, Bagán JV, Ceballos A. Infecciones micóticas orales. En: Liebana J, Bagán JV (Eds.) Terapéutica antimicrobiana en odontoestomatología. Madrid, Beecham, 1996: 311-331

AGUIRRE JM. Candidiasis oral. Gac Med Bilbao 1992; 89: 169-171.

AGUIRRE Urizar José Manuel, 2002. Candidiasis orales. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 17-21

ALEM Mohamed A. S., L. Julia Douglas 2004. Effects of aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Biofilms and Planktonic Cells of *Candida albicans*. Antimicrobial agents and chemotherapy, Jan. 2004, pp. 41-47

ARENAS Guzmán Roberto “Micología Médica Ilustrada” Segunda edición. Ed. Mc. Graw Hill, México D.F. 2003 pp. 188-202

ASAKURA K, IWAGUCHI S, MOMMA M, SUKAI T, HIGASMDE K, TANAKAK K. Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeast of *Candida albicans* and *C. glabrata*. J Gen Microbiol 1991: 137: 2531-8

BANERJEE SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, et al. Secular trends in nosocomial primary blood-stream infections in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. Am J Med 1991;91(Suppl. 3B):S86–9

BROOKS Geo. F. et. al. "Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg", 24ª edición. Ed. Manual Moderno, México D.F. 2008 pp. 674-676

BRUZUAL Igor et. al. 2007. Biofilm formation by fluconazole-resistant *Candida albicans* strains is inhibited by fluconazole. Journal of Antimicrobial Chemotherapy January 2007 pp. 1-10

BURNIE J. P., F. C. Odds, et al 1985. Outbreak of systemic *Candida albicans* in intensive care unit caused by cross infection. Br. Med. J., 290: 746-748

CALDERONE RA, BRAUN PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiol Rev 1991: 55: 1-20

CALDERONE Richard A. "Candida and Candidiasis" Ed. ASM Press E.U.A. 2002 pp. 3-5, 15-25, 81-82

CARMO - SOUSA L. 1969. Distribution of yeasts in nature. In Rose, A. H., and J. S. Harrison (ed 3.), The yeasts, vol. 1. London Academic Press, pp. 79-105

CEBALLOS A, Aguirre JM, Echeverría MA, Ceballos L. Prevalencia y distribución de las candidiasis orales en pacientes con SIDA establecido. Medicina Oral 1996; 1: 6-10

DAWSON Beth, Robert G. Trapp. "Bioestadística médica" Tercera edición. Ed. Manual Moderno, México 2002. pp. 27-64

DOUCHET C., M. Gerard, et al. 1985 Etude microbiologique effective sur 1998 prelevements vaginaux. Med. Trop., 45: 59-66

DOUGLAS LJ. *Candida* proteinases and candidosis. Crit Rev Biotechnol 1988; 8: 121-9

DURÁN Estela Liliana et. al. 2007. Estudio de la variabilidad genética entre aislamientos clínicos de *Candida albicans* formadores de biopelículas. Rev. Iberoam. Micol. 24 pp. 268-271

ECHEVERRÍA Alejandro, et. al. Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 95-98

ELIOT, B. W. et al. 1984. Oral therapy in vaginal candidosis. Oxford, U.K., Medral Education Services, Ltd. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 499-511

ENGMAN, M. F. 1920. A pelicular fungus infection of the skin. Arch. Dermatol Syphilol., 1 :730

FRIDKIN SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 1996; 9:499 – 511

GARZON S, MARQUIS G, MONTPLAISIR S, KURSTAK E. Antigenic structure of *Candida albicans*: electron microscope localization of polysaccharide and immunodeterminants in the cell wall. In: Immunology of fungal diseases. New York: Marcel Dekker, 1989: 3-36

HAZEN KC. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. Infect Immun 1989; 57: 1894-1900

HEE Shin Jong et. al. 2002. Biofilm production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. Journal of Clinical Microbiology Apr. 2002 pp. 1244-1248

HERRERA Teófilo, Miguel Ulloa “El reino de los Hongos (micología básica y aplicada)”. Ed. Fondo de Cultura Económica México D.F. 1990 pp. 398, 399, 180-182, 51-66

[http://es.wikipedia.org/wiki/Distribuci%C3%B3n\\_de\\_frecuencias](http://es.wikipedia.org/wiki/Distribuci%C3%B3n_de_frecuencias)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5476&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s>

JAFFAR A. Al-Tawfiq 2007. Distribution and epidemiology of *Candida* species causing fungemia at a Saudi Arabian hospital, 1996 - 2004

JARVIS WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. Clin Infect Dis 1995;20:1526 – 30

JIN Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage

in case of human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol 2003; 41: 2961-2967.

JOKLIK Wolfgang K. et. al. "Zinsser Microbiología" 20ª edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina 1998 pp. 1427-1438, 1511-1523

KIRK, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalpers, J. A., eds. (2001). Dictionary of the Fungi, 9th ed. Wallingford, UK: CABI Publishing.

KLEIN R. S., C. A. Harris et al. 1984. Oral candidiasis in high risk patients as the initial manifestation of acquired immunodeficiency Syndrome. N. Engl. J. Med., 31: 354-358

KONEMAN Elmer W. et. al. "Diagnóstico microbiológico" texto y atlas a color. Quinta edición. Ed. Médicapamericana Buenos Aires, Argentina 2003 pp. 1012-1019, 1027-1029

KUMAMOTO Carol A. 2002. *Candida* biofilms. Current Opinion in Microbiology 5 pp. 608-611

LI Xiaogang, Zhun Yan and Jianping Xu 2003. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. Microbiology 149 pp. 353-362

LLOVERA Vilma Suárez, Mayda Rosa Perurena Lancha. Identificación de levaduras de exudados vaginales: características clínicas asociadas a la candidiasis. Rev Cubana MedTrop 2004;56(1):21-5

MACDONALD E ODDS FC. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. J Med Microbiol 1980; 13: 423-35

MC CULLOUGH M. J., B. C. Ross, P. C. Reade. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes and methods of strain differentiation. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 1996; 25: 136-144.

MELO Analy S. et. al. 2011. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. Isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. Medical Mycology April 2011, 49 pp. 253-262

MONTEIRO Andrea S. et. al. 2011. Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfaces by *Trichosporonmontevideense* CLOA72. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 84 pp. 467-476

MONTGOMERY Douglas C., George C. Runger “Applied Statistics and Probability for Engineers” Third edition. Ed. John Wiley and Sons, USA 2003. pp. 59-89.

MUKHERJEE Pranab K. et. al. Alcohol Dehydrogenase Restricts the Ability of the Pathogen *Candida albicans* To Form a Biofilm on Catheter Surfaces through an Ethanol-Based Mechanism. Infection and immunity, July 2006, pp. 3804-3816

NGUYEN MH, Peacock JE, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. Am J Med 1996; 100:617 – 23

ODDS F. C. 1979. *Candida* and Candidosis. Baltimore, University Park Press.

ODDS F.C. 1987 *Candida* infections: An overview. CRC Critical Rev Microbiol 151-5,1987

OLSEN I. and O. Bondevik. 1978. Experimental *Candida*-induced denture stomatitis in the wistar rat. Sand. J. Dent. Res./ 86: 392-398

ORTEGA M., et. al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. Journal of Hospital Infection 77 (2011) 157-161

PEETERS Elke, Hans J. Neils, Tom Coenye 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of Microbiological Methods 72 157-165

PEMÁN Javier, Emilia Cantón, Amparo Valentín 2008. Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 124-128

PFALLER MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission. Clin Infect Dis 1996;22:S89 – 94.

PRASAD Rajendra “*Candida albicans*” Ed. Springer -Verlag Alemania 1991 pp. 144-158

PUZNIAK L, Teutsch S, PowderlyW, Polish L. Has the epidemiology of nosocomial candidemia changed? Infect Control HospEpidemiol2004 ; 25:628 – 33.

RAMAGE G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukariotic Cell* 2005; 4: 633-638

ROTROSEN D, Calderone RA, Edwards JE Jr. Adherence of *Candida* species to host tissues and plastic surfaces. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 73-85

SALAVERT Miguel Lletí, Isidro Jarque Ramos, Javier Pemán García. Los aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clinicoterapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24 Supl1:36-45

SAMARANAYAKE LP, Macfarlane TW. *Oral Candidiasis*. London, Butterworth & Co, 1990. pp. 66-103

SENEVIRATNE C. J. 2009. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Archives of oral biology* 54 pp. 1052-1060

SMITH Anthony W. 2005. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems?. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 pp. 1539-1550

VALENTÍN Amparo, et. al. (2007). Actividad in vitro de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. *Rev. Iberoam. Micol.* 2007; 24: 272-277



VILLAR María, et. al. (2011). Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2011; 29,(9):660-665

WEIMER Richard C. "Estadística" Segunda edición. Editorial continental

WILLARD Rippon John "Micología Médica (hongos y actinomicetos patógenos)", 3ª edición. Ed. Interamericano - Mc Graw Hill, México D.F. 1990 pp. 575-617

WYCLIFFE L. Wright, Richard P. Wenzel 1997. Nosocomial *Candida*. *Epidemiology, Transmission, and prevention. Infectious disease clinics of North America. Volume 11, Number 2, June 1997 pp. 411-425*

XIE Zhihong et. al. 2011. A quantitative real-time RT-PCR assay for mature *C. albicans* biofilms. *BMC Microbiology* 11:93 pp. 1-8

ZUWAYLIF Fadil H. "Estadística general aplicada" Primera edición. Ed. Fondo educativo interamericano, México 1986. p.p. 4-11