



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN  
AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNOSTICA

PRESENTA

**NETZAHUALCOYOTL CRUZ PILAR DE LOS ANGELES NIZAGUIE**

ASESORES: DR. ENRIQUE SALAS TÉLLEZ

DRA. ALMA LUCILA NÚÑEZ DEL ARCO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO DE MÉXICO 2017



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).

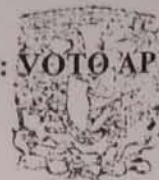
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa 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 comunicar a usted que revisamos el: Tesis y Examen Profesional

Determinación de la actividad enzimática en aislamientos de *Candida albicans* de origen clínico.

Que presenta la pasante: Pilar de los Angeles Nizaguie Netzahualcoyotl Cruz

Con número de cuenta: 411082268 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura 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 13 de Octubre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Enrique Salas Téllez	
VOCAL	Q.F.B. Leticia Badillo Solís	
SECRETARIO	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio	
2do. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	

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

## DEDICATORIAS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres, a mi madre María del Carmen Cruz Castillo, que siempre ha creído en mí y ha estado en los momentos más importantes de mi vida, que siempre hizo todo lo que estuvo en sus manos, y hasta lo que no, para apoyarme y alentarme cuando más he necesitado, que me ha cuidado y acompañado desde que tengo memoria y que me ha enseñado a ser valiente y fuerte con su ejemplo. A mi padre Yuri E. Netzahualcoyotl Almazán por impulsarme siempre a dar lo mejor de mí en todo lo que haga, por darme lecciones de vida que no voy a olvidar, por enseñarme que lo más importante en la escuela es “esforzarse, aplicarse y aprender algo nuevo” y que absolutamente todo en esta vida tiene solución.

A mi hermano Yuri Tonatiuh Netzahualcoyotl Cruz quien ha sido más que un hermano un buen amigo y aunque no lo sepa un maestro de vida, por acompañarme en esas largas noches de estudio, darme ánimos, brindarme aliento y calma en los momentos de mayor estrés haciéndome saber que cree en mí y por ayudarme a estudiar prestando un verdadero interés en lo que tanto me apasiona que es mi carrera. Sabes que creo en ti y sé que vas a llegar muy lejos y a cumplir todo lo que te propongas en esta vida y mucho más.

Le dedico esta tesis también a mi abuelo Abel Cruz Martínez por siempre demostrar su orgullo por mí, por alentarme a terminar lo que empecé de la mejor manera, por brindarme su apoyo aun a la distancia y por siempre interesarse por mi bienestar. Por su puesto, también a mi abuela Julia Castillo Acevedo por cuidarme y hacer que me olvidara del estrés siempre con solo su presencia.

A mi abuela María de los Angeles Almazán Fuentes, que ya no está conmigo pero sé que aun así está orgullosa, como siempre lo estuvo, de que haya logrado una de mis metas.

A la UNAM y especialmente a la FES Cuautitlán, por aceptarme como parte esta maravillosa institución a quien le debo toda mi formación profesional, me llevo una

de las mejores etapas de mi vida, un enorme cumulo de conocimientos, ideas y experiencias que voy a llevar por lo que me reste de vida.

A cada uno de mis profesores que siempre dieron su máximo esfuerzo por transmitirme sus conocimientos y experiencias, pero de manera especial a los profesores Ricardo Santiago, Idalia Avila Miyazawa, Pablo Martinez Labat, Leticia Cubillo Carrilo, Sandra Martinez Robles, Rosalba Bonilla Sanchez, Leticia Badillo Solis, Gloria Leticia Arellano Martinez y Alejandro Gutierrez Garcia gracias a todos ustedes (y a todos los que me falto mencionar) hoy me convierto con orgullo en una profesionista orgullosa de su formación.

A mis tíos Mónica Netzahualcoyotl y Gilberto Vázquez por pensar en mi y ayudarme a hacer prácticas en el Hospital Regional 1 de Octubre y por ponerme en contacto con el Jefe del Laboratorio el químico Roberto Magdaleno que me dio la oportunidad de adquirir experiencia aun cuando no me conocía, así como a los químicos que sin tener que hacerlo me dejaron aprender de ellos; a la química Jovita, Humberto, Javier, Patricia, Alejandra y a mis grandes amigos de la sección de urgencias: Jessica, Genaro, Antonio y a la química Berta, gracias por sus enseñanzas y sincera amistad.

A esas grandes y maravillosas personas que me acompañaron en este viaje y que gozaron cada momento junto a mi Ana, Montse, Itzel, Nancy, Emilia, Daniel, Erick, Gustavo y Uriel, así como hemos aprendido mucho de cada profesor y vivencia, yo he aprendido de cada uno de ustedes y me han hecho una mejor persona y bioquímica, gracias a todos ustedes la universidad fue una experiencia enriquecedora, divertida e inolvidable, no hay forma de que me olvide de ustedes, de su valiosa amistad y amor hacia mí.

Por ultimo pero no menos importante, a mis asesores el Dr. Enrique Salas Tellez y la Dra. Alma L. Nuñez del Arco, por brindarme además de los recursos brindados por PAPIME proyecto PE207414 y el lugar para desarrollar esta tesis, su apoyo, conocimientos y sobre todo paciencia a lo largo de este trabajo de tesis, sinceramente ¡Gracias! y espero que esto no sea un “adiós” sino un “Hasta luego”.

“Aquel que tiene un “Porqué” para vivir  
puede enfrentarse a todos los “comos””

Friedrich Nietzsche.

## ÍNDICE:

	PAGINAS
Índice de abreviaturas	7
Índice de cuadros y tablas	7
Índice de figuras y diagramas	8
Índice de graficas	9
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>11</b>
1.0 Generalidades de <i>Candida albicans</i>	11
1.1 Candidiasis	12
1.1.1 Antecedentes históricos	16
1.1.2 Etiología	17
1.1.3 Distribución geográfica	17
1.1.4 Hábitat y fuente de infección	17
1.1.5 Vía de entrada	19
1.1.6 Patogenia	19
2.0 Actividad enzimática	21
2.1 Hemolisinas	21
2.2 Proteasas	22
2.3 Fosfolipasas	23
2.4 Esterasas	26
Justificación	27
Hipótesis	27
Objetivo general	28

Objetivos particulares	28
Metodología	29
○ Identificación de muestras	30
○ Prueba de actividad hemolítica	31
○ Ensayo de actividad proteasa	32
○ Ensayo de actividad fosfolipasa	34
○ Ensayo de actividad esterasa	35
Resultados	36
Análisis de resultados	48
Conclusiones	54
Referencias	55
Anexos	57



## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection.
<b>SDA</b>	Sabouraud Dextrosa Agar.
<b>nom. cons.</b>	Nomen conservandum.
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana.
<b>PL</b>	Fosfolipasas
<b>PLB</b>	Fosfolipasa B.
<b>PLD</b>	Fosfolipasa D.
<b>Hi</b>	Hemolytic index o Índice hemolítico.
<b>SAP</b>	Aspartil proteasas
<b>HRT</b>	Hospital Regional de Tlalnepantla
<b>EFI</b>	Enfermedad Fúngica Invasora
<b>Saps</b>	Aspartil proteasas secretadas
<b>YM agar</b>	Agar yema de huevo malta

## INDICE DE CUADROS Y TABLAS

Número título de cuadro o tabla	Página
Cuadro 1.- Taxonomía del genero Candida.	12
Cuadro 2.- factores que predisponen a candidiasis.	13
Cuadro 3.- Escala para interpretación de intensidad enzimática de acuerdo a su valor de Pz.	33
Tabla 1.- Identificación de las muestras provenientes del HRT.	37

## INDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS

Número y título de figura o diagrama.	Página.
Diagrama 1.- Metodología general del estudio.	29
Figura 1.- Tipos de fosfolipasas en función del lugar donde cortan al fosfolípido.	24
Figura 2.- Esquema de la estructura de membranas biológicas. (Flores, 2005)	26
Figura 3.- Tinciones de GRAM de muestras L17-60-15 (izquierda) y L17-64-15(derecha) 100x	30
Figura 4.- Actividad hemolítica de Candida spp. En Agar SDA sangre de borrego (enriquecida con 3% de glucosa).	32
Figura 5.- Actividad proteolítica de diferentes aislamientos de C. albicans en medio con albumina sérica bovina, después de cinco días de incubación.	33
Figura 6.- Actividad fosfolipasa de diferentes aislamientos de C. albicans en agar malta suplementado con yema de huevo después de tres días de incubación. (Ombrella, 2008)	35
Figura 7.- Prueba de opacidad en tween 80 positiva (30°C por 10 días) (Pakshir, 2013)	36
Figura 8.- Cepas L17-12-15 (izquierda) y L17-19-15 (derecha) sembradas por triplicado en medio SDA sangre de carnero (enriquecida con 3% glucosa), presentando beta hemolisis en todos los casos usando de criterio el anillo alrededor del inculo junto con hemolisis alfa alrededor del mismo.	41
Figura 9A.- Actividad proteolítica de la muestra L17-86-15 de C. albicans en medio con albumina sérica bovina, después de cinco días de incubación. La actividad proteolítica está señalada con las flechas en la misma figura.	44

Figura 9B.- Foto ampliada de uno de los inóculos de la muestra L17-86-15, la actividad proteasa está señalada con una flecha.	
Figura 10.- Actividad proteolítica de la muestra L17-50-15 de C. albicans en medio con albumina sérica bovina, después de cinco días de incubación (Actividad señalada por las flechas).	45
Figura 11.- Actividad fosfolipasa de muestras L17-103-15 (izquierda) y L17-104-15 (derecha) C. albicans C. dubliniensis ATCC en agar malta suplementado con yema de huevo después de tres días de incubación (Flechas).	47
Figura 12.- Resultado positivo para prueba de esterasa de muestra L17-102-15 (izquierda) y l17-103-15(derecha) tras 10 días a 30°C. En ambas placas se pueden observar halos opacos con precipitaciones alrededor de las colonias.	48

## INDICE DE GRAFICAS

Número y título de gráfica	Página
Grafica 1.-Cepas cuyo Pz se encuentra por debajo y por arriba del promedio.	41
Grafica 2- Porcentaje de cepas cuyo Pz se encuentra por debajo y por arriba del promedio.	42
Grafica 3- Distribución de cepas de acuerdo al criterio de intensidad de actividad enzimática utilizado por Hernández. Solís.	43
Grafica 4.- Origen clínico de los aislamientos estudiados de acuerdo a la intensidad de actividad proteasa.	44
Grafica 5- Distribución de cepas para actividad fosfolipasa de acuerdo al promedio Pz de toda la prueba.	46
Grafica 6.- Distribución de cepas de acuerdo a la intensidad de actividad enzimática según Hernandez-Solis.	46

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

Grafica 7.- Origen clínico de los aislamientos estudiados de acuerdo a la intensidad de actividad fosfolipasa.	47
Grafica 8.- Comparación de promedios de Pz de las cepas de acuerdo a su origen clínico en la prueba de actividad proteasa.	51
Grafica 9.- Comparación de promedios de Pz de las cepas de acuerdo a su origen clínico en la prueba de actividad fosfolipasa.	53

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas invasoras son frecuentes en los pacientes inmunodeprimidos y en aquellos ingresados en áreas críticas. Estas infecciones causan una elevada morbilidad y mortalidad, así como un consumo elevado de los recursos para su prevención, diagnóstico y tratamiento. Frecuentemente, la candidiasis de las mucosas (oral, gastrointestinal y vaginal), es el primer signo de deterioro de la función inmunológica. La severidad de las infecciones micóticas aumenta proporcionalmente con el aumento de la disfuncionalidad del sistema inmune; por lo tanto. Los episodios de candidiasis en las superficies mucosas son muy frecuentes y difíciles de tratar (Panizo, 2001).

El conocimiento de la patogenia del hongo así como de la respuesta inmunitaria del huésped frente a la agresión, se postula como una herramienta imprescindible para optimizar el manejo de estas infecciones (García-Vidal, 2012).

### 1.0 Generalidades de *Candida albicans*.

El género *Candida* incluye cerca de 200 especies, pero solo 58 son oportunistas en animales y el humano, entre las cuales sobresale *C. albicans*. Usualmente el género *Candida* tiene características definidas: son levaduras con ausencia de pigmentos (melánicos y carotenoides); forma celular variable, es decir, pueden ser elípticas, globosas, cilíndricas y triangulares; tiene pared celular con dos capas; reproducción por gemación holoblástica o blastoconidios y pueden formar pseudohifas e hifas (con excepción de *C. glabrata*) (Bonifaz, 2010).

El género *Candida* con anterioridad se clasificó dentro de *Deuteromycetes*, familia *Cryptococaceae*, sin embargo, con la desaparición de estos grupos y la nueva taxonomía basada en la secuenciación genética, se les ordena dentro del tipo de levaduras ascosporadas. La taxonomía se describe en el cuadro 1.

Cuadro 1 Taxonomía del género *Candida* (Bonifaz, 2010).

Clase:	<i>Ascomycetes</i>
Subclase:	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden:	<i>Saccharomycetales</i>
Familia:	<i>Saccharomycetes</i>
Género:	<i>Pichia, Hansenula, Arxiozyma</i> (estados teleomórficos).
Especies:	Los estados anamorficos son denominados <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. dubliniensis</i> .

## 1.1 CANDIDIASIS

Se trata de una micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida*, en especial *C. albicans*. Las manifestaciones clínicas son localizadas, diseminadas o sistémicas; puede afectar 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, 2014).

Las micosis superficiales de la piel y mucosas son algunas de las infecciones humanas con mayor prevalencia observadas en la práctica clínica. Los agentes etiológicos comprenden los dermatofitos y levaduras responsables de infecciones tales como dermatofitosis, pitiriasis versicolor y candidiasis. Los casos de micosis superficiales y enfermedades invasivas relacionadas a especies pertenecientes al género *Candida* han aumentado progresivamente con los años. La candidiasis es la micosis oportunista más frecuente. Es una infección aguda o crónica de las mucosas, piel, uñas o tejidos profundos causada por levaduras del genero *Candida*. En general afecta a todos los grupos de edad, sexo raza y ocupación, aunque algunos tipos particulares de candidiasis afectan con mayor frecuencia a determinados grupos de personas (López, 2004).

La candidiasis es causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*. Y *Candida albicans* es uno de los mayores agentes causales de las micosis profundas y superficiales (Rohitashow, 2010). De hecho la reciente incidencia en las infecciones fúngicas a nivel mundial son motivo de gran preocupación en salud pública. A lo largo de los años las especies de *Candida* siguen siendo causa de infecciones hospitalarias, particularmente en adultos y en las unidades de cuidados intensivos pediátricos (Bezerra, 2015, García, 2012). Cualquier tejido puede ser afectado por lo que se presentan diversos cuadros clínicos, cada uno de ellos asociado directamente al estado inmunológico del paciente. Las candidiasis de mucosas y piel son las más frecuentes, mientras que las sistémicas son de evolución aguda o crónica y generalmente severas (García, 2012).

La mayoría de las especies de *Candida* son saprofiticas y pueden formar parte de la flora cutánea con excepción de *Candida albicans* que cuando se encuentra en la piel es agente etiológico de una candidiasis primaria. Hay múltiples factores predisponentes a la infección candidiásica: unos dependen del huésped y otros de las condiciones ambientales como se explica en el cuadro 2.

Cuadro 2.- Factores que predisponen a candidiasis (Arenas, 2014).

Estados fisiológicos.	Infancia y vejez, embarazo.
Factores locales.	Humedad, exposición ocupacional, oclusión cutánea, prótesis, heridas y quemaduras, hemostasis.
Endocrinopatías y enfermedades metabólicas	Diabetes, obesidad, hiperuricemia, síndrome de Cushing, insuficiencia tiroidea, acrodermatitis enteropática, deficiencia de hierro, poliendocrinopatía.
Enfermedades debilitantes	Neoplasias, infecciones, inanición, infección por VIH, enfermedades relacionadas con VIH, SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida).
Medicamentos y otros tratamientos.	Hormonas sexuales (anticonceptivos), antibióticos de amplio espectro, glucocorticoides, inmunosupresores, citotóxicos, radioterapia.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

Intervenciones quirúrgicas y otras medidas.	Intervención quirúrgica, hiperalimentación parenteral, cateterismo, traqueotomía.
Consumo de drogas.	Heroína (por su forma de administración en ocasiones con jeringas no estériles).

La gravedad de la infección depende sobre todo de las alteraciones primarias del hospedero más que de las propiedades patógenas del hongo. El microorganismo causal más frecuente y virulento es *C. albicans*, responsable de un 90% de las candidiasis. (Arenas, 2014)

Aunque en México la incidencia de *C. glabrata* se ha incrementado de manera importante.

Sin lugar a dudas, la candidiasis es la enfermedad fúngica invasora (EFI) más común en nuestro entorno y aunque hay descritas más de cien especies distintas de *Candida*, el 95-97% de todas las EFI producidas por levaduras de este género están causadas por solo cinco especies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. La principal fuente de infección por *Candida spp.*, es endógena (previa colonización de la piel o mucosas durante el parto), aunque también puede transmitirse a través de material infectado, personal sanitario o desde otros pacientes (Pemán, 2012).

La manera en la que *Candida albicans* invade las células del hospedero puede ocurrir de formas físicas, enzimáticas o una combinación de las dos. Muchos investigadores han sugerido que hay una relación entre la patogenicidad y la actividad enzimática en *Candida* lo que podría ser una expresión de su virulencia (Pakshir, 2013).

Existen dos grandes familias de enzimas degradativas secretadas y algunos de sus miembros han sido asociados con invasión y con evasión del sistema inmune. Corresponden a las aspartil proteinasas (SAP, codificadas por 10 genes) y las fosfolipasas (PL). Las primeras pueden estar unidas o incorporadas en la pared celular o ser secretadas y sirven para que *C. albicans* hidrolice proteínas del



hospedero como colágeno, laminina, fibronectina, mucina, lactoferrina e inmunoglobulinas (De la Calle, Rodríguez, 2012).

De hecho algunos de los pasos cruciales en la patogénesis de las candidiasis superficiales consisten en la adhesión fúngica, colonización y una subsecuente penetración de los tejidos. En todas estas fases la producción de enzimas hidrolíticas es un evento fundamental (Souza, 2015).

En este sentido las 2 clases más importantes de enzimas tienen roles centrales y prominentes: proteasas y fosfolipasas, ya que tanto las proteínas como los fosfolípidos representan los constituyentes químicos más importantes en la membrana de las células del hospedero, como queratina y colágeno, las cuales tienen que ser destruidas con el propósito de obtener nutrientes para el crecimiento y desarrollo fúngico así como facilitar la diseminación dentro del hospedero (Souza Ramos, 2015).

Otros de los mecanismos postulados como parte de la virulencia in vivo de *Candida* son: Hongo dimórfico (transformación morfológica de levadura en hifa), lo que también favorece la penetración y permite evadir el sistema de defensa, pues la hifa libera mayor cantidad de fosfolipasas y es más resistente a la fagocitosis; efectos inmunorreguladores de determinantes fúngicos que contribuyen a disminuir la actividad de las defensas del huésped; cambios fenotípicos, que permiten al hongo adaptarse a condiciones diferentes o cambiantes. (Arenas, 2014)

En el presente estudio se proponen maneras cualitativas y semi cuantitativas de comprobar y medir la actividad de cuatro enzimas conocidas del género *Candida* spp.: proteasa, esterasa, fosfolipasa y hemolisinas. Que en el reino fúngi son consideradas como importantes factores de virulencia (Pakshir, 2013).

### 1.1.1 Antecedentes históricos.

La candidiasis es una de las enfermedades micóticas que se conoce desde la antigüedad. En su obra *Epidemics*, Hipócrates describió que en niños recién nacidos y en pacientes debilitados se presentaban placas blanquecinas en la boca, a lo que denominó “estomatitis aftosa”. En Francia fueron descritas diversas variedades clínicas por Veron y Berg en 1835, pero no es sino hasta 1844 que Bennet, y en 1853 Robin, aislaron el hongo y propusieron de nueva cuenta que la enfermedad es propia de pacientes debilitados. A través de los años, muchos han sido los autores que han descrito las variedades clínicas y que han realizado trabajos epidemiológicos, tanto por su frecuencia como por su creciente resistencia a los antifungicos. En la actualidad la candidiasis sigue siendo una de las enfermedades más estudiadas a todos los niveles tanto por su frecuencia como por su creciente resistencia a los antifungicos (Kwon-Chung, 1992).

En 1849, Wilkinson describió por primera vez la candidiasis vaginal y su origen micológico. Robin reconoció que las aftas fúngicas podían causar infecciones sistémicas como un evento final de otra enfermedad no relacionada y llamo al hongo *Oidium albicans* en 1853 (Kwon-Chung, 1992).

Fue hasta el año 1875 que Haussmann reconoció que los agentes etiológicos de las aftas orales y vaginales era el mismo. El demostró la transmisión del hongo a la boca de infantes desde las lesiones vaginales de sus madres. En 1890, Schmorl reporto un caso de candidiasis diseminada que involucraba múltiples órganos. Durante los siguientes 50 años, continuaron los reportes de las diferentes formas de infección de la candidiasis incluyendo onicomycosis, enfermedad crónica mucocutánea, cistitis, endocarditis, osteomielitis y endoftalmitis, (Kwon-Chung, 1992).

Después de décadas estudiando a este hongo y tras haber sido nombrado de diversas formas, el nombre genérico *Candida* fue aceptado finalmente como nom. cons. (Nombre conservado) por el octavo congreso de botánica de Paris en 1954 (Kwon-Chung, 1992).

El nombre del agente etiológico ha pasado por diversos géneros y especies, se ha llegado a contar hasta 250 sinónimos y acrónimos, de los más importantes tenemos a *Oidium albicans* (Robin 1853) y *Monilia candida* (Bonoderm y Hansen 1868), este último término utilizado hasta 1932, cuando gracias a los trabajos de Langeron y Talice, quedó clasificada como *Candida albicans*. (Bonifaz, 2010)

### 1.1.2 Etiología.

La candidiasis es producida por diversas especies del genero *Candida*, en la actualidad clasificada con base en su secuenciación genética, dentro de la clase *Ascomycetes* y la familia *Saccharomycetes*. Las especies más frecuentes son: *C. albicans* (40-85%), *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae*. Algunas de estas especies presentan estados teleomorficos (ascosporados) (Bonifaz, 2010).

### 1.1.3 Distribución geográfica

Es una enfermedad cosmopolita y la más frecuente en todo el mundo. La incidencia se ha elevado durante los últimos 30 años. Afecta a individuos de cualquier edad, grupo étnico o sexo. No tiene relación con el clima, la situación geográfica ni el estado socioeconómico; sin embargo, se han encontrado algunas diferencias regionales, como el hecho de que la candidiasis interdigital en los pies es más frecuente en lugares tropicales y la onicomycosis sin paroniquia en lugares fríos. (Arenas, 2014)

### 1.1.4 Hábitat y fuente de infección

El hábitat de las diversas especies de *Candida* es el humano y algunos animales homeotermos. No se aísla del suelo, ni de *detritus* vegetal; los raros aislamientos que se han hecho de estas fuentes se consideran por contaminación fecal.

Diversas especies de *Candida* son componentes de la microbiota habitual del cuerpo, se presentan desde el primer día de nacimiento, dado que se adquiere en canal de parto y tienen una gran predilección por las mucosas. Se encuentran en el tracto gastrointestinal, habitando boca, laringe y faringe; su número en estos sitios

se puede incrementar por diversos factores, por ejemplo la simple falta de aseo bucal; el estómago en general no es saprofitado porque presenta un pH demasiado ácido, en cambio coloniza intestino delgado y grueso, de ahí que en la materia fecal y en la región perianal es común encontrarla. La flora intestinal compuesta por *Candida* y otras levaduras se incrementa con dietas ricas en carbohidratos, sobre todo a partir de frutas.

Se estima que del 25% al 50% de las personas sanas tienen *Candida* como parte de la microbiota normal de la boca, y se encuentra a *C. albicans* en el 70-80% de esos aislamientos. El rango de carga oral aumenta substancialmente en pacientes hospitalizados; especialmente los que tienen VIH, dentaduras postizas, diabetes, pacientes recibiendo quimioterapia antineoplásica, antibióticos, personas de la tercera edad y niños (Murray, 2013).

Forman parte también de la flora normal en mucosas genitales. En el hombre es menos frecuente y se puede encontrar de 0 a 10%. En cambio en vagina, por su propia condición anatómica, *C. albicans* y *Candida spp* habitan en equilibrio con otros microorganismos como el bacilo de Doderlein (*Lactobacillus*); en mujeres no embarazadas y, dependiendo de sus hábitos higiénicos, del uso de dispositivos intrauterinos, de tratamientos anticonceptivos orales, entre otros, se puede encontrar en un porcentaje que va desde 5 hasta 30%.

Cuando la mujer se embaraza, la microbiota de *Candida* se incrementa de un 30 hasta un 75% debido entre otras cosas a desequilibrios con la flora bacteriana, aumento de glucógeno, cambios de pH, y modificaciones de la respuesta inmune dependiendo del trimestre en el que se encuentre.

Las diversas especies de *Candida* no son frecuentes en piel sana, llegándose a aislar muy de vez en cuando en región perianal, interdigital y umbilical. Cuando la piel está enferma, sobre todo por algunas dermatosis (dermatitis por contacto o del área del pañal), la flora de *Candida* se incrementa. *C. albicans* no forma parte de la flora de uñas, su aislamiento de estas se considera infección. En vías respiratorias superiores y urinarias se encuentra con frecuencia (Bonifaz, 2010).

### 1.1.5 Vía de entrada

Debido a que *Candida albicans* y otras especies oportunistas son parte integral de la flora habitual, en general provocan enfermedades endógenas favorecidas por algún factor de predisposición del paciente; sin embargo, hay ocasiones en que la candidiasis se adquiere en forma exógena, por ejemplo, por introducción de grandes inóculos de levaduras a través de catéteres y de jeringas no estériles (por drogadicción), o bien por cateterismo (Bonifaz, 2010).

### 1.1.6 PATOGENIA

Las infecciones de piel más comunes producidas por *Candida* spp son intertrigo, dermatitis del pañal, balanitis, paroniquia, onicomycosis, afectación perineal y foliculitis. En cuanto a infecciones superficiales en membranas mucosas incluye vaginitis, estomatitis, glositis, esofagitis y otras del tracto gastrointestinal.

El término de candidiasis mucocutánea crónica comprende un grupo de infecciones por *Candida*, que afecta a piel, mucosas, pelo y uñas, que suele comenzar en el primer año de vida, de evolución prolongada y persistente a pesar del tratamiento, y que se asocia a anomalías en las células T. (Martínez, 2014)

Considerada como una clásica enfermedad por hongos oportunistas, la candidiasis requiere por fuerza de factores predisponentes, la mayoría de las veces se origina de manera endógena, casi siempre atribuible a dos procesos: el desequilibrio de la microbiota microbiana, que favorece el incremento de levaduras de *Candida*, lo cual se puede deber a cambios en el pH, cúmulos de nutrientes como el glucógeno, o por disminución de la microbiota bacteriana por antibióticos; o bien por enfermedades o procesos que influyan en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular, por ejemplo defectos en leucocitos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos T y B.

Los casos exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras, por ejemplo por cateterismo o drogadicción, ya que se inoculan los microorganismos de manera directa al torrente circulatorio.

El desarrollo del padecimiento está influido por una serie de factores que actúan de manera coordinada; los más importantes son:

- a) Adaptación al pH: Las diversas especies de *Candida* tienen una gran adaptación a diversos medios y sustratos. Propiedad regida por 2 genes (PHR1 y PHR2), ambos se inactivan en diferentes condiciones, el primero se activa en pH neutro o ligeramente básico (sangre o piel alcalinizada) y se inactiva en medio ácido, activándose a su vez el segundo (por ejemplo en vagina).
- b) Adhesinas: sustancias que influyen en la adhesión de la levadura, su presencia está bien comprobada en *C. albicans* y *C. glabrata*.
- c) Enzimas: Se han reportado como factores de virulencia de las especies de *Candida* a diversas enzimas, siendo las más importantes: queratinasas, peptidasas, hemolisinas, proteasas, hialuronidasas. En forma específica: aspartil-proteasas secretora, fosfolipasas y lipasas.
- d) Dimorfismo: capacidad de estas levaduras de cambiar morfológicamente de blastoconidio a pseudohifa e hifa. Cambio estimulado por condiciones ambientales y considerado uno de los factores de patogenia más significativos.
- e) Switching fenotípico: entendida como la capacidad que tienen estas levaduras de hacer grandes cambios fenotípicos como diferencias en la morfología colonial, antigenicidad o disminución en la producción de enzimas y toxinas.
- f) Formación de biopelículas: Una biopelícula es una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y mantenidos con fuerza por sustancias poliméricas secretadas por los mismos, lo cual le da alta capacidad defensiva, persistencia, mayor resistencia al ataque de antibióticos y más capacidad invasiva.

## 2.0 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Aproximadamente el 60% de los adultos sanos y el 26-65% de niños sanos pueden albergar microorganismos de *Candida* sin signos o síntomas de candidiasis. Como ya se mencionó anteriormente si la variedad de condiciones sistémicas y locales que mantienen balance entre hospedero y levadura es perturbado *Candida* puede proliferar y producir enfermedad. Las especies de *Candida* desarrollan mecanismos específicos de virulencia que les confieren la habilidad de colonizar células epiteliales del hospedero, para invadir células más profundas, o para afectar las defensas del mismo (Kadir, 2007).

Muchas características de *Candida spp.* han sido propuestas como factores que le permiten a este hongo causar infecciones diseminadas en hospederos susceptibles. Por ejemplo la habilidad de reconocer y adherirse a tejidos de hospederos, tubo germinativo y la formación de hifas, switch fenotípico entre otros, así como la producción de enzimas hidrolíticas como las lipasas y proteasas, las aspartil proteasas fosfolipasas fosfatasas y esterases, son todos importantes determinantes de virulencia.(Yigit, 2009)

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)

### 2.1 Hemolisinas

Las hemolisinas son sustancias que producen lisis de los eritrocitos, mediante la producción de poros en la membrana citoplasmática. La mayoría de ellas son proteínas o lípidos. Son un factor de virulencia de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahemolyticus*, *Streptococcus pyogenes* y otro gran número de patógenos entre ellos *Candida albicans*.

La secreción de hemolisinas es un factor de virulencia que contribuye a la patogénesis de *Candida*. El factor hemolítico de las especies de *Candida* ha sido descrito por muchos investigadores. En particular a *Candida albicans* puesto que esta especie tiene la capacidad de secretar hemolisina seguida de la adquisición del hierro contenido en la hemoglobina y su capacidad de fijar el complemento, opsonizando la superficie de los eritrocitos y finalmente lisándolos lo que facilita la invasión de hifas en candidiasis diseminada (Pakshir, 2013). Mientras que ha habido un importante número de estudios acerca de enzimas hidrolíticas como las proteasas, lipasas y fosfolipasas, los estudios acerca de la actividad hemolítica en *Candida spp.* son pocos (Yigit, 2009).

## 2.2 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 proteasas (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 proteasas 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. 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 las levaduras no patógenas como por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, lo cual apoya que estas proteínas están implicadas en su virulencia. (Calderone, 2002; Castrillón, 2005)

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; Pemán, 2007, Castrillón 2010)

### 2.3 Fosfolipasas

Las fosfolipasas son enzimas que degradan lípidos, por ejemplo los que se encuentran en membranas y se nombran dependiendo del sitio en que actúan (Figura 1). Uno de los factores más importantes de virulencia de *C. albicans* son las fosfolipasas extracelulares, que degradan los constituyentes fosfolípidos de la membrana celular llevando a la destrucción de las células huésped o la alteración de las características de la superficie para facilitar la adherencia y la subsecuente infección (Kadir, 2007, Kohler, 2006).

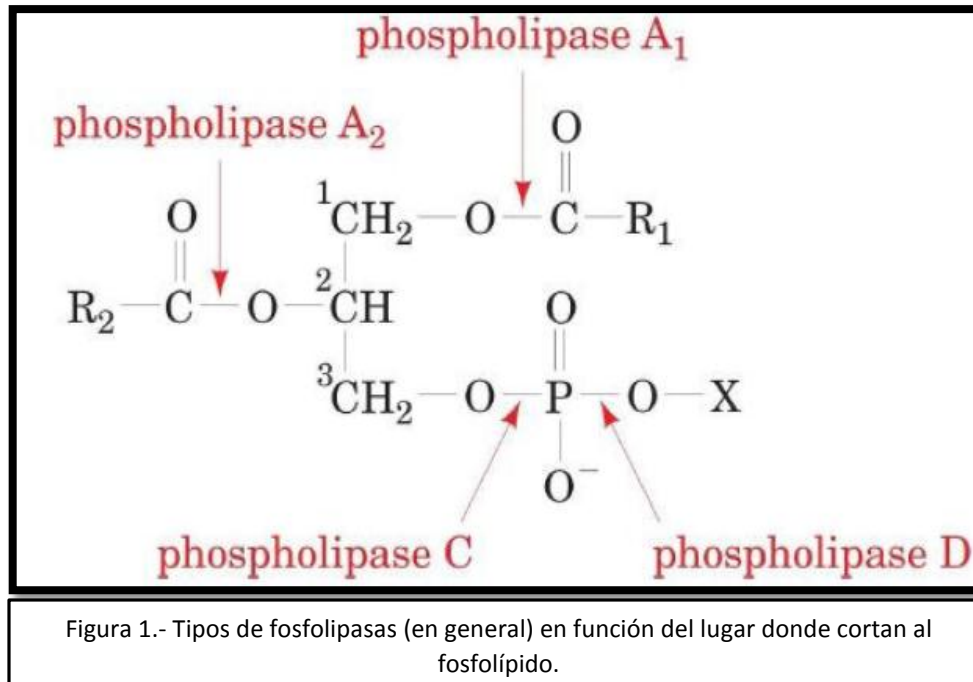


Figura 1.- Tipos de fosfolipasas (en general) en función del lugar donde cortan al fosfolípido.

La producción de fosfolipasa extracelular de *C. albicans* fue reportada por primera vez en la década de 1960 por Costa et al. y Werner sembrándola para su crecimiento en medio que contenía yema de huevo o lecitina y analizando los productos degradados de lípidos. Y su detección cuantitativa en la misma levadura con un ensayo en placa fue descrita por Price et al., quien demostró importantes variaciones en la actividad fosfolipasa entre diferentes aislamientos de *C. albicans* de sangre, orina y heridas. Se concluyó con esto que la prevalencia de aislamientos de *C. albicans* productoras de fosfolipasa varían con el tipo de aislamiento y se correlacionan con el sitio o tipo de infección y con la presencia de alguna enfermedad sistémica. Price et al. reportó que el 55% de aislamientos de *C. albicans* de la sangre, 50% de infecciones de heridas y el 30% de infecciones urinarias con candidiasis grave produjeron fosfolipasa (Kadir, 2007).

Entre todos los factores de virulencia que le confieren patogenicidad a *Candida albicans*, las fosfolipasas merecen especial atención. Las fosfolipasas están formadas por un grupo heterogéneo de enzimas que comparten la habilidad de hidrolizar uno o más enlaces éster. Dichas enzimas facilitan la penetración de las hifas verdaderas dentro de las células y tejidos puesto que tienen la capacidad de hidrolizar las moléculas que constituyen en mayor medida las membranas celulares

como se puede observar en la figura 2. Diferentes especies producen una cantidad variable de enzimas dependiendo de su patrimonio genético, estímulos ambientales y otras condiciones lo que impacta directamente en su virulencia y lo hace un blanco importante para su tratamiento:

- 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)

Las fosfolipasas extracelulares predominantes en *C. albicans* son la fosfolipasa B (PLB) y fosfolipasa D (PLD). Notablemente, PLB es una enzima que puede remover a los ácidos grasos *sn-1* (PLB1) y *sn-2* (PLB2) de los fosfolípidos de la columna vertebral (Taniguchi, 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 lisofosfolipasa transacilasa. 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; Castrillón, 2005)

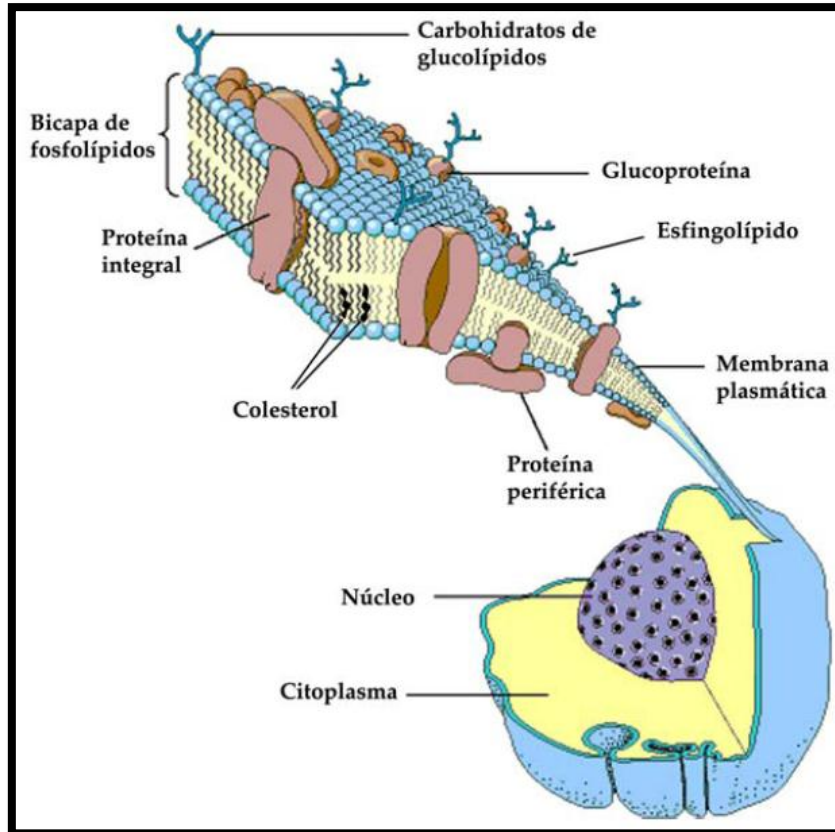


Figura 2.- Esquema de la estructura de membranas biológicas. (Flores, 2005)

## 2.4 Esterasas

Forma parte de las enzimas lipolíticas que al igual que las fosfolipasas son enzimas que causan daño a las membranas celulares del hospedero. Estas actividades lipolíticas han sido reportadas en varias especies de *Candida*. Aunque existe relativamente poca información concerniente a las actividades lipolíticas de los aislamientos de *C. albicans* que estén consistentemente asociados a infecciones humanas y animales. Es interesante determinar si estos factores están presentes en linajes patógenos de *C. albicans* (Khosravi, 2008). Existen varias opciones para realizar este estudio, y en esta ocasión se optó por el test de opacidad de tween 80.

## Justificación

Como se mencionó en la introducción las infecciones fúngicas invasoras son frecuentes en los pacientes inmunodeprimidos y en aquellos ingresados en áreas críticas. El conocimiento de la patogenia del hongo así como de la respuesta inmunitaria del huésped frente a la agresión, se postula como una herramienta imprescindible para optimizar el manejo de estas infecciones (García-Vidal, 2012).

Solo una mínima proporción de hongos tienen capacidad para ser patógenos del ser humano. En la actualidad las infecciones fúngicas invasoras más frecuentes son aquellas causadas por las especies de *Candida* y de *Aspergillus*, que pueden presentar diferentes factores de virulencia que potencien su capacidad invasora (García-Vidal, 2012).

Se eligió a *Candida albicans* porque es el patógeno fúngico más común en humanos y en los últimos años ha desarrollado un extenso repertorio de mecanismos putativos de virulencia que le permiten una colonización exitosa e infección de un hospedero bajo oportunas condiciones predisponentes. Y uno de los factores que contribuyen a esta virulencia es la producción de enzimas hidrolíticas (Khosravi, 2008).

En este estudio se utilizaron cepas provenientes de diversas infecciones causadas por *Candida albicans* además de 2 cepas ATCC de *C. albicans* y *C. dubliniensis* y se llevaron a cabo cuatro pruebas en cada una para demostrar que los aislamientos clínicos presentan cuatro de los principales factores de patogenicidad que le dan su virulencia a *Candida albicans*: hemolisinas, proteasas, fosfolipasas y esterases.

## Hipótesis

Si se llevan a cabo las pruebas para las enzimas hemolisinas, proteasas, fosfolipasas y esterases en las 102 cepas de *Candida albicans* provenientes del Hospital Regional de Tlalnepantla, con la ayuda de métodos cualitativos y semi cuantitativos entonces se podrá comprobar que las cepas presentan dicha actividad enzimática y por lo tanto son virulentas.

## Objetivo general

Determinar si los aislamientos de *Candida albicans* poseen la capacidad de producir los factores patogénicos de: hemolisinas, proteasas, fosfolipasas y estererasas.

## Objetivos particulares

- Estandarizar los métodos en placa para actividad fosfolipasa, proteasa, estererasa y actividad hemolítica.
- Realizar un análisis estadístico de la actividad enzimática encontrada en los aislamientos con base en los resultados obtenidos.
- Medir la actividad enzimática de fosfolipasa, proteasa y hemolisinas con ayuda de métodos semi cuantitativos.
- Comprobar si las cepas tienen actividad estererasa con la ayuda del método cualitativo de tween 80.

## METODOLOGIA

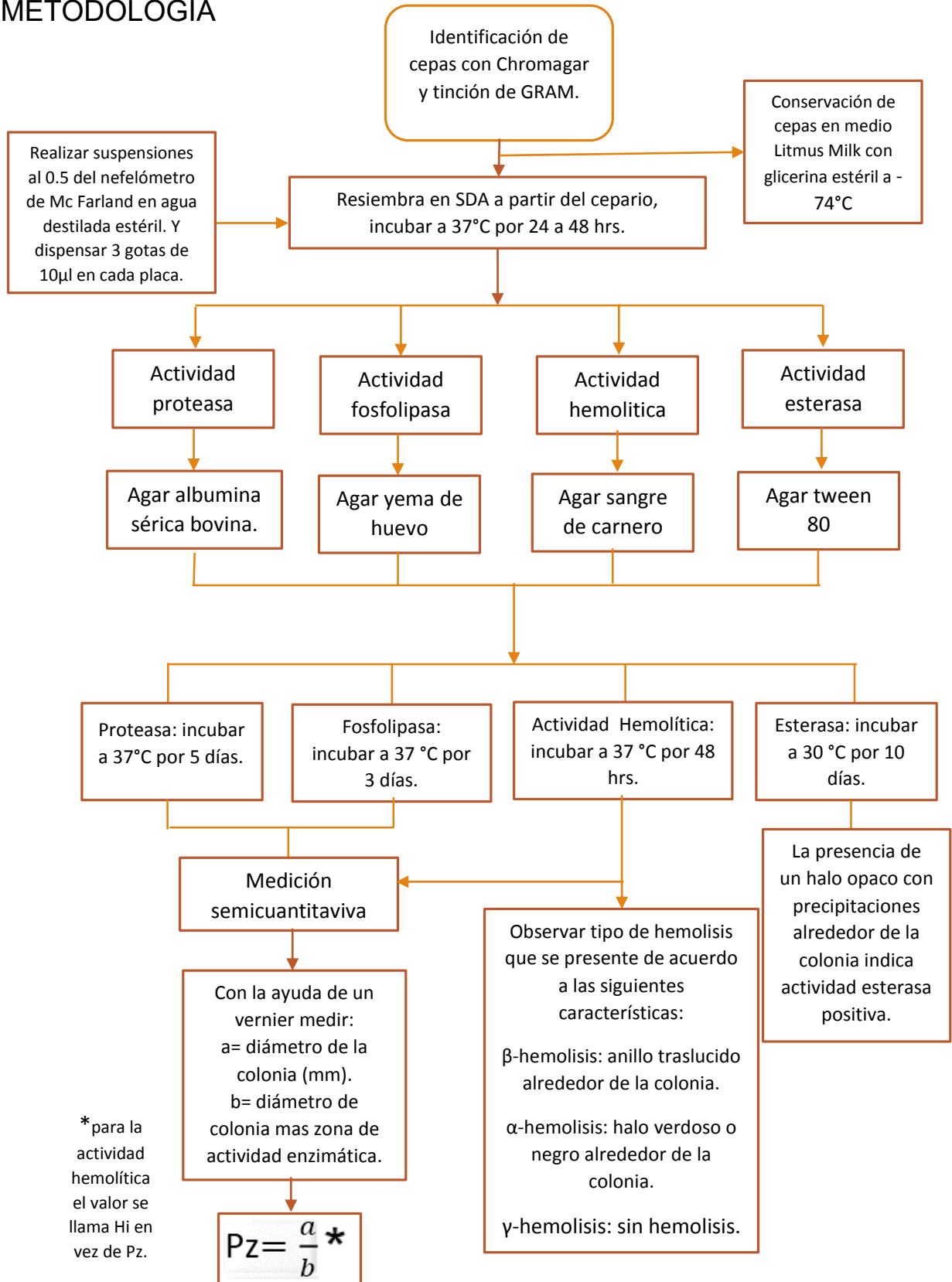


Diagrama 1.- Metodología general del estudio.

### IDENTIFICACION DE LAS MUESTRAS

Después de ser recibidas las 102 muestras del Hospital Regional de Tlanepantla (HRT) etiquetadas como *Candida spp.* estas fueron resembradas en SDA por 24 horas a 37 °C además de que a cada una se le realizo una revisión con microscopio óptico con la tinción de GRAM para asegurar que se tratara de levaduras y que no estuvieran contaminadas con bacterias a consecuencia de un mal manejo durante la toma de muestra o el transporte (ver Figura 3), una vez corroborado el punto anterior fueron sembradas en Chromoagar para identificar la especie de *Candida* de la que se trataba. Posteriormente se realizó con la ayuda de la técnica de biología molecular PCR, una identificación de las cepas utilizadas en el presente estudio y se confirmó que pertenecen al género *Candida* y especie *albicans*. Una vez identificadas fueron resembradas en tubos con medio YM inclinado se conservaron en un medio que consiste en Litmus Milk y glicerina estéril para ser congeladas a -74 °C de temperatura en un refrigerador especial para conservación de muestras biológicas a dicha temperatura.

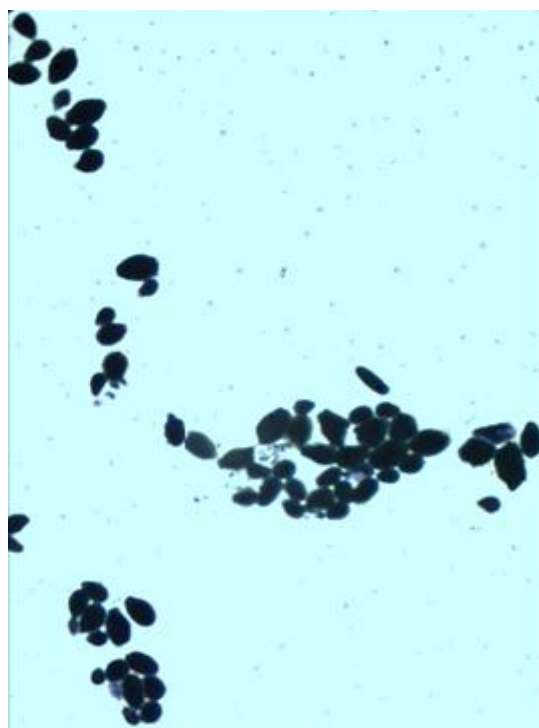


Figura 3.- Tinciones de GRAM de muestras L17-60-15 (100x).



## PRUEBA DE ACTIVIDAD HEMOLITICA

- Preparación del medio

Se utilizaron 7 ml de sangre de carnero desfibrinada de los Laboratorios Microlab S.A. de C.V. por cada 100ml de SDA suplementado con 3% de glucosa.

El medio es preparado con 65g de SDA por cada 1000 ml de agua destilada y 1.95g de glucosa (el 3% de la mezcla total) para la misma cantidad de agua. Posteriormente el medio es esterilizado con autoclave bajo las condiciones 121°C/15lb/15min.

Se deja enfriar el medio hasta que se pueda manipular y se agrega la sangre de cordero desfibrinada con la ayuda de una pipeta estéril, cuidando que este proceso sea en un área estéril (cerca de un mechero) y la fuerza con la que se dispensa la sangre para no provocar la lisis de los eritrocitos. Si el medio conserva el color original de la sangre el medio está listo, sin embargo, si el color del medio cambió a negro o verde oscuro, los eritrocitos han sido lisados y el medio se debe repetir.

- Sembrado

Se preparó una suspensión de células igualada al 0.5 del nefelómetro de McFarland de cultivos de 24 hrs. en agua destilada estéril, luego 10 µl de esa suspensión siembran goteando dicha cantidad en el medio por triplicado en cada placa y se incuban a 37°C por 48 hrs.

- Lectura de resultados:

La presencia de un anillo traslucido transparente distintivo alrededor del sitio de inculo indica beta hemolisis, en caso de encontrar un halo verde o negro indica alfa hemolisis (en ambos casos la hemolisis es positiva pero en los resultados de debe especificar si es alfa o beta) y en caso de no encontrarse un halo la actividad hemolítica se considera negativa (Figura 4).

Posteriormente se realiza un análisis semicuantitativo basado en lo reportado por Yigit en 2009 con la siguiente formula:

$$Hi = \frac{a}{b}$$

Dónde: a= diámetro de la colonia (mm); b= diámetro de la colonia más la zona de precipitación (mm).

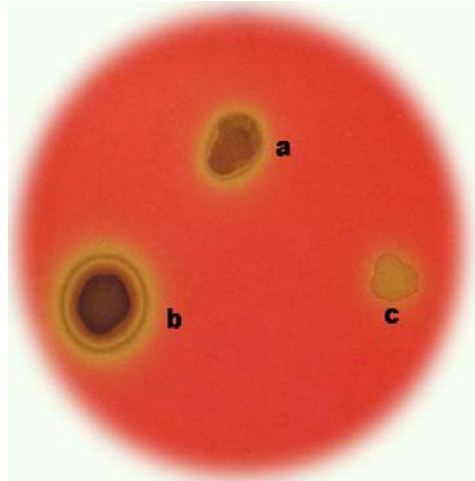


Figura 4.- Actividad hemolítica de *Candida spp.* En Agar SDA sangre de borrego (enriquecida con 3% de glucosa). a:  $\alpha$  hemolisis, b:  $\beta$  hemolisis (se puede observar el anillo representativo alrededor de la zona de hemolisis), c: no hemolisis (Yigit, 2009).

## PRUEBA DE ACTIVIDAD DE PROTEASAS

- Preparación del medio

Se llevó a cabo el método en placa, utilizando medio de cultivo que contiene 0,5 g  $K_2HPO_4$ ; 0,04 g  $MgSO_4 \cdot H_2O$ ; NaCl 1 g; 0,2 g extracto de levadura; 4 g glucosa y 4 g de agar bacteriológico por cada 150ml de agua destilada, esta solución es esterilizada en autoclave a  $121^\circ C/15lb/15$  minutos.

Se pesan 0.5g de albúmina sérica bovina; que sirve como única fuente de nitrógeno, y se solubiliza en 50ml de agua destilada tras lo cual se filtró con la ayuda de papel con tamaño de poro de  $0.45 \mu m$  (marca Mllipore). Se agrega al medio, se disuelve con agitación suave y se dispensa en las placas Petri estériles grandes.

- Sembrado

Se preparan suspensiones de células con agua destilada estériles igualadas al 0.5 del nefelómetro de McFarland y se inoculan  $10 \mu l$  de la suspensión por triplicado en cada placa y se incuban a  $37^\circ C$  durante 5 días.

- Lectura de resultados

Transcurrido el tiempo se tiñen con amino black al 0.6 %; la decoloración se realiza con ácido acético al 20%. Se miden los diámetros de las colonias y de las zonas claras alrededor de cada una de ellas (Figura 5), con la ayuda de un vernier y los

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

valores en milímetros (mm) son utilizados para calcular el índice de actividad enzimática (Pz) de la siguiente forma:

$$Pz = \frac{a}{b}$$

Dónde: a= diámetro de la colonia (mm); b= diámetro de la colonia más la zona de precipitación (mm).

- Interpretación de resultados por el cuadro 3

Pz=1.0 → Sin actividad enzimática.
0.900 ≤ Pz ≤ 0.999 → Actividad enzimática muy débil.
0.800 ≤ Pz ≤ 0.899 → Actividad enzimática débil.
0.700 ≤ Pz ≤ 0.699 → Actividad enzimática moderada.
Pz ≤ 0.699 → Actividad enzimática alta.

Cuadro 3.- Escala para interpretación de intensidad enzimática de acuerdo a su valor de Pz (Hernandez-Solis, 2014).

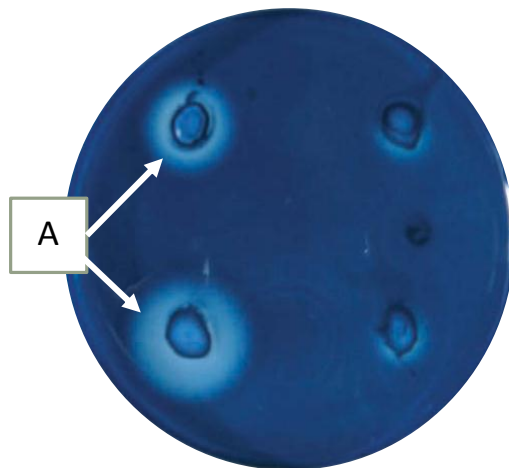


Figura 5.- Actividad proteolítica de diferentes aislamientos de *C. albicans* en medio con albumina sérica bovina, después de cinco días de incubación. A: se puede observar un área de actividad que no fue teñida por el colorante tras la incubación. (Ombrella, 2008)

## PRUEBA DE ACTIVIDAD FOSFOLIPASA

- Preparación del medio

La actividad fosfolipasa se detectó por el método en placa que consistió en agar de extracto de malta suplementado (BD) con 2% de yema de huevo.

Se agregan 33.6g de Agar extracto de Malta (BD) en 980ml de agua destilada, tras lo cual se introduce al autoclave 121°C/15lb/15 minutos. Se deja enfriar el medio a temperatura ambiente y una vez que alcance una temperatura aproximada de 50°C se agregan 20ml de yema de huevo por cada litro de medio con la ayuda de una pipeta estéril cerca de un mechero para evitar contaminación.

- Sembrado

Tras sembrar las cepas en SDA por 48 HRS. A 37 °C se preparan una suspensión de levadura en agua destilada estéril igual a 0.5 de McFarland a partir de las colonias puras, se toman 10 µl de la suspensión y se inoculan dejando caer una gota de dicho volumen al medio por triplicado en cada placa, se le permite reposar a 25 °C o a temperatura ambiente para que se sequen las gotas (cerca del mechero que provee un área de esterilidad) incubar a 37°C por 3 días (Ombrella, 2008).

- Lectura de resultados

En el día cinco, un halo de hidrolisis alrededor de las colonias se mide con la ayuda de un vernier y la actividad de fosfolipasa es medida por el cociente del diámetro de la colonia entre el diámetro de la colonia más la zona de hidrolisis (Figura 6) y expresada como Pz que es calculada e interpretada de la siguiente forma:

$$Pz = \frac{a}{b}$$

Dónde: a= diámetro de la colonia (mm); b= diámetro de la colonia más la zona de precipitación (mm).

- Interpretación de resultados: Ver cuadro 3



Figura 6.- Actividad fosfolipasa positiva de diferentes aislamientos de *C. albicans* en agar malta suplementado con yema de huevo después de tres días de incubación. Donde se puede observar área de precipitación alrededor de la colonia (Ombrella, 2008)

### PRUEBA DE ACTIVIDAD ESTERASA

- PREPARACION DEL MEDIO

Se pesaron 10 g de peptona de carne, 5g de NaCl, 0.1g de CaCl<sub>2</sub> (Merck) y 15 g de agar bacteriológico de BD por cada 1000ml de agua destilada, posteriormente se ajusta el pH a 6.8 y posteriormente se esteriliza en autoclave.

Finalmente se agregan 5 ml de tween 80 (esterilizado por autoclave) al medio frío (50°C) y se dispensa el medio en placas Petri estériles de 90mm.

- Sembrado

Se realizan suspensiones de las cepas en agua destilada al 0.5 del nefelómetro de McFarland y se inoculan 10µl de dicha suspensión (por triplicado en cada placa), las cepas utilizadas van a ser de 1 noche de crecimiento.

Todas las placas se incuban a 30 °C por 10 días.

- Lectura de resultados

Un halo opaco donde se observan puntos de precipitado alrededor de las colonias, es tomado como actividad esterasa positiva (Figura 7).

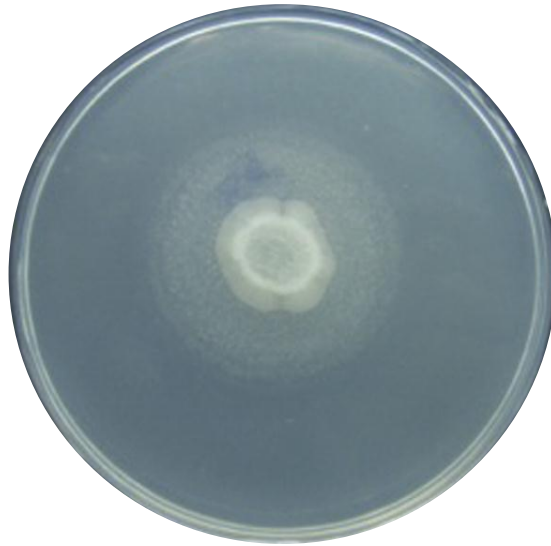


Figura 7.- Prueba de opacidad en tween 80 se puede observar un halo de opacidad alrededor del sembrado lo que indica que la prueba es positiva (30°C por 10 días) (Pakshir, 2013)

## RESULTADOS

Las muestras obtenidas en el HRT fueron aisladas como consecuencia de infecciones o enfermedades de pacientes de dicho hospital razón por la cual contaban en su totalidad con un diagnóstico presuntivo de ser *Candida spp.*. Cuando estas muestras llegaron al laboratorio fueron identificadas mediante tinción de GRAM, en primer lugar, para corroborar que el diagnóstico con el que se contaba era correcto, que efectivamente se trataba de levaduras y para asegurarse que no estaban contaminadas con bacterias a causa de la toma de muestra, manipulación en el hospital o el transporte. Posteriormente fueron resembradas en medio SDA para obtener mejores aislamientos con el propósito de ser sembradas una vez más en Chromagar para diferenciar la especie de *Candida* de la que se trataba dando como resultado el diagnóstico confirmatorio, estos datos fueron organizados en la tabla 1.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

Tabla 1.- Identificación de las muestras provenientes del HRT.

Clave original.	Clave nueva.	Sexo.	Tipo de muestra.	Diagnóstico presuntivo.	Diagnóstico confirmatorio.
2	L17-1-15	INP	INP	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
3	L17-2-15	INP	INP	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
6	L17-3-15	INP	INP	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
11	L17-4-15	INP	INP	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
106	L17-5-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
147	L17-6-15	Femenino	Faríngeo	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
198	L17-7-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
216	L17-8-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
241	L17-9-15	Femenino	Vaginal	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i>
267	L17-10-15	INP	Faríngeo	<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i>
274	L17-11-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
298	L17-12-15	Femenino	Faríngeo	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
328	L17-13-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
481	L17-14-15	Femenino	Vaginal	<i>Desconocido</i>	<i>C.albicans</i>
498	L17-15-15	Femenino	Vaginal	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
524	L17-16-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
534	L17-17-15	Femenino	Vaginal	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.albicans</i>
543	L17-18-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
614	L17-19-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
624	L17-20-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
625	L17-21-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
650	L17-22-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
683	L17-23-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
704	L17-24-15	Femenino	URO	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
731	L17-25-15	INP	Secreción	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
786	L17-26-15	INP	INP	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
796	L17-27-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

820	L17-28-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
929	L17-29-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
939	L17-30-15	Femenino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
940	L17-31-15	Femenino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
941	L17-32-15	Femenino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
943	L17-33-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
947	L17-34-15	Masculino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
953	L17-35-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
956.1	L17-36-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
956.2	L17-37-15	Femenino	Vaginal	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
957	L17-38-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
963	L17-39-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
971	L17-40-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
982	L17-41-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
984	L17-42-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
988	L17-43-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
1018	L17-44-15	Femenino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
1171	L17-45-15	Femenino	Urocultivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
1201	L17-46-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
1269	L17-47-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
1440	L17-48-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
1575.1	L17-49-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
1575.2	L17-50-15	Femenino	Vaginal	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
1586	L17-51-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
1621	L17-52-15	Femenino	F-S	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2350	L17-53-15	Femenino	Urocultivo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2404	L17-54-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2422	L17-55-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2465	L17-56-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2527	L17-57-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2965	L17-58-15	INP	INP	INP	<i>C. albicans</i>



DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

3105	L17-59-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
3218.1	L17-60-15	Femenino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
3800	L17-61-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
3812	L17-62-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
4034	L17-63-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4349	L17-64-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4459	L17-65-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4533	L17-66-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
4537	L17-67-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4730	L17-68-15	Masculino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
4812	L17-69-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4814	L17-70-15			<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
4853	L17-71-15	Femenino	URO	<i>C. albicans con contaminación</i>	<i>C. albicans</i>
4853.1	L17-72-15	INP	URO	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
5376	L17-73-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
5507	L17-74-15	INP	Secreción	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i>
5507.2	L17-75-15	INP	INP	INP	<i>C. albicans</i>
5509	L17-76-15	Masculino	Secreción	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
5674	L17-77-15	Femenino	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
6321	L17-78-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
6920	L17-79-15	Femenino	URO	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7120	L17-80-15	INP	INP	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7661	L17-81-15	Femenino	Vaginal	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i>
7760	L17-82-15	Femenino	URO	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8750.1	L17-83-15	Femenino	URO	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8750.2	L17-84-15	Femenino	URO	<i>C. tropicalis</i>	<i>C.albicans</i>
8881	L17-85-15	Femenino	Faríngeo	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9072	L17-86-15	Femenino	Faríngeo	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9085	L17-87-15	Masculino	Faríngeo	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9154	L17-88-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

9289	L17-89-15	Femenino	Vaginal	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9653	L17-90-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9655	L17-91-15	Femenino	Vaginal	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9676	L17-92-15	INP	Secreción glandular	<i>Candida spp.</i>	<i>C. albicans</i>
9676.1	L17-93-15	INP	Secreción glandular	<i>Candida spp.</i>	<i>C. albicans</i>
9686	L17-94-15	Femenino	Vaginal	<i>Candida spp.</i>	<i>C. albicans</i>
9686.1	L17-95-15	Femenino	Vaginal	<i>Candida spp.</i>	<i>C. albicans</i>
9708	L17-96-15	INP	Faríngeo	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
9753	L17-97-15	INP	INP	INP	<i>C. albicans</i>
9763	L17-98-15	Femenino	INP	INP	<i>C. albicans</i>
9895	L17-99-15	Femenino	URO	INP	<i>C.albicans</i>
9895.1	L17-100-15	INP	INP	INP	<i>C.albicans</i>
2509095.1	L17-101-15	INP	INP	<i>C.albicans</i>	<i>C. albicans</i>
2509095.2	L17-102-15	Femenino	INP	<i>C. tropicalis</i>	<i>C.albicans</i>
Cepa ATCC	L17-103-15	--	--	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
INP.- Información no proporcionada por HRT.					

Se analizaron a las 102 cepas provenientes del Hospital Regional de Tlalnepantla (HRT) en el medio de agar sangre de carnero para analizar su actividad hemolítica en primer lugar y el 100% de ellas presento el anillo que de acuerdo a la bibliografía es indicativo de hemolisis beta (ver figura 8), posteriormente se llevaba a cabo la medición del diámetro de la colonia con la ayuda de un vernier y se dividió entre el diámetro de la colonia más el anillo de hemolisis con lo cual se obtenía el Hi o Hemolytic index por sus siglas en inglés.

El promedio de índice hemolítico (Hi) obtenido en la prueba de actividad hemolisina fue de 0.527, haciendo un análisis estadístico se encontró que 40 de las cepas, es decir, el 39.21% están por encima del promedio y 62 de las cepas, que representa un 60.78% de las cepas están por debajo del promedio (Ver gráfico 1).



Gráfico 1.-Cepas cuyo Pz se encuentra por debajo y por arriba del promedio. Se puede observar de manera general que aunque el 100% de las cepas presentan actividad hemolítica solo el 39% tienen actividad hemolítica arriba del promedio.

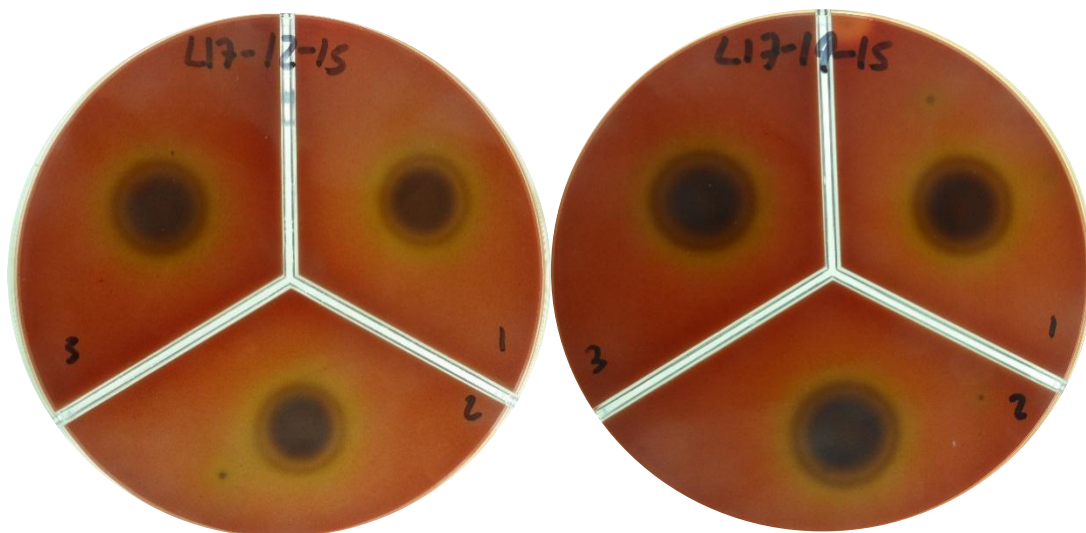


Figura 8.- Cepas L17-12-15 (izquierda) y L17-19-15 (derecha) sembradas por triplicado en medio SDA sangre de carnero (enriquecida con 3% glucosa), presentando beta hemolisis en todos los casos usando de criterio el anillo alrededor del inóculo junto con hemolisis alfa alrededor del mismo.

En cuanto a la actividad proteasa que fue medida de acuerdo al criterio utilizado por Hernández-Solís se obtuvo un Pz promedio de 0.726 que al ser comparado con los resultados de la tabla 2; 62 de ellas, es decir, un 60.78% estaban por arriba de esta media y por lo tanto 40 cepas (39.21%) tuvieron una actividad proteasa por debajo de la media (Ver gráfico 2) con lo cual se puede apreciar que una notable mayoría además de tener actividad proteasa, dicha actividad está por encima del promedio del total de las cepas.



Grafica 2.- Porcentaje de cepas cuyo Pz se encuentra por debajo y por arriba del promedio. Se observa que el 61% de las cepas tienen actividad proteasa con intensidad arriba del promedio.

De acuerdo al criterio de Hernández-Solís el valor Pz se divide en rangos dentro de los cuales se puede clasificar la intensidad de la actividad enzimática; siguiendo este criterio se analizaron las 102 cepas y se obtuvo que 32 cepas (32.35%) tienen actividad proteasa alta, 54 (52.94%) moderada, 13 (12.74%) débil y solo 2 cepas (1.96%) tienen actividad enzimática muy débil (Gráfica 3).

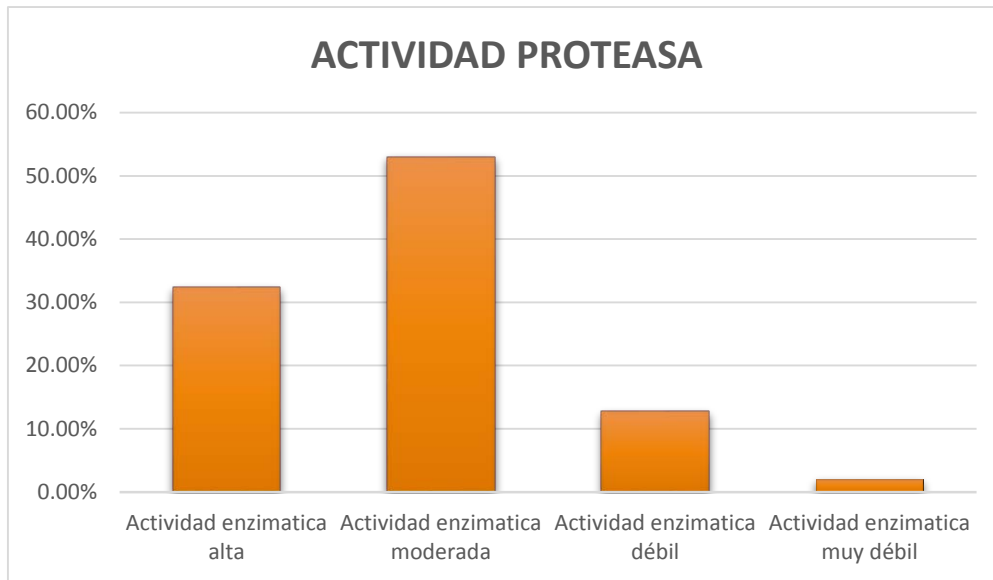
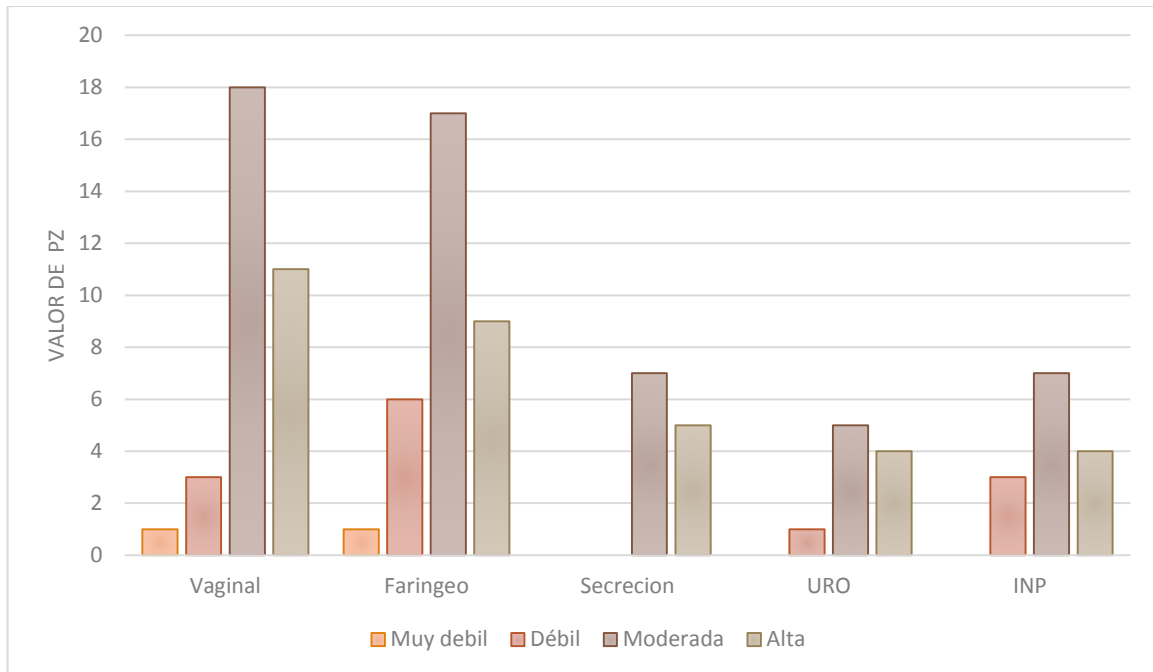


Gráfico 3.- Distribución de cepas de acuerdo al criterio de intensidad de actividad enzimática utilizado por Hernández. Solís (2014). En esta grafica se observa de manera más detallada que predomina la actividad proteasa moderada y alta.

Analizando el origen clínico de las cepas con las que se llevó a cabo la prueba de proteasa en función de la intensidad de actividad enzimática de acuerdo a Hernandez-Solís se obtuvo que de las dos cepas con actividad proteasa muy débil una pertenecía a una muestra vaginal y la otra proviene de un exudado faríngeo, de las 13 muestras con actividad enzimática débil el 23.07% fueron vaginales, el 46.15% fueron de exudado faríngeos, el 7.6% era de una infección urinaria y el 23.07% no se especifica el origen. Por otro lado entre las 54 cepas que presentaron actividad proteasa moderada el 33.33% fueron de origen vaginal, el 31.48% de exudados faríngeos, el 12.9% de secreciones glandulares y faríngeas, 9.25% de infecciones urinarias y un 12.9% de origen no especificado. Por último, de un total de 33 cepas con actividad proteasa alta un 33.33% fueron de origen vaginal, 27.27% de exudados faríngeos, 15.15% de secreciones, 12.12% de infecciones urinarias y otro 12.12% de ellas se desconoce el origen clínico. Todos estos resultados se muestran en la gráfica 4.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.



Grafica 4.- Origen clínico de los aislamientos estudiados de acuerdo a la intensidad de actividad proteasa. (INP=Información no proporcionada por el HRT)

La manera cualitativa de saber si las cepas poseían actividad proteasa fue observando un halo blanco alrededor de las colonias después de haber sido teñidas con el colorante Amido- black tras los 5 días de incubación como se muestra en las figuras 9 y 10.

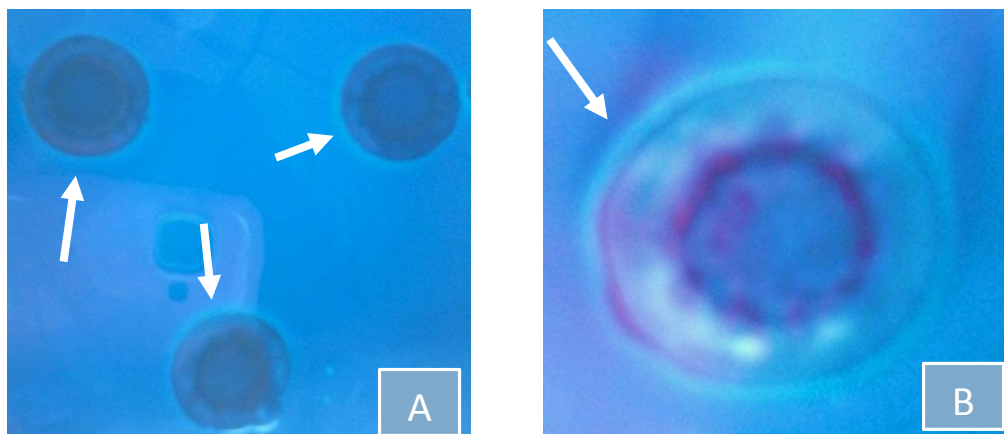


Figura 9A.- Actividad proteolítica de la muestra L17-86-15 de *C. albicans* en medio con albumina sérica bovina, después de cinco días de incubación. La actividad proteolítica (señalada con las flechas en la figura) se distingue por tratarse de una zona clara alrededor del área de sembrado después de la tinción del medio con amidoblack.  
 Figura 9B.- Foto de uno de los inóculos de la muestra L17-86-15, la actividad proteasa está señalada con una flecha.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

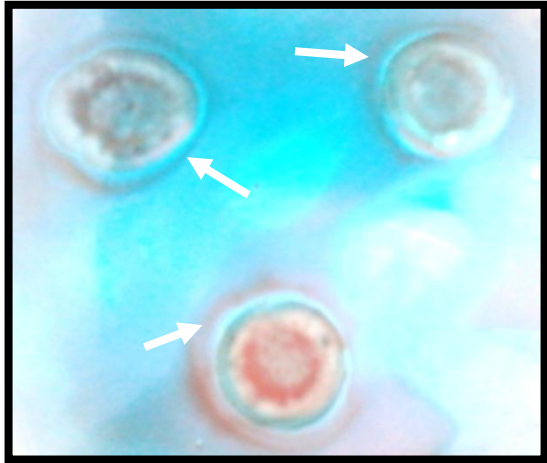
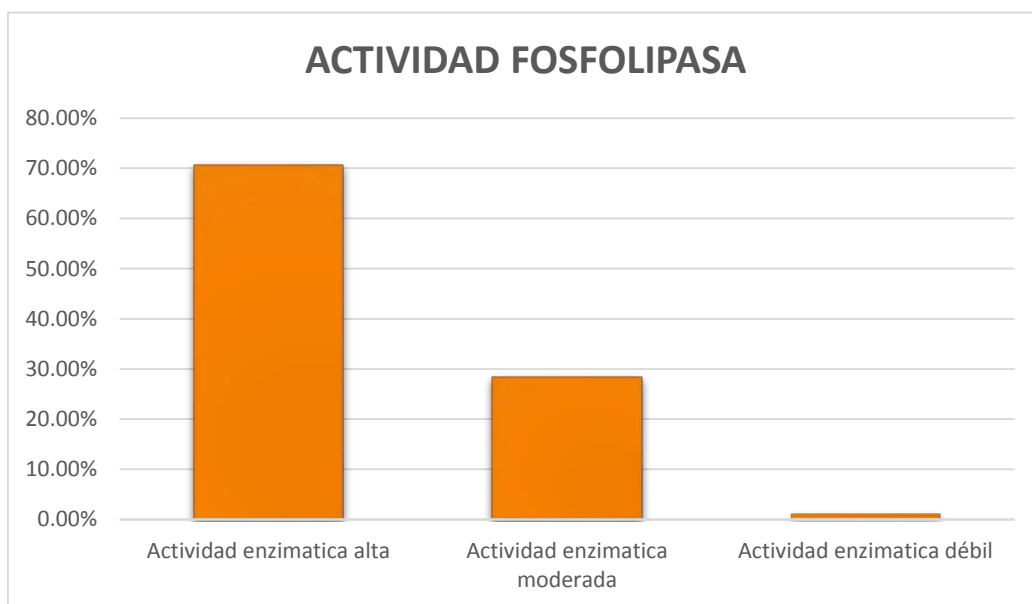
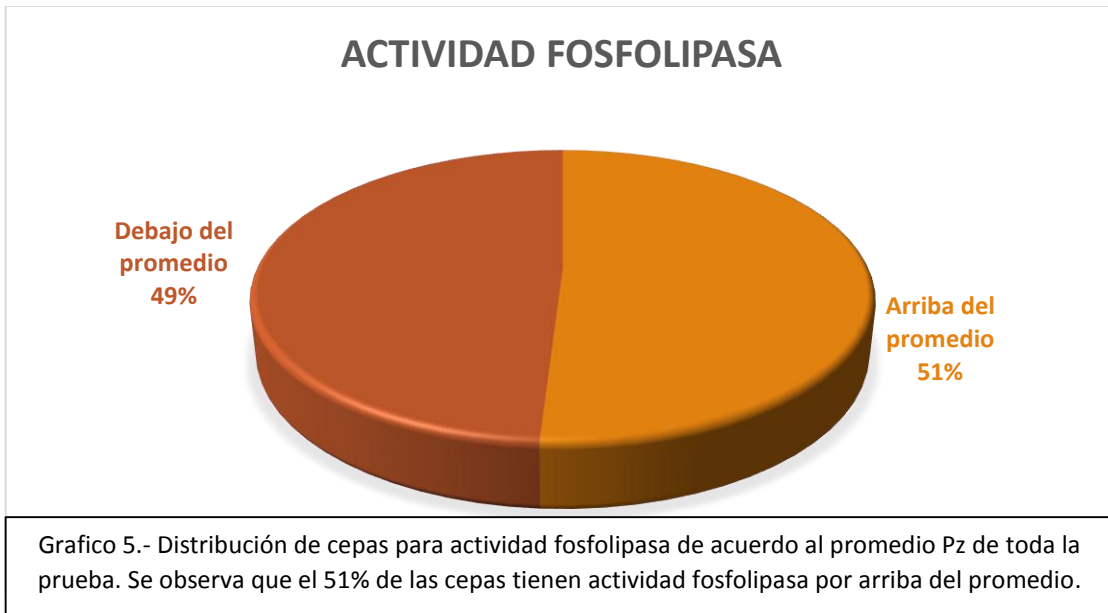


Figura 10.- Actividad proteolítica de la muestra L17-50-15 de *C. albicans* en medio con albumina sérica bovina, después de cinco días de incubación, se puede observar un halo claro alrededor del inoculo (Actividad señalada por las flechas).

El promedio Pz de actividad fosfolipasa fue de 0.671 con 52 cepas (50.98%) por arriba de este promedio y 50 cepas (49.01%) por debajo del mismo (Ver gráfico 5). Así mismo, se realizó un análisis con base en los rangos de actividad con base en el criterio usado por Hernandez-Solís, al igual que con el ensayo de actividad proteasa y se obtuvo que 72 cepas (70.58%) tuvieron actividad enzimática alta, 29 (28.43%) tuvieron actividad enzimática moderada y únicamente una cepa (que representa un 0.98%) presentó actividad fosfolipasa débil. (Ver gráfica 6)

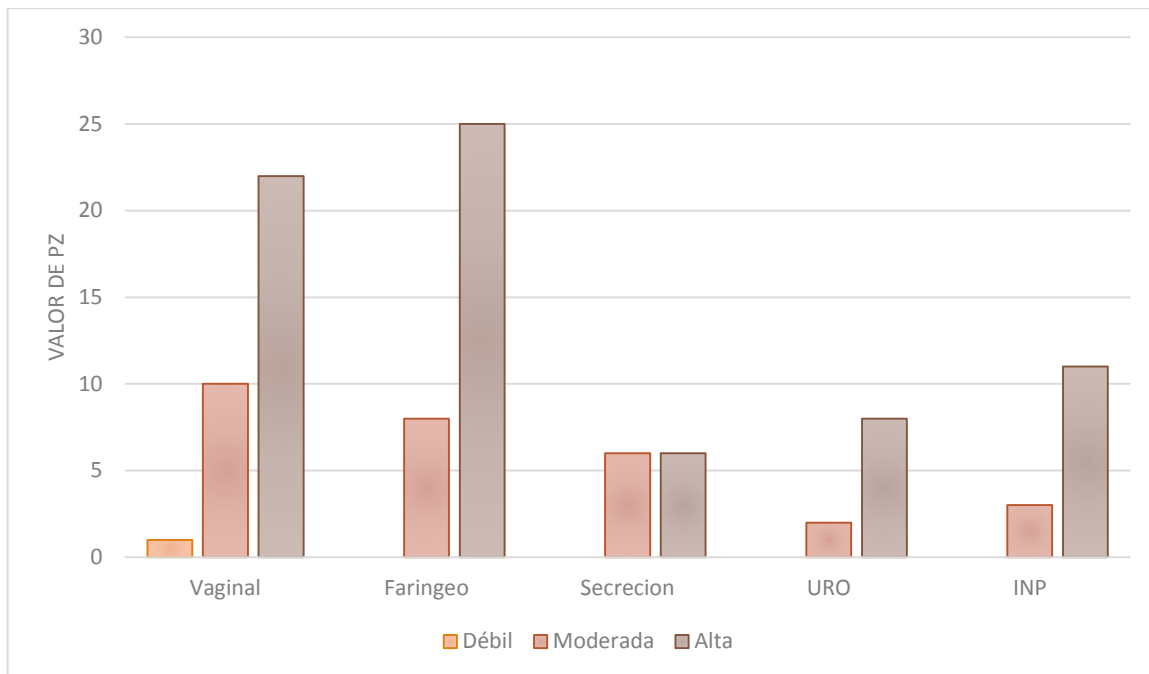
Otra forma en la que se realizó una distribución de las cepas fue por su origen clínico en función de la intensidad de la actividad fosfolipasa: ninguna tuvo actividad fosfolipasa muy débil, una cepa de origen vaginal tuvo actividad débil, entre las 29 cepas con actividad enzimática moderada 34.5% fueron vaginales, 27.6% de exudados faríngeos, 20.7% de secreciones, 6.9% de infecciones urinarias y 10.3% de origen desconocido y por ultimo para esta prueba de las 72 con actividad fosfolipasa alta el 30.55% fueron de origen vaginal, 34.7% de exudados faríngeos, 8.3% de secreciones, 11.1% de infecciones urinarias y 15.3% de origen desconocido (Grafica 7)



Grafica 6.- Distribución de cepas de acuerdo a la intensidad de actividad enzimática según Hernandez-Solis (2014). Se observa con mayor detalle que predomina la actividad fosfolipasa moderada y alta.



DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.



Gráfica 7.- Origen clínico de los aislamientos estudiados de acuerdo a la intensidad de actividad fosfolipasa. (INP= Información no proporcionada por el HRT)

La forma cualitativa de saber que la actividad fosfolipasa era positiva consistía en identificar un halo de hidrolisis alrededor del área de sembrado en la placa como se muestra en la figura 11.

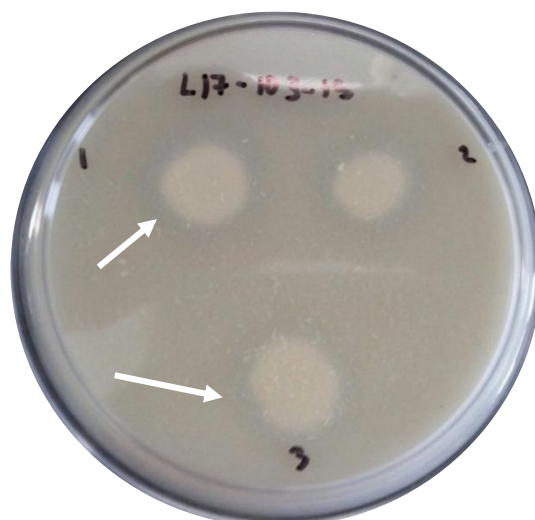


Figura 11.- Actividad fosfolipasa de muestra L17-103-15 *C. albicans* ATCC en agar malta suplementado con yema de huevo después de tres días de incubación, se observa un área de hidrolisis alrededor (Flechas).

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

Por último, para que el ensayo de actividad esterasa se considerara positiva, se debe observar un halo opaco con precipitaciones alrededor de la colonia como se muestra en la figura 9; y como se muestra posteriormente en la figura 12 este resultado se obtuvo en un 99.01% de las muestras con excepción de la cepa L17-21-15 sin actividad esterasa.

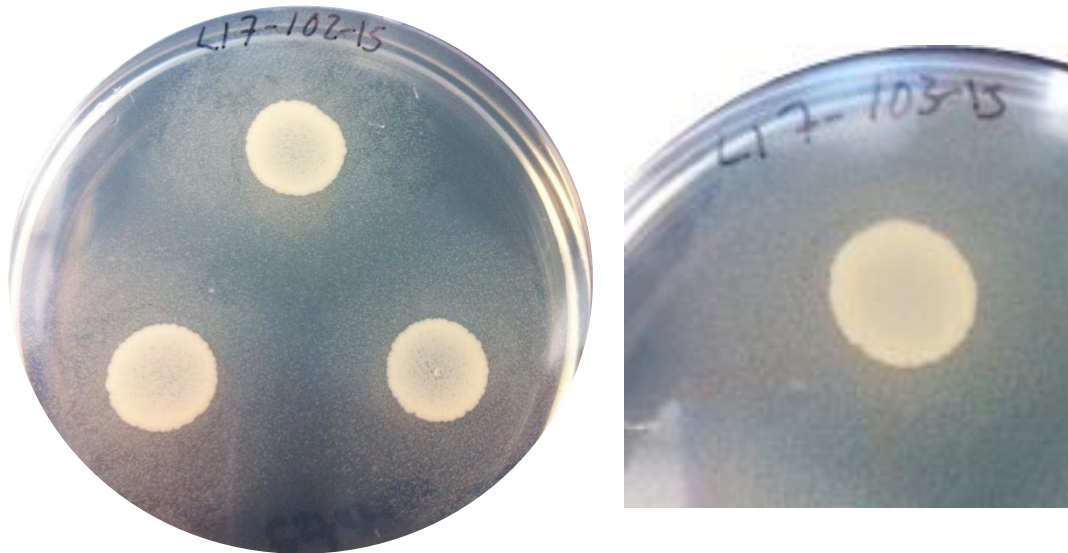


Figura 12.- Resultado positivo para prueba de esterasa de muestra L17-102-15 (izquierda) y l17-103-15(derecha) tras 10 días a 30°C. en ambas placas se pueden observar halos opacos con precipitaciones alrededor de las colonias.

### ANALISIS DE RESULTADOS

La prevalencia de micosis superficiales ha tenido un enorme aumento en los últimos años, afectando alrededor del 20-25% de la población mundial. En este escenario, las micosis cutáneas son la forma más frecuente de infección y en consecuencia constituyen un mayor problema de salud pública a nivel mundial (De Souza, 2015). La candidiasis es una infección fúngica oportunista causada por varias especies de *Candida*, la severidad de las infecciones micóticas aumenta proporcionalmente con el aumento de la disfuncionalidad del sistema inmune, por lo tanto, los episodios de candidiasis en las superficies mucosas son muy frecuentes y difíciles de tratar (Panizo, 2001). Aunado a los factores de virulencia que posee *Candida*, como la propiedad de adherencia, la habilidad de competir con otros microorganismos por nutrientes y la capacidad de evadir defensas del hospedero, interactúan entre sí, aumentando la frecuencia de la candidiasis especialmente en pacientes inmunosuprimidos (Panizo, 2001). Además existe la habilidad de este organismo para producir enzimas extracelulares lo que también puede estar ligada a su virulencia. Y

aunque *Candida* tiene la habilidad de producir estas enzimas, la cantidad y potencia de las mismas es diferente entre especies o incluso depende de la fuente o sitio de aislamiento (Pakshir, 2013).

Como ya se ha mencionado con anterioridad en este estudio se determinó *in vitro* la actividad hemolítica y enzimática de fosfolipasa, proteasa y esterasa en 102 cepas de aislamientos clínicos que causaron candidiasis en humanos.

La secreción de hemolisinas es un factor de virulencia que contribuye a la patogénesis de *Candida*. En particular en *Candida albicans* puesto que esta especie tiene la capacidad de secretar hemolisina seguida de la adquisición del hierro contenido en la hemoglobina y su capacidad de fijar el complemento, opsonizando la superficie de los eritrocitos y finalmente hemolizándolos lo que facilita la invasión de hifas en candidiasis diseminada (Pakshir, 2013).

Como resultado de esta prueba el 100% de los aislamientos produjeron una beta hemolisis en el medio con un Hi promedio de 0.527 y como se muestra en el grafico aunque todas tuvieron  $\beta$ -hemolisis solo un 39.21% presentaron actividad alta con respecto a la media de las muestras totales.

Debido a que la patogenicidad de *C. albicans* está regulada por una serie de factores de virulencia, entre los cuales se encuentran diversas enzimas hidrolíticas extracelulares que convierten a las infecciones candidiasicas en multifactoriales, se decidió estudiar la participación de las actividades fosfolipasa y proteinasa en las candidiasis de los aislamientos clínicos del HRT.

Como se ha mencionado *Candida albicans* es un patógeno facultativo que ha desarrollado una serie de factores de virulencia entre los que se encuentran la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares entre las que destacan las aspartil proteinasas secretorias (Saps), que son una familia de enzimas capaces de degradar diversos tipos de sustratos fisiológicamente importantes como los que conforman las mucosas y elementos del sistema inmune. Estudios experimentales han demostrado que la elevada producción de Saps por *C.albicans* mejora la capacidad del microorganismo para colonizar y penetrar tejidos y evadir el sistema inmune del huésped (Hernández-Solís, 2014). Las proteasas secretadas son activas a un pH ácido, presentando cada isoenzima un rango de pH y un pH óptimo de actividad en este estudio en particular, se cuidó que el medio de cultivo en el que se llevaba a cabo la prueba estuviera ajustado en un pH entre 4.5 y 5.

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

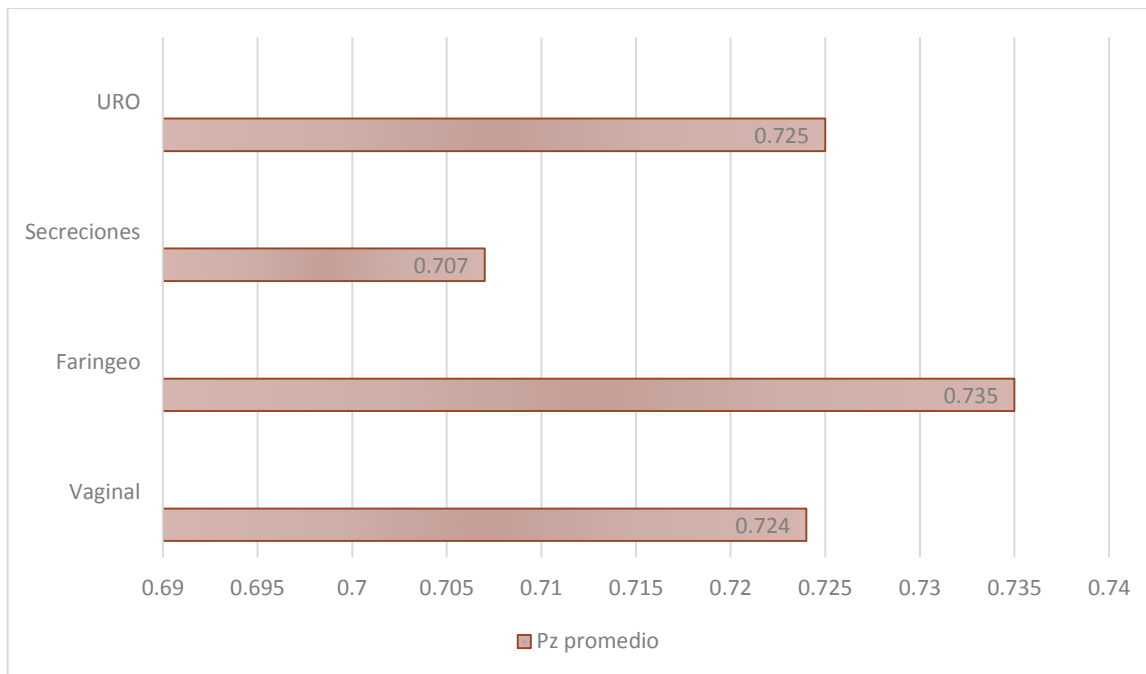
La colonización por *C. albicans* puede llevar a la infección sistémica cuando el huésped presenta factores de riesgo, como el uso de antibióticos de amplio espectro, esteroides u otros agentes inmunosupresores, diabetes mellitus, sida, quimioterapias por tratamiento contra el cáncer, y pacientes sometidos a trasplante de órganos (Hernández-Solís, 2014).

La secreción de Saps ha sido asociada a la patogenicidad de *C albicans*, ya que cepas aisladas de pacientes con candidiasis bucal han mostrado mayor actividad proteolítica que las aisladas de la cavidad oral de portadores sanos (Hernández-Solís, 2014). En este trabajo se demuestra esto ya que de las 33 cepas que se utilizaron y tenían un origen de infección faríngea 17 mostraron actividad proteasa moderada y 9 actividad alta.

En este estudio además de separar los resultados de acuerdo a la intensidad de actividad también se dividieron las cepas por su origen clínico, entre los cuales se encuentran además de las 33 cepas de origen faríngeo, 33 de origen vaginal, 12 provenientes de secreciones, 10 provenientes de infecciones urinarias y 14 cuyo origen no estaba especificado por el HRT que las donó. Con esto se muestra claramente que las cepas que suelen tener una importante actividad proteolítica provienen de infecciones vaginales y faríngeas seguidas por las provenientes de alguna secreción y las urinarias respectivamente.

Al analizar la actividad proteolítica entre los diferentes grupos, se observó que aquel con *Candida* proveniente de secreciones presento mayor actividad, con una media de actividad Pz de 0.707, aunque no hubo una diferencia significativa estadísticamente y le siguieron los grupos de cepas provenientes de origen vaginal con 0.724, urinario con 0.725 y faríngeo con 0.735. Aunque en este estudio las cepas provenientes de exudados faríngeos tuvieron una media de actividad proteasa relativamente baja, un estudio realizado por Tsang et al. en el 2007 señala que las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes diabéticos mostraron una mayor actividad proteolítica que las cepas aisladas de sujetos sanos, y mencionan que esta actividad podría estar relacionada con características propias de estos pacientes, como el pH ácido y la reducción del flujo salival (Hernández-Solís, 2014). (Ver grafica 8)

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.



Grafica 8.- Comparación de promedios de Pz de las cepas de acuerdo a su origen clínico en la prueba de actividad proteasa.

En estudios similares se ha publicado que el 100% de las cepas provenientes de pacientes con VIH, cáncer, diabetes y candidiasis oral presentaron actividad proteolítica; en sujetos sanos se ha publicado que el 50% de las cepas presentan dicha actividad (Hernández-Solís, 2014).

El tercer grupo de enzimas que se evaluaron en este estudio son las fosfolipasas que son consideradas una de las enzimas extracelulares más importantes porque juegan un papel significativo en la patogénesis ya que juegan un rol activo en la invasión del tejido del hospedero en candidiasis (Pakshir, 2013). También es sabido que los aislamientos clínicos de *C. albicans*, con un alto nivel de actividad fosfolipasa extracelular está relacionado con otros factores de patogenicidad como adhesión, invasión, de tejido del hospedador y un aumento de la formación del tubo germinativo (Kumar, 2010).

El término fosfolipasas describe un grupo heterogéneo de enzimas con capacidad de hidrolizar glicerofosfolípidos. La fosfolipasa parece jugar un papel clave en la invasión del tejido del hospedero en la candidiasis. Estas enzimas han sido reconocidas como factores de virulencia de bacterias, protozoos y hongos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* o *Cryptococcus neoformans* (Ombrella, 2008).

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

Algunos investigadores sugieren que aunque no encontraron diferencias significativas entre las cepas aisladas de pacientes diabéticos y sujetos sanos, parece ser que la diabetes mellitus podría influir en el mejoramiento de la expresión de los factores de virulencia de *C. albicans*, y aun que no se contó con el historial médico de los pacientes de quienes provenían las cepas utilizadas en el estudio, esto podría ser la explicación de porqué las fosfolipasas fueron en su mayoría de intensidad enzimática alta (70.6%), seguidas por actividad moderada (28.4% cepas), solo una cepa con actividad enzimática débil y ninguna con actividad enzimática muy débil, con una media de Pz de 0.671 sobre la que se encontraron el 50.98% de las cepas del estudio.

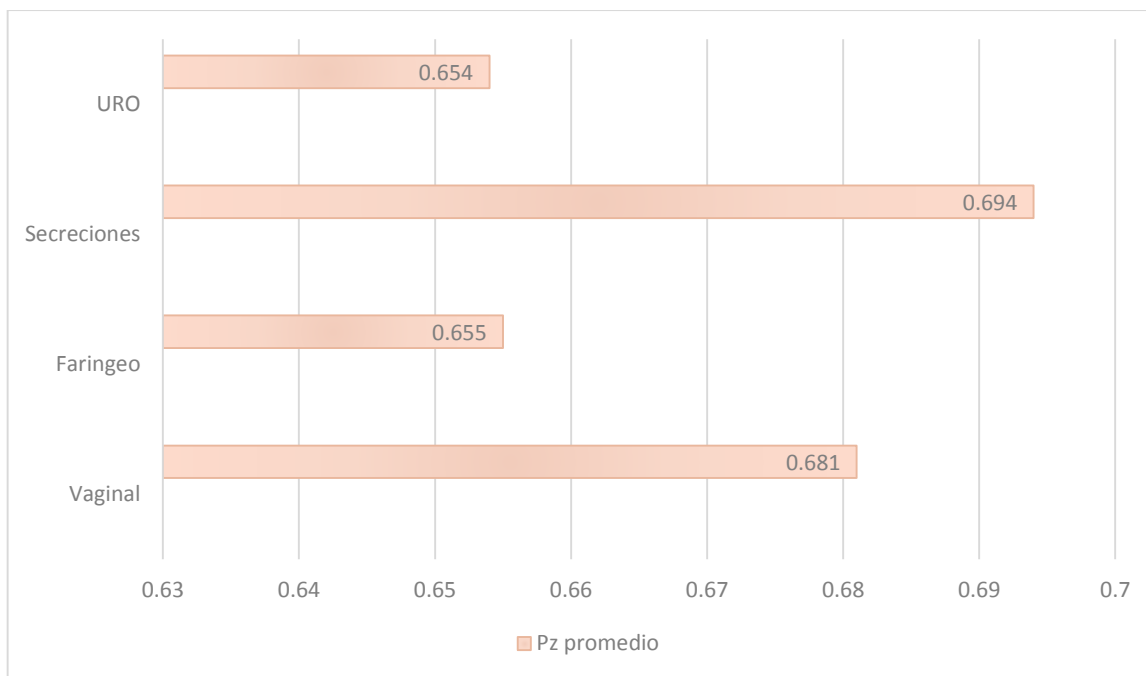
Barret-Bee et al. desde 1985 En particular, fueron los primeros en correlacionar la producción de fosfolipasa por *C. albicans* con su naturaleza patogénica demostrando que los aislamientos con alto potencial patogénico (altos niveles de adhesión a células del epitelio oral y gran patogenicidad para ratones) tenían una alta actividad fosfolipasa en comparación con levaduras con bajo potencial patogénico. Adicionalmente, los aislamientos en sangre de *C. albicans* han mostrado mayor actividad fosfolipasa *in vitro* que los aislamientos orales en pacientes sanos (Pini, 2011).

En el caso de esta enzima también se hizo un análisis estadístico separando en grupos de acuerdo al origen de las infecciones de las cuales provinieron las cepas utilizadas y se obtuvo que el grupo de cepas con un promedio menor de Pz (y por lo tanto mayor actividad enzimática como se explica en la tabla 3) fueron las de origen urinario con 0.654, seguidas de las de origen faríngeo con 0.655, luego las de origen vaginal con 0.681 y finalmente las que provenían de secreciones con un Pz promedio de 0.694. Esto último queda representado visualmente en la gráfica 9.

Este resultado muestra tener gran concordancia con los datos proporcionados por la literatura, ya que aproximadamente el 80% de los aislamientos de *Candida* de enfermedades crónicas de riñón exhiben actividad fosfolipasa, mientras que otros autores afirman que el 55.9% de los aislamientos de *Candida spp.* provenientes de catéter, sangre y cavidad oral, presentan actividad fosfolipasa. En otro estudio en una ciudad al sudeste de Iran, reporta que todos los aislamientos de *C. albicans* de vías urinarias y candidiasis vaginal tienen actividad fosfolipasa igual que en este estudio (Pakshir, 2013).

Además se considera a las fosfolipasas una de las enzimas hidrolíticas más importantes para la invasión de *Candida* en el tejido del hospedero.

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.



Gráfica 9.- Comparación de promedios de Pz de las cepas de acuerdo a su origen clínico en la prueba de actividad fosfolipasa.

Por último se realizó el estudio de la actividad esterasa con la ayuda del Test de opacidad con Tween 80 que es utilizado para la detección de dicha actividad enzimática en especies de *Candida* e incluso para distinguir entre ellas en algunos casos. Las enzimas lipolíticas hidrolizan el Tween y liberan ácidos grasos que luego se unen al calcio contenido en el medio. Este complejo es visible como cristales insolubles alrededor de las colonias (Pakshir, 2013). Este estudio es completamente cualitativo por lo que los resultados se expresaron como “Positivo” o “Negativo”, y tal como se menciona en los resultados; 101 de 102 cepas dieron un resultado positivo a esta prueba. Lo que demuestra que aunque aún no esté claro el mecanismo por el cual las enzimas lipolíticas actúan o si están relacionadas directamente con la virulencia de *Candida albicans* es cierto que se encuentra activa en cepas provenientes de infecciones activas junto con otras enzimas que si están claramente relacionadas a la patogenicidad de este microorganismo.

## CONCLUSIONES

Finalmente con la reunión y análisis de los datos obtenidos por la experimentación, se concluye que ya que la virulencia de *C. albicans* se debe no solo a una de sus factores de patogenicidad sino a la combinación de los mismos y se comprobó con este estudio que todas las cepas obtenidas del HRT, a excepción de la cepa L17-21-15 que presento todas las actividades enzimáticas excepto por la actividad esterasa; tenían los cuatro factores de patogenicidad que contribuyen principalmente a dicha virulencia. Por lo tanto, se comprobó que eran patógenas, debido a que dichas cepas provenían de infecciones activas.

Se cumplió con el objetivo de determinar si los aislamientos de *Candida albicans* poseen la capacidad de producir los factores patogénicos de: esterasas, fosfolipasas, proteasas y hemolisinas, y con esto se confirmó la hipótesis de que aplicando a las cepas de *Candida albicans* estudiadas las cuatro pruebas elegidas para comprobar y cuantificar (en el caso de actividad proteasa y fosfolipasa) la actividad enzimática, se demostraría que dichas cepas tienen estas enzimas y por tanto, son virulentas.

Por último, cabe mencionar, que este estudio se puede complementar examinando con las mismas cepas otros de los factores de patogenicidad como la adhesión y la resistencia a antimicóticos, producción de biopelículas, entre otros.



REFERENCIAS.-

1. Arenas, Roberto. (2014). "Micología medica ilustrada". Quinta edición, Ed. Mc Graw Hill, Mexico, D.F., pags. 240-251.
2. Bezerra de Melo Ricetoea Érika, Ralciane de Paula Menezes, Mário Paulo Amante Penatti, Reginaldo dos Santos Pedroso. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. Rev Iberoam Micol. 2015; 32 (2):79–82.
3. Bonifaz, Alexandro (2010). Micología Medica Basica, 3ª edición, ed. Mc Graw Hill, Mexico, D.F., 279-302.
4. Castañón Olivares Laura R. Departamento de Microbiología y Parasitología, Departamento de microbiología y parasitología-Recursos en Micología. Facultad de Medicina, UNAM. México. [<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>], fecha de consulta: 20/08/15. [Última modificación 10 agosto 2015].
5. 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.
6. De la Calle-Rodríguez N, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. Rev CES Med 2012; 26(1): 43-55
7. Flores Herrera O, Rendón Huerta E, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E, Velázquez López I. "Nuevas funciones para las fosfolipasas y aciltransferasas de fosfolípidos: una breve revisión de las funciones y el metabolismo de fosfolípidos". Mensaje Bioquímico, Vol XXIX. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2005).
8. Garcia-Vidal Carolina, y Carratalá, Jordi. Patogenia de la infección fúngica invasora. Enferm Infec Microbiol Clin. 2012;30(3):151–158.
9. Hernández-Solís Sandra E., Florencio Rueda-Gordillo y Rafael A. Rojas-Herrera. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. Rev Iberoam Micol. 2014;31(2):137–140.
10. Kadir Tanju, Birsay Gumru, Banu Uygün-Can. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: The influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. archives of oral biology 52 (2007) 691 – 696.
11. KUMAR Rohitashw, P. K. SHUKLA. Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. Fungal biology 114 (2010) 189 – 197
12. Köhler Gerwald A., Audrey Brenot , Eric Haas-Stapleton , Nina Agabian , Rupal Deva , Santosh Nigam. Phospholipase A2 and Phospholipase B activities in fungi. Biochimica et Biophysica Acta 1761 (2006) 1391–1399.
13. Kwon-Chung K. J., Bennett John E. (1992). "Medical Mycology". Ed. Lea & Febiger, Estados Unidos. Pags. 280-285.
14. López Martínez Rubén, et. al. (2004). "Micología medica". 2º edición, Editorial Trillas, México D.F., pp. 99-107.

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN AISLAMIENTOS DE CANDIDA ALBICANS DE ORIGEN CLINICO.

15. Murray Patrick R., Rosendal K., Pfaller M. (2013). Medical Microbiology, ELSEVIER, 7 edición, China, pp. 11-12.
16. Ombrella A., Racca Liliana y Ramos Laura. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 12-16.
17. Pakshir K., K. Zomorodian, M. Karamitalab, M. Jafari, H. Taraz, H. Ebrahimi. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida spp.* isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. Journal de Mycologie Médicale (2013) 23, 113—118.
18. Panizo, M. M., Reviákina, V.(2001). *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 21(2), 38-45. Recuperado en 05 de mayo de 2016, de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562001000200011&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200011&lng=es&tlng=es).
19. Pemán J. (2007) Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Revista Iberoamericana de Micología, capítulo 11.27.
20. Pemán Javier, y Miguel Salavert (2012). Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30 (2):90–98.
21. Pini Gabriella, Elisabetta Faggi. Extracellular phospholipase activity of *Malassezia* strains isolated from individuals with and without dermatological disease. Rev Iberoam Micol. 2011;28(4):179–182.
22. Rohitashw KUMAR, P. K. SHUKLA. Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. fungal biology 114 (2010) 189 –197.
23. Souza Ramosa Livia, Leonardo Silva Barbedob, Lys Adriana Braga-Silva, André Luis Souza dos Santos, Marcia Ribeiro Pinto, Diana Bridón, Graca Sgarbia. Protease and phospholipase activities of *Candida spp.* Isolated from cutaneous candidiasis. Rev Iberoam Micol. 2015;32(2):122–125.
24. Taniguchi Lisa, Berenice de Fátima Faria, Rosimeire Takaki Rosa, Alessandra de Paula e Carvalho, Lauren Christine Gursky, Selene Lobo Elifio-Esposit, Nipuna Parahitiyawa, Lakshman Perera Samaranayake, Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa. Proposal of a low-cost protocol for colorimetric semi-quantification of secretory phospholipase by *Candida albicans* grown in planktonic and biofilm phases. Journal of Microbiological Methods 78 (2009) 171–174
25. Yigit N., E. Aktas. Comparison of the efficacy of different blood medium in determining the hemolytic activity of *Candida* species. Journal de Mycologie Médicale (2009) 19, 110—115.

## ANEXO 1

### Preparación de amido black para la prueba de actividad proteasa.

Por cada 100ml de Ácido acético 20%

Ácido acético glacial	20ml
-----------------------	------

Agua destilada	80ml
----------------	------

Disolver el ácido acético en el agua destilada y homogeneizar.

Para 120 ml de Amidblack 0.6%

Colorante Amidblack (polvo)	0.7g
-----------------------------	------

Ácido acético 20%	40ml
-------------------	------

Agua desionizada	40ml
------------------	------

Etanol	40ml
--------	------

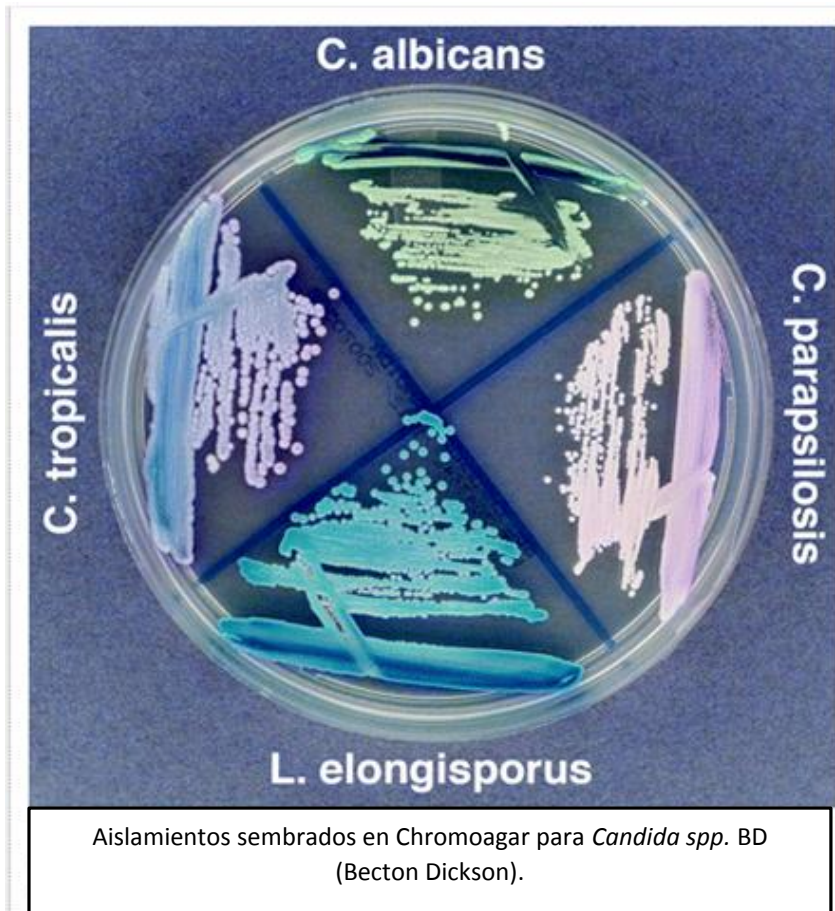
Disolver el polvo de amidoblack en el ácido acético 20%, agua desionizada y etanol hasta que no haya grumos y conservar en frasco ámbar.

### Revelado de las placas para la prueba de actividad proteasa.

Agregar colorante amidoblack hasta cubrir por completo la superficie de la placa de agar, esperar alrededor de un minuto y retirar el excedente en un contenedor adecuado (ya que el amidoblack no se desecha en el drenaje, sino que se contratan los servicios de una empresa que le dé el tratamiento adecuado a este tipo de residuos). Posteriormente revelar la placa con ácido acético 20%, agregándolo en la superficie de la placa por no más de un minuto.

## ANEXO 2

Interpretación de Chromagar de la marca BD para identificación de especies del genero *Candida spp.*



### Chromagar BD= Candida

*C. albicans* → Verde esmeralda con crecimiento a 42°C

*C. dubliniensis* → Verde oscuro sin crecimiento a 42°C

*C. tropicalis* → azul oscuro con halo purpura (colonias aisladas se ven moradas. Fig. 1)

*C. krusei* → Colonias rugosas centro rosado.

*C. glabrata* → Violeta- morado (incluso las colonias aisladas)

*C. parapsilosis* → Colonias rosas con halo blanco (colonias solas se ven blancas)