



**Fundación H. A. Barceló. Facultad de Medicina. Instituto Universitario de Ciencias de la Salud. Doctorado en Ciencias de la Salud**

Doctoranda  
***Bqca. María Celina Vedoya***

## **Producción de biopelícula y actividad in vitro de una solución saturada de sacarosa en levaduras del complejo *Candida parapsilosis***

**Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de “Doctor en Ciencias de la Salud”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Directora  
***Dra. Alicia Arechavala***  
Co-Director  
***Dr. Pedro Darío Zapata***

**Buenos Aires, 2019**



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



FUNDACION H.A.BARCELO  
FACULTAD DE MEDICINA

**FUNDACIÓN H. A. BARCELO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**DOCTORADO CIENCIAS DE LA SALUD**



**Tesis Doctoral**

**“Producción de biopelícula y actividad *in vitro* de una solución saturada de sacarosa en levaduras del complejo *Candida parapsilosis*”**

**TESISTA: MARÍA CELINA VEDOYA**

**celivedoya@hotmail.com**

**DIRECTOR: Dra. ALICIA ARECHAVALA**

**CO-DIRECTOR: Dr. PEDRO DARIO ZAPATA**

---

<b>INSTITUTO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD- FUNDACIÓN HÉCTOR A. BARCELÓ</b>
TESIS DE DOCTORADO
Título del Trabajo: Producción de biopelícula y actividad <i>in vitro</i> de una solución saturada de sacarosa en levaduras del complejo <i>Candida parapsilosis</i>
Apellido y Nombre del autor: Vedoya, María Celina
Director de Tesis: Arechavala, Alicia
Codirector: Zapata, Pedro Dario
Plan de Tesis: Evaluación de la capacidad de formación de biopelículas del complejo <i>Candida parapsilosis</i> y la sensibilidad de las formas planctónicas y sésiles (biopelículas) frente a una solución saturada de sacarosa.
Año: 2019
Unidad Académica, Instituto o laboratorio donde se realizó:  Instituto de Biotecnología Misiones “ <i>Dra. María Ebe Reca</i> ” (InBioMis) y Laboratorio de Micología “ <i>Dra. Martha G. Medvedeff</i> ”, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (Universidad Nacional De Misiones). Posadas, Misiones (Argentina).

*“La ilusión despierta el empeño y solamente la paciencia lo termina”*

*Anónimo*

*Para mi familia que es la inspiración de mi vida.*

*Quiero expresar mi agradecimiento:*

*A mi familia por el amor, aliciente y por la paciencia ante mis ausencias.*

*A mi madre, por el amor y la confianza que siempre depositó en mí. Por su ejemplar modelo de integridad y determinación, a quien admiraré siempre.*

*A la Fundación H. A. Barcelo por darme la invaluable oportunidad de lograr formarme en el nivel de Post Grado de Doctor.*

*A la UNaM, por ser el ámbito de desarrollo de la presente tesis.*

*A la Profesora Dra María Ebe Reca y la Dra. Bqca. Martha G. Medvedeff, por ser ambas ejemplo de honestidad, entereza y humildad; que serán siempre un incuestionable ejemplo.*

*A mi querida Directora de Tesis, por brindarme su experiencia en un marco de confianza y afecto, fundamentales para la concreción de este trabajo.*

*A mi Co-Director por sus valiosas sugerencias y acertados aportes al trabajo.*

*A mis colegas de trabajo, por la amistad, incentivo, apoyo; por compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante la realización de los experimentos.*

*A Isabel Any Señuk, Vanesa Mabel Eugenia Sosa, Lucas Madrassi, Liliana Andrea Irrazabal, María Viviana Askenazi y Ernesto Velásquez, por la disposición y desinteresada e incondicional ayuda.*

*A la Dra. María Isable Fonseca, Dra. Laura Villalba, Dra Romina Coniglio y a la Dra. Karina Salvatierra, por la gran generosidad, por compartir experiencias y por el ilimitado apoyo que me brindaron.*

*Y a todos aquellos, que directa o indirectamente colaboraron con la realización de este trabajo.*

## **RESUMEN**

Dentro de las levaduras del género *Candida*, el complejo *Candida parapsilosis* también denominado *Candida parapsilosis sensu lato*, son levaduras ubicuas y forman parte de la microbiota normal de piel humana. En base a la heterogeneidad hallada en las regiones ITS1, ITS2 y la secuencia de ADN ribosomal 5,8s (ADNr), se determinó que este complejo está integrado por levaduras genotípicamente diferentes, y se las denominó *C. parapsilosis* s.s. (grupo I), *C. orthopsilosis* (grupo II), y *C. metapsilosis* (grupo III). Un factor de patogenicidad especialmente significativo del complejo es la formación de biopelículas. Esta forma de vida, en comunidades adheridas a superficies protege a las mismas del sistema inmunitario y aumenta su resistencia a la acción de los antifúngicos; lo que en consecuencia conlleva, a la posible persistencia de la infección y potencial permanencia del foco de infección. Ante esta situación, la posibilidad de uso de formulaciones alternativas tales como una solución saturada de sacarosa, eugenol y polietilenglicol, representa una alternativa promisoriosa y de la cual no hay experiencia en el estado del arte sobre su acción biocida sobre estas comunidades microbianas y sus formas planctónicas.

Los objetivos de esta tesis fueron establecer la frecuencia de especies crípticas de las cepas clínicas identificadas originalmente como del complejo *C. parapsilosis* y evaluar la capacidad de formación de biopelículas, *in vitro*; y determinar la bioactividad *in vitro* de una SSS, sobre las formas sésiles y sobre las formas planctónicas del complejo *C. parapsilosis*.

La estrategia metodológica utilizada fue un diseño descriptivo, experimental, transversal y cuantitativo; y se esgrimió un estudio retrospectivo con un trabajo de campo. Se analizaron 54 cepas identificadas originalmente por métodos fenotípicos, como complejo *C. parapsilosis* provenientes de aislamientos de muestras clínicas, depositadas en la colección de de la Cátedra de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (FCEQyN) de la Universidad de Misiones (UNaM), entre 01 de Febrero de 2014 a 31 de Julio 2018. Las muestras fueron del tipo no probabilísticas escogidas en forma ocasional. Se utilizó la secuenciación de la región ITS1-5,8S- ITS2 para la identificación molecular de cepas catalogadas como complejo *C. parapsilosis*. Se determinó la capacidad

de formación de biopelículas *in vitro* en placas de microtitulación de fondo plano y se determinó cuantitativamente el grado de formación de biopelícula, con un lector de Elisa a 490 nm. Se evaluó la sensibilidad *in vitro* a SSS, cualitativamente en tubo para las formas planctónicas y cuantitativamente en placas de microtitulación para las formas sésiles.

En la población analizada, la frecuencia de las distintas especies que integran el complejo *C. parapsilosis* fue: *C. parapsilosis* s.s. (grupo I) en una frecuencia del 85% (45/53), *C. metapsilosis* (grupo III) en un 11% (6/53) y *C. orthopsilosis* (grupo II) en un 4% (2/53). Tras la identificación genotípica por secuenciación, una cepa resultó ser *C. guilliermondii* identificada erróneamente debido a que en su momento solo se utilizaron métodos fenotípicos. El 68% (36/53) de la levaduras del complejo *C. parapsilosis* desarrolló biopelícula. De las 45 cepas de *C. parapsilosis* s.s., 32 mostraron capacidad de formación de biopelículas *in vitro*, lo que representa el 71% (32/45), de las cuales el 13% (6/32) presentaron un porcentaje de bloqueo de + (una cruz); el 22% (10/32) exhibieron un porcentaje de bloqueo de ++ (dos cruces) y el 36% (16/32) ponderó un porcentaje de bloqueo +++ (tres cruces). *C. metapsilosis* formó biopelículas, lo hizo en un 33% (2/6) y se cuantificó un porcentaje de ++ (dos cruces) El 100% (2/2) de *C. orthopsilosis* tuvo la capacidad de desarrollarlas y se midió un porcentaje de bloqueo (tres cruces).

Se analizó la bioactividad de la SSS sobre las formas planctónicas. No hubo desarrollo de ninguna de las cepas del complejo *C. parapsilosis*, que estuvieron en contacto con la SSS por 12 h. La viabilidad de las cepas se comprobó con subcultivos en agar glucosa Sabouraud 20. Tampoco se detectó desarrollo en las cepas testigo ATCC 22019, DMic 14837 y DMic 134539.

La SSS fue efectiva *in vitro* sobre las formas sésiles tras el contacto por 24 h con la solución de ensayo, sobre las cepas del complejo *C. parapsilosis* con capacidad de formar biopelículas.

Se determinó que dentro del complejo *C. parapsilosis* mantenidas en la colección de cepas de la FCEQyN (UNaM), la especie predominante fue *C. parapsilosis* s.s., seguida de *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*. Los datos de cuantificación mostraron que la mayoría de

las cepas de *C. parapsilosis* s.s. formaban una capa de biopelícula variable con predominio de entramados más densos. Las dos cepas de *C. metapsilosis* formaron biopelículas densas, mientras que en *C. orthopsilosis*, la densidad de la biopelícula varió. La SSS resultó ser efectiva sobre las formas planctónicas y sobre las biopelículas de cepas del complejo *C. parapsilosis*.

**Palabras Clave:** Biopelículas - complejo *Candida parapsilosis* - solución saturada de sacarosa



## **ABSTRACT**

Within the yeasts of the genus *Candida*, the *Candida parapsilosis* complex, also called *Candida parapsilosis sensu lato*, are ubiquitous yeasts and are part of the normal microbiota of human skin. Based on the heterogeneity found in the ITS1, ITS2 regions and the 5.8s ribosomal DNA sequence (rDNA), it was determined that this complex is composed of genotypically different yeasts, and they were named *C. parapsilosis* s.s. (group I), *C. orthopsilosis* (group II), and *C. metapsilosis* (group III). An especially significant pathogenicity factor of the complex is the formation of biofilms. This way of life, in communities adhered to surfaces, protects them from the immune system and increases their resistance to the action of antifungals; which consequently leads to the possible persistence of the infection and potential permanence of the infection focus. Given this situation, the possibility of using alternative formulations such as a saturated solution of sucrose, eugenol and polyethylene glycol, represents a promising alternative. There is no previous experience in the state of the art on the biocidal action on these microbial communities and their planktonic forms.

The objectives of this thesis were to establish the frequency of cryptic species of the clinical strains originally identified as the *C. parapsilosis* complex and to evaluate the biofilm formation capacity, in vitro; and to determine the in vitro bioactivity of an SSS, on the sessile forms and on the planktonic forms of the *C. parapsilosis* complex.

The methodological strategy used was a descriptive, experimental, transversal and quantitative design; and a retrospective study was supported with a field work. Fifty four strains originally identified by phenotypic methods, such as *C. parapsilosis* complex from isolates of clinical samples, were analyzed. They were deposited in the collection of the Chair of Mycology of the Faculty of Exact Chemical and Natural Sciences (FCEQyN) of the University of Misiones (UNaM), between February 1st, 2014 and July 31st, 2018. The samples were of the non-probabilistic type occasionally chosen. Sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 region was used for the molecular identification of strains tagged as *C. parapsilosis* complex. The vitro biofilm formation capacity was determined in flat bottom microtiter plates and the degree of biofilm formation was quantitatively determined with an

Elisa reader at 490 nm. In vitro sensitivity to SSS was evaluated, qualitatively in tubes for planktonic forms and quantitatively in microtiter plates for sessile forms.

In the analyzed population, the frequency of the different species that integrate the *C. parapsilosis* complex was: *C. parapsilosis* s.s. (group I) in a frequency of 85% (45/53), *C. metapsilosis* (group III) in a 11% (6/53) and *C. orthopsilosis* (group II) in 4% (2/53). After genotypic identification by sequencing, one strain turned out to be *C. guilliermondii*, misidentified because only phenotypic methods were used at the time. 68% (36/53) of the yeasts of the *C. parapsilosis* complex developed biofilm. Of the 45 strains of *C. parapsilosis* s.s., 32 showed in vitro biofilm formation capacity, which represents 71% (32/45), of which 13% (6/32) presented a blocking percentage of + (a cross); 22% (10/32) exhibited a +++ block percentage (two crosses) and 36% (16/32) weighted a +++ block percentage (three crosses). *C. metapsilosis* formed biofilms in 33% (2/6) and a percentage of ++ (two crosses) was quantified. The whole *C. orthopsilosis*, 100% (2/2), had the ability to develop biofilms and a blocking percentage (three crosses) was measured.

The bioactivity of SSS on planktonic forms was analyzed. There was no development of any of the strains of the *C. parapsilosis* complex, which were in contact with the SSS for 12 h. The viability of the strains was verified with subcultures on Sabouraud 20 glucose agar. No growth was detected in the control strains ATCC 22019, DMic 14837 and DMic 134539.

SSS was effective in vitro on sessile forms on strains of the *C. parapsilosis* complex with the ability to form biofilms, after being in contact for 24 h with the test solution,

It was determined that within the *C. parapsilosis* complex maintained in the FCEQyN (UNaM) collection of strains, the predominant species were *C. parapsilosis* s.s., followed by *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. The quantification data showed that most of the strains of *C. parapsilosis* s.s. formed a variable biofilm layer with a predominance of denser webs. The two strains of *C. metapsilosis* formed dense biofilms, while in *C. orthopsilosis*, the density of the biofilm varied. SSS was found to be effective on planktonic forms and on biofilms of strains of the *C. parapsilosis* complex.

**Keywords:** Biofilms - *Candida parapsilosis* complex - saturated sucrose solution

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AFLP: Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados

AGS: Agar Glucosado Sabouraud

AHL: Agar Hongos y Levaduras

AL: Agar Leche

$a_w$ : actividad agua

CE: Caldo Enriquecido

CGS: Caldo Sabouraud Glucosa

CLSI: National Committee for Clinical Laboratory Standards

DNAAs: Desoxirribonucleasas

dNTP: Deoxinucleósido trifosfato

E: Eugenol

EPIC: Cruce de intrón cebado en exón (Exon-primed intron-crossing)

HRE: es la humedad relativa de equilibrio

HRM: Análisis de alta resolución de fusión (*High Resolution Melt*)

IGS: Espacios intergénicos (*Intergenic Spacer*)

INEI-ANLIS: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud

ITS: Espacios transcritos internos (*Internal Transcribed Spacers*)

LAMP: Amplificación Isotérmica mediada por horquillas (Loop mediated isothermal amplification)

ML: Máxima verosimilitud

MLST: Tipificación multilocus de secuencias (Multilocus sequence typing)

MP: Máxima parsionia

$n_1$ : moles de solvente

$n_2$ : moles de soluto

NJ: Neighbor-Joining

p: presión de vapor del agua en la solución

$p_0$ : presión del vapor del agua pura

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEG-400: Polietilenglicol 400

QS: *quorum sensing*

RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar (Random Amplified Polymorphic DNA)

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

s. l.: *sensu lato* "en sentido amplio"

s. s.: *sensu stricto* "en sentido estricto"

s: coeficiente de sedimentación de Svedberg

SADH: Gen que codifica la alcohol deshidrogenasa (alcohol dehydrogenase-encoding gene)

SPE: Sustancia polimérica extracelular

SSS: Solución saturada de azúcar + Eugenol + Polietilenglicol 400

TBE: Tris-Borato-EDTA

$T_m$ : Temperatura de hibridación

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
INTRODUCCIÓN, PROBLEMA DE INVESTIGACION, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	6
1.3. JUSTIFICACIÓN .....	6
1.4. HIPOTESIS.....	8
1.5. OBJETIVO GENERAL .....	8
1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>10</b>
MARCO TEORICO .....	10
2.1. MICOSIS.....	10
2.2. CANDIDIASIS.....	12
2.3. COMPLEJO <i>Candida parapsilosis</i> .....	14
2.3.1. Espectro clínico .....	14
2.3.1.1. Infecciones superficiales .....	15
2.3.1.2. Infecciones en mucosas.....	15
2.3.1.3. Infecciones del tracto urinario .....	16
2.3.1.4. Infecciones sistémicas .....	16

2.3.2. Características morfológicas y fisiológicas .....	17
2.3.3. Caracterización molecular.....	19
2.3.3.1. ADN Ribosomal.....	22
2.3.3.2. Filogenia molecular .....	24
2.4. BIOPELÍCULAS.....	27
2.4.1. Fases de formación de las biopelículas.....	30
2.4.2. Estructura de las biopelículas .....	33
2.4.3. Regulación del proceso de formación de las biopelículas .....	35
2.4.4. Cuantificación de las biopelículas .....	39
2.5. SOLUCIÓN SATURADA DE SACAROSA .....	40
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>43</b>
ASPECTOS METODOLÓGICOS .....	43
3.1. PROPUESTA METODOLÓGICA .....	43
3.1.1. Universo.....	43
3.1.2. Muestra.....	43
3.1.3. Estructura de los datos.....	44
3.1.3.1. Unidad de análisis .....	44
3.1.3.2. Variables.....	44
3.1.3.3. Escala de valores .....	44
3.1.3.4. Dimensiones.....	44
3.1.3.5. Indicadores .....	44
3.1.3.6. Fuente de información .....	45
3.1.3.7. Instrumentos herramientas .....	45

3.1.3.8. Plan de análisis .....	46
3.2. MATERIALES.....	46
3.2.1. Muestras (unidad de análisis) .....	46
3.2.2. Medios de cultivos.....	47
3.2.3. Soluciones y líquidos de montaje .....	47
3.3. MÉTODOS.....	47
3.3.1. Identificación fenotípica presuntiva.....	47
3.3.1.1. Siembra en CHROMagar Candida®.....	48
3.3.1.2. Microcultivo.....	49
3.3.2. Identificación molecular de cepas del complejo <i>C. parapsilosis</i> .....	50
3.3.2.1. Extracción y purificación de ADN genómico.....	50
3.3.2.2. Amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2.....	51
3.3.2.3. Electroforesis en geles de agarosa .....	52
3.3.2.4. Secuenciación de los fragmentos amplicados y comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas.....	53
3.3.2.5. Análisis bioinformático .....	53
3.3.3. Formación <i>in vitro</i> de biopelículas .....	54
3.3.5. Determinación de la bioactividad <i>in vitro</i> de la SSS, sobre las formas sésiles (biopelículas) del complejo <i>Candida parapsilosis</i> .....	56
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>57</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
4.1. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA PRESUNTIVA .....	57
4.2. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	59



4.2.1. Obtención ADN genómico. Estandarización de las condiciones para la amplificación. Amplificación y secuenciación de la de la región ITS1-5,8S-ITS2.....	59
4.2.1.1. Extracción de ADN .....	59
4.2.1.2. Estandarización de las condiciones para la amplificación de la región ITS1-5,8S-TS2 .....	61
4.2.1.3. Amplificación y secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2 de las cepas fúngicas; con la concentración de $Cl_2Mg$ , la temperatura de hibridación ( $T_m$ ) y la concentración de ADN óptimas comprobadas. ....	63
4.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	65
4.4. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS <i>in vitro</i> .....	69
4.5. BIOACTIVIDAD <i>in vitro</i> DE LA SSS, SOBRE LAS FORMAS PLANCTÓNICAS DEL COMPLEJO <i>C. parapsilosis</i> .....	76
4.6. BIOACTIVIDAD <i>in vitro</i> DE LA SSS, SOBRE LAS FORMAS SÉSILES DEL COMPLEJO <i>Candida parapsilosis</i> .....	77
<b>CAPÍTULO V</b> .....	79
DISCUSIÓN.....	79
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	91
CONCLUSIONES .....	91
<b>CAPÍTULO VII</b> .....	92
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXO I .....	121
MEDIOS DE CULTIVOS, SOLUCIONES, LÍQUIDOS DE MONTAJE Y COLORANTES ....	121
ANEXO II .....	125

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN, A PARTIR DE HONGOS LEVADURIFORMES	
.....	125
ANEXO III .....	126
IMÁGENES FOTOGRÁFICAS .....	126

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN, PROBLEMA DE INVESTIGACION, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

#### **1.1. INTRODUCCIÓN**

Los hongos son microorganismos ubicuos que pueden ser aislados de los suelos, el aire y el agua, estos representan un dominio biológico esencial, único y fascinante. Dentro de la naturaleza, han estado en contacto con la humanidad desde su origen. Como grupo ejercen profundo efecto tanto beneficioso como deletéreo, sobre todas las formas de vida. Los hongos pueden causar enfermedades en humanos al producir alergias luego de sensibilización con antígenos micóticos, elaborar o generar toxinas y algunos pueden causar infecciones, que se denominan micosis. En el hombre, las micosis se clasifican desde el punto de vista de su localización anatómica en superficiales, subcutáneas y sistémicas; las primeras afectan las capas superficiales de la piel, mucosas y semimucosas; y las dos últimas, dermis, tejido subcutáneo y órganos internos.

Otra manera de clasificar a las micosis es atendiendo a la interacción huésped parásito: las causadas por hongos patógenos primarios u hongos patógenos verdaderos - *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Paraccocidioides* spp.- y las causadas por hongos conocidos como oportunistas donde los agentes etiológicos más frecuentes son *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* entre otros (Ayats *et al.*, 2010; Pemán & Zaragoza, 2012).

Durante las últimas décadas el incremento de las micosis invasoras causadas por hongos oportunistas ha sido constante. La morbilidad y mortalidad de estas micosis son muy elevadas, hecho que las convierte en un importante problema de salud pública. Esto se debe, no solo a alteraciones de barreras naturales de defensa y a la vulnerabilidad de pacientes inmunocomprometidos, sino también en gran parte a los avances de la medicina, como la incorporación de nuevas modalidades terapéuticas. Algunas de ellas, como

tratamientos antimicrobianos de amplio espectro, uso de nutrición parenteral, uso de catéteres intravenosos e intubación endotraqueal entre otros, son considerados factores de riesgo para este tipo de infecciones invasoras. Con mayor frecuencia ocurren en pacientes que tienen enfermedades de base tales como patologías oncológicas en quimioterapia, terapias inmunosupresoras, trasplantes, grandes cirugías y estar afectados por enfermedades graves que requieren atención en una unidad de cuidados intensivos (UCI) (Cantón *et al.*, 2011). Su incidencia está aumentando globalmente, se estima que el 5% de los pacientes hospitalizados van a desarrollar una infección y que entre el 3 y el 6% de estas infecciones, serán candidiasis invasoras (Quindós *et al.*, 2007). Estas candidiasis presentan un pronóstico sombrío debido a las graves enfermedades subyacentes de los pacientes y a la acción patógena directa de las levaduras (Quindós *et al.*, 2007). La mortalidad por candidiasis invasora está condicionada por diferentes factores, tanto diagnósticos como terapéuticos (Marr, 2004) y oscila entre el 25 y el 38%, y puede llegar a ser del 70% en enfermos con una inmunodeficiencia profunda (Tortorano, 2006).

No menos importantes son las micosis superficiales que involucran al género *Candida*, y entre ellas, a las onicomycosis que son consideradas las onicopatías más frecuentes en todo el mundo (Feng *et al.*, 2012). *C. albicans* es el agente etiológico involucrado en mayor proporción en onicomycosis de manos de adultos. Aunque, en las dos últimas décadas irrumpieron nuevas especies como responsables de estas patologías, entre ellas *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* son consideradas levaduras emergentes, demostrando tener capacidad de producir deterioro en uñas de manos. Estos cambios detectados, pueden deberse a la especialización de los sistemas de resistencia de las levaduras ante el uso no racional de antifúngicos (Treviño-Rangel *et al.*, 2012a)

Las levaduras del género *Candida* son hongos patógenos oportunistas del humano, son diploides pertenecientes Reino Fungi (que se constituyó como tal, en 1969 tras la propuesta de Whittaker), subreino Dycaria, división *Ascomycota*, subdivisión: *Saccharomycotina*, Clase: *Saccharomycetes*, Orden: *Saccharomycetales*, Familia: *Saccharomycetaceae*, Género: *Candida* (anamorfo). Sus especies se encuentran en

numerosos nichos ecológicos y prácticamente en todos los ecosistemas terrestres y acuáticos (Hibbett *et al.*, 2007; Howell & Hazen, 2011; Wang, *et al.*, 2009). *Lodderomyces elongisporus* fue considerado como un estado sexual del complejo *C. parapsilosis*, pero la secuenciación del gen del ARN ribosómico reveló que *L. elongisporus* representa una especie distinta (Treviño-Rangel *et al.*, 2012a; Al-Obaid *et al.*, 2018).

Las especies de *Candida* que producen infecciones en humanos más frecuentemente son: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis* (Figueras *et al.*, 2011). Dentro de las levaduras del género *Candida*, las levaduras del complejo *C. parapsilosis* son levaduras ubicuas y es parte de la microbiota normal de piel humana.

En base a la heterogeneidad hallada en las regiones ITS1, ITS2 y la secuencia de ADN ribosomal 5,8s (ADNr), se agrupó el complejo *C. parapsilosis*, que aunque fueran fisiológicamente y morfológicamente indistinguibles, eran genotípicamente diferentes, y se los denominó *C. parapsilosis sensu stricto* (grupo I), *C. orthopsilosis* (grupo II), y *C. metapsilosis* (grupo III) (Scherer & Stevens, 1987; Lehmann, *et al.*; 1992; Lin *et al.*, 1995; Rycovska *et al.*, 2004; Tavanti *et al.*, 2005; Gonçalves, *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2012; Valach *et al.*, 2012; Tosun *et al.*, 2013; Tapia & Correa, 2015).

Su patogenicidad es limitada cuando los tegumentos se encuentran ilesos. Se puede encontrar involucrada en lesiones subungueales en personas saludables. Asimismo, ha sido reportada como agente etiológico de importantes infecciones nosocomiales, particularmente afecciones sistémicas y endocarditis (Ruzicka *et al.*, 2007). En la colonización, infección y evasión de los mecanismos de defensa del huésped, posee factores de virulencia atribuidos a la morfología celular, factores de adhesión, cambios fenotípicos, biopelículas y actividad enzimática lipolítica y proteolítica extracelular (Calderone & Fonzi, 2001; Merino Guzmán *et al.*, 2011).

La formación de biopelículas es un factor de patogenicidad especialmente significativo en *C. parapsilosis* (Kuhn *et al.*, 2004). Se estima que aproximadamente un 65% de las infecciones humanas están relacionadas con esta capacidad (Douglas, 2002; Pemán

*et al.*, 2008). La habilidad de formación de estas estructuras biológicas en superficies traumatizadas, como quemaduras, heridas o úlceras crónicas; en dispositivos de uso médico, implantable o dispositivos médicos invasores, como catéteres intravasculares o urinarios y tubos endotraqueales; convierte a esta especie en un patógeno importante a ser tenido en cuenta por el sistema de salud (Ramage *et al.*, 2005; Castrillón Rivera *et al.*, 2013). Esta forma de vida de las levaduras en comunidades adheridas a superficies protege a las mismas del sistema inmune y aumenta su resistencia a la acción de los antifúngicos. Lo que en consecuencia conlleva, a la posible persistencia de la infección y potencial permanencia del foco de infección (Al Fattani & Douglas, 2004; Ruzicka *et al.*, 2007; Febres *et al.*, 2018). El perfil físico y genético de los microorganismos dentro de la comunidad protegida de la biopelícula (formas sésiles), son diferentes de su existencia como células independientes y desprotegidas (formas planctónicas), por lo que el estudio de la sensibilidad antifúngica en ambas poblaciones se vuelve trascendente y de gran impacto fármaco económico y sanitario (Douglas, 2002; Adam *et al.*, 2002; Douglas, 2003). Las biopelículas sirven de foco de infecciones, pero además se asocian con altos niveles de resistencia antimicrobiana, lo que explica la persistencia de las infecciones, aun con tratamiento adecuado. Se observó que el aumento de la resistencia se asocia con el incremento de la actividad metabólica, lo que indica que la resistencia aparece con el tiempo, con la maduración de las biopelículas. Las dos consecuencias clínicas son la marcada resistencia a agentes antimicrobianos y la protección de las defensas del huésped, lo que los hace refractarios al tratamiento convencional.

Ante esta situación, la posibilidad de uso de formulaciones alternativas tales como una solución saturada de sacarosa con el agregado de eugenol (E) y polietilenglicol 400 (PEG-400), nombrada en adelante SSS; representa una alternativa promisoriosa y de la cual no hay experiencia en el estado del arte sobre su acción biocida sobre estas comunidades microbianas.

Se han realizado estudios sobre la relación que existía entre la supervivencia de los microorganismos y las altas concentraciones de solutos. Los mismos concluyeron que la alta

concentración de soluto produce una disminución de la actividad agua ( $a_w$ ) y este es el mecanismo por el cual se produciría la inhibición del crecimiento microbiano. El requerimiento de agua de los microorganismos está mejor expresado en término de  $a_w = p/p_o$  donde  $p$  es la presión de vapor del agua en la solución y  $p_o$  es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Se ha establecido también que la  $a_w$  del medio no es solamente el factor regulador determinante de la respuesta biológica del microorganismo, sino también la naturaleza del soluto usado para reducir la misma. La utilización de la sacarosa como soluto en altas concentraciones con la consecuente disminución de la  $a_w$  fue ampliamente estudiada en microbiología de alimentos, y su aplicación se extendió extendiéndose su aplicación a la curación de heridas infectadas (Medvedeff *et al.*, 1998). A la solución de sacarosa se le adiciona la acción antiséptica del E y del PEG-400, que producen una disminución adicional de la actividad agua (Medvedeff *et al.*, 2000).

Se aprovecha la propiedad germicida de la sacarosa para el tratamiento de heridas supuradas con la adición de eugenol, que suma acción antiséptica. Se logra mayor estabilidad de la solución saturada de sacarosa cuando se dispersa el E en PEG-400 (Medvedeff, *et al.*, 2001). La SSS tuvo eficacia fungicida *in vitro* frente a *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*, *Purpureocillium lilacinum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* (Medvedeff *et al.*, 2000; Medvedeff, *et al.*, 2001; Ortt, *et al.*, 2004; Medvedeff *et al.*, 2005; Medvedeff *et al.*, 2007). La evaluación genotóxica de esta formulación antifúngica arrojó que no hay indicios de efectos cito o genotóxicos (Medvedeff *et al.*, 2005; Bich *et al.*, 2010).

A pesar de que se dispone de diversas drogas específicas para el tratamiento de infecciones micóticas, algunas de ellas son difíciles de tratar con los agentes existentes. Si la droga empleada no es lo suficientemente efectiva contra el agente patógeno comprometido, existe el peligro que se produzca una eliminación incompleta de la infección seguida por una recidiva (Medvedeff *et al.*, 2001). Estas evidencias entusiasman el seguir ensayando *in vitro* esta SSS, frente a biopelículas del complejo *Candida parapsilosis*.

## **1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

¿En qué frecuencia se encuentran las especies crípticas que integran el complejo *C. parapsilosis*?

¿Cómo se comportan *in vitro* las formas sésiles (biopelículas) y las formas planctónicas de las diferentes especies del complejo *C. parapsilosis*, frente a la bioactividad de una solución saturada de sacarosa?

## **1.3. JUSTIFICACIÓN**

El complejo *C. parapsilosis* se constituye en un patógeno emergente importante que en el ser humano que ha aumentado considerablemente en importancia y prevalencia en los últimos dos decenios, por lo que esta levadura representa una complicación, tanto en infecciones superficiales como profundas. Las personas en mayor riesgo de infección grave incluyen los recién nacidos y pacientes en unidades de cuidados intensivos. La mayoría de estos enfermos están sometidos a múltiples maniobras diagnósticas y terapéuticas, están tratados con fármacos antibacterianos de amplio espectro o con antivirales, o son portadores de catéteres u otros dispositivos intravasculares. Las infecciones por *C. parapsilosis* se asocian sobre todo con las soluciones de hiperalimentación, prótesis y catéteres permanentes, así como la propagación nosocomial de la enfermedad a través de las manos de los trabajadores de la salud (Quindós *et al.*, 2007).

Entre los factores implicados en la patogénesis de la enfermedad se incluyen la secreción de enzimas hidrolíticas, la adhesión a las prótesis, y la formación de biopelículas. Las biopelículas constituyen una ventaja adaptativa, tanto en la colonización de las células y tejidos humanos, como de prótesis, implantes y catéteres médicos. Muchas micosis que no responden a los antifúngicos se asocian con la formación de biopelículas que además son difíciles de eliminar por los mecanismos inmunológicos del hospedero. Generalmente contienen material polimérico extracelular que protege a los microorganismos que las conforman, estos polímeros restringen la permeabilidad y se vuelven más difíciles de eliminar con los biocidas disponibles (Douglas, 2002; Douglas, 2003; Al Fattani & Douglas,



2004; Betancourth *et al.*, 2004; Febres *et al.*, 2018). Hay que tener en cuenta que muchas de las micosis más resistentes al tratamiento se asocian con la formación de biopelículas (Rivera *et al.*, 2005). La importancia de las biopelículas radica principalmente en la dificultad que implica para el médico erradicar la causa de la infección ya que las estructuras micóticas asociadas a biopelículas (sésiles), son menos sensibles a la acción de los antimicrobianos que sus correspondientes células planctónicas. A lo que se suma que la persistencia de las biopelículas en el cuerpo humano sería la principal causa de la recurrencia y/o cronicidad de diversas infecciones (Reisner *et al.*, 2006).

Por lo expuesto, de la investigación de las biopelículas del complejo *C. parapsilosis*, y la bioactividad de la SSS sobre sus formas sésiles y planctónicas se conseguirían aportes que podrían representar una promisorio alternativa terapéutica (Briozzo *et al.*, 1989; Sá, 2008; Grau-Cerrato & Ferrández-Quirante, 2009). Si bien los avances de la industria farmacéutica son notorios en cuanto a la obtención de productos antimicrobianos, se continúa tratando de optimizar el espectro de acción de los medicamentos y de minimizar los efectos secundarios (Medvedeff *et al.*, 2005). Asimismo, es sabido que no todas las especies tienen idéntico patrón de sensibilidad a los antifúngicos (Cuenca-Estrella *et al.*, 2005; Zaoutis *et al.*, 2005; Grau-Cerrato & Ferrández-Quirante, 2009). Sumado a esto, el hecho que los costos de los tratamientos antimicóticos son muy elevados, por lo que seguir el estudio de formulaciones menos costosas como la SSS, podría constituir un importante aporte no sólo para la salud del paciente sino también para los costos farmacológicos directos y los costos indirectos derivados de los efectos adversos producidos por algunos antifúngicos.

Es menester tener en cuenta que la resistencia a los antimicrobianos es uno de los problemas de salud más críticos y de difícil solución. Con el agravante de que la decisión de utilizar un antimicrobiano, ya sea que surja del consumidor mismo o de una decisión del médico, suele adoptarse sin tener en cuenta el panorama epidemiológico. Ante esta situación, la utilización de procedimientos de laboratorio que permitan evaluar el perfil de sensibilidad de los microorganismos, en general y de los integrantes del complejo *C.*

*parapsilosis*, en particular; son de utilidad en infectología y se lograría sumar interesantes aportes a la epidemiología de la resistencia. En consecuencia se podrían elaborar políticas de prevención e implementar estrategias de control del desarrollo de resistencias en la comunidad, que minimicen el impacto de las mismas.

Hay que mencionar que las infecciones fúngicas cuestan dinero, medios de subsistencia y vidas humanas; y amenazan con quebrantar la eficacia de los programas de atención de la salud. Representan un problema social y, desde un punto de vista económico, como una externalidad negativa en el ámbito de la atención de salud.

#### **1.4. HIPOTESIS**

Hay diferencia en la frecuencia de las especies crípticas que conforman el complejo *C. parapsilosis*, las que tienen distinta capacidad de producción de biopelículas, *in vitro*.

La SSS presenta bioactividad biopelículas, *in vitro*, frente a las formas planctónicas y frente a las formas sésiles (biopelículas) de las diferentes especies que conforman el complejo *C. parapsilosis*.

#### **1.5. OBJETIVO GENERAL**

Establecer la frecuencia de especies crípticas de las cepas clínicas identificadas originalmente como del complejo *C. parapsilosis* y evaluar la capacidad de formación de biopelículas, *in vitro*.

Determinar la bioactividad *in vitro* de una SSS, sobre las formas sésiles (biopelículas) y sobre las formas planctónicas del complejo *C. parapsilosis*.

#### **1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Confirmar la identidad de las cepas del complejo *C. parapsilosis* en la colección de cepas de la Cátedra de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (FCEQyN) de la Universidad de Misiones (UNaM), utilizando métodos fenotípicos.

Identificar molecularmente las especies crípticas del complejo *C. parapsilosis*.

Establecer la frecuencia de especies del complejo *C. parapsilosis* involucradas en micosis humanas, conservadas en la colección de cultivos del Laboratorio de Micología (FCEQyN- UNaM).

Determinar mediante un ensayo *in vitro* la capacidad de producción de biopelículas de diferentes aislamientos del complejo *C. parapsilosis*.

Correlacionar el origen clínico de las cepas aisladas con la capacidad de producción de biopelículas *in vitro*.

Analizar la bioactividad de la SSS, *in vitro*, sobre las formas planctónicas y de las formas sésiles (biopelículas) del complejo *C. parapsilosis*.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEORICO**

#### **2.1. MICOSIS**

Los hongos constituyen uno de los principales reinos eucariotas además de las Plantae y Animalia. Pueden ser aislados de los suelos, en el aire y en el agua, estos microorganismos ubicuos representan un dominio biológico esencial, único y fascinante. Estos organismos heterótrofos poseen una pared celular quitinosa y crecen como células individuales o como un micelio multicelular compuesto de hifas. Aunque algunas especies no son capaces de formar estructuras reproductivas especializadas y se propagan únicamente por el crecimiento vegetativo, muchos hongos se reproducen sexual y asexualmente a través de las esporas. Hasta la fecha, se han descrito alrededor de 70 000 especies de hongos, mientras que el número total de especies se ha estimado en 1,5 millones. Como grupo ejercen profundo efecto tanto beneficioso como deletéreo, sobre todas las formas de vida. Los hongos pueden causar enfermedades en humanos, producir alergias luego de sensibilización a antígenos micóticos, elaborar o generar toxinas y algunos pueden causar infecciones y proliferar activamente en huéspedes humanos.

Las micosis son enfermedades del hombre y de los animales producidas por hongos. Las micosis se clasifican desde el punto de vista de su localización anatómica en superficiales, profundas localizadas (subcutáneas) y sistémicas; la primera afecta las capas superficiales de la piel, mucosas y semimucosas; y las dos últimas, dermis, tejido subcutáneo y órganos más profundos de la economía. Las denominadas sistémicas endémicas son ocasionadas por hongos patógenos primitivos y comienzan, casi siempre, a partir de un foco respiratorio inicial, en tanto otro grupo de micosis diseminadas son producidas por hongos ambientales o de la microbiota normal que son capaces de invadir diversos órganos o tejidos en individuos inmunocomprometidos (micosis oportunistas). El límite histológico entre las micosis superficiales y las de la dermis es la membrana basal,

estructura de naturaleza compleja situada en la unión dermoepidérmica. Sin embargo, varios agentes fúngicos causantes habituales de lesiones superficiales, pueden profundizarse ocasionalmente hasta la dermis o el corion y afectar órganos diversos siempre que condiciones favorecedoras del huésped así lo permitan.

Por otro lado, las micosis se catalogan en dos grandes grupos, atendiendo a la interacción huésped parásito: las causadas por hongos patógenos primarios y las causadas por hongos oportunistas. La primera categoría incluye las infecciones causadas por hongos patógenos verdaderos: *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Paraccoccidioides* spp. Mientras que los agentes etiológicos más frecuentes de las infecciones oportunistas son *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* entre otros (Torres Rodríguez, 1993; López Martínez, 2008).

Los hongos patógenos verdaderos son aquellas especies que tienen la capacidad de provocar la enfermedad en el huésped humano normal cuando el inóculo es lo suficientemente grande. La mayor parte de estas infecciones son asintomáticas o de muy breve duración y se resuelven con rapidez. La resolución de la infección se acompaña de una resistencia específica a la reinfección. En los individuos que se presenta una infección residual o crónica, la respuesta tisular es de tipo granulomatosa. Los hongos patógenos muestran transición morfológica de la forma saprófita a la forma parasitaria, que se encuentra en los tejidos infectados cuyo aislamiento e identificación son importantes para un diagnóstico correcto (Pemán *et al.*, 2001).

Los hongos considerados oportunistas poseen virulencia inherente muy baja, por lo que las defensas del huésped tienen que estar muy disminuidas para que se establezca una infección, las infecciones oportunistas dependen primero de que se haya alterado la resistencia del huésped, más que del tamaño del inóculo. No tienen un área geográfica restringida. La respuesta celular usual es necrótica supurativa que a menudo está pobremente organizada en una reacción granulomatosa (López Martínez, 2008).

Desde hace más de 40 años se utiliza el término micosis oportunistas para designar a un grupo de infecciones por hongos que viven normalmente como saprobios en el

ambiente o en cavidades naturales de seres humanos, tienen la capacidad de presentar cambios bioquímicos y morfológicos en contacto con personas que tienen defectos en sus mecanismos de defensa. En un momento dado, cualquier hongo saprófito puede transformarse en patógeno secundario (Arenas Guzmán, 2013).

## **2.2. CANDIDIASIS**

La candidiasis es una infección primaria o secundaria, causada por levaduras del género *Candida*, con manifestaciones clínicas extremadamente variables de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, en las cuales el hongo puede causar lesiones cutáneas, mucocutáneas, profundas o diseminadas.

Las candidiasis son las micosis invasoras más frecuentes y presentan un pronóstico sombrío debido a las graves enfermedades subyacentes de los pacientes y a la acción patógena directa de *Candida*. La mortalidad por candidiasis invasora está condicionada por diferentes factores, tanto diagnósticos como terapéuticos y oscila entre el 25 y el 38%, pueden llegar a ser del 70% en enfermos con inmunocompromiso y/o circunstancias que permitan el progreso de estas patologías (Marr, 2004; Tortorano *et al.*, 2006; Quindós *et al.*, 2007).

La candidiasis es una enfermedad de enorme importancia en patología humana, no sólo por su frecuencia y variedad de manifestaciones clínicas, sino por el hecho de que a pesar de ser posibles agentes etiológicos de una micosis superficial; en presencia de factores favorecedores, sus agentes etiológicos son capaces de penetrar en los tejidos y diseminarse por vía hemática provocando cuadros severos de sepsis y lesiones viscerales profundas. Dentro de las formas clínicas de las candidiasis, la candidiasis invasora representa una entidad que ha producido en las últimas tres décadas un aumento significativo de la morbilidad y de la tasa de mortalidad relacionada. Se la observa en adultos con enfermedades graves, en los neonatos de bajo peso, en los niños con enfermedades malignas de los órganos hemocitopoyéticos y en los pacientes internados en unidades de cuidados intensivos (Cantón *et al.*, 2001).

Los agentes etiológicos responsables de las candidiasis, son levaduras de carácter oportunista del género *Candida*, se ceban del paciente debilitado y manifiestan acción patógena cuando están presentes en el huésped factores favorecedores locales o generales que lo permitan (Villanueva Reyes & Arenas, 2007).

El género *Candida* incluye hongos levaduriformes dimorfos (a excepción de *C. glabrata*) que pueden encontrarse en dos diferentes estados: blastosporas que son las estructuras de reproducción asexual que aseguran la diseminación de la levadura; y estarían asociadas con las colonizaciones asintomáticas; y, por otro lado, los micelios (hifas y pseudohifas) que son las formas germinativas con capacidad invasora tisular, por lo que su hallazgo en las lesiones resulta fundamental para el diagnóstico de la afección.

Existen varias especies de *Candida* diferenciadas entre sí principalmente por sus respectivas características bioquímicas. Entre esas especies se destaca por su importancia como principal agente de candidiasis, *Candida albicans*. Otras especies de interés son, entre otras, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*.

En cuanto a la ecología de *Candida*, forman parte de la biota saprobia normal de la boca, tubo digestivo, la vagina y los pliegues cutáneos en el ser humano. El sistema gastrointestinal humano tiene una población pequeña pero constante de *C. albicans*. Otras especies que pueden colonizar el tracto gastrointestinal son: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. *C. guilliermondii* y *C. kefyr* se encuentran en menor frecuencia. Las levaduras aisladas de boca pertenecen en su mayor fracción a *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. kefyr*. Las levaduras residentes de piel normal incluyen a *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. krusei*. *C. albicans* y *C. tropicalis* se encuentran con regularidad en la piel normal. En la mucosa vaginal normal se puede aislar *C. albicans* y con menor frecuencia *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* (Rippon, 1990; Bonifaz Trujillo, 2012; Arenas Guzmán, 2013).

Las candidosis son micosis causadas por estas levaduras oportunistas, son infecciones de evolución aguda, subaguda o crónica. Se han identificado más de 150 especies, sin embargo *C. albicans* es el patógeno más comúnmente aislado en el hombre y

es el causante de 78% de todas las infecciones micóticas nosocomiales. Otras con importancia clínica incluyen *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* y *C. zeylanoides*. Estos microorganismos son capaces de infectar la piel, las uñas, las mucosas y diferentes órganos internos, causan enfermedades sistémicas. Dichas candidosis sistémicas son causantes de infecciones graves, que plantean importantes problemas a la hora de su diagnóstico y terapéutica en pacientes inmunosuprimidos (Carballo, 2010; Alfonso *et al.*, 2010).

La incidencia de estas infecciones muestra elevación constante en inmunodeprimidos por deficiencia de inmunidad celular (caquexia, sida) o humoral (leucemia, mieloma); por alteraciones de la fagocitosis (lupus, diabetes); granulocitopenia (citotóxicos, radioterapia) o en inmunodepresión consecutiva a la administración de glucocorticoides y quimioterapia, principalmente en trasplantados; también se observan en quienes sufren quemaduras graves, así como en pacientes con hiperalimentación parenteral y con catéteres intravasculares. Algunas de estas no se diagnostican sino hasta el momento de la necropsia (Arenas Guzmán, 2013).

## **2.3. COMPLEJO *Candida parapsilosis***

### **2.3.1. Espectro clínico**

El complejo *C. parapsilosis* fue aislado por primera vez en 1928, a partir de las heces de un paciente con diarrea, en Puerto Rico. La levadura fue denominada inicialmente *Monilia parapsilosis* en 1928 por Ashford; pero, sin embargo, en un principio se le consideró que era el anamorfo del ascomiceto *Lodderomyces elongisporus*, estudios posteriores comprobaron que se trataba de un taxón distinto (Treviño-Rangel *et al.*, 2012b; Pinto, 2013).

El complejo *C. parapsilosis* se relaciona con una vasta gama de formas clínicas, desde infecciones superficiales, las cuales afectan especialmente el lecho ungueal de uñas de manos y muy raramente el de los pies, piel, oído medio, hasta infecciones sistémicas que pueden llegar a comprometer seriamente la vida del paciente. Eventualmente, se han reportado casos esporádicos de peritonitis, endoftalmitis, trastornos articulares, que tienen



involucrado como agente etiológico, a este complejo (Trofa *et al.*, 2008). Últimamente ha emergido como un importante patógeno nosocomial que causa candidiasis invasora en pacientes críticos hospitalizados y en infantes con bajo peso (Pappas *et al.*, 2003; Almirante *et al.*, 2006; Bassetti *et al.*, 2006; Pfaller & Diekema, 2007; Yong *et al.*, 2008). Se la ha aislado repetidamente de piel y uñas de las manos de enfermeras y otros profesionales del área de salud, dado que forma parte de la biota comensal humana normal (van Asbeck *et al.*, 2009).

Tienen capacidad para colonizar catéteres intravasculares, materiales y equipamiento biomédico, materiales plásticos, látex; líneas de nutrición parenteral y soluciones antisépticas. Se ha verificado su presencia en fluidos intravenosos y en bombas de vacío utilizadas para la producción de nutrición parenteral. Se la ha relacionado con el uso prolongado de catéteres y prótesis, ya que presenta capacidad de adherencia y formación de biopelículas en la superficie interna de los mismos (Weems, 1992; Branchini *et al.*, 1994; Trofa *et al.*, 2008). Se considera al complejo *C. parapsilosis* como un importante patógeno emergente, asociado de manera creciente con un amplio espectro clínico de infecciones (van Asbeck *et al.*, 2009).

#### **2.3.1.1. Infecciones superficiales**

Las levaduras del complejo *C. parapsilosis* están comprometidas, en lesiones en uñas con onicomicosis de tipo subungüéal distal y en afecciones de piel. Se describen como factores de riesgo asociados a pacientes que presentan trastornos crónico-degenerativos, particularmente la diabetes mellitus, así como la obesidad, inmunosupresión, antibioticoterapia prolongada, heridas traumáticas (Mujica *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2012; Mohammadi *et al.*, 2017).

#### **2.3.1.2. Infecciones en mucosas**

Las levaduras del complejo *C. parapsilosis* están reportadas como agentes etiológicos de vulvovaginitis lo cual se vinculó principalmente al uso indiscriminado de derivados azólicos (Sobel, 2007). El papel de esta levadura como un patógeno vaginal

tiende a ser cuestionable, particularmente por su papel como levadura comensal. Sin embargo, hay reportes que las cepas vaginopáticas se caracterizan por una mayor secreción de proteinasas aspárticas ya que estas enzimas pueden comprometer la integridad normal de la vagina por hidrólisis de la inmunoglobulina A de la mucosa una de las más efectivas barreras vaginales contra la infección (De Bernardis *et al.*, 1989; Naglik *et al.*, 2003).

### **2.3.1.3. Infecciones del tracto urinario**

Las infecciones urinarias originadas por levaduras del complejo *C. parapsilosis* son reportadas se asocian a la utilización de sistemas de drenaje (Silva *et al.*, 2012).

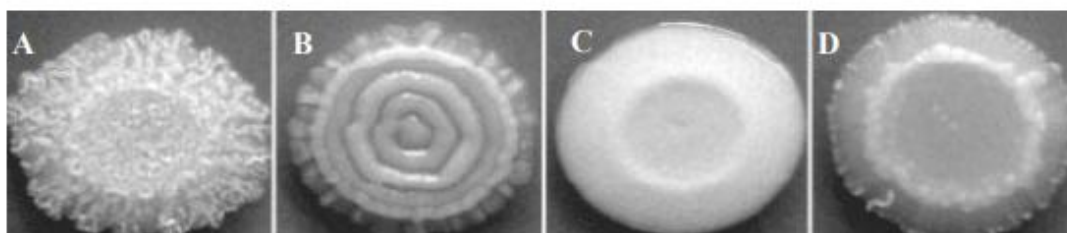
### **2.3.1.4. Infecciones sistémicas**

El constante reporte de levaduras del *C. parapsilosis*, implicadas en infecciones sistémicas es una tendencia que muestra un notable cambio epidemiológico que implica una revisión de las prácticas del servicio de salud. La frecuencia de candidosis diseminada debida a esta levadura se ha incrementado en los últimos años, ha adquirido mayor protagonismo, dependiendo del país estudiado, del tipo de paciente, de la edad, etc. Las infecciones por *C. parapsilosis* se han atribuido a varios factores de riesgo, que incluyen la capacidad selectiva del microorganismo para proliferar como se mencionó anteriormente, en soluciones para hiperalimentación intravenosa y su afinidad por dispositivos intravasculares y materiales prostéticos. Los pacientes inmunocomprometidos, como individuos con VIH/SIDA, enfermos oncológicos y aquellos recientemente sometidos a procedimientos médicos invasores representan una población de riesgo; así como los neonatos prematuros de bajo peso. Se han publicado casos de endocarditis, pancreatitis y meningitis (Galván & Mariscal, 2006; Cheung *et al.*, 2006; Alvarez, 2016; Garzoni & Garbino, 2007; Khan *et al.*, 2007; Pérez-García *et al.*, 2016).

### 2.3.2. Características morfológicas y fisiológicas

El complejo *C. parapsilosis* está constituido por microorganismos diploides morfológicamente caracterizados por células redondeadas, ovals o alargadas con gemación multilateral, carentes de reproducción sexual y capaces de producir pseudohifas. El tamaño de las levaduras oscila 3-4 x 5-8  $\mu\text{m}$ . Las especies del complejo *Candida parapsilosis* desarrollan en medios de cultivo con un 50% de glucosa; también son capaces de desarrollar en medios con 0,01% de cicloheximida, aunque *C. parapsilosis* s.s. lo hace en forma variable, y ninguna especie del complejo desarrolla en medios con cicloheximida al 0,1%. El crecimiento es evidente *in vitro* a las 24-48 h a 28-37 °C en aerobiosis, en diversos medios de cultivo (Laffey & Butler, 2005). Macroscópicamente los cultivos se presentan como colonias blancas, de morfología lisa o rugosa, con márgenes bien determinados que desprenden un ligero olor butírico. Sin embargo, se pueden observar otros fenotipos de colonias como crepé, concéntricas, o crateriformes (Németh *et al.*, 2013), como se observan en la Figura Nro. 1. El fenotipo de la colonia está directamente relacionado con la morfología de la levadura, así mientras los fenotipos crepé y concéntrico están compuestos fundamentalmente por pseudohifas, los fenotipos cráter y liso, presentan células levaduriformes (Kurtzman *et al.*, 2011; Németh *et al.*, 2013).

En cuanto a las colonias se han descrito diferentes morfologías: crepé, concéntrica, lisa y cráter, como se observan en la Figura Nro. 1. El fenotipo de la colonia está directamente relacionado con la morfología de la levadura, así mientras los fenotipos crepé y concéntrico están compuestos fundamentalmente por pseudohifas, los fenotipos cráter y liso, presentan células levaduriformes (Laffey & Butler; 2005; Kim *et al.*, 2006).



**Figura Nro. 1: Diferentes morfologías de colonias de levaduras del complejo *C. parapsilosis* obtenidas de aislados clínicos. A: colonias con forma Crepe; B: colonias con forma Concéntrica; C: colonias con forma Lisa y D: colonias con forma Cráter (Laffey & Butler; 2005)**

En medio de agar leche con Tween 80, el complejo *C. parapsilosis* puede hacer una transición dimórfica de levadura a pseudohifa, con ramificaciones de cadenas de células elongadas en forma de “árbol de navidad”, artemisia o zig-zag, con ramificaciones laterales que gradualmente se vuelven más cortas hacia el ápice de la hifa, detalles que se aprecian en la Figura Nro. 2; y la presencia de hifas grandes (células gigantes, indicadas por la flecha) (Gago *et al.*, 2014b; Cattana, 2016).



**Figura Nro. 2: Imagen microscópica del complejo *C. parapsilosis* de un cultivo en lámina en agar harina de maíz (400x)**

El grado de formación de pseudohifas varía en cada aislado, aunque varios grupos de investigación han encontrado la incapacidad de formar pseudohifas en aislados de *C. metapsilosis* (Abi-chacra *et al.*, 2013). Las levaduras de este complejo son incapaces de formar hifas verdaderas.

En CHROMagar Candida<sup>®</sup>, las colonias son de color marfil a rosa lavanda, y algunas son de aspecto rugoso.

Las pruebas fisiológicas y bioquímicas consisten en una serie de ensayos de asimilación (auxonograma-metabolismo aeróbico) y fermentación (zimograma-metabolismo anaeróbico) de carbohidratos para la identificación de levaduras. En el auxanograma, la asimilación del azúcar se detecta por el crecimiento visible. En el zimograma, los productos del metabolismo se detectan por la producción de gas (hidrógeno y anhídrido carbónico). Estos procedimientos son poco utilizados en la actualidad, debido básicamente a lo

laborioso de los mismos, por lo que se han comercializado algunos equipos que facilitan la identificación de las levaduras (Rodero *et al.*, 2005; Guilarte & Pardi, 2009).

Se disponen de métodos comerciales y con desiguales niveles de automatización para la identificación fenotípica. Estos sistemas automatizados están fundamentados en ensayos de asimilación de carbohidratos y otras reacciones bioquímicas, los cuales se encuentran estandarizados y simplificados en forma de sustratos liofilizados. A diferencia de las pruebas convencionales, que pueden tomar entre 2-20 días, el sistema automatizado permite la identificación de la levadura en un lapso de 24-48 h y los resultados pueden ser leídos en forma visual o automática a través de un Software. Entre estos sistemas podemos mencionar al API® ID32C, Vitek2® o RapID™ levadura Plus, pero no son capaces de diferenciar las especies del complejo *C. parapsilosis*. Algunos investigadores sugieren que estos sistemas automatizados deben ser complementados con el estudio morfológico (Mendoza, 2005).

### **2.3.3. Caracterización molecular**

Las especies del complejo *C. parapsilosis* no pueden diferenciarse por los métodos fenotípicos clásicos, utilizados corrientemente en los laboratorios de micología; dado que las tres especies que lo componen, presentan las mismas características morfológicas, de crecimiento y perfiles de asimilación y fermentación de azúcares. Sin embargo, esta limitación de los caracteres morfológicos y bioquímicos para diferenciar estas levaduras estrechamente relacionadas, así como la laboriosidad requerida en su estudio y, en algunos casos, la insuficiente resolución que proporcionan a nivel taxonómico, ha propiciado el uso de las técnicas moleculares (Castrillo, *et al.*, 2012).

Las técnicas moleculares han asistido y complementado a la clasificación. En la actualidad se usan datos moleculares para establecer relaciones filogenéticas entre organismos. Además, representan métodos alternativos al cultivo, cuya intención es mejorar la rentabilidad de las pruebas microbiológicas y se aplican en el diagnóstico de infecciones fúngicas. Por otra parte, las técnicas moleculares constantemente contribuyen al estudio de

la organización taxonómica de los hongos (Palomares *et al.*, 2007). Pueden usarse métodos de biología molecular (intrón RPS0, inteína VMA), RPC-RFLP (genes *SADH*, *FSK1* y *MnSOD*), PCR en tiempo real, regiones ITS1, mtDNA, IGS1, gen *SADH*, pirosecuenciación (región ITS2) o proteómica como MALDI-TOF, entre otros. Recientemente, se ha demostrado que esta última metodología identifica correctamente las tres especies del complejo, y es una herramienta promisoría para ser utilizada en los laboratorios de microbiología (Criseo *et al.*, 2015; Tapia & Correa, 2015; Cattana, 2016).

Desde principio de la década del 90' se demostró, por diferentes métodos moleculares, que los aislamientos identificados fenotípicamente como *C. parapsilosis* eran genéticamente más heterogéneos que los de otras especies de *Candida*. En los aislamientos, de cepas de *Candida parapsilosis*, se identificaron tres grupos I, II y III genéticamente diferentes, sobre la base de una variedad de estudios moleculares incluidos la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y análisis de secuencia de ITS. En base a la heterogeneidad hallada en las regiones, ITS2 y la secuencia de ADN ribosomal 5,8S (ADNr), se determinan las especies crípticas del complejo *C. parapsilosis* (Scherer & Stevens, 1987; Lehmann, *et al.*; 1992; Rycovska *et al.*, 2004; Tavanti *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2012).

Algunos investigadores concluyeron que, dadas que las diferencias en las secuencias de ADN entre varios genes en los grupos I, II y III del complejo *C. parapsilosis* son demasiado grandes, propusieron los nombres *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, respectivamente, para los grupos II y III. El término "*psilosis*" significa "esprue" (diarrea tropical), y el epíteto de la especie "*parapsilosis*" acuñado por Ashford completó parte de su nombre. Es así como se propusieron los nuevos nombres de especies en un paralelo irónico a la manera en que se usan los prefijos "*orto*" (originalmente significa "correcto") y "*meta*" (originalmente significa "con" o "después"). Entonces finalmente se planteó, para los integrantes del complejo *C. parapsilosis* -que son fisiológica y morfológicamente indistinguibles, y genotípicamente diferentes- una nueva nomenclatura: *C. parapsilosis sensu stricto* (grupo I), *C. orthopsilosis* (grupo II), y *C. metapsilosis* (grupo III), con

diferencias importantes en cuanto a su virulencia, como así también a la sensibilidad frente a antifúngicos. Entonces a partir de ahora nos referimos a *C. parapsilosis* complex, cuando la identificación se haga a nivel de complejo por criterios morfológicos y bioquímicos; y específicamente, *C. parapsilosis* s.s., *C. orthopsilosis*, y *C. metapsilosis* cuando se haya identificado a nivel de especie, por medio de técnicas moleculares (Lin *et al.*, 1995; Tavanti *et al.*, 2007; Gonçalves, *et al.*, 2010; Valach, 2012; Tosun *et al.*, 2013; Barbedo *et al.*, 2017), según se indica en la Tabla Nro. 1.

**Tabla Nro. 1: Resumen de los principales estudios publicados sobre la identificación de especies del complejo *C. parapsilosis* por métodos basados en ADN.**  
Fuente: Barbedo *et al.*, 2017

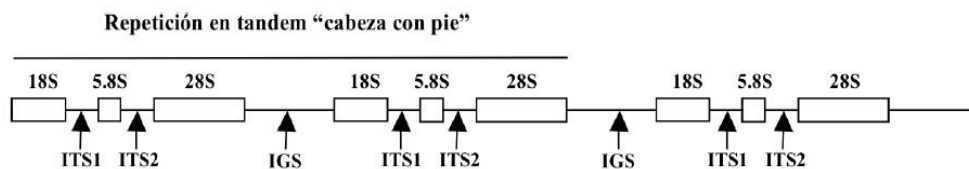
Referencias	Fuente de los ejemplares	Nro. de aislados (% por especie)			Métodos basados en el ADN utilizados para la diferenciación
		<i>C. parapsilosis</i> s.s.	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>	
Tavanti <i>et al.</i> , 2005	Diferentes fuentes clínicas	20 (74,1)	7 (25,9)	0 (0,0)	MLST; RAPD; <i>SADH</i> -RFLP
Pryce <i>et al.</i> , 2006	Sangre y otras fuentes línicas.	8 (88,9)	1 (11,1)	0 (0,0)	PCR, secuenciación directa de <i>BacTec</i> <i>SADH</i> -RFLP; AFLP
Tavanti <i>et al.</i> , 2007	Diferentes fuentes clínicas	277 (95,5)	13 (4,5)	0 (0,0)	
Gomez-Lopez <i>et al.</i> , 2008	Sangre	67 (85,9)	5 (6,4)	6 (7,7)	ITS
Lockhart <i>et al.</i> , 2008	Muestras línicas invasoras	1762 (92,1)	117 (6,1)	34 (1,8)	<i>SADH</i> -RFLP
Borman <i>et al.</i> , 2009	Diferentes fuentes clínicas	7 (33,3)	11 (52,4)	3 (14,3)	Pirosecuenciación
Hensgens <i>et al.</i> , 2009	Diferentes fuentes clínicas	375 (94,9)	0 (0,0)	20 (5,1)	<i>SADH</i> -RFLP; AFLP
Tay <i>et al.</i> , 2009	Sangre	29 (70,7)	10 (24,4)	2 (4,9)	ITS; RAPD
Asadzadeh <i>et al.</i> , 2009	Sangre y otras fuentes clínicas	109 (95,6)	5 (4,4)	0 (0,0)	Especies específicas PCR; <i>SADH</i> -RFLP; ITS y D1/D2 secuenciación
Silva <i>et al.</i> , 2009a	Fuentes clínicas y ambientales	160 (94,7)	4 (2,4)	5 (2,9)	<i>SADH</i> -RFLP
Mirhendi <i>et al.</i> , 2010	Sangre	75 (95,0)	2 (2,5)	2 (2,5)	<i>SADH</i> -RFLP; <i>SADH</i> , ITS y D1/D2 secuenciación
Hays <i>et al.</i> , 2011	Sangre y otras fuentes clínicas	114 (98,3)	2 (1,7)	0 (0,0)	PCR en tiempo real; <i>SADH</i> -RFLP
del Pilar Vercher <i>et al.</i> , 2011	Sangre	30 (76,9)	5 (12,8)	4 (10,3)	Secuenciación del intrón RPS0
Souza <i>et al.</i> , 2012	Diferentes fuentes clínicas	48 (50,0)	39 (40,6)	9 (9,4)	PCR en tiempo real
Prandini <i>et al.</i> , 2013	Sin información	46 (54,1)	22 (25,9)	17 (20,0)	Secuenciación de inteínas
Carolis <i>et al.</i> , 2014	Diferentes fuentes clínicas	12 (27,3)	19 (43,2)	13 (29,5)	AFLP
Feng <i>et al.</i> , 2012	Diferentes fuentes clínicas	112 (56,6)	30 (15,1)	56 (28,3)	EPIC-PCR
Gago <i>et al.</i> , 2014a	Diferentes fuentes clínicas	10 (33,3)	13 (43,4)	7 (23,3)	ITS; HRM
Trabasso <i>et al.</i> , 2015	Sangre	31 (86,1)	4 (11,1)	1 (2,8)	ITS; <i>TOP2</i> -LAMP
Asadzadeh <i>et al.</i> , 2015	Sangre	361 (95,7)	15 (3,6)	1 (0,3)	PCR Múltiple; AFLP; ITS y D1/D2 secuenciación

### 2.3.3.1. ADN Ribosomal

Existen regiones presentes en todos los genomas celulares que pueden proporcionar información para reconstrucciones filogenéticas donde los caracteres morfológicos no son suficientes.

Las secuencias del ADN ribosómico (ADNr) que codifican para la formación de ARN ribosómico incluyen a 3 genes: ADNr 18S, ADNr 5,8S, y ADNr 28S, los cuales se presentan como un “*cluster*” génico, el cual es repetido en tandem centenas de veces y se transcriben como una unidad (Solé; 2002).

En una unidad, los genes están separados por dos regiones, los espacios transcriptos internos (*Internal Transcribed Spacers*, ITS): ITS1 e ITS2. Por otro lado, dos unidades de ADNr son separadas por espacios intergénicos, *intergenic spacer* (IGS), detallados en la Figura Nro. 3 (Begerow *et al.*, 2010; Schoch *et al.*, 2012).



**Figura Nro. 3: Estructura de la unidad ribosomal en hongos (Tomada de: Guzman 2008)**

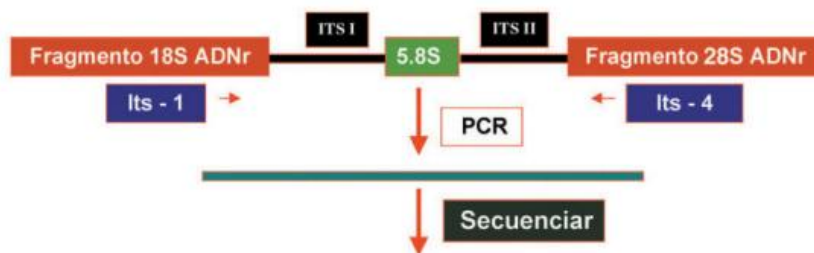
La heterogeneidad de los ITS ha sido utilizada para clasificar filogenéticamente a los microorganismos (Hillis & Dixon, 1991; Iwen *et al.*, 2002; Solé Ollé, 2002). En este sentido, la amplificación del ADNr fue una de las primeras aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en micología, bajo la necesidad de emplear un método más efectivo que la identificación por morfología macro y microscópica (White *et al.*, 1990).

Para ello se utilizan cebadores universales que fueron diseñados de manera de permitir la amplificación de los ITS de cualquier hongo, independientemente del género al que pertenece. En la amplificación de estas zonas de ADNr se pueden utilizar los iniciadores ITS-1 e ITS-4, diseñando por White *et al.* (1990); la naturaleza multicopia de las repeticiones del ADNr hace de esta región una secuencia fácil de amplificar aún cuando se utilicen



muestras de ADN muy diluidas o altamente degradadas (De Luna *et al.*, 2005; Said *et al.*, 2007; Yong *et al.*, 2008; Matheny *et al.*, 2005; Villalobos *et al.*, 2005; Leaw *et al.*, 2006; Schoch *et al.*, 2012).

La región amplificada, comprenderá el ITS1, 5,8S y el ITS2, la cual podrá tener secuencias de nucleótidos útiles para la sistemática molecular a nivel de especie, e incluso dentro de las especies, que permitan realizar un análisis de la evolución de los caracteres, poner en evidencia los patrones estimables sobre los procesos evolutivos y formular hipótesis de los mismos (Figura Nro. 4) (Hillis & Dixon, 1991; Iwen *et al.*, 2002; Insua *et al.*, 2003).



**Figura Nro. 4: Estructura del ADN ribosómico, con los fragmentos ITS. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo20.pdf>**

En 2007, los participantes de la reunión *All Fungi Barcoding* aceptaron que la región ITS del gen nuclear de ADNr era la más apropiada para el código de barras (*barcoding*) del reino fúngico (Rossman, 2007).

En la Figura Nro. 5, se observa una representación del proceso de amplificación de fragmentos de ácido nucleico mediante la técnica de PCR. Los tres pasos que se repiten representan un ciclo completo, con las fases de desnaturalización (separación de cadenas), unión de los cebadores a cada hebra y síntesis de la copia del fragmento diana. El proceso se repite tantos ciclos como se programe, obteniéndose un elevado número de copias idénticas de la diana.

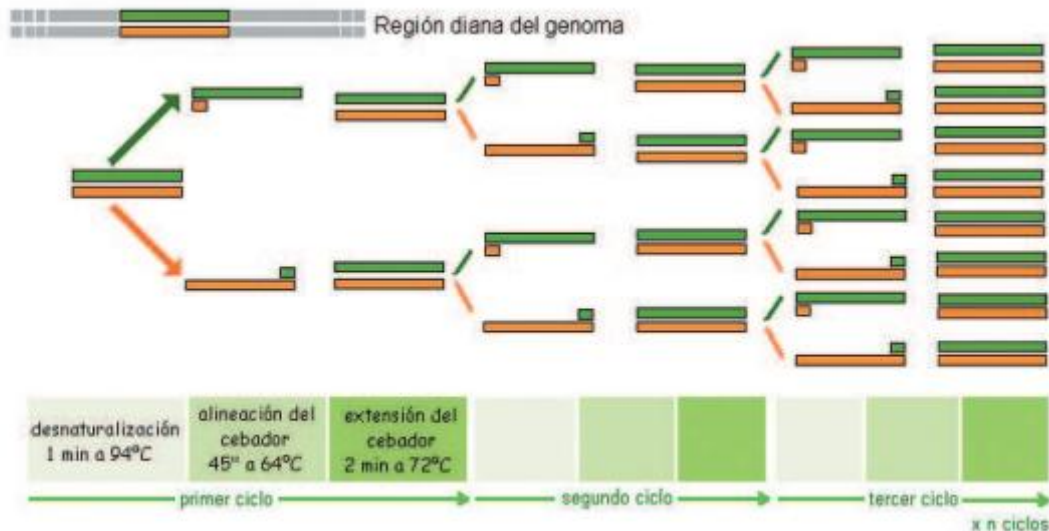


Figura Nro. 5: Estructura del ADN ribosómico, con los fragmentos ITS. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo20.pdf>

### 2.3.3.2. Filogenia molecular

La filogenia y la filogenómica molecular han revisado y enriquecido en gran medida la sistemática fúngica en las últimas décadas. La mayoría de los análisis se han realizado comparando regiones génicas ortólogas únicas o múltiples. La misma establece las relaciones evolutivas entre organismos con base en la comparación de caracteres moleculares, fundamentalmente entre secuencias de ADN (Penny *et al.*, 1992). La estructura resultante del árbol es un reflejo de las relaciones evolutivas existentes entre los organismos. Los tres principios fundamentales de la sistemática filogenética:

- La naturaleza se ordena de manera jerárquica, y ese orden puede representarse mediante diagramas ramificados (árboles como representación gráfica);
- La historia o filogenia de dichas estructuras jerárquicas pueden inferirse identificando novedades evolutivas compartidas;
- Los estudios evolutivos y las clasificaciones deben tener en cuenta la filogenia de los grupos bajo estudio.

Los métodos más utilizados para reconstruir los árboles filogenéticos se basan en sofisticados algoritmos que permiten poner a prueba la hipótesis de monofilia en diversos

grupos de organismos. Los instrumentos más frecuentemente usados son los métodos de *Máximo Parsimony* (MP), *Máximo Likelihood* (ML) y *Neighbor Joining* (NJ) (Nei & Kumar, 2000; Takahashi & Nei, 2000).

El método MP es un método de gran utilidad basado en el principio de parsimonia. Su objetivo es lograr un árbol filogenético con el menor número de eventos evolutivos para dar explicación a los procesos o fenómenos observados. Un árbol con cambios mínimos es muy probable que sea una buena estimación del verdadero árbol. Al minimizar los cambios, el método minimiza el ruido filogenético debido a la homoplasia (cambio evolutivo paralelo que hace que dos organismos presenten un mismo carácter adquirido independientemente) y a la evolución independiente. Asume que cualquier carácter heredable es una homología potencial (Grandcolas *et al.*, 2001). Entonces, todos los caracteres son tratados de igual manera, con el “mismo peso” o misma influencia, al momento de inferir los árboles filogenéticos. Se fundamenta en la idea filosófica Navaja de Occam (Occam’s razor) formulado por William Ockham en el siglo XIV, basado en una premisa muy simple: en igualdad de condiciones la solución más sencilla es probablemente la correcta. O sea, que si se parte de dos o más hipótesis que dan lugar a explicaciones igual de válidas para un acontecimiento dado, la hipótesis más simple tiene mayor probabilidad de ser la correcta para explicar el fenómeno. Esto es porque la solución más simple requiere el menor número de suposiciones y de operaciones lógicas. Siguiendo este principio, un árbol con el menor número de substituciones es posiblemente la mejor opción para exponer las diferencias entre los taxones. Esta perspectiva se argumenta en que los cambios evolutivos que ocurren dentro de lapsos cortos son relativamente raros. Es fácil de comprender y confiable (Farris, 1970; Peña, 2011; Kolaczkowski & Thornton, 2004).

El ML usa técnicas estadísticas estándar para inferir la distribución de probabilidades al asignar esas probabilidades a posibles árboles filogenéticos (frecuentemente secuencias de nucleótidos de ADN). El ML debe calcular la longitud de ramas para cada árbol diferente (Hasegawa *et al.*, 1991). En este método se calcula el número de cambios evolutivos que requiere cada uno de los árboles, se prefiere el que implica la mínima cantidad de cambios

evolutivos que se requieren para explicar una determinada matriz de caracteres (Peña, 2011). A dicho número se le considera como la longitud del árbol. Está basado en las probabilidades conocido como “Máxima Verosimilitud”. En estadística, la estimación por máxima verosimilitud es un procedimiento probabilístico para ajustar un modelo y encontrar sus parámetros dado un conjunto de observaciones. En este caso encontrar el árbol más probable según los datos (secuencia nucleotídica) bajo un árbol dado y un modelo especificado para los cambios en el ADN. Tras la obtención del árbol, es necesario determinar el grado de fiabilidad del mismo, para esto existen diferentes métodos para determinarlo, entre ellos uno de los más utilizados es el análisis de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). Este análisis se basa en una reordenación al azar de los datos originales que genera una serie de árboles-réplica, y calcula el porcentaje de conservación de cada una de las ramas del árbol original a lo largo de los diferentes árboles-réplica. De esta forma establece el índice de *bootstrap* para cada rama del árbol original (De Luna *et al.*, 2005).

El método NJ o del vecino más próximo emplea técnicas generales de aglomeración de datos para el análisis de secuencias y se basa en las distancias genéticas que agrupa entre sí a las secuencias con menor distancia genética entre ellas, siguiendo el principio de mínima evolución. (Saitou & Nei, 1987; Tamura *et al.*, 2004). El objetivo fundamental de este método es poder identificar individuos cuando se desconoce la especie a la que pertenecen. Además, existe la posibilidad de descubrir especies crípticas en grupos de morfología compleja o inaccesible (Hebert *et al.*, 2003). Esto es factible ya que la variabilidad intra-específica de esta secuencia es menor que la variación existente entre especies diferente. Es un algoritmo de preferencia para estudios de “código de barras molecular” (*DNA barcoding*) (Hebert *et al.*, 2010), ya que los individuos pertenecientes a una misma especie formarán grupos aislados debido a su alto nivel de semejanza (Peña, 2011). El árbol obtenido es aquel en el que la suma total de las longitudes de las ramas es la menor. En el paso inicial, se unen los dos *neighbors* (secuencias) que tengan la menor distancia genética. Luego, este par inicial se considera como una sola entidad, y se busca la siguiente

secuencia que tenga la menor distancia genética con ésta. El procedimiento continúa hasta unir todas las secuencias al árbol final (Tamura *et al.*, 2004).

El árbol que se obtiene usando NJ no refleja relaciones evolutivas, sino que en realidad es una representación del grado de similitud, no de la sistemática filogenética. Este árbol inferido con NJ no debe ser calificado como árbol filogenético y sería erróneo admitir que los agrupamientos obtenidos, vislumbran una especie ancestral y sus especies descendientes. Son agrupaciones de miembros muy similares que no pueden ser considerados clados, ni grupos monofiléticos (Peña, 2011).

Si las topologías de los árboles obtenidos, usando los diferentes métodos, son concordantes, la hipótesis filogenética resultante es considerada robusta.

## **2.4. BIOPELÍCULAS**

Las definiciones de biopelículas existentes en la literatura son múltiples pero todas ellas describen de manera similar la interrelación que se establece entre los diferentes microorganismos que componen la comunidad y la estructura sobre la cual están soportados.

A continuación, se citan algunas de las definiciones más relevantes:

- *“Comunidades microbianas adheridas a una superficie, rodeadas por una matriz extracelular polimérica de origen microbiano y otros compuestos del medio. La composición de esta matriz es variable, puede estar formada por carbohidratos, péptidos, proteínas, lípidos o una combinación de estas sustancias, aunque la mayor parte del volumen la constituye el agua, la que representa casi el 90% del contenido total”* (Lappin-Scott & Bass, 2001).

- *“Un consorcio funcional de microorganismos organizados en una extensa matriz polimérica”* (Elder *et al.*, 1995).

- *“Una comunidad de microorganismos embebidos en una matriz polimérica orgánica, adheridos y unidos irreversiblemente a una superficie”* (Costerton *et al.*, 1999).

- *“Una comunidad compleja de microorganismos, unidos irreversiblemente a una superficie, a una interfase o entre ellos, embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, que exhiben una alteración del fenotipo”* (Donlan & Costerton, 2002).

- *“Comunidades de microorganismos irreversiblemente adheridas a una superficie que producen sustancia polimérica extracelular (SPE) y que exhiben un estado metabólico alterado comparado con el crecimiento planctónico correspondiente, especialmente con respecto a la transcripción y las interacciones entre las células”* (Lindsay & Von Holy, 2006).

Esta estrategia adaptativa ofrece cuatro ventajas importantes, protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y posibilita la transferencia de material genético (ADN).

La forma de vida de los microorganismos adheridos a superficies, en algún tipo de interfase, sólido-líquido, sólido-aire, líquido-aire o entre líquidos inmiscibles, siempre que haya materia orgánica y humedad suficientes, se conoce desde hace mucho tiempo y se ha visto su poder indiscutible y el gran impacto médico e industrial que ocasionan (O'Toole *et al.*, 2000; Stoodley *et al.*, 2002).

Las biopelículas se unen de modo irreversible a un sustrato, y las células sésiles que la componen muestran características fenotípicas diferentes a sus correspondientes células de vida libre o planctónicas. La fijación e inmovilización es fundamental para su consolidación ya que las células dimiten de ser móviles y errantes, para hacerse sedentarias. El paso del modo de vida planctónico al modo sésil sobrelleva cambios fenotípicos sustanciales y una interacción variable entre el entorno y la expresión génica. Todas estas circunstancias pueden incrementar sus capacidades de supervivencia (Costerton *et al.*, 1999; Donlan & Costerton, 2002, Quindós *et al.*, 2009). En el Tabla Nro. 2, se aprecian características de las biopelículas de microorganismos.

**Tabla Nro. 2: Características de las biopelículas (Betancourth *et al.*, 2004)**

Características de las biopelículas
Adherencia
Heterogeneidad
Diferentes microambientes (pH, tensión O <sub>2</sub> , concentración de iones, carbono, nitrógeno)
Sistema circulatorio primitivo
Resistente a las defensas del hospedero, agentes antimicrobianos y detergentes
<i>Quorum sensing</i>

El conocimiento alcanzado sobre biopelículas bacterianas es abundante, sin embargo, los estudios acerca de las biopelículas fúngicas, son más recientes y menos numerosos. Estas comunidades de microorganismos viables se encuentran adheridas a superficies inertes o a tejidos vivos, y protegidos por una sustancia polimérica extracelular (SPE) producida por ellas. Las SPE que forma una matriz adherente protege a los microorganismos, que forman estas comunidades adaptativas, de agentes antimicrobianos, previenen el acceso de biocidas y toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la biopelícula al estrés ambiental, ya sea por su neutralización química o por la creación de una barrera de difusión, y finalmente, posibilita la transferencia de material genético. Representan una estrategia de supervivencia pues proporcionan una protección contra las defensas y mecanismos de erradicación microbiana, y cuentan con canales que les permite establecer un vínculo con el medio externo para hacer intercambio de nutrientes y eliminar metabolitos de desecho (Dunne, 2002; Douglas, 2002; Betancourth *et al.*, 2004; Lindsay & Von Holy, 2006; Navia *et al.*, 2010).

Estas congregaciones microbianas constituyen la forma más exitosa de colonización entre los microorganismos. Son ubicuas en la naturaleza y responsables de muchas enfermedades. La formación de las biopelículas ocurre como un proceso continuo de acuerdo con varias fases de desarrollo que son: a) acondicionamiento, b) adhesión, c) síntesis de matriz extracelular, d) maduración y e) dispersión, lo que lleva a la formación de una estructura uniforme en forma de depósitos homogéneos y acumulaciones viscosas

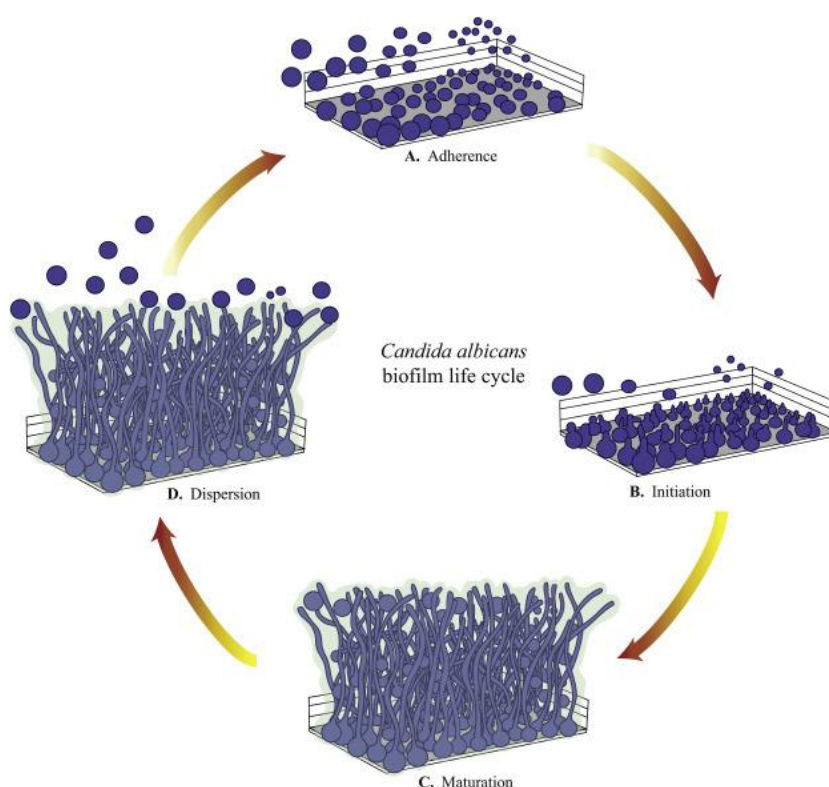
celulares rodeados de una matriz de polímeros con canales abiertos para el movimiento de agua (Castrillón Rivera. *et al.*, 2013).

La formación de biopelículas está determinada por las especies fúngicas, condiciones de la superficie y factores medioambientales. En cuanto a las especies fúngicas de interés médico, la mayoría tiene la capacidad de producir biopelículas. En el género *Candida* se destacarían por su capacidad de producir biopelículas, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* (Shin *et al.*, 2002; Won Song, *et al.*, 2005; Ramage, *et al.*, 2005; Henriques *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2008; Bizerra *et al.*, 2009; Quindós *et al.*, 2009). Los microorganismos se adhieren a las superficies en un proceso muy complejo, con muchas variables que afectan su éxito. En general, la adhesión puede ocurrir más fácilmente en superficies rugosas e hidrófobas. La colonización microbiana se incrementa cuando la rugosidad de la superficie aumenta y el área de superficie es mayor. Las propiedades fisicoquímicas de la superficie pueden influir mucho en la adhesión microbiana. Muchos investigadores han encontrado que la adhesión es más rápida en superficies hidrófobas como teflón y otros plásticos que sobre materiales hidrofílicos como el vidrio o metales (Zambrano & Londoño, 2006). Los factores medioambientales que influyen en el proceso de formación de biopelículas, específicamente en la adhesión fúngica al sustrato son: características del medio acuoso, pH, cantidad de nutrientes, cargas iónicas, temperatura y fluidez. Varios estudios muestran el efecto de los medios acuosos sobre la adhesión y la formación de biopelículas. De igual manera la velocidad de las turbulencias fluctuantes en el medio puede afectar la formación de biopelículas (Zambrano & Londoño, 2006).

#### **2.4.1. Fases de formación de las biopelículas**

La formación de las biopelículas de *Candida* spp. “*in vivo*”, es un proceso dinámico y complejo. Sigue estadios diferenciados predecibles, no es un proceso aleatorio y tiene 4 estadios diferenciados, los cuales se detallan en la Figura Nro. 6.





**Figura Nro. 6: Etapas de la conformación de una biopelícula de *C. albicans*. A: Adhesión de levaduras a una superficie. B: Iniciación de la formación de la biopelícula. C: Maduración de la biopelícula. D: Dispersión para dirigirse a otros sitios (Gulati & Nobile, 2016)**

En las etapas iniciales ( $\leq 6$  h), se produce una adhesión celular al sustrato con la formación de capas sencillas de levaduras gemantes con gran actividad metabólica. En esta etapa entran en juego la hidrofobicidad, fuerzas electrostáticas y uniones específicas entre adhesina –receptor. Este proceso depende de factores ambientales, como la temperatura y el pH, y de factores genéticos propios del microorganismo involucrado que incluyen aspectos como la sensibilidad ambiental y presencia de determinadas proteínas en la superficie de las células en cuestión. Durante las fases de adhesión, los microorganismos cambian su fenotipo y llegan a ser básicamente diferentes respecto a su forma planctónica. Este cambio implica la expresión de genes específicos, se producen cambios y alteraciones en su morfología y cambia su tasa de crecimiento (Kumar & Anand, 1998).

En la etapa de iniciación se forma una capa fina de células, arquitectura que va cambiando hacia una estructura organizada proceso que se denomina maduración, siempre y cuando se den las condiciones adecuadas para un crecimiento suficiente del mismo. La creciente maduración va dotando a la biopelícula de un diseño cada vez más complejo que

se va adaptando a la presencia de nutrientes, al oxígeno y a los cambios poblacionales, formando microcolonias discretas separadas por canales de agua. La densidad estructural de la matriz se incrementa en el núcleo mientras que las capas externas persisten porosas. Toda ella posee abundancia de hifas, pseudohifas, y excreción del material de la matriz extracelular. En estas biopelículas maduras (> 24-48 h), destaca la presencia de una serie de canales acuosos que permiten el flujo de agua, nutrientes; metabolitos y productos de desecho. El origen de estos microcanales parece asociarse al despegue y liberación de microcolonias de *Candida* (Coogan *et al.*, 2006). La dispersión de las levaduras a partir de la biopelícula, pueden desprenderse o desagregarse y volver a la vida planctónica lo que podría derivar en la colonización a distancia del foco primario. El desprendimiento puede ser considerado como una etapa más del ciclo de vida de la biopelícula (Coogan *et al.*, 2006).

En las biopelículas candidiásicas coexisten disímiles formas celulares con un vía de comunicación intercelular “*quorum sensing*” o autoinducción (QS) que modula su desarrollo, al evitar superpoblación innecesaria y controlar la competencia por nutrientes; favorece el crecimiento y la dispersión celular particularmente para la diseminación y para el establecimiento de sitios distales de infección (Hogan, 2006; Valentín *et al.*, 2007).

La detección de *quorum* (número mínimo) o QS, la logran a través de la secreción y detección de las moléculas inductoras. Estas moléculas señal o autoinductor, como tirosol y farnesol, socializan la comunicación y modulan comportamientos, regulando transformaciones morfogénicas (Deveau & Hogan, 2011; Marengo *et al.*, 2013). El tirosol propicia la formación de las hifas y la biomasa de la biopelícula en las etapas iniciales (1-6 h) y se ha probado que las células sésiles originan cantidades significativamente mayores de tirosol que las planctónicas. El farnesol es un compuesto autorregulador morfogénico, que muy probablemente se produce *in situ* en biopelículas; inhibe la formación de hifas, impide el progreso excesivo de la biopelícula madura y favorece la dispersión celular a otras localizaciones: (Hornby *et al.*, 2001; Alem *et al.*, 2006). La dispersión celular asimismo se ve facilitada por el ácido cis-2-decenóico y otros ácidos grasos de cadena corta que operarían

como señales de comunicación entre las células (Davies & Marques, 2009; Quindós *et al.*, 2009).

Las biopelículas imponen a los solutos una velocidad de difusión más lenta que la existente en el medio líquido y esto influye que dentro de ellas existan gradientes de concentración de oxígeno, nutrientes, etc.; entre las zonas periféricas, en contacto directo con el medio y las más internas de su arquitectura. La difusión, se ve modificada por la densidad de la trama de la matriz y por la característica química de los polisacáridos que componen la matriz extracelular (González-Brambila & López-Isunza, 2007). Además el acceso de anticuerpos, células del sistema inmune y de antimicrobianos, pueden tener dificultad para acceder a los microorganismos localizados en las capas más profundas.

#### 2.4.2. Estructura de las biopelículas

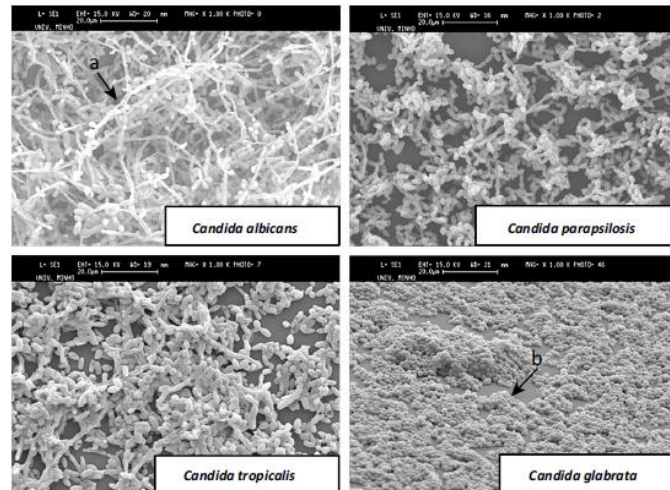
Es importante abordar el hecho de que las biopelículas son variables en su estructura y matriz, composición que difiere entre especies como se exponen en la Tabla Nro. 3 y en la Figura Nro. 7 y (Jain *et al.*, 2007; Holland *et al.*, 2014).

**Tabla Nro. 3: Características de las Biopelículas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata* (Araújo, 2017)**

Especies	Estructura de las biopelículas	Composición matricial
<i>C. albicans</i>	Estructura de bicapa con levadura, hifas y pseudohifas	Compuesto principalmente por carbohidratos, proteínas, fósforo y hexosaminas
<i>C. parapsilosis</i>	Delgada biopelícula consistente en agregado de blastosporas con células de levadura y pseudohifas	Altas cantidades de carbohidratos y bajos niveles de proteínas
<i>C. tropicalis</i>	Densa red de células de levadura con evidente morfologías filamentosas	Bajos niveles de carbohidratos y proteínas
<i>C. glabrata</i>	Monocapa compacta o multicapa de solo blastosporas	Altos niveles de carbohidratos y proteínas; compuesta principalmente de hexosamina

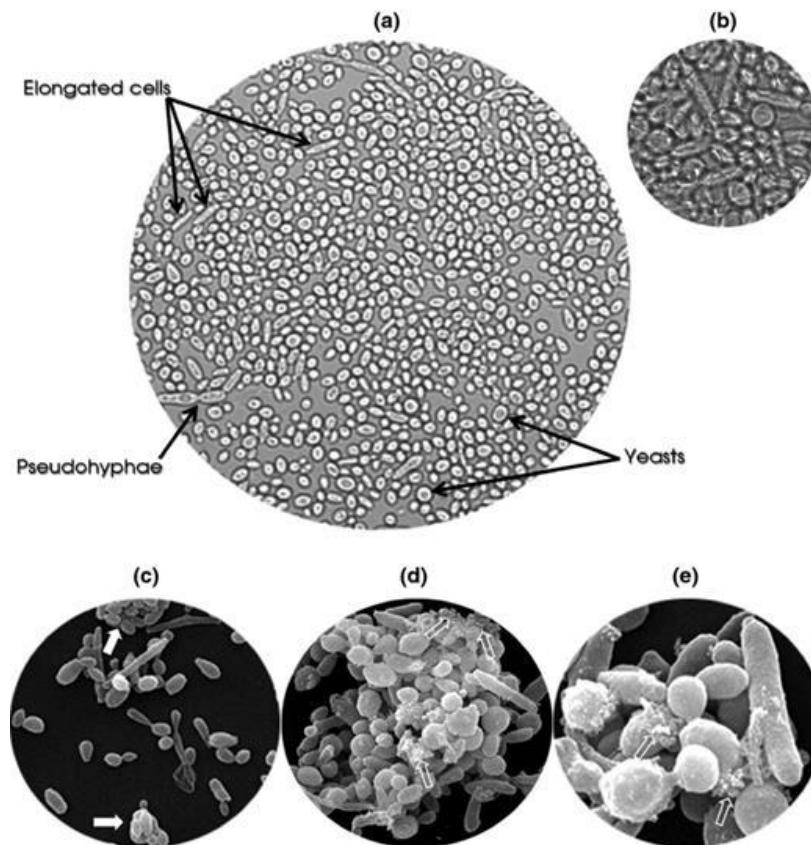
En resumen, la información detallada en la Tabla Nro. 2 y en la Figura Nro 7; se puede inferir que comparando con *C. albicans*, las biopelículas de *C. parapsilosis* son mucho menos gruesas y consisten en blastosporas agregadas con células de levadura y

pseudohifas. Por otro lado, con respecto a las biopelículas de *C. parapsilosis*, las matrices extracelulares contienen altas cantidades de carbohidratos; sin embargo, la cantidad de la proteína es más baja en comparación con la de otras especies (Silva *et al.*, 2009b).



**Figura Nro. 7: Estructura de la biopelícula de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*. Formas filamentosas. Blastosporas. Microscopía electrónica de barrido tras 24 h de crecimiento de la biopelícula (Araújo, 2017)**

La arquitectura *in vitro* de las biopelículas del complejo *C. parapsilosis*, se dispone en una capa homogénea de levaduras, algunas células más alargadas y pseudohifas, como se exhiben en la Figura Nro. 8. Las células se distribuyen en un 97% de agua y en una matriz de mucopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y productos de lisis celular. En la mencionada figura, se aprecia la biopelícula del complejo *C. parapsilosis* sobre sustrato después de 24 h (a) y 48 h (b). La biopelícula de fase temprana (c) se presenta como un aglomerado de células con morfología de levadura (flechas blancas), como también células elongadas y pseudohifas. Una típica biopelícula madura se observa luego de 48 horas de adhesión (d y e), y consiste en una red densa de elementos levaduriformes, pseudohifas y una matriz extracelular delgada e irregular (flechas blancas abiertas) que aparecen como una red fibrosa entre células fúngicas. Arquitecturas similares de biopelículas fueron observadas en *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*.



**Figura Nro. 8: Arquitectura de la biopelícula de especies del complejo *Candida parapsilosis* (Abi-chacra *et al.*, 2013)**

A pesar de que el complejo *C. parapsilosis* origina cuantitativamente menos biopelícula y estructuralmente de menor complejidad que *C. albicans*; ciertos fenotipos del complejo *C. parapsilosis* tienen mayor capacidad de formar pseudohifas, generan mayores cantidades de biopelícula y son más invasoras que las cepas en las cuales predomina la forma levaduriforme. Aunque esto se ve con mayor frecuencia en los aislamientos de *C. parapsilosis* s.s. y *C. orthopsilosis*, las tres especies del complejo son competentes para formar biopelículas con una topografía de la superficie y arquitectura similares (Kuhn *et al.*, 2002; Laffey & Butler, 2005; Lattif *et al.*, 2010).

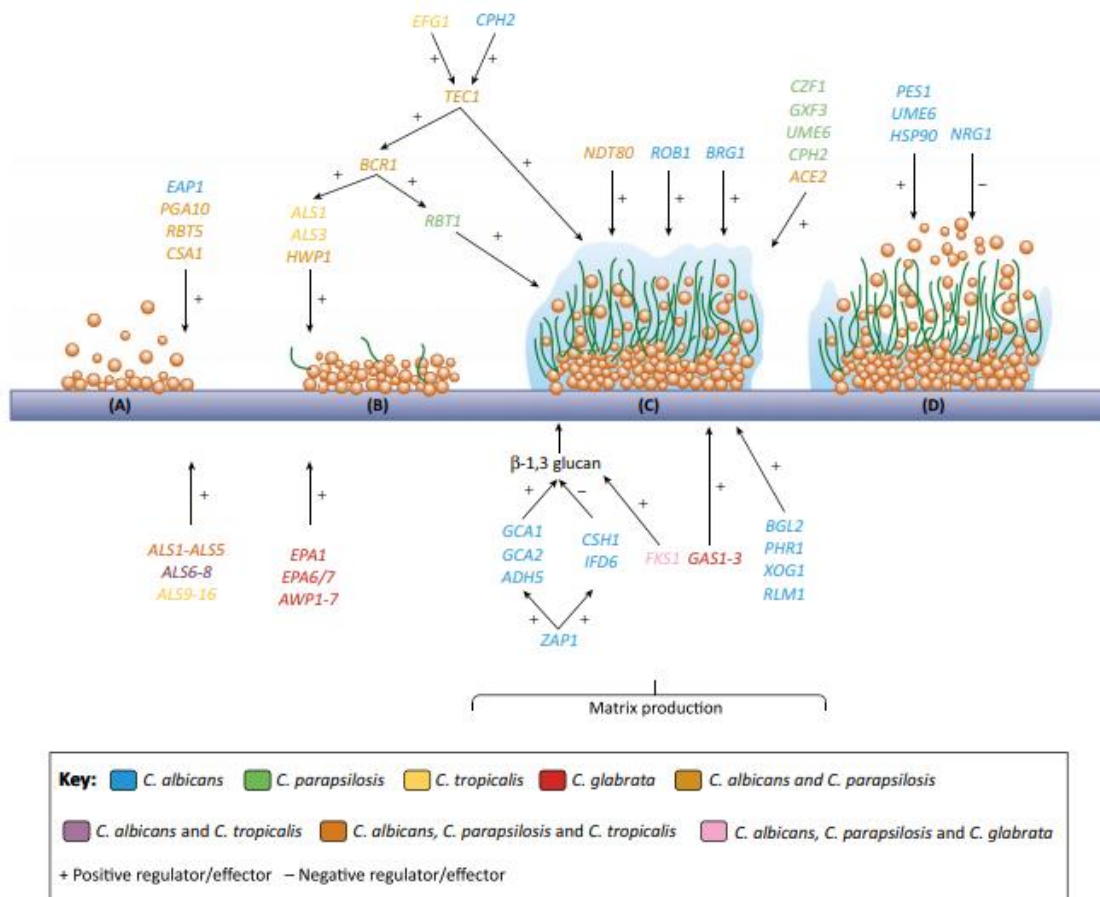
### **2.4.3. Regulación del proceso de formación de las biopelículas**

Las distintas fases de desarrollo de la biopelícula (adhesión, colonización, maduración y dispersión) están dirigidas por eventos moleculares complejos. Las especies de *Candida* utilizan varios genes que juegan un papel importante en las diferentes etapas

del desarrollo de la biopelícula. Genes reguladores detallados en la Figura Nro. 9 (Araújo, 2017).

En *Candida parapsilosis* s.l. se han descrito genes ortólogos a *Candida albicans*, tales como HWP1 y ALS. El gen HWP1 está involucrado en el proceso de adhesión celular y la consecuente formación de la biopelícula. El gen ALS1-5 interviene en la traducción de adhesinas, indispensables en el paso de la adhesión.

En la etapa de maduración intervienen los genes BCR1, factor de transcripción requerido para la formación de biopelículas; el gen EFG1, factor de transcripción involucrado en la formación de biopelículas y crecimiento de hifas; el gen NDT80, factor de transcripción involucrado en la formación de biopelícula; el gen RBT1, requerido para el desarrollo de biofilm, regulado por BCR1. Los genes CZF1, GZF3, UME6, CPH2 y el ACE2, son factores de transcripción adicionales en el complejo *C. parapsilosis*, que regulan la formación de biopelículas. La formación de biopelículas se reduce drásticamente cuando se elimina ACE2. Sin embargo, este gen también está involucrado en la regulación del desarrollo de biopelículas en *C. albicans*, controlando la adherencia de esta especie y la división celular. El gen FKS, intermedia en la maduración de la biopelícula en presencia de glucosa (Toro Crespo, 2011; Araújo, 2017).



**Figura Nro. 9: Genes reguladores involucrados en diferentes etapas de la construcción de las biopelículas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata*.**  
 (A): Adhesión inicial. (B): Formación de capas de microcolonias basales. (C): Biopelícula madura constituido por células con diversas morfologías y matriz extracelular. (D): Desprendimiento y dispersión de la biopelícula (Araújo, 2017).

Las células en las biopelículas poseen características diferentes de sus homólogas planctónicas (en suspensión), como el incremento de la resistencia a las defensas inmunológicas y a la acción de los antimicrobianos (Valentín *et al.*, 2007).

Existen numerosas evidencias epidemiológicas que relacionan las biopelículas con distintos procesos infecciosos, tales como:

- colonización de sustratos por estructuras microbianas,
- presencia de un biomaterial, tejido dañado, o sustrato de tejido relativamente acelular,
- iniciación de infección por pequeños inóculos microbianos,

- resistencia mediada por biopelículas a los mecanismos de defensa del huésped y a la terapia antimicrobiana.
- infecciones persistentes por resistencia al tratamiento antimicrobiano.
- presencia de inflamación, tejido celular dañado, y necrosis en la interfase tejido-implante (zona fibroinflamatoria, inmunoincompetente) generado por partículas derivadas del biomaterial,
- alteración de la respuesta mediada por células y posiblemente humoral del huésped por la presencia del biomaterial y microorganismo (Lasa *et al.*, 2005).

En los últimos años, las biopelículas han sido reconocidas progresivamente como factores importantes en la patogenia de muchas infecciones humanas persistentes, incluyendo placa dental, caries, infección periodontal, cistitis crónica, endocarditis, osteomielitis, y prostatitis crónica. También se ha demostrado que una variedad de dispositivos médicos puede portar biopelículas, provocando infecciones asociadas, entre las que se destaca la sepsis por catéteres intravenosos y arteriales. Hay que tener en cuenta que el número de dispositivos médicos permanentes está en aumento, y una proporción cada vez mayor de infecciones relacionadas con el dispositivo son causadas por *Candida* spp. Asimismo, se han descrito, en catéteres urinarios, y lentes de contacto. *Candida* spp. pueden producir biopelículas en materiales sintéticos y que pueden llegar a ser relativamente refractarios a la terapia médica (Costerton *et al.*, 1999; Kuhn *et al.*, 2004; Ramage *et al.*, 2008).

En la actualidad se disponen de varios modelos *“in vitro”* para estudiar la formación y el desarrollo de biopelículas, para caracterizar las propiedades globales y para la sensibilidad de las biopelículas de *Candida* spp. a los agentes antifúngicos. El más simple de éstos, y el primero en ser descrito, consiste en permitir el crecimiento de las poblaciones adheridas a superficies escogidas adecuadamente y el crecimiento se controla cuantitativamente mediante un ensayo colorimétrico que depende de la reducción de una sal de tetrazolio (Ramage *et al.*, 2001; Douglas, 2002; Ramage *et al.*, 2008).



#### **2.4.4. Cuantificación de las biopelículas**

Históricamente, se han estudiado a los microorganismos en el plancton (libre células flotantes y homogéneas) en cultivo puro. Sin embargo, ha habido un cambio de paradigma como el vínculo entre las formas sésiles (superficie unida y células heterogéneas) la patogénesis y la infección humana, ahora es ampliamente aceptada. Es evidente que una amplia gama de bacterias y hongos son capaces de alternar entre el crecimiento planctónico y sésil, estimándose que el 80% de todos los microorganismos en el medio ambiente existe en las comunidades de las biopelículas (Sternberg *et al.*, 2014).

La formación de las biopelículas *in vitro*, se estudia en diferentes soportes como fragmentos de catéteres (silicona, cloruro de polivinilo, polietileno, teflón), tiras de acrílico, láminas de vidrio, filtros de celulosa, tubos de polipropileno y en microplacas.

Se han empleado numerosas técnicas para la cuantificación de las biopelículas (Azeredo *et al.*, 2017). Estos ensayos, como sistemas artificiales, varían ampliamente en cuanto a sus requisitos de tiempo y costo.

La formación de biopelículas en placas de microtitulación es ciertamente el método más comúnmente utilizado. Se pueden realizar la cuantificación en microplacas de titulación con:

1. Ensayo de biomasa total, basado en la cuantificación de la matriz y células viables y no viables: safranina; cristal violeta, fluorocromo.
2. Ensayo de viabilidad: basado en la actividad metabólica de las células viables: reducción de sales de tetrazolium (XTT), y resazurin (alamar blue).
3. Ensayos de cuantificación de la matriz, basados en la tinción específica de componentes de la matriz: DMMB (dimethyl methylene blue). Se utilizan generalmente con dispositivos médicos de materiales sintéticos (Costa-Orlandi *et al.*, 2017).

## 2.5. SOLUCIÓN SATURADA DE SACAROSA

El primer registro del uso del azúcar granulado para tratar heridas data de 170 A.C. En 1976, Leon Herszage comenzó a utilizar el azúcar molido común en el tratamiento de heridas infectadas por diferentes bacterias en humanos, y su primera publicación apareció en 1980 (Herszage *et al.*, 1980).

En dicha oportunidad y confirmado con trabajos posteriores se puede afirmar que el azúcar es un bacteriostático universal. La acción germicida del azúcar básicamente por el principio fisicoquímico conocido como disminución de la actividad agua ( $a_w$ ) con la consecuente inhibición del desarrollo microbiano (Herszage *et al.*, 1982; Chirife *et al.*, 1983a; Fennema, 1996).

Una vez inhibido el desarrollo bacteriano, el hospedante responde con un incremento de su inmunidad celular. A partir de ello se comienza a generar tejido en mayor cantidad que lo habitual, se logra la formación de una capa que inhibe toda sobreinfección y permite una sólida reparación cicatrizal (Chirife *et al.*, 1982; Chirife *et al.*, 1983a). La aplicación del azúcar sobre heridas supuradas, actúa como germicida, esto se fundamenta por la acción y participación del sistema inmunológico en los sucesivos estadios de la desinflamación y reparación cicatrizal. Es decir, el azúcar actuaría como “suctor” de macrófagos hacia la herida aumentando los fibroblastos y la formación de colágeno. El hospedante responde con un incremento de la inmunidad celular (Herszage *et al.*, 1982).

El concepto de  $a_w$  se maneja desde 1930 en bacteriología de alimentos y se han estudiado los distintos solutos y las concentraciones con que se deben hacer soluciones para el control de las diversas especies bacterianas.

La  $a_w$  se define de la siguiente manera:

$$a_w = p/p_0$$

Ecuación en la que  $a_w$  es la actividad del agua pura,  $p$  es la presión parcial del agua por encima de la muestra y  $p_0$  es la presión del vapor del agua pura a la misma temperatura. Esta ecuación es una aproximación a la expresión actividad original de Lewis, donde  $a_w = f/f_0$

en la que  $f$  es la fugacidad del solvente (fugacidad es la tendencia de un solvente a escapar de la solución) y  $f_0$  es la fugacidad del solvente puro. A bajas presiones (por ejemplo, ambiente) la diferencia entre  $f/f_0$  y  $p/p_0$  es tan pequeña (menos del 1%) que la definición  $a_w$  en términos de  $p$  y  $p_0$  es claramente justificable.

La  $a_w$  también está relacionada con varios otros términos, interrelaciones que son útiles:

$$a_w = p/p_0$$

$$a_w = \text{HRE}/100$$

$$a_w = n_1 / n_1 + n_2$$

En las anteriores ecuaciones HRE, es la humedad relativa de equilibrio (%) en torno al producto,  $n_1$  los moles de solvente y  $n_2$  los moles del soluto. Es conveniente resaltar que la  $a_w$  es una propiedad intrínseca de la muestra, mientras que la humedad relativa de equilibrio es una propiedad de la atmósfera en equilibrio con la muestra (Herszage *et al.*, 1982).

Como se mencionó anteriormente la SSS esta formulada con sacarosa, E y PEG 400. La sacarosa es un  $\alpha$ -D glucopiranosido- $\beta$ -D-fructofuranosido. La incorporación de eugenol, principio activo del clavo de olor, logra sumar la acción germicida del mismo, que como otros compuestos fenólicos, actúa por ruptura e inhibición de la biosíntesis de componentes celulares, demostrada por microscopía electrónica. El eugenol, 4 alil-2 metoxi fenol- $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$ , es prácticamente insoluble en agua, miscible con cloroformo, éter, aceites.

Es el principio activo del clavo de olor y abarca el 90-95% del aceite esencial del clavo de olor. Como otros fenoles tiene acción germicida. Actúa por ruptura o inhibición de la biosíntesis de la pared celular bacteriana, demostrado por microscopía electrónica (Briozzo *et al.*, 1989; Chirife *et al.*, 1992; Medvedeff *et al.*, 1997; Benencia & Courreges, 2000; Horne *et al.*, 2001; Núñez *et al.*, 2001; Chee & Lee, 2007; Ali *et al.*, 2009):

Compatibilizar sacarosa y eugenol en fase acuosa, requiere de la incorporación de polietilenglicol 400 (PEG 400), polímero de condensación de óxido de etileno y agua, y que responde a la formula general  $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{-O-CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{OH}$ ;  $n$  varía entre 3 y 225. Como

vehículo permite disolver numerosos principios activos en agua. El PEG 400 es líquido, soluble en agua y miscible con otros glicoles. El PEG 400 se incorpora a emulsiones, aceite - agua, como agente reológico (para ajustar su consistencia y retardar la fase acuosa). Además favorece la exudación y puede mejorar la limpieza de heridas, presenta una correcta extensibilidad y tiene una adecuada adherencia a los tejidos (Chirife *et.al.*, 1983b).

## **CAPÍTULO III**

### **ASPECTOS METODOLÓGICOS**

#### **3.1. PROPUESTA METODOLÓGICA**

La estrategia metodológica utilizada fue atento al estado del arte (grado de conocimiento del objeto), un diseño descriptivo; según el grado de control o posición del investigador, se manejó un diseño experimental; según el tipo de tarea, se desarrolló un trabajo de campo; atento al movimiento del objeto, se aplicó un estudio transversal; según el momento o temporalidad en que se constituyen los datos, se esgrimió un estudio retrospectivo. Finalmente, la estrategia metodológica fue cuantitativa.

##### **3.1.1. Universo**

Se emplearon un total de 54 cepas identificadas originalmente por métodos fenotípicos, como complejo *C. parapsilosis* -provenientes de aislamientos de muestras clínicas de casos de micosis superficiales y profundas, de pacientes internados y ambulatorios de ambos sexos, sin límite de edad- depositadas en la colección de de la Cátedra de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (FCEQyN) de la Universidad de Misiones (UNaM). Las cepas se aislaron de productos biológicos derivados de centros asistenciales de salud al Servicio de Extensión y Vinculación Tecnológica “Aislamientos Fúngicos de Interés Médico” Resolución CD N° 047/02, (FCEQyN, UNaM).

##### **3.1.2. Muestra**

Las muestras fueron del tipo no probabilísticas escogidas en forma ocasional. El subtipo fue accidental. Se empleó como único criterio de inclusión, el que hayan sido aisladas de infecciones humanas- en pacientes internados y ambulatorios de ambos sexos, sin límite de edad- y que su compromiso como agentes etiológicos de los procesos

mórbidos, haya sido demostrado. El número muestral fue de 54 aislamientos depositados en la colección como levaduras del complejo *C. parapsilosis*.

### **3.1.3. Estructura de los datos**

#### **3.1.3.1. Unidad de análisis**

Cada una de las especies del complejo *C. parapsilosis*.

#### **3.1.3.2. Variables**

- a. Especies integrantes del complejo *C. parapsilosis*.
- b. Capacidad de producción de biopelículas.
- b. Sensibilidad antifúngica *in vitro*.

#### **3.1.3.3. Escala de valores**

- a. *Candida parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.
- b. Producen biopelículas o no producen biopelículas.
- c. Sensible o resistente.

#### **3.1.3.4. Dimensiones**

a. Las especies del complejo *C. parapsilosis*, se identificaron con base en el polimorfismo de las regiones ITS1 e ITS2, y la región que codifica para el ADNr de la subunidad 5,8S (ITS1-5,8S-ITS2).

b. La dimensión considerada en la producción de biopelículas *in vitro*, fue la masa total y especie del complejo *C. parapsilosis*.

c. Las dimensiones tenidas en cuenta en la determinación de la sensibilidad antifúngica fueron concentración del inóculo de levadura, tiempo de incubación, temperatura de incubación y especie del complejo *C. parapsilosis*.

#### **3.1.3.5. Indicadores**

a. Para la identificación molecular de las especies del complejo *C. parapsilosis*; se analizó el polimorfismo de la región ITS1-5,8S-ITS2 (Scherer & Stevens, 1987; Lehmann, *et al.*; 1992; Rycovska *et al.*, 2004; Tavanti *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2012).

b. Para la formación de células planctónicas (biopelículas), el procedimiento fue cuantitativo en placas de microtitulación.

c. Para la sensibilidad antifúngica *in vitro* frente a SSS, de las formas planctónicas, el procedimiento fue cualitativo en tubos de ensayo (según protocolo de Medvedeff, *et al.*, 2000).

d. Para la sensibilidad antifúngica *in vitro* frente a SSS, de las formas sésiles, el procedimiento fue cuantitativo en placas de microtitulación.

#### **3.1.3.6. Fuente de información**

El tipo de información primaria. El criterio de selección de las cepas, fue según la oportunidad

#### **3.1.3.7. Instrumentos herramientas**

El instrumento para la obtención de datos de la presente tesis, fue la observación.

Se utilizaron las siguientes herramientas de laboratorio:

- Microscopio óptico Ernst Leitz GMBH Wetzlar (German).
- Espectrofotómetro MAPADA MODELO UV-3300, Shanghai.
- Centrífuga Presvac DCS 16-RV
- Termociclador Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd. Life Express Thermal Cycler. Model: TC 96/G/H(b)
- Cuba de Electroforesis SubSystem 70 modelo E-0310 (Labnet Internacional, Inc.) y fuente de poder Power Station 300Plus (Labnet Internacional, Inc.).
- Incubadora con agitación orbital (Thermolyne ROSI 1000 Reciprocating Orbital Shaking Incubator, USA).

- Lector de Elisa a 490 nm (Rayto RT-2100C Microplate Reader).

### **3.1.3.8. Plan de análisis**

Se empleó como parámetro estadístico, frecuencia.

Se aplicó como método estadístico la prueba de Chi cuadrado, utilizando el software Statgraphics Centurion XV (2009) para un nivel de confianza de 95%.

En la búsqueda de identidad de las secuencias obtenidas, se realizó de las mismas con las secuencias depositadas en base de datos públicas, con el herramienta *nBLAST* disponible *on line*. Se aliniaron secuencias con el programa *Bioedit 7.2.6.0*. Para la determinación de las relaciones filogenéticas se utilizó la herramienta *PhyML 3.0* (Guindon *et. al.*, 2010) de ATCG *Montpellier Bioinformatics Platform*, con el método de reconstrucción Maximum Likelihood (Nei y Kumar, 2000) con 1000 *bootstrap* de repeticiones y GTR como modelo de sustitución de nucleótidos; editado con el programa *MEGA 7.0.26* (Kumar *et. al.*, 2016).

## **3.2. MATERIALES**

### **3.2.1. Muestras (unidad de análisis)**

Para esta tesis se analizaron 54 cepas identificadas como integrantes del complejo *Candida parapsilosis*, depositadas en el cepario de la Cátedra de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM), entre 01 de Febrero de 2014 a 31 de Julio 2018. Las cuales se conservaron en agua destilada estéril a 4 °C.

Las cepas fueron subcultivadas, tras su conservación, en medios de cultivos agar glucosa Sabouraud 4% (Laboratorios Britania) y en agar hongos y levaduras (Laboratorios Britania) cultivadas por 48-72 h a 28 °C y a 37 °C.



### **3.2.2. Medios de cultivos**

Los medios de cultivo utilizados para la realización del presente trabajo se mencionan a continuación y se detallan en el ANEXO I:

- Agar Sabouraud glucosado (AGS). Laboratorios Britania
- Agar Sabouraud glucosado 20
- Agar hongos y levaduras (AHL). Laboratorios Britania
- CHROMagar Candida<sup>®</sup>
- Agar leche Tween 80 (AL)
- Caldo Sabouraud glucosa (CGS)
- Caldo enriquecido (CE)

### **3.2.3. Soluciones y líquidos de montaje**

Las soluciones, líquidos de montaje y colorantes utilizados para la ejecución del presente trabajo se indican a continuación y se especifican en el ANEXO I:

- Azul de lactofenol
- Tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS)
- Safranina
- Solución saturada de sacarosa ( $a_w$ :  $0,65 \pm 0,02$ )

## **3.3. MÉTODOS**

### **3.3.1. Identificación fenotípica presuntiva**

Las cepas del complejo *C. parapsilosis* fueron re identificadas - fueron previamente identificadas para integrar la colección- presuntivamente por medio de los procedimientos

utilizados en la micología clásica, basados en sus características culturales macroscópicas y microscópicas. Además se determinó su comportamiento en medio cromogénico, CHROMagar *Candida*®. La re-identificación fenotípica de las cepas, se realizó según la marcha de la Figura Nro. 10 (Medvedeff *et al.*, 2008).

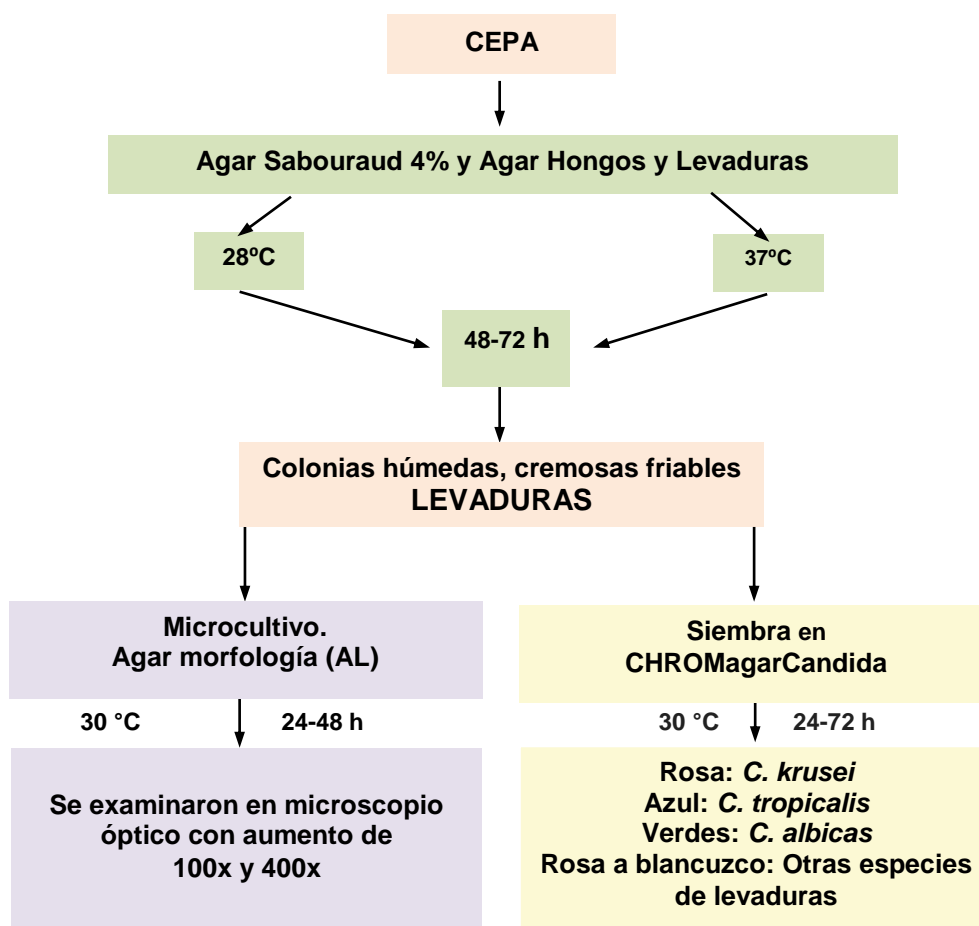


Figura Nro. 10: Esquema de la marcha de la identificación fenotípica presuntiva

### 3.3.1.1. Siembra en CHROMagar *Candida*®

El CHROMagar *Candida*® (CHROMagar Company Ltd., Francia) fue descrito por Odds y Bernaerts en 1994 para identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida*. Es un medio de cultivo selectivo y diferencial de identificación presuntiva. Este medio diferencial emplea dos cromógenos, que indican la presencia de las enzimas X-NAG (5-bromo-4-cloro-3-indol N acetil B-D-glucosamida) y BCIP (5-bromo-6-cloro-3-indol fosfatasa p-toloudina), que detectan la actividad de las enzimas hexosaminidasa y fosfatasa

alcalina respectivamente, las cuales permiten diferenciar las colonias de *C. albicans* de las de *C. tropicalis*, *C. krusei* y de otras especies importantes de *Candida*.

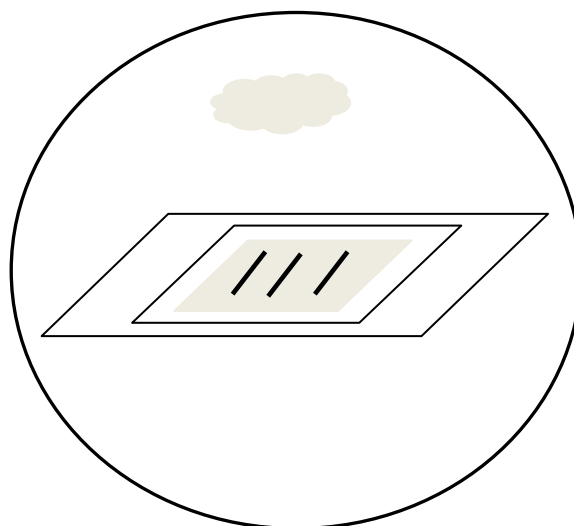
Las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* producen diferentes colores, lo que permite la detección directa de estas especies de levadura en la placa de aislamiento. Las colonias de *C. albicans* aparecen de color verde. Las colonias de *C. tropicalis* aparecen de azul verdoso a azul metálico y las colonias color rosado, corresponden a *C. krusei*. Otras especies de levadura pueden desarrollar colonias blancas a rosa pálido un color natural (crema). La incubación es a temperatura de 30 °C por 24-72 h en condiciones de aerobiosis (Nadeem *et.al.*, 2010; Estrada-Barraza *et.al.*, 2011; Guilarte *et.al.*, 2011; Neppelenbroek *et.al.*, 2014).

Cada una de las cepas aisladas, se inocularon según las técnicas tradicionales en placas de Petri por el método de estrías. Se incubaron las placas en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C durante 48 h para que las levaduras manifiesten completamente el color. En este medio, el complejo *C. parapsilosis* desarrolla colonias marfil a rosa lavanda (Odds & Bernaerts 1994; Vijaya *et.al.*, 2014).

### **3.3.1.2. Microcultivo**

Es el mejor método para observar la morfología y disposición microscópica de las distintas estructuras fúngicas. Se utiliza en el cultivo y diferenciación de especies de *Candida* spp. con base en las características miceliales. El Tween 80 (polisorbato) se incorpora para reducir la tensión superficial y aumentar la formación de hifas y blastoconidios y clamidosporas (Medvedeff *et al.*, 2008). Se coloca un portaobjetos en el interior de una placa de Petri y se esterilizan en autoclave, envueltas en papel. Sobre cada portaobjeto se agregó 2,5 mL de medio de cultivo esteril. Se utilizó como medio de cultivo AL (Figura Nro. 11). La inoculación se realizó, haciendo tres cortes paralelos en el agar (separados 1 cm) manteniendo el ansa en un ángulo aproximado de 45°. Se colocó un cubreobjetos estéril sobre la superficie de agar cubriendo una parte de las estrías de siembra. Se incubaron las placas sembradas a 30 °C durante 24-48 h y luego se examinaron en microscopio óptico con aumento de 100x y 400x. La caracterización

microscópica del microcultivo provee información importante de su micromorfología característica y es un paso relevante en el procedimiento de identificación (Medvedeff *et al.*, 2008).



**Figura Nro. 11: Microcultivo en Agar Leche Tween 80 (Medvedeff *et al.*, 2008)**

### **3.3.2. Identificación molecular de cepas del complejo *C. parapsilosis***

#### **3.3.2.1. Extracción y purificación de ADN genómico**

Para realizar la extracción del ADN, el primer paso es el crecimiento de la cepa fúngica en medio líquido. En un tubo de ensayo estéril con 5 mL de caldo enriquecido, se transfirió con un ansa ojal la colonia, a 37 °C por 72 h. Luego de transcurrido este tiempo, se trasvasó el cultivo a un tubo de 15 mL estéril, se realizó una centrifugación de 3 min a 3000 r.p.m. (centrífuga Presvac DCS 16-RV). Se descartó el sobrenadante y se trabajó con el pellet para la extracción de material genético. Se extrajo ADN a partir del material fúngico utilizando el protocolo propuesto por Fonseca (2012) (ver ANEXO II: Protocolo de extracción de ADN, a partir de hongos levaduriformes). Para ello el contenido celular digirió a 60 °C con Proteinasa K 0,1mg/mL,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y SDS 2% (p/v) en solución buffer Tris-HCl 100 mM (pH 8), NaCl 1,5 M y EDTA 50 mM. El ADN se purificó con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y acetato de potasio 3 M, luego se precipitó con alcohol isopropílico. El ADN genómico extraído se conservó en agua miliQ (Biopack ®), en freezer a -20 °C.

La calidad del ADN se verificó mediante la visualización en geles de agarosa 1 % (p/v) teñidos con gel red. La cuantificación se realizó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia corresponde a 50  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de ADN. La pureza de ADN se determinó mediante la relación de la absorbancia 260 nm/absorbancia 280 nm (espectrofotómetro MAPADA MODELO UV-3300, Shanghai).

### 3.3.2.2. Amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2

Para realizar la amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2, se utilizaron los cebadores universales ITS1 e ITS4 (White *et.al.*, 1990), los cuales se describen en Tabla Nro. 4.

**Tabla Nro. 4: Secuencia de cebadores utilizados en la identificación de los aislamientos seleccionados**

Cebador	Secuencia	Referencia
ITS1	5´ - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3´	White <i>et.al.</i> , 1990
ITS4	5´ - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3´	White <i>et.al.</i> , 1990

Para llevar a cabo la puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se preparó una master mix a volumen final de 60  $\mu\text{L}$ , conteniendo agua libre de DNAasa, Buffer 1X,  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM, dNTPs 200  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  de cada uno de los cebadores universales mencionados previamente, 0,5 U de Taq polimerasa y ADN templado 10 ng/  $\mu\text{L}$ .

El programa para realizar la PCR consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C durante 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de amplificación, constituidos por:

- desnaturalización a 94 °C, por 40 segundos
- hibridación *annealing* a 58 °C, por 40 segundos
- extensión a 72 °C, por 40 segundos

Seguido por una extensión final a 72 °C durante 10 min, con equipo Termociclador Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd. Life Express Thermal Cycler. Model: TC 96/G/H (b).

Como control positivo del proceso de amplificación se utilizó el ADN aislado de las tres cepas de referencia: *C. parapsilosis* s.s. ATCC 22019 ATCC® 22019™, *C. metapsilosis*

DMic 14837 y *C. orthopsilosis* DMic 134539. Mientras que el control negativo no incluyó ADN templado.

Con el fin de optimizar las condiciones para la amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2, y obtener una banda única, las variables que fueron ajustadas incluyeron la optimización de la concentración de  $MgCl_2$ , la temperatura de hibridación ( $T_m$ ), y la concentración de ADN, como se detalla a continuación:

#### **a. Optimización de la concentración de $Cl_2Mg$**

Para la puesta a punto del método de amplificación se trabajó con dos concentraciones diferentes de  $Cl_2Mg$ . Se probaron  $Cl_2Mg$  2,5 mM y 1,5 mM, para lograr la concentración de  $Mg^{++}$  libre adecuada para la actividad enzimática y disminuir el nivel de amplificación inespecífica.

#### **b. Optimización de la temperatura de hibridación ( $T_m$ ).**

Para optimizar la hibridación (*annealing*), se realizó la amplificación del ADN templado, a diferentes temperaturas de hibridación: 50 °C, 55 °C y 58 °C.

#### **c. Optimización de concentración de material genético**

El ADN templado amplificado fue ensayado en diferentes concentraciones: a 20 ng/ $\mu$ L, a 10 ng/ $\mu$ L y a 5 ng/ $\mu$ L, cuantificado por espectrofotómetro (MAPADA MODELO UV-3300, Shanghai).

### **3.3.2.3. Electroforesis en geles de agarosa**

La visualización de la integridad del ADN extraído se verificó en gel de agarosa al 1% (p/v), mientras que la separación de los productos de PCR se realizó agarosa al 2% (p/v). Los mismos fueron preparados en buffer TBE-0,5X (Tris-Borato-EDTA). Las muestras se sembraron en los pocillos del gel mezclando 5  $\mu$ L del producto de PCR con 0,5  $\mu$ L de buffer de siembra 6X, compuesto por glicerol 60%, EDTA 0,01 M y azul de bromofenol 0,1%. La corrida electroforética se realizó a 110 V por 30 min en una cuba SubSystem 70 modelo E-0310 (Labnet Internacional, Inc.) conectada a una fuente de poder Power Station 300Plus

(Labnet Internacional, Inc.). Para la visualización de las bandas, los geles se tiñeron con solución de gel red (Biotium, 10000X). Las muestras se observaron bajo luz UV y las corridas fueron fotografiadas con cámara digital Canon Power Shot G10.

#### **3.3.2.4. Secuenciación de los fragmentos amplicados y comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas**

La purificación seguida de la secuenciación de los productos de PCR, se realizó en el servicio de Secuenciación Automática de MACROGEN, Corea. Las muestras se enviaron en tubos de 1,5 mL a una concentración de 50 ng/μl. De cada amplificación, se secuenciaron ambas hebras, utilizando los cebadores ITS1 e ITS4. Dichas secuencias se analizaron *in silico* mediante herramientas bioinformáticas disponibles como se describe en el siguiente punto.

#### **3.3.2.5. Análisis bioinformático**

Los resultados de la secuenciación se analizaron mediante el programa *Bioedit* 7.2.6.0., el cual permite la visualización y edición de los cromatogramas.

En primer lugar, se realizó una edición de las secuencias obtenidas de la secuenciación, se eliminaron los segmentos de baja calidad de ambos extremos, y se corrigieron los errores aparentes de los cromatogramas.

Posteriormente la secuencia consenso corregida se comparó con secuencias depositadas en la base pública utilizando la herramienta *nBLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se seleccionaron las secuencias de cepas de referencia (ATCC) y aquellas con un porcentaje de identidad superior a 99% y un valor E de 0.0.

Se construyó un set de datos y las secuencias fueron alineadas y mediante alineamiento múltiple con el algoritmo *ClustalW* del programa *Bioedit* 7.2.6.0 (Hall, 1999). El archivo se guardó en formato FASTA (.fas).

Utilizando la herramienta “Utilities” de *PhyIemon 2.0* (Sanchez *et. al.*, 2011) se transformó el formato FASTA en formato PAML (.phy).

Utilizando la herramienta *PhyML 3.0* (Guindon *et. al.*, 2010) de *ATCG Montpellier Bioinformatics Platform*, se obtuvo un árbol filogenético con el método de reconstrucción basado en el modelo explícito de evolución *Maximum Likelihood* (Nei & Kumar, 2000) con 1000 *bootstrap* de repeticiones y un modelo de sustitución de nucleótidos GTR (del inglés, *General Time Reversible*). El modelo GTR se generó en el programa *PhyML 3.0*.

El árbol filogenético fue editado utilizando el programa *MEGA7.0.26* (Kumar *et. al.*, 2016).

### **3.3.3. Formación *in vitro* de biopelículas**

Para la *formación in vitro* de biopelículas se utilizó el ensayo de biomasa total, basado en la cuantificación de la matriz y células viables. Una ventaja del mismo es su bajo precio debido al uso de un colorante económico y un equipo no costoso (un lector de placas). Se han identificado algunos inconvenientes del método como su tendencia a sobreestimar la capacidad de formación de biopelículas de cepas productoras de material extracelular (polisacáridos) y a su incapacidad para distinguir entre células vivas y no viables. Estas últimas debilidades, no le quitan utilidad al procedimiento, dado que se obtienen resultados reproducibles e identificación rápida de cepas con fuerte, moderado y débil capacidad de formación de biopelícula (Ommen *et al.*, 2017).

Las levaduras se incubaron en AGS durante 24 h a 37 °C. Se preparó una suspensión de cada levadura de  $3 \times 10^7$  UFC/mL (la concentración del inóculo se determinó por recuento en cámara de Neubauer) en caldo Sabouraud glucosa (CGS), suplementado con glucosa con una concentración final de 8%. Un mL de la suspensión se inoculó en tubos de poliestireno con 9 mL de CGS. Se distribuyeron 200 µL de esta suspensión en cada pocillo de placas comerciales de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (CELLSTAR<sup>®</sup>, greiner bio-one, CAT. Nro. 655 180. Lote 16043G3), se incubaron a 37 °C durante 24 h en una incubadora con agitación orbital (Thermolyne ROSI 1000;USA), a 37 °C



a 38 r.p.m. Luego la placa se lavó 4 veces con buffer fosfato salino (PBS) y se coloreó con safranina al 1%. Tras retirar el excedente, la lectura de las microplacas se realiza en seco, con un lector de Elisa a 490 nm (Rayto RT-2100C, China). La prueba se realizó por triplicado. La disminución de la transmitancia es proporcional al grado de formación de biopelícula por cada cepa de levadura. El porcentaje de bloqueo, se calculó:  $\% \text{ bloqueo} = (1 - T) \times 100$ .

La cuantificación de las biopelículas, por medio de porcentaje de bloqueo, de *C. parapsilosis* s.s, permite agrupar de la siguiente manera; si el porcentaje de bloqueo es < a 5 se considera negativo; si el porcentaje de bloqueo es de 5 a 20, + (una cruz); si el porcentaje de bloqueo es de 20 a 50, ++ (dos cruces) y si el porcentaje de bloqueo es > a 50, +++ (tres cruces). También se incluyeron pozos de control negativo que contenían caldo estéril sin inocular las levaduras en estudio (Gokce, *et al.*, 2007; Peeters *et al.*, 2008; Mohandas & Ballal, 2011).

#### **3.3.4. Determinación de la bioactividad *in vitro* de la SSS, sobre las formas planctónicas del complejo *Candida parapsilosis***

La metodología empleada fue la siguiente, según Medvedeff, *et.al.*, 1997: Se repicaron las cepas en AGS durante y se incubaron por 24 h a 37 °C. Se realizó una suspensión de cada una de las cepas en un tubo de ensayo que contenía 2 mL de caldo Sabouraud. A partir de ella se obtuvo una suspensión con turbidez equivalente a un tubo testigo N°5 Mc Farland. Se colocó 50 µL de la suspensión anterior, previamente homogeneizada en un tubo de ensayo a la cual se añadió 2 mL de la SSS, cuya composición se detalla en Anexo I. Luego de vigorosa agitación se comenzó a contar el tiempo que transcurrió desde que la suspensión de la cepa se puso en contacto con la SSS. Para comprobar la viabilidad de la cepa se realizaron repiques a los 30 min, 12 h y 24 h, en placas de agar glucosa Sabouraud 20.

Las placas se incubaron a 28 °C y se observaron durante 36 h, con el objeto de verificar presencia o ausencia de desarrollo fúngico durante este período. Para comprobar

viabilidad de las cepas testigos se repicaron las mismas a partir de las suspensiones realizadas en agar glucosa Sabouraud 20. Estas se realizaron en paralelo a cada ensayo (Medvedeff, *et.al.*, 1997; Medvedeff, *et.al.*, 1998; Medvedeff, *et.al.*, 2000).

### **3.3.5. Determinación de la bioactividad, sobre las formas sésiles (biopelículas) del complejo *Candida parapsilosis*.**

Las levaduras que desarrollaron biopelículas se incubaron en AGS durante 24 h a 37 °C h. Se preparó una suspensión de cada levadura de  $3 \times 10^7$  UFC/mL en CGS (la concentración del inóculo se determinó por recuento en cámara de Neubauer), suplementado con glucosa con una concentración final de 8%. Un mL de la suspensión se inoculó en tubos de poliestireno con 9 mL de SSS. Se distribuyeron 200  $\mu$ L de esta suspensión en cada pocillo de placas comerciales de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano, se incubaron a 37 °C durante 24 h, en una incubadora con agitación orbital (Thermolyne ROSI 1000, USA) a 38 rpm. Luego la placa se lavó 4 veces con PBS y se coloreó con safranina al 1%. Se retiró el excedente de colorante y la lectura de las microplacas se realizó en seco, con un lector de Elisa a 490 nm (Rayto RT-2100C, China). La prueba se realizó por triplicado. También se incluyeron pozos de control negativo con SSS, sin inocular.

## **CAPÍTULO IV**

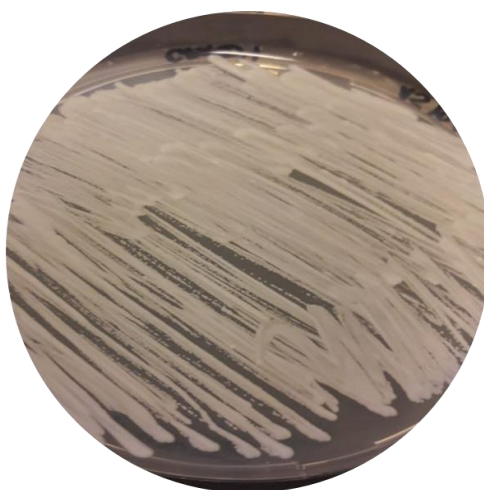
### **RESULTADOS**

#### **4.1. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA PRESUNTIVA**

Se recuperaron 54 cepas catalogadas como integrantes del complejo *C. parapsilosis*. Los aislamientos exhibieron colonias de color blanco, cremoso lisa o rugosa, después de 48 h, observadas en Figura Nro. 12 y Figura Nro. 13, respectivamente.

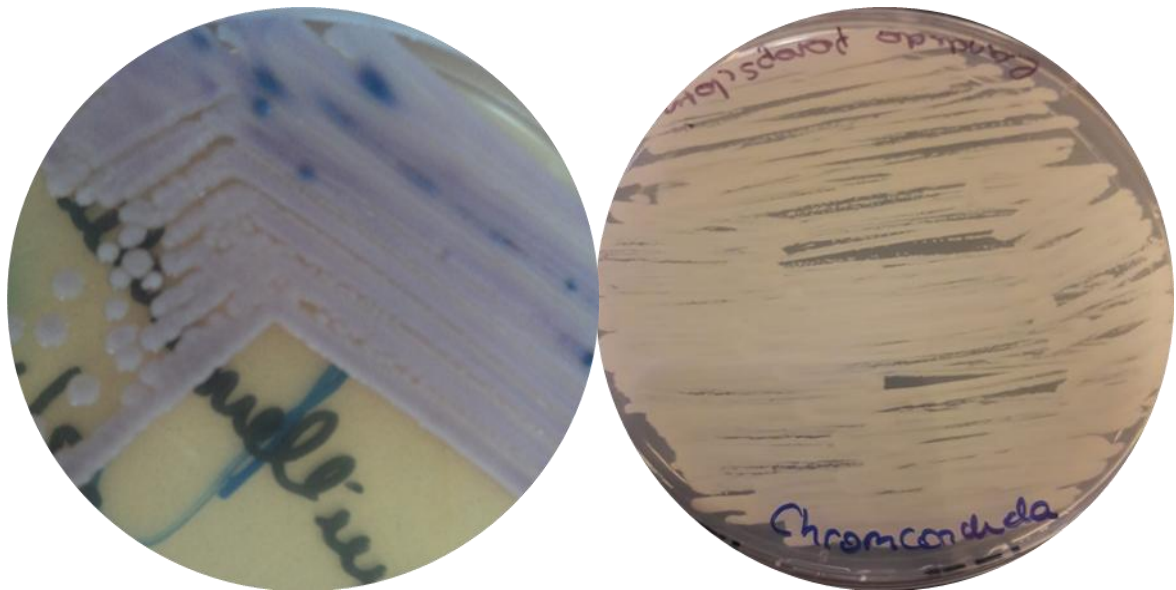


**Figura Nro. 12: Morfología macroscópica de colonias en Agar Sabouraud 4%**



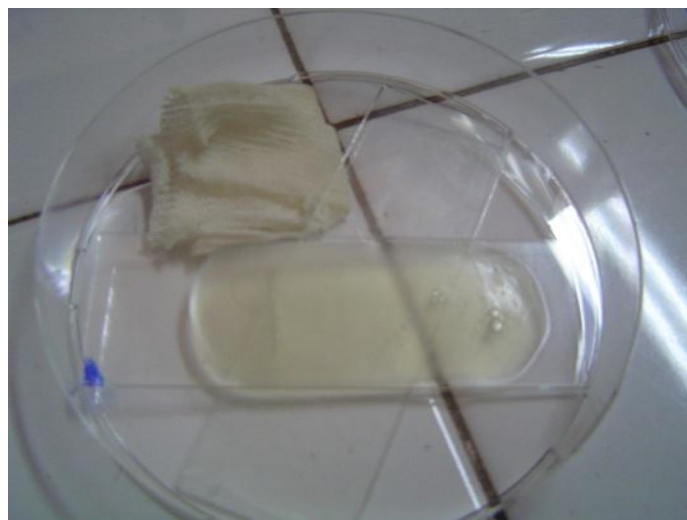
**Figura Nro. 13: Morfología macroscópica de colonias en Agar Hongos y Levaduras**

Las 54 cepas estudiadas originalmente como probables *C. parapsilosis*, en CHROMagar Candida® presentaron color blanquecino liláceo como se presentan en Figura Nro. 14; aunque no significativo para la identificación presuntiva del complejo *C. parapsilosis*.



**Figura Nro. 14: Morfología macroscópica de las colonias en CHROMagar Candida®**

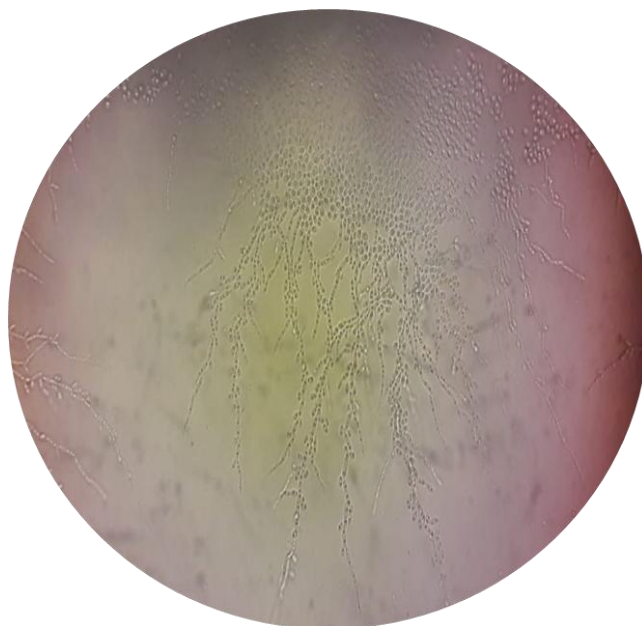
De la observación microscópica de microcultivo en Agar Leche con Tween 80, de la Figura Nro. 15; en 53 cepas se apreciaron levaduras ovales de 4 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y pseudomicelio corto, según la observación microscópica en 400X de la Figura Nro. 16.



**Figura Nro. 15: Láminas de Microcultivo en Agar Leche con Tween 80**

Una cepa reveló micromorfología inconsistente con el complejo *C. parapsilosis*. La microscopía mostró levaduras pequeñas, ovoides y brotantes, de 3 a 5  $\mu\text{m}$ ,

que al principio no formaron pseudomicelio y que tras las 72 h formaron conglomerados de pseudohifas. Tras la identificación genotípica por secuenciación (en el apartado 4.2.), esta cepa resulto ser *C. guilliermondii*, identificada erróneamente debido a que en su momento solo se utilizaron métodos fenotípicos.



**Figura Nro. 16: Micromorfología en Agar Leche con Tween 80, se observan levaduras ovas de 4 -5  $\mu\text{m}$  de diámetro y pseudomicelio corto**

## **4.2. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

### **4.2.1. Obtención ADN genómico. Estandarización de las condiciones para la amplificación. Amplificación y secuenciación de la de la región ITS1-5,8S-ITS2**

#### **4.2.1.1. Extracción de ADN**

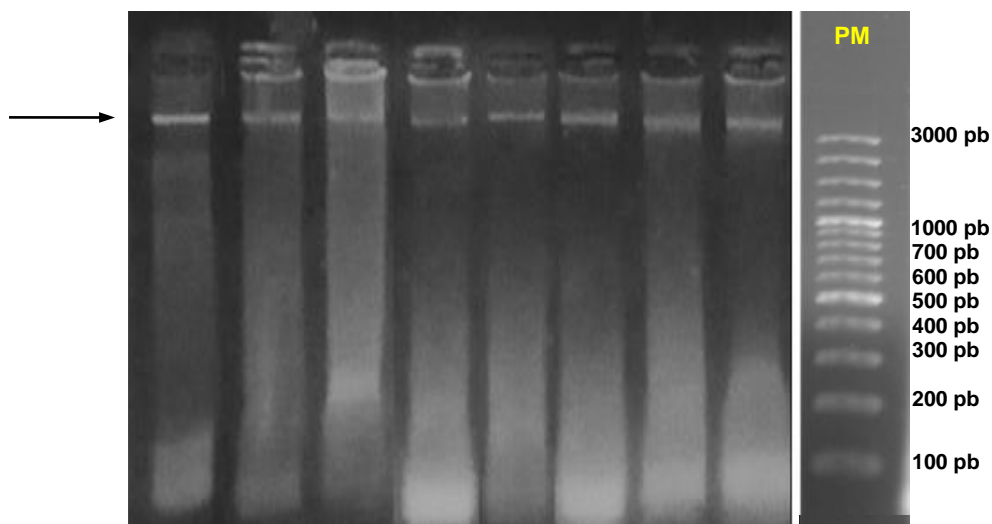
Se logró extraer material genético de las 54 cepas incluidas en este estudio, una cepa de *C. parapsilosis* s.s. ATCC 22019; y dos controles externos - una cepa de *C. metapsilosis* DMic 14837 y otra de *C. orthopsilosis* DMic 134539 - cedidos por el Departamento Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán”; en una cantidad apreciable, lo que se puede ver en los tubos de 1,5 mL de la Figura Nro. 17.



**Figura Nro. 17: Observación macroscópica del material genético extraído de dos cepas del complejo *C. parapsilosis***

Se obtuvo una primera aproximación de la integridad del ADN genómico obtenido, por medio de una corrida electroforética realizada en geles de agarosa al 1%, se observaron bandas nítidas y de buena intensidad para cada una de las muestras (Figura Nro. 18)

Se logro obtener ADN en un rango de concentración de 20 a 50 ng/μL con una pureza entre 1,6 a 1,8; concentración adecuada para ser las amplificaciones por PCR.



**Figura Nro. 18: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de material genético a partir de levadura del complejo *C. parapsilosis*. La flecha indica el ADN extraído.**

#### 4.2.1.2. Estandarización de las condiciones para la amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2

A partir del ADN genómico obtenido de cada cepa ensayada, se logró la amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2 mediante cebadores universales ITS 1 (5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3') e ITS 4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3') (White *et al*, 1990). Para esto se ensayó en primera instancia la concentración de  $Cl_2Mg$ , seguido de la optimización de la  $T_m$  y la concentración del templado.

##### a. Optimización de la concentración de $Cl_2Mg$

Con una concentración de 1,5 mM de  $Cl_2Mg$  no fue posible visualizar bandas en la electroforesis de la PCR (Figura Nro. 19). Sin embargo, empleando 2,5 mM de  $Cl_2Mg$  se detectaron dos bandas (Figura Nro. 20). Una de estas bandas fue de 500 pb aproximadamente que coincide con el peso molecular esperado para la amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2. Mientras que la otra banda inespecífica fue de 850 pb aproximadamente. El peso molecular esperado se cotejó con tres cepas de referencia *C. parapsilosis* s.s. ATCC 22019 ATCC® 22019™, *C. metapsilosis* DMic 14837 y *C. orthopsilosis* DMic 134539.

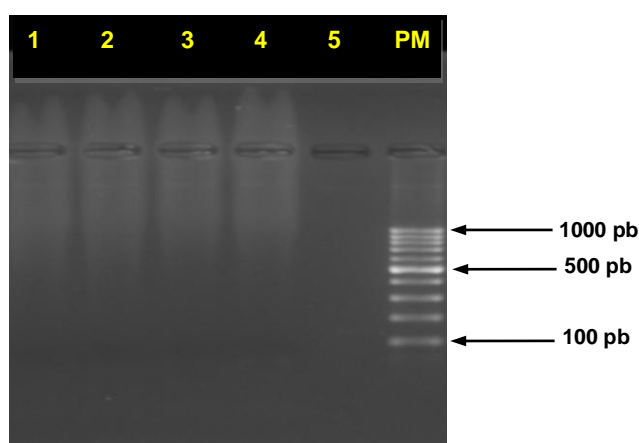


Figura Nro. 19: Amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2 utilizando 1,5 mM de  $Cl_2Mg$  y una  $T_m$  de 50°C a partir de cepas del complejo *C. parapsilosis* (Carril de 1 al 3). Carril 4: *C. parapsilosis* s.s. ATCC 22019. Carril 5: control negativo (no incluyó ADN templado) y PM peso molecular (Marcador de ADN D0017 100 a 1000 pb-INBIO, Argentina). La flechas indican las bandas de aproximadamente 100 pb, de 500 pb y de 1000 pb.

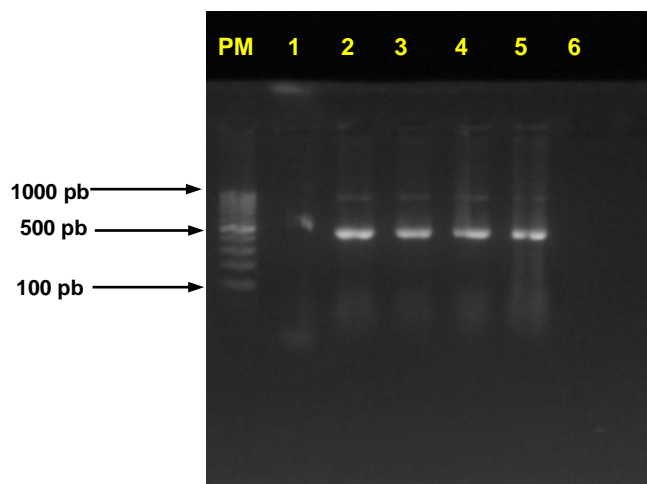


Figura Nro. 20: Amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2 utilizando 2,5 mM de  $Cl_2Mg$  y una  $T_m$  de 50°C a partir de ADN del complejo *C. parapsilosis* (Carril de 1 al 4). Carril 5: *C. parapsilosis* s.s. ATCC 22019. Carril 6: control negativo (no incluyó ADN templado) y PM: peso molecular (Marcador de ADN D0017 100 a 1000 pb–INBIO, Argentina). La flechas indican las bandas de aproximadamente 100 pb, de 500 pb y de 1000 pb.

A fin de obtener una única banda, se continuó con la optimización de la  $T_m$  y la concentración de ADN templado utilizado.

#### b. Optimización de la temperatura de hibridación ( $T_m$ ) y de la concentración de ADN utilizado

En la optimización de la  $T_m$  y de la concentración de ADN, se logró obtener una banda única utilizando una  $T_m$  de 58 °C y una concentración de 10 ng/ $\mu$ L (Figura Nro. 21). Utilizando las  $T_m$  de 50 °C y 55 °C y una concentración de 20 ng/ $\mu$ L de ADN no se logró obtener una banda única, observando otra banda a la altura de 850 pb y de 200 pb. Mientras que utilizando 5ng/ $\mu$ l de ADN no fue posible obtener una banda del tamaño esperado.

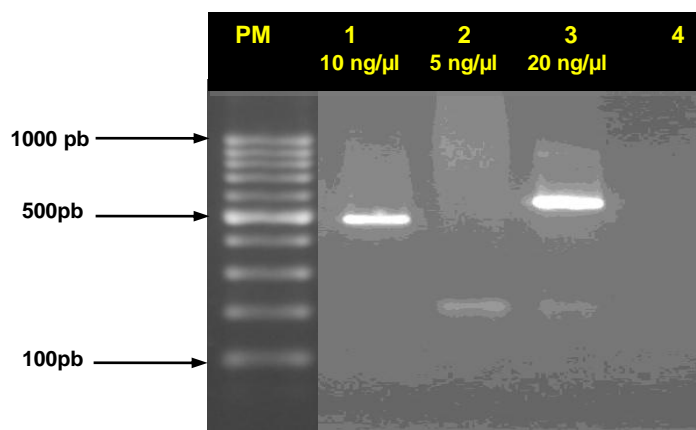
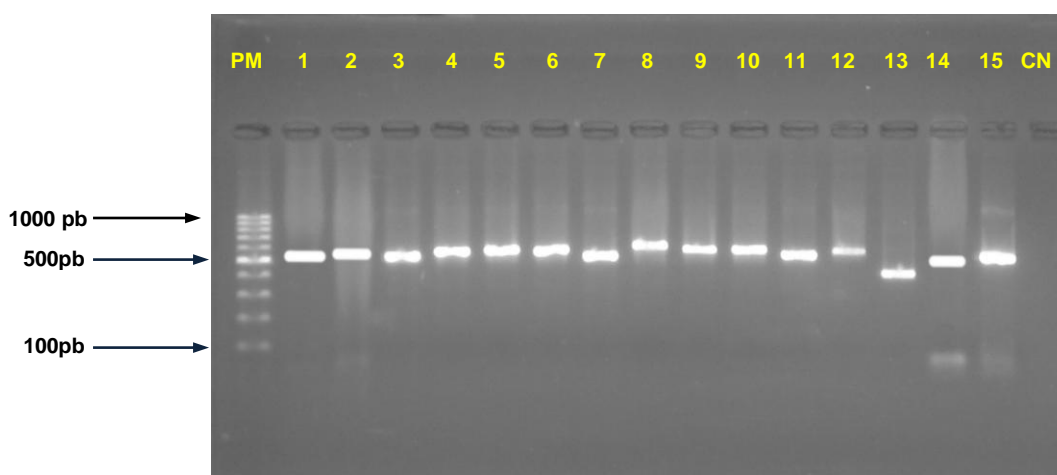


Figura Nro. 21: Electroforesis en gel de agarosa, amplificación de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 a partir de tres concentraciones de ADN de cepa *C. parapsilosis* s.s. ATCC 22019. Carril 1 a 3: Diferentes concentraciones de ADN. Carril 4: control negativo (no incluyó ADN templado). La flechas indican las bandas de aproximadamente 100 pb, de 500 pb y de 1000 pb.



#### 4.2.1.3. Amplificación y secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2 de las cepas fúngicas; con la concentración de $Cl_2Mg$ , la temperatura de hibridación ( $T_m$ ) y la concentración de ADN óptimas comprobadas.

Se trabajó con las condiciones de PCR estandarizadas, para las muestras utilizadas, utilizando 2,5 mM de  $Cl_2Mg$  y una  $T_m$  de 58 °C a partir de ADN (10 ng/ $\mu$ L) de *C. parapsilosis* s.l., fue posible obtener una banda única entre 400 y 600 pb para cada una de las cepas ensayadas, tal como se aprecia en la Figura Nro. 22. En dicha figura, se observan las bandas únicas del carril de 1 al 14; en el carril 15 se muestra la amplificación obtenida para el control positivo *C. parapsilosis* s.s. ATCC 22019. CN correspondió al control negativo y PM al peso molecular (Marcador de ADN D0017 100 a 1000 pb–INBIO, Argentina). La línea 13 que es visiblemente de aproximadamente 400 pb corresponde a la cepa que en la búsqueda de identidad de las secuencias con base de datos públicas, resultó ser *C. guilliermondii*. También se utilizaron los controles de *C. metapsilosis* DMic 14837 y *C. orthopsilosis* DMic 134539, que permitieron comprobar (datos no mostrado en la imagen fotográfica).



**Figura Nro. 22: Corrida electroforética observándose la amplificación de las regiones ITS1-5,8S-ITS2 de las cepas estudiadas. La flechas indican las bandas de aproximadamente 100 pb, de 500 pb y de 1000 pb.**

La secuenciación de los fragmentos obtenidos, permitió la obtención de secuencias de nucleótidos de buena calidad para los 57 amplicones productos de la PCR (Figura Nro. 23 y Figura Nro. 24).

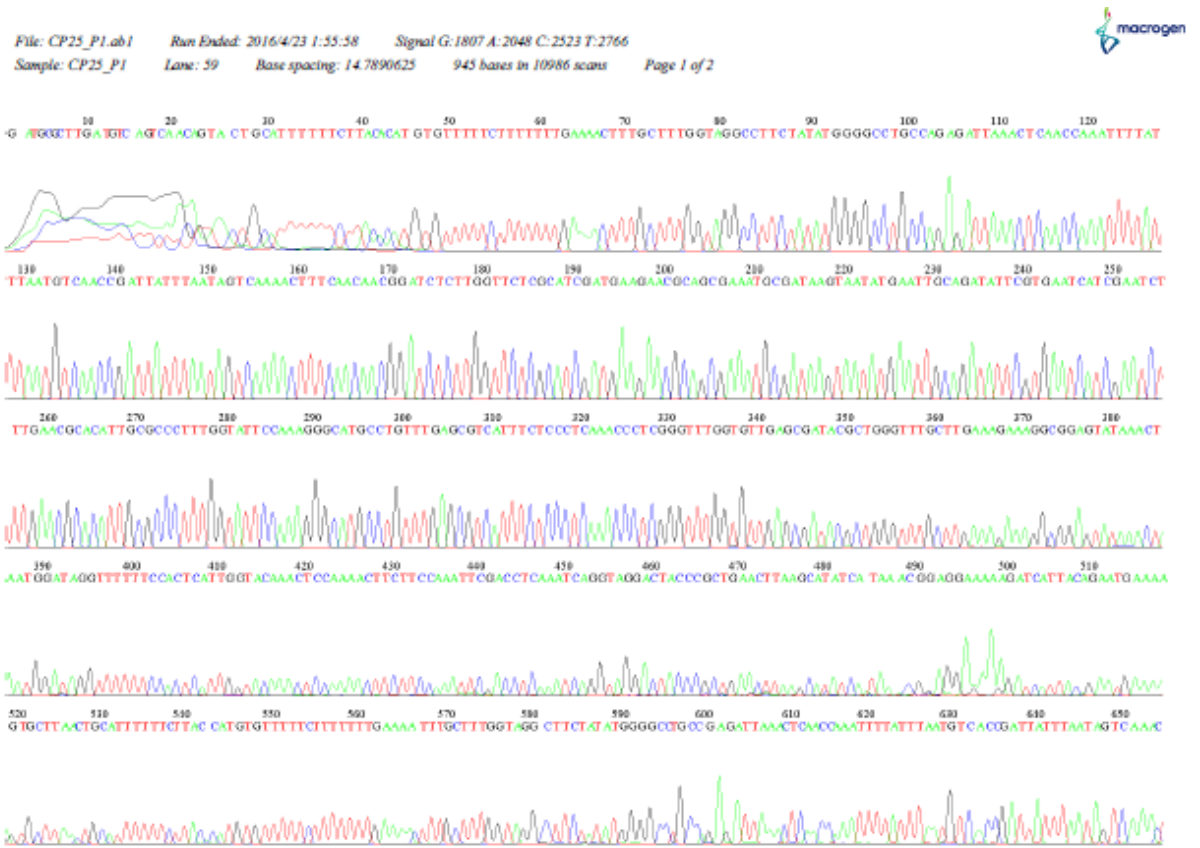


Figura Nro. 1: Datos recibidos de Macrogen en formato pdf. En este caso de la cepa CP25



Figura Nro. 2: cromatograma de la cepa CP25 editado en Bioedit 7.2.6.0

### 4.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

#### - **Busqueda de identidad de las secuencias con base de datos públicas del GenBank (NCBI):**

De las 57 secuencias obtenidas, 53 cepas y la cepa control ATCC 22019 mostraron un porcentaje de identidad superior al 99% y un *E-value* de 0,0 con una cobertura de 98% con secuencias de *C. parapsilosis* s.s.; los controles *C. metapsilosis* DMic 14837 y *C. orthopsilosis* DMic 134539 manifestaron un porcentaje de identidad superior al 99% y un *E-value* de 0,0 con una cobertura de 99% con las secuencias de *C. metapsilosis* y de *C. orthopsilosis* respectivamente. Una secuencia exhibió un porcentaje de identidad superior al 99, 82% y un *E-value* de 0,0 con una cobertura de 98% con secuencias de *C. guilliermondii*, la cual que no se incluyó en el análisis filogenético.

#### - **Análisis filogenético:**

La topología del árbol obtenido en *MEGA 7.0.26* (Figura Nro. 25) permite observar 3 clústers principales correspondientes a *C. parapsilosis* s.s., *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*; con soporte estadístico de *Bootstrap* iguales o mayores al 62%.

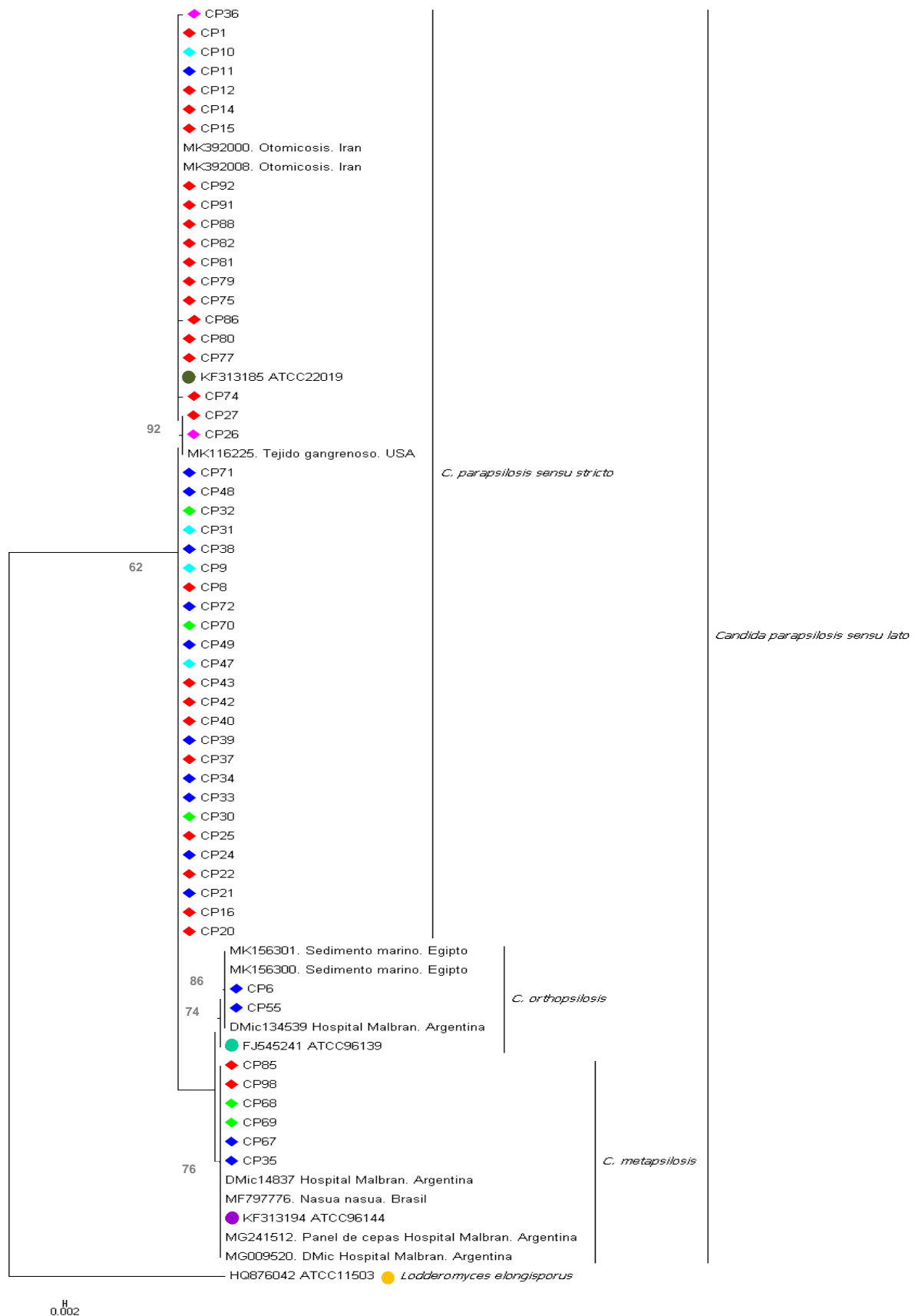
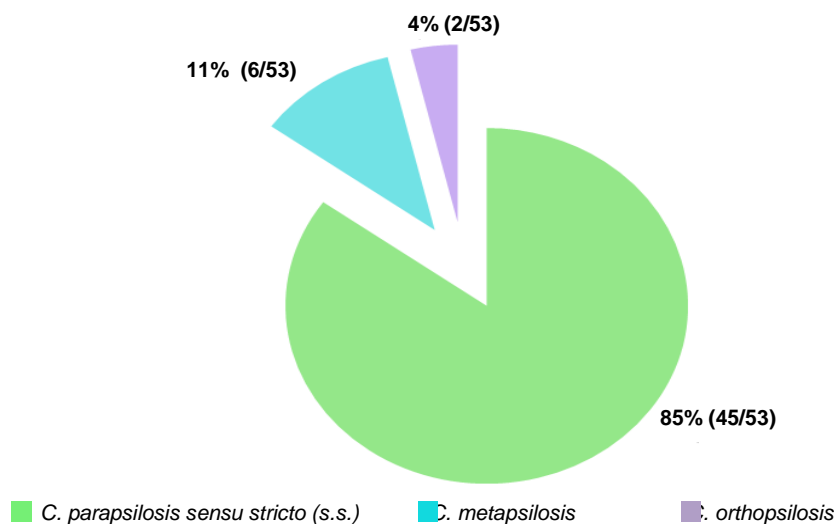


Figura Nro. 3: Árbol filogenético para las regiones nucleotídicas ITS1 – 5,8S – ITS2 (450 pb) de las cepas en estudio obtenido mediante la herramienta *PhyML 3.0* (Guindon *et. al.*, 2010) de *ATCG Montpellier Bioinformatics Platform*, con el método de reconstrucción *Maximum Likelihood* (Nei y Kumar, 2000) con 1000 *bootstrap* de repetición y GTR como modelo de sustitución de nucleótidos; editado con el programa *MEGA7.0.26* (Kumar *et. al.*, 2016). Cepas de referencia: ● *C. parapsilosis s.s.* ATCC22019; ● *C. orthopsilosis* ATCC96139; ● *C. metapsilosis* ATCC96144; ● *Lodderomyces elongisporus* ATCC11503. Muestras clínicas: ◆ Hemocultivo; ◆ Piel; ◆ Uña de mano; ◆ Uña de pie; ◆ Urocultivo.

En la Figura Nro. 26, se aprecia la frecuencia de las distintas especies que integran el complejo *C. parapsilosis*, se destaca el predominio *C. parapsilosis* sensu stricto (grupo I), seguida por *C. metapsilosis* (grupo III) y en tercer lugar de frecuencia *C. orthopsilosis* (grupo II).



**Figura Nro. 4: Frecuencia de las distintas especies del complejo *C. parapsilosis* (n=53)**

En el análisis de las frecuencias de especies, no se incluyó la cepa CP3, que estaba erróneamente catalogada por identificación fenotípica presuntiva, como integrante del complejo *C. parapsilosis* y por identificación molecular resultó ser *C. guilliermondii*. Tampoco están incluidas las tres cepas testigos: *C. parapsilosis s.l.* ATCC 22019, *C. metapsilosis* DMic 14837 y *C. orthopsilosis* DMic 134539.

Las muestras biológicas de las cuales se aislaron las cepas del complejo *C. parapsilosis*, se presentan en la Figura Nro. 27.

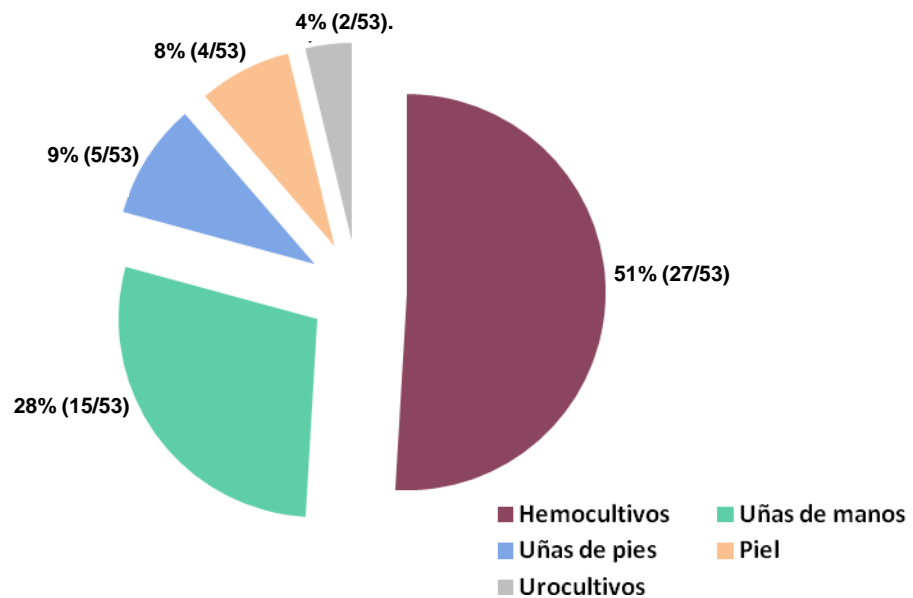


Figura Nro. 27: Frecuencia del origen de las cepas del complejo *C. parapsilosis* (n=53)

Sobre el total de aislamientos de levaduras del complejo *C. parapsilosis* procedentes de hemocultivos, los datos de frecuencia de aislamientos de *C. parapsilosis* s.s. son exhibidos en la Figura Nro. 28.

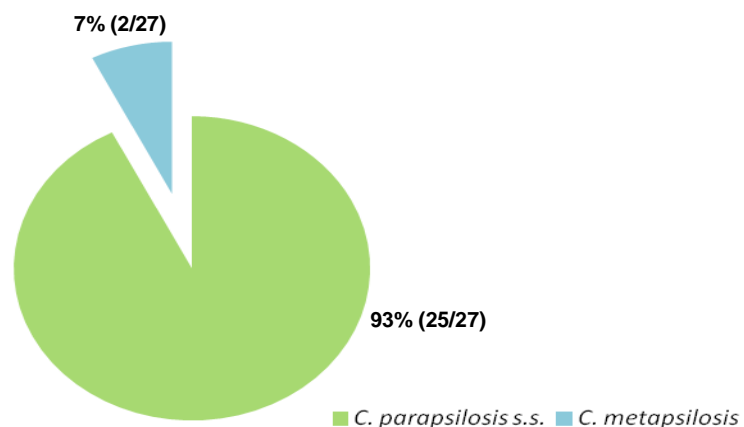


Figura Nro. 5: Frecuencia de las distintas especies del complejo *C. parapsilosis*, procedentes de hemocultivos (n=27)

En tanto que, sobre el total de aislamientos de levaduras del complejo *C. parapsilosis* procedentes de uña de manos, la frecuencia de aislamientos se presentan en la Figura Nro. 29.

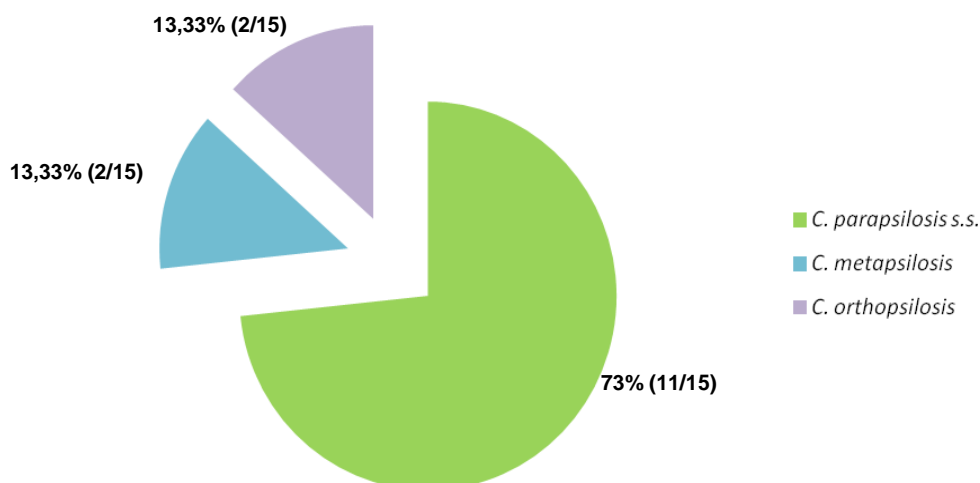


Figura Nro. 6: Frecuencia de las distintas especies del complejo *C. parapsilosis*, procedentes de uñas de manos (n=15)

Mientras que sobre el total de aislamientos de levaduras del complejo *C. parapsilosis* procedentes de otros sitios anatómicos, la frecuencia de aislamientos se despliegan en la Figura Nro. 30.

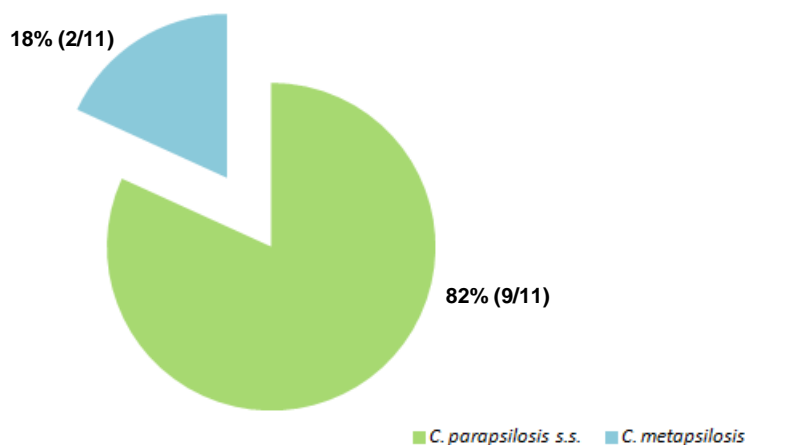


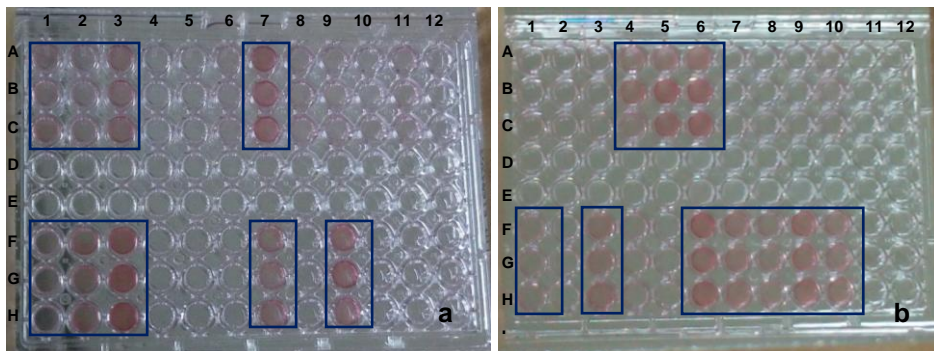
Figura Nro. 7: Frecuencia de las distintas especies del complejo *C. parapsilosis*, procedentes de otros sitios anatómicos (n=11)

#### 4.4. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS *in vitro*

Se evaluó la capacidad de producción de biopelículas *in vitro* de las 53 cepas del complejo *C. parapsilosis*, la cepa *C. guilliermondii* (CP3), la cepa complejo *C. parapsilosis*

ATCC 22019 (CP2), la cepa de *C. metapsilosis* DMic 14837 (CP59) y la cepa de *C. orthopsilosis* DMic 134539 (CP63).

Tras la formación de *in vitro* de biopelículas y posterior aplicación del colorante, se puede observar ausencia de biopelículas (pocillos incoloros) o presencia de las mismas en diferentes tonalidades de rosa (desde rosa pálido hasta intenso), que se muestran en las placas de microtitulación de la Figura Nro. 31a y 31b.



**Figura Nro. 8: Visualización de la formación biopelículas *in vitro*. Los rectángulos violetas enmarcan la formación de biopelículas.**

Los datos de los materiales de origen de los aislamientos, de los resultados de la identificación fenotípica y molecular; de los valores de absorbancia; transmitancia; porcentaje de bloqueo y su interpretación, se observan en la Tabla Nro. 5.



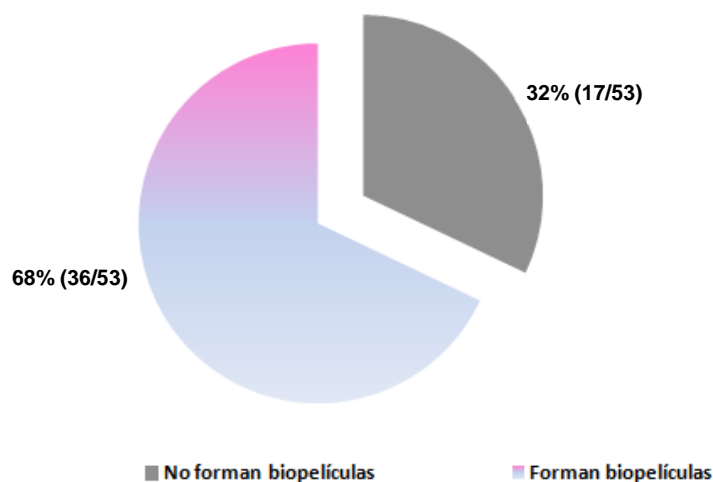
Tabla Nro. 5: Datos del origen de las cepas, de identificación fenotípica y molecular; de valores de absorbancia; transmitancia y porcentaje de bloqueo.

CANTIDAD	CÓDIGO. CEPA	PROCEDENCIA	IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	ABSORBANCIA	TRANSMITANCIA	% DE BLOQUEO	RESULTADO
1.	CP1	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,272	0,53456436	46,5435640	+++
2.	CP2	<b>ATCC 22019</b>	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,024	0,94623716	5,376283863	negativo
3.	CP3	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. guilliermondii</i>	0,014	0,96827786	3,172214374	negativo
4.	CP8	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,0235	0,94732718	5,26728155	negativo
5.	CP9	Piel	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,024	0,94623716	5,376283863	negativo
6.	CP6	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	0,376	0,42072663	57,92733716	+++
7.	CP10	Piel	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,165	0,68391165	31,60883527	++
8.	CP11	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,687	0,20558906	79,44109404	+++
9.	CP12	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,01	0,97723722	2,276277904	negativo
10.	CP14	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,009	0,97948999	2,051001459	negativo
11.	CP15	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,451	0,35399734	64,60026589	+++
12.	Cp16	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,402	0,39627803	60,37219657	+++
13.	CP20	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,017	0,96161228	3,838772162	negativo
14.	CP21	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,036	0,92044957	7,955042825	+
15.	CP22	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,076	0,83945999	16,05400135	+
16.	CP24	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,193	0,64120958	35,87904234	++
17.	CP25	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,28	0,52480746	47,51925398	++
18.	CP26	Urocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,436	0,36643757	63,35624254	+++
19.	CP27	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,535	0,2917427	70,82572986	+++
20.	CP30	Uña pie	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,061	0,86896043	13,10395707	+
21.	CP31	Piel	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,053	0,88511561	11,48843902	+
22.	CP32	Uña pie	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,023	0,94841846	5,15815367	negativo
23.	CP33	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,046	0,89949758	10,05024185	+
24.	CP34	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,14	0,72443596	27,55640399	++
25.	CP35	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. metapsilosis</i>	0,022	0,95060479	4,939520634	negativo
26.	CP36	Urocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,283	0,52119471	47,88052889	++
27.	CP37	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,03	0,9332543	6,67456992	negativo

28.	CP38	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,02	0,95499259	4,500741398	negativo
29.	CP39	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,465	0,34276779	65,72322135	+++
30.	CP40	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,514	0,30619634	69,38036566	+++
31.	CP42	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,3635	0,43301207	56,69879323	+++
32.	CP43	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,389	0,40831939	59,16806137	+++
33.	CP47	Piel	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,385	0,41209752	58,79024809	+++
34.	CP48	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,63	0,23442288	76,55771185	+++
35.	CP49	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,177	0,66527316	33,47268438	++
36.	CP55	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	0,065	0,86099375	13,90062478	+
37.	CP59	<b>DMic 14837</b>	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. metapsilosis</i>	0,101	0,79250133	20,74986695	+
38.	CP63	<b>DMic 134539</b>	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	0,023	0,94841846	5,15815367	negativo
39.	CP67	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. metapsilosis</i>	0,234	0,5834451	41,65548957	++
40.	CP68	Uña pie	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. metapsilosis</i>	0,007	0,98401111	1,598889424	negativo
41.	CP69	Uña pie	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. metapsilosis</i>	0,291	0,51168184	48,83181645	++
42.	CP70	Uña pie	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,008	0,98174794	1,825205698	negativo
43.	CP71	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,006	0,98627949	1,372051437	negativo
44.	CP72	Uña mano	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,15	0,70794578	29,20542156	++
45.	CP74	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,292	0,510505	48,9495	++
46.	CP75	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,148	0,71121351	28,87864863	++
47.	CP77	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,922	0,11967405	88,03259469	+++
48.	CP79	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,792	0,16143586	83,85641443	+++
49.	CP80	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,073	0,84527885	15,47211548	+
50.	CP81	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,27	0,5370318	46,29682036	++
51.	CP82	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,547	0,2837919	71,62080972	+++
52.	CP85	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. metapsilosis</i>	0,009	0,97948999	2,051001459	negativo
53.	CP86	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,022	0,95060479	4,939520634	negativo
54.	CP88	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,368	0,42854852	57,14514796	+++
55.	CP91	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,017	0,96161228	3,838772162	negativo
56.	CP92	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. parapsilosis s.s.</i>	0,023	0,94841846	5,15815367	negativo
57.	CP98	Hemocultivo	<i>C. parapsilosis s.l.</i>	<i>C. metapsilosis</i>	0,013	0,97050997	2,949003275	negativo

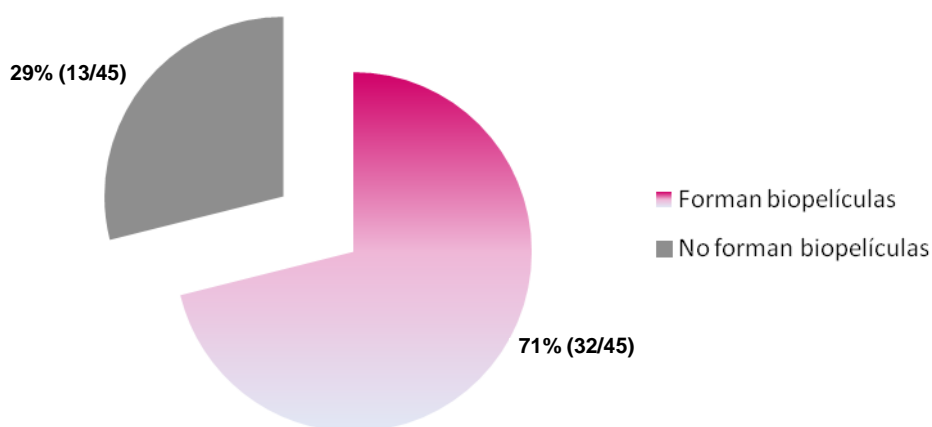
Interpretación: Si el % de Bloqueo es < a 5 se considera negativo; si el % de Bloqueo es de 5 a 20, +cruz; si el % de Bloqueo es de 20 a 50, ++ cruces y si el % de Bloqueo es > a 50, +++cruces. Las levaduras del complejo *C. parapsilosis* se consignan como *C. parapsilosis s.l.*

Con el método utilizado, se obtuvo un desarrollo de biopelículas de levaduras del complejo *C. parapsilosis*, en un 68%, Figura Nro. 32.



**Figura Nro. 9: Capacidad de formación de biopelícula *in vitro* de las especies del complejo *C parapsilosis* (n=53)**

Un total de 32 de las 45 cepas de *C. parapsilosis* s.s. mostraron capacidad de formación de biopelículas *in vitro*, lo que representa un 71%, como se puede observar en la Figura Nro. 33.



**Figura Nro. 10: Capacidad de formación de biopelícula *in vitro* de *C parapsilosis* s.s. (n=45)**

*C. metapsilosis* formó biopelículas en un 33% (2/6) y *C. orthopsilosis* en un 100% (2/2).

En cuanto a la procedencia de la muestra y la capacidad de formación de biopelículas de *C. parapsilosis* s.s., se observó que las cepas procedentes de hemocultivos,

17 de 25 (68%) fueron productoras de biopelículas. Capacidad que, en el caso de uñas de mano, representó el 81% (9/11) y en aislados de otros sitios anatómicos constituyó un 67% (6/9). Al hacer el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.5$ ) en cuanto a formación de biopelículas entre aislamientos de *C. parapsilosis* s.s., procedentes de hemocultivos y de otras muestras biológicas.

Los porcentajes de bloqueo *C. parapsilosis* s.s. se visualizan en la Figura Nro. 34.

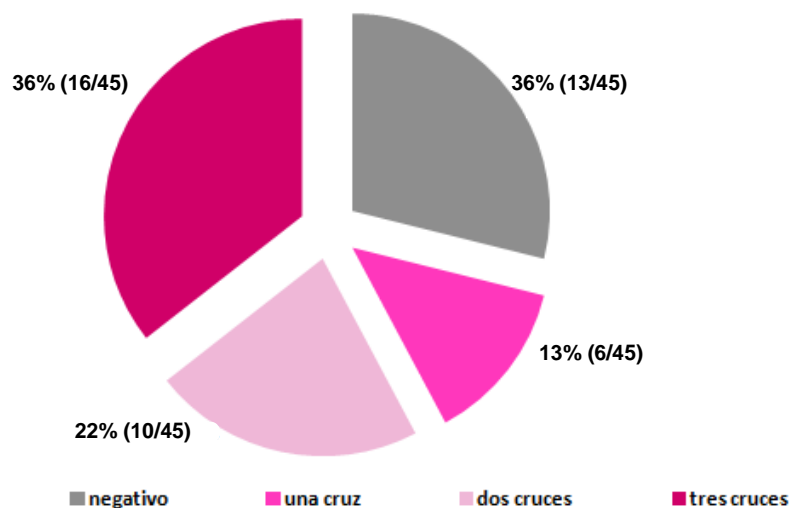


Figura Nro. 11: Cuantificación de las biopelículas *in vitro*, de *C. parapsilosis* s.s. (n=45)

Las 2 cepas de *C. metapsilosis* que formaron biopelículas cuantificaron un porcentaje de 20 a 50 (++)). En el caso de *C. orthopsilosis*, en todas las cepas, se midió un porcentaje de bloqueo de de 5 a 20 (+) y de 20 a 50 (+++).

La segregación de los datos de la cuantificación de las biopelículas *in vitro*, según los sitios anatómicos se detallan en la Tabla Nro. 6.

Tabla Nro. 6: Cuantificación de las biopelículas de *C. parapsilosis* s.s, según productos biológicos

Biopelículas de <i>C. parapsilosis</i> s.s.	Hemocultivos n=25	Uñas manos n=11	Otros productos Biológicos n=9	Total
Negativo	8	2	3	13
+	2	2	2	6
++	4	4	2	10
+++	11	3	2	16

Referencia. Otros productos biológicos: piel, n=4; uña pie, n=3; Urocultivo n=2.

En el caso de *C. metapsilosis*, las cepas aisladas de hemocultivos no tuvieron capacidad de formar biopelículas. En tanto que las cepas obtenidas de uñas de mano, una formó biopelículas, en tanto que la otra no. La discriminación de los datos de la cuantificación de las biopelículas *in vitro*, teniendo en cuenta los sitios anatómicos se detallan en la Tabla Nro. 7.

**Tabla Nro. 7: Cuantificación de las biopelículas de *C. metapsilosis*, según productos biológicos**

Biopelículas de <i>C. metapsilosis</i>	Hemocultivos n=2	Uñas manos n=2	Otros productos Biológicos n=2	Total
Negativo	2	1	1	4
+	-	-	-	-
++	-	1	1	2
+++	-	-	-	-

Referencia. Otros productos biológicos: uña pie, n=2.

El origen de las dos cepas de *C. orthopsilosis*, fue uña de manos y ambos aislados formaron biopelículas *in vitro* con distinto grado de capacidad de hacerlo, una cepa la formó con intensidad de una cruz (+) y otra en una intensidad de tres cruces (+++).

En la Tabla Nro. 8, se puede apreciar la comparación de la capacidad de formación de biopelículas entre las especies que integran del complejo *C. parapsilosis* y el origen de los aislados ya sean de hemocultivos, de uñas de manos o de otras localizaciones.

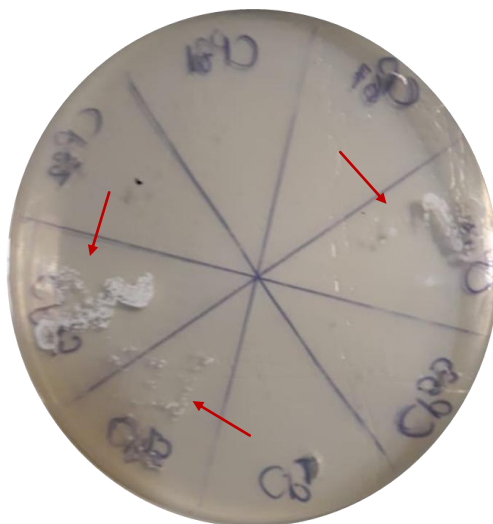
**Tabla Nro. 8: Comparación entre la formación de biopelículas entre aislamientos complejo *C. parapsilosis*, de hemocultivos, uñas de manos y otras localizaciones**

Nro. de especies del complejo <i>C. parapsilosis</i>	Nro. Cepas formadoras de Biopelículas/ total de las especies del complejo (%)			
	Hemocultivos n=27	Uñas manos n=15	Otros productos Biológicos n=11	Total
<i>C. parapsilosis s.s</i>	68% (17/25)	81% (9/11)	67% (6/9)	71% (32/45)
<i>C. metapsilosis</i>	0/2	50% (1/2)	50% (1/2)	33% (2/6)
<i>C. orthopsilosis</i>	0/0	100% (2/2)	0/0	100% (2/2)
<b>Complejo <i>C. parapsilosis</i> Total</b>	<b>63% (17/27)</b>	<b>80% (12/15)</b>	<b>64% (7/11)</b>	<b>68% (36/53)</b>

Referencia. Otros productos biológicos: piel, n=4; uña pie, n=5; Urocultivo n=2.

#### 4.5. BIOACTIVIDAD *in vitro* DE LA SSS, SOBRE LAS FORMAS PLANCTÓNICAS DEL COMPLEJO *C. parapsilosis*.

De las 53 cepas del complejo *C. parapsilosis* en su forma planctónica, se observó desarrollo residual después de 30 min de contacto con SSS, en las cepas CP25, CP26, CP27, CP67 y CP79, algunos de ellos indicados en la Figura Nro. 35. No se detectó crecimiento de las 48 cepas restantes del complejo *C. parapsilosis*. Tampoco se detectó desarrollo en las cepas testigo ATCC 22019, DMic 14837 y DMic 134539, tras el contacto por 30 minutos con la solución de ensayo.



**Figura Nro. 12: Crecimiento de las levaduras tras un contacto de 30 min con SSS. Agar glucosa Sabouraud 20. Las flechas rojas señalan el crecimiento.**

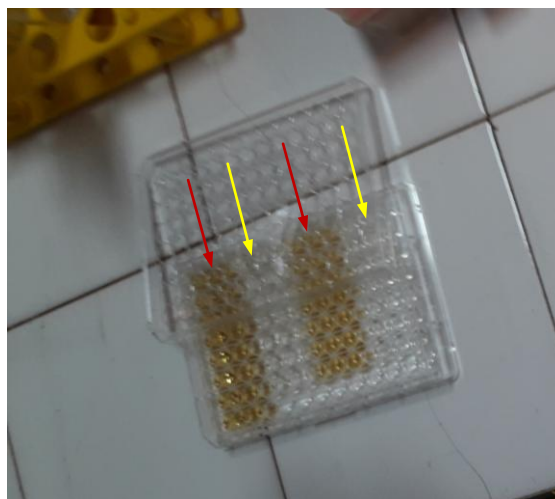
Sin embargo, tras la observación de los repiques en agar glucosa Sabouraud 20, tras el contacto con la SSS a las 12 h y 24 h, no hubo desarrollo de ninguna de las cepas del complejo *C. parapsilosis*. En la Figura Nro. 36, se demuestra el resultado de algunas de las cepas ensayadas, tras 12 h de contacto con la SSS.



**Figura Nro. 13: Ausencia de desarrollo de cepas del complejo *C. parapsilosis* tras un contacto de 12 h con SSS. Agar glucosa de Sabouraud 20.**

#### **4.6. BIOACTIVIDAD *in vitro* DE LA SSS, SOBRE LAS FORMAS SÉSILES DEL COMPLEJO *Candida parapsilosis***

Los ensayos de bioactividad *in vitro* de la SSS, sobre las formas sésiles del complejo *Candida parapsilosis*, se realizaron en las cepas que tuvieron la capacidad de formar biopelículas siguiendo el protocolo del apartado 3.3.3 y 3.3.5 (Figura Nro 37). Los resultados se observan en la Tabla Nro 9.



**Figura Nro. 14: Ensayo de bioactividad *in vitro* de la SSS sobre las formas sésiles del complejo. Las flechas rojas indican pocillos con SSS y las amarillas sin SSS**

**Tabla Nro. 2: Resultados de la bioactividad *in vitro* de la SSS frente a las especies del complejo *C. parapsilosis* con capacidad de formar biopelículas.**

Cantidad	CODIGO.	IDENTIFICACION	ABSORBANCIA	TRANSMITANCIA	% DE BLOQUEO	RESULTADO
	CEPA	MOLECULAR	CON SSS	CON SSS	CON SSS	
1.	CP1	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,011	0,97498964	2,50103622	negativo
2.	CP6	<i>C. orthopsilosis</i>	0,022	0,95060479	4,939520634	negativo
3.	CP10	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,013	0,97050997	2,949003275	negativo
4.	CP11	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,01	0,97723722	2,276277904	negativo
5.	CP15	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,017	0,96161228	3,838772162	negativo
6.	CP16	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,005	0,98855309	1,144690534	negativo
7.	CP21	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,015	0,96605088	3,394912101	negativo
8.	CP22	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,021	0,95279616	4,720383598	negativo
9.	CP24	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,013	0,97050997	2,949003275	negativo
10.	CP25	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,01	0,97723722	2,276277904	negativo
11.	CP26	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,012	0,97274722	2,725277622	negativo
12.	CP27	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,016	0,96382902	3,617097638	negativo
13.	CP30	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,019	0,95719407	4,280592871	negativo
14.	CP31	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,008	0,98174794	1,825205698	negativo
15.	CP33	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,017	0,96161228	3,838772162	negativo
16.	CP34	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,008	0,98174794	1,825205698	negativo
17.	CP36	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,011	0,97498964	2,501036228	negativo
18.	CP39	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,017	0,96161228	3,838772162	negativo
19.	CP40	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,019	0,95719407	4,280592871	negativo
20.	CP42	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,011	0,97498964	2,501036228	negativo
21.	CP43	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,008	0,98174794	1,825205698	negativo
22.	CP47	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,008	0,98174794	1,825205698	negativo
23.	CP48	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,017	0,96161228	3,838772162	negativo
24.	CP49	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,011	0,97498964	2,501036228	negativo
25.	CP55	<i>C. orthopsilosis</i>	0,013	0,97050997	2,949003275	negativo
26.	CP67	<i>C. metapsilosis</i>	0,018	0,95940063	4,059936848	negativo
27.	CP69	<i>C. metapsilosis</i>	0,011	0,97498964	2,501036228	negativo
28.	CP72	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,008	0,98174794	1,825205698	negativo
29.	CP74	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,016	0,96382902	3,617097638	negativo
30.	CP75	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,016	0,96382902	3,617097638	negativo
31.	CP77	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,015	0,96605088	3,394912101	negativo
32.	CP79	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,011	0,97498964	2,501036228	negativo
33.	CP80	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,018	0,95940063	4,059936848	negativo
34.	CP81	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,012	0,97274722	2,725277622	negativo
35.	CP82	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,008	0,98174794	1,825205698	negativo
36.	CP88	<i>C. parapsilosis</i> s.s.	0,018	0,95940063	4,059936848	negativo

Dado que la cepa de *C. metapsilosis* DMic 14837 (CP59), cepa testigo- también fue productora de biopelículas, también se la enfrentó *in vitro*, a la SSS dando un % de bloqueo de 2,949003275, que arroja una interpretación del resultado negativo.



## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

Cada vez más, las infecciones fúngicas son pensadas como un acontecimiento creciente y de preocupación al nivel mundial. El aumento de la incidencia y la gravedad de las micosis están relacionados con pacientes debilitados inmunológicamente, con enfermedades de base y/o con circunstancias que hacen posible que el hongo encuentre la oportunidad para causar infección. En este complicado escenario el complejo *Candida parapsilosis* ha emergido como agente importante de fungemia y se ha posicionado como la segunda levadura oportunista más frecuentemente aislada de infecciones del torrente sanguíneo en diferentes contextos clínicos en todo el mundo, especialmente en América Latina y Asia (Silva *et al.*, 2012).

Este complejo se asocia a un amplio espectro de expresiones clínicas, la fungemia es la más significativa por su frecuencia de aparición y morbilidad asociada. Actualmente, la incidencia de *C. parapsilosis sensu lato* ha aumentado considerablemente, y es la segunda especie de *Candida* más frecuente, alcanza el 20,5% de los casos en América Latina (Abi-chacra *et al.*, 2013).

En Argentina es el primer agente etiológico de candidemia en unidades de cuidados intensivos pediátricos y neonatales, con una prevalencia hasta 10 veces mayor que en adultos (Cattana, 2016). *C. parapsilosis s.l.* es responsable de 20 a 30% de todas las infecciones por hongos, particularmente aquellas relacionadas con el uso de catéter y otros dispositivos médicos (Rodero *et al.*, 2005; Garcia-Effron *et al.*, 2012; Riera *et al.*, 2014; Ziccardi *et al.*, 2015; Tiraboschi *et al.*, 2017).

Estos datos a los que se suman la casuística del grupo de trabajo de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM) que integro, han sido el motor del interés por el complejo *C. parapsilosis*. En este sentido, en este trabajo se indagó en dos

ámbitos diferentes que manejan conceptos y herramientas distintas: el micológico y el molecular.

Desde el punto de vista micológico, y con respecto al dimorfismo o cambio fenotípico del complejo *C. parapsilosis* en medio de agar leche – Tween 80, las cepas estudiadas presentaron levaduras ovoides y pseudomicelio son concordantes con las características de estas levaduras (Gago *et al.*, 2014b; Cattana, 2016).

Otro de los métodos micológicos empleados para identificación rápida en este trabajo fue el CHROMagarCandida utilizado en este trabajo, técnica sencilla y relativamente económica de uso en el laboratorio de diagnóstico micológico (Sayyada *et al.*, 2010).

Las cepas del complejo *C. parapsilosis* analizadas no pudieron ser identificadas presuntivamente con este medio cromogénico, ya que las colonias manifestaron coloraciones blanquecinas liláceas. Estas variaciones que van desde el marfil al rosa-lavanda es debido a la mezcla de la coloración natural de la colonia y al pigmento resultante de su actividad enzimática, en coincidencia con lo observado previamente por diferentes autores (Ruiz-Aragón *et al.*, 2003; López *et al.*, 2005; Singaravelu *et al.*, 2014, Camacho-Cardoso *et al.*, 2017).

Dentro de las infecciones fúngicas, la candidemia continúa siendo la más frecuente y la incidencia de complejo *C. parapsilosis* ha crecido progresivamente en los últimos años con un rol etiológico confirmado como agente de micosis. Los datos de las cepas analizadas en este estudio son similares a la epidemiología de otros trabajos sobre estas levaduras (Quindós, 2014; Villalobos *et al.*, 2016).

En este trabajo, el mayor número de los aislamientos de levaduras del complejo *C. parapsilosis* procedieron de hemocultivos en un 51% de los casos, seguidos por uñas de manos en un 28%, datos que coinciden con los de otros autores que refieren un alto aislamiento de este complejo de hemocultivos (Treviño-Rangel *et al.*, 2012a; Martí Carrizosa 2015; García-Salazar *et al.*, 2017) y en manos humanas (Bonassoli *et al.*, 2005; Chinduma *et al.*, 2017).

Con la elucidación de las tres especies dentro del complejo *C. parapsilosis*, por medio de la identificación genotípica surgen interrogantes sobre la frecuencia de las especies del complejo de las cepas estudiadas y por otro lado, la herramienta de biología molecular factible de utilizar, con el cual se pueda diferenciar las especies del complejo (de Llanos Frutos, *et al.*, 2004; Rodríguez Tudela *et al.*, 2008). Las técnicas moleculares, sobre todo aquellas basadas en amplificación por PCR y comparación de secuencias, se han incorporado a la caja de herramientas con que se abordan el conocimiento de la biodiversidad, la evolución y la filogenia (Ratón, 2004; Leaw *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010; Borghi *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2012; Németh *et al.*, 2013; Gago *et al.*, 2014a; Guevara Granja 2016; Sadeghi *et al.*, 2018). De todas maneras, es importante remarcar que la identificación de un organismo debe apoyarse en un conjunto de diferentes criterios, tanto morfológicos como moleculares (Gherbawy *et al.*, 2010).

El número de especies fúngicas potencialmente patógenas ha sufrido un marcado incremento, muchas de ellas son especies crípticas que forman parte de complejos de especies que han sustituido a lo que antes eran consideradas como simples morfoespecies (Guarro, 2012). El complejo *C. parapsilosis* es un ejemplo de ello, su conformación por *C. parapsilosis* s.s. (grupo I) que junto con las especies crípticas *C. orthopsilosis* (grupo II) y *C. metapsilosis* (grupo III) comprenden este grupo de estrecha filogenia, mostraron una alta especificidad con los cebadores seleccionados. Las cepas fúngicas seleccionadas fueron identificadas satisfactoriamente con la PCR, lo que fue corroborado por tres cepas de referencia *C. parapsilosis* s.s. ATCC 22019 ATCC<sup>®</sup> 22019<sup>™</sup>, *C. metapsilosis* DMic 14837 y *C. orthopsilosis* DMic 134539 utilizadas cuya identificación realizada en este trabajo fue coincidente con su catalogación de origen (grupo I). Diferenciar estas especies tiene interés desde el punto de vista clínico- epidemiológico dado que se ha comprobado que *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* tienen un comportamiento similar, mientras que *C. metapsilosis* posee un potencial de virulencia menor (Corrales *et al.*, 2015).

De las 54 cepas estudiadas, una cepa originalmente identificada fenotípicamente de forma incorrecta y en la re-identificación molecular definitiva resultó ser *C. guilliermondii*.

Este tipo de situaciones; desafortunadamente, no son infrecuentes (Arastehfar *et al.*, 2019). Las técnicas moleculares son herramientas de alto potencial para la identificación y clasificación taxonómica de microorganismos. Tienen la ventaja de ser específicas, sensibles y eficientes, permiten diferenciar especies muy relacionadas entre si desde el punto de vista taxonómico (Ratón, 2004; Mendoza, 2005). De todas maneras, la identificación de levaduras indudablemente combina pruebas fenotípicas y moleculares (Pincus *et al.*, 2007; Arastehfar *et al.*, 2019).

En este estudio se confirmó que la frecuencia de *C. parapsilosis* s.s. fue de un 85%; mientras que *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* se detectaron con una incidencia mucho menor, 11% y 4%, datos similares a los informados del aislamiento y la identificación a partir de muestras clínicas en Europa, América del Norte, Asia y Brasil (Borman *et al.*, 2009; Carolis *et al.*, 2014; Gago *et al.*, 2014b).

En varios trabajos se confirmó que entre el 70,7% y el 98,3% de las especies del complejo eran *C. parapsilosis* s.s.; intervalo que contiene a la frecuencia determinada en esta tesis (Tavanti *et al.*, 2005; Pryce *et al.*, 2006; Tavanti *et al.*, 2007; Gomez-Lopez *et al.*, 2008; Lockhart *et al.*, 2008; Hensgens *et al.*, 2009; Tay *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009a; Asadzadeh *et al.*, 2009; Mirhendi *et al.*, 2010; Hays *et al.*, 2011; Del Pilar Vercher *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2012 Trabasso *et al.*, 2015; Asadzadeh *et al.*, 2015).

A diferencia de los datos obtenidos, *C. orthopsilosis* parece recuperarse con más frecuencia que *C. metapsilosis* (Lockhart *et al.*, 2008; Borman *et al.*, 2009; Tay *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2012; Prandini *et al.*, 2013; Carolis *et al.* 201; Feng *et al.*, 2012; Gago *et al.*, 2014b; Asadzadeh *et al.*, 2015; Barbedo *et al.*, 2017).

Con respecto al análisis filogenético, como se había mencionado en Capítulo de Resultados, el árbol de *Maximum Likelihood* mostró 3 *clústers* principales correspondientes a *C. parapsilosis* s.s., *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

*C. parapsilosis* s.s., formó un agrupamiento con un 62% de *bootstrap* y se sabe que los valores de *bootstrap* son dependientes del dataset y de las secuencias (cuán diferentes

son entre ellas). Y a pesar que Baldauf (2003) reportó que valores iguales o mayores al 70% son considerados como indicadores confiables del agrupamiento; el análisis filogenético obtenido en este estudio, se consolida al agrupar las cepas estudiadas con cepas testigo: MK392000 otomicosis (Irán), MK392008 otomicosis (Irán), MK116225 tejido gangrenoso (USA) y KF313185 ATCC22019, confirmando los resultados del análisis de identidad de secuencias. *Bootstrap* más bajo que en el trabajo de Ge, *et al.*, 2012.

*C. orthopsilosis* conformó un *clústers* monofilético con un 86% de *bootstraps* y un agrupamiento con cepas testigo MK156301 sedimento marino (Egipto), MK156300 sedimento marino (Egipto) y cepa de referencia DMic 134539 de INEI-ANLIS (Argentina) a. *C. metapsilosis* exhibió un soporte estadístico de 76% de *bootstraps* y un agrupamiento afianzado con cepas testigo: MF797776 *Nasua* (Brasil), MG241512 panel de cepas INEI-ANLIS (Argentina), MG009520 DMic INEI-ANLIS (Argentina) y DMic 14837 INEI-ANLIS (Argentina) (Baldauf; 2003).

La distribución de aislados de las especies del complejo *C. parapsilosis*, de diferentes muestras clínicas, de las cepas de este trabajo y las obtenidas por otros autores, se expresan en la Tabla Nro. 10. En la misma, se aprecia que *C. parapsilosis* s.s. fue la de mayor frecuencia (última fila de la tabla) dentro del complejo como en todas las distribuciones publicadas, en coincidencia con los resultados del presente trabajo. La frecuencia de aislamientos de los investigadores están en un intervalos de 71,9% a 98,5%; y la frecuencia encontrada es de un 85% (45/53), en dicho intervalo de frecuencias (Miranda-Zapico *et al.*, 2011; Cebeci *et al.*, 2011; De Toro *et al.*, 2011; Treviño-Rangel *et al.*, 2012a; Ge *et al.*, 2012; Tosun *et al.*, 2013; Da Silva *et al.*, 2015; Ataidés *et al.*, 2015; Neji *et al.*, 2017)

En cuanto, a *C. orthopsilosis* la frecuencia de aislamiento detectada fue de un 4% (2/53), en tanto que aislamientos de diferentes trabajos son del 1,5% al 8,5% (Tabla Nro. 10); incluso se detectó esta levadura, en el trabajo de Ge *et al.*, 2012.

Por su parte, *C. metapsilosis* como integrante del complejo fue identificada en el presente trabajo en un 11% (6/53), valor incluido entre el 0,8% al 28,1% obtenidos por

investigadores consignados en la Tabla Nro. 10. El grupo de Cebeci *et al.*, 2011, no detecto esta especie del complejo.

**Tabla Nro. 3: Comparación de resultados de la tesis con estudios de investigadores, sobre distribución de las especies de *C. parapsilosis* s.l. aisladas de aisladas de diferentes productos biológicos clínicos**

Frecuencia de las especies de <i>C. parapsilosis</i> s. l.			Lugar de estudio	Grupo de Investigadores
<i>C. parapsilosis</i> s.s.	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>		
95.19% (435/ 457)	2,41% (11/457)	2,41% (11/457)	España	Miranda-Zapico <i>et al.</i> , 2011.
98.5% (67/68)	1,5% (1/68)	0	Turquía	Cebeci <i>et al.</i> , 2011.
91% (111/122)	8,2% (10/122 )	0,8% (1/122)	España	De Toro <i>et al.</i> , 2011.
90.4% (311/344)	8,4% (29/344)	1,2% (4/344)	México	Treviño-Rangel <i>et al.</i> , 2012a.
71.9% (41/57)	0	28,1% (16/57)	China	Ge <i>et al.</i> , 2012.
90,5% (38/42)	2,4% (1/42)	7,1% (3/42)	Turquía	Tosun <i>et al.</i> , 2013.
95% (77/81)	2,5% (2/81)	2,5% (2/81)	Brasil	Da Silva <i>et al.</i> , 2015.
89.7% (78/ 87)	5,7% (5/87)	4,6% (4/87)	Brasil	Ataides <i>et al.</i> , 2015.
94.5% (172 /182)	2,2% (4/182)	3,3% (6/182)	Tunes	Neji <i>et al.</i> , 2017.
85% (45/53)	4% (2/53)	11% (6/53)	Argentina	Datos de la presente tesis

El hallazgo de especies del complejo *C. parapsilosis* procedentes de hemocultivos fueron reportadas por varios autores (Lupetti *et al.*, 2002; Tortorano *et al.*, 2006; Villanueva Reyes & Arenas, 2007; Quindós *et al.*, 2007; Ruzicka *et al.*, 2007; Dizbay *et al.*, 2010; Cantón *et al.*, 2011; Da Silva Ruiz *et al.*, 2013a; García-Salazar *et al.*, 2017; Febres *et al.*, 2018).

Los datos obtenidos de frecuencia de aislados de levaduras del complejo *C. parapsilosis* procedentes de hemocultivos, que se exhiben en la última fila de la Tabla Nro. 11; se compararon con los de otros autores en filas anteriores. Se observa que, como se halló en este estudio, *C. parapsilosis* s.s., tuvo la mayor frecuencia de aislamientos de este complejo fúngico, como agente etiológico de candidemia, en coincidencia con otros autores. Frecuencias que van desde 80,6% a 96,5% y que en nuestro caso representó el 93% (25/27).

Este estudio ha puesto de manifiesto que la especie crítica *C. metapsilosis* representa el 7% (2/27) de las infecciones en sangre atribuidas al complejo *C. parapsilosis*, mayor que las mencionadas por varios investigadores (Tabla Nro. 11).

No hemos aislado de hemocultivos, *C. orthopsilosis*, En un estudio regional de Cattana 2016, *C. metapsilosis* no fue aislada de este tipo de material biológico.

**Tabla Nro. 4: Comparación de resultados de la tesis con estudios de investigadores sobre distribución de las especies del complejo *C. parapsilosis*, aisladas de hemocultivos**

Frecuencia de las especies de <i>C. parapsilosis</i> s. l.			Lugar de estudio	Grupo de Investigadores
<i>C. parapsilosis</i> s.s.	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>		
91.4% (160/175)	2,3% (4/175)	2,9% (5/175)	Portugal	Silva <i>et al.</i> , 2009a.
88% (124/141)	9% (13/141)	3% (4/141)	Brasil	Gonçalves <i>et al.</i> , 2010.
85.9% (61/71)	8,5% (6/71)	5,6% (4/71)	Taiwán	Chen <i>et al.</i> , 2010.
90.7% (330/364)	8,2% (30/364)	1,1% (4/364)	España	Cantón <i>et al.</i> , 2011.
96.5% (191/198)	1,0% (2/198)	2,5% (5/198)	China	Feng <i>et al.</i> , 2012.
80.6% (75/93)	18,3% (17/93)	1,1% (1/93)	Brasil	Constante <i>et al.</i> , 2014.
98% (59/60)	2% (1/60)	0	Argentina	Cattana, 2016
94,2% (81/86)	4,6% (4/86)	1,2% (1/86)	Venezuela	Moreno <i>et al.</i> , 2017.
93% (25/27)	0	7% (2/27)	Argentina	Datos de la presente tesis

En cuanto a la onicomicosis, micosis que afecta a todas las edades y poblaciones, y es a menudo recalcitrante a los tratamientos tópicos tiene a *Candida parapsilosis* s.s. como la especie más aislada, seguida por *C. albicans*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* (Figueiredo *et al.*, 2007; Jayatilake *et al.*, 2009; Godoy-Martinez *et al.*, 2009). Sin embargo, *C. metapsilosis* se convirtió en la segunda especie líder en lesiones ungueales en uñas de los pies. Datos que con respecto a los obtenidos en la presente tesis, no distan mucho; dado que sobre el total de aislamientos de levaduras del complejo procedentes de uña de manos, la frecuencia de aislamientos de *C. parapsilosis* s.s. fue de un 73% (11/15); seguida por *C. metapsilosis* en un 13,33% (2/15) y *C. orthopsilosis* en un 13,33% (2/15); presentados en la Figura Nro. 25 (Feng *et al.*, 2015; Mohammadi *et al.*, 2015).

*C. parapsilosis* s.s. fue aislada de cuatro muestras procedentes de piel. Hay que recordar que la patogenia de estas infecciones ocurre en etapas en las cuales interactúan diferentes factores del huésped y la virulencia del hongo, que juegan un papel crítico. Para la colonización inicial de la epidermis, están involucrados componentes de adhesión superficial del hongo; lo que determinará el éxito en el establecimiento de la infección. Las defensas del huésped contra la colonización, aparte de factores físicos, son otros microorganismos y sustancias que compiten en la piel, capaces de inhibir el crecimiento de *Candida*. Una vez que las células fúngicas han comenzado a incrustarse en las superficies epidérmicas, se encuentran con la dificultad que representa la resistencia mecánica innata de las superficies queratinizadas; obstáculo que puede ser salvado por la hidrólisis fúngica, las enzimas hidrolíticas y la maceración; y así puede comenzar a concretarse la infección de epitelios. En este escenario el anfitrión llama a una variedad de defensas a jugar, incluyendo la proliferación epidérmica y epitelial, la fagocitosis directa de *Candida* por queratinocitos, y la activación de una respuesta inflamatoria (Odds, 1994).

Los dos casos en que se aisló de urocultivo a levaduras del complejo *psilosis*, se caracterizaron como agente etiológico a *C. parapsilosis* s.s. datos que concuerdan con aislamientos de otros autores (Lima *et al.*, 2017). Los urocultivos positivos indican colonización o infección del tracto urinario (candiduria), pero también podrían ser un signo de candidiasis sistémica grave o candidemia. *Candida* spp. también puede llegar al tracto urinario por la vía ascendente, desde la uretra hasta la vejiga, o por diseminación hematógena (Kauffman, 2014). Las lesiones en la pelvis, los túbulos y los uréteres renales, y la formación de una "bola fúngica", que bloquea y causa lesiones al sistema urinario, son las principales complicaciones asociadas con la candiduria (Fisher *et al.*, 2011; Pappas *et al.*, 2009; De Freitas *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2017).

En el presente trabajo se demostró que el complejo *Candida parapsilosis* manifestó la capacidad de producir biopelículas como lo han verificado diferentes investigadores (Mah & O'toole, 2001; Kuhn *et al.*, 2002; Rossignol *et al.*, 2009; Rangel & de Jesús, 2011; Febres *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2012; Araújo, 2017).



En el marco de nuestras condiciones experimentales, determinación de biomasa total, basado en la cuantificación de la matriz, células viables y no viables con safranina se encontró que el 68% (36/53) de las cepas del complejo *C. parapsilosis*, fueron capaces de formar biopelículas lo que difiere del trabajo realizado por Toro Crespo (2011) de un 53,2% diferencia que se justifica en el hecho que en dicho trabajo se utilizó ensayo de viabilidad basado en la actividad metabólica de las células viables: reducción de sales de tetrazolium (XTT). Trabajo que expresa además que el 58,5% de *C. parapsilosis* s.s. produjeron biopelículas *in vitro*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* no la formaron, datos que difieren de los obtenidos en esta tesis según se aprecian en Tabla Nro. 8. Aunque otros investigadores detectaron que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* fueron capaces de producir biopelículas *in vitro* (Lattif *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2015). Los estudios retrospectivos disponibles sobre este factor de virulencia de *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis*, son aun escasos.

En tanto, la capacidad del complejo *C. parapsilosis* para producir biopelículas se evaluó en 27 aislados procedentes del torrente sanguíneo, de 15 de uñas de manos y de 11 aislados de otros materiales biológicos. Existen pocos trabajos que estudien la capacidad de formación de biopelículas de las especies de este complejo.

De las cepas procedentes de hemocultivos, levaduras de *C. parapsilosis* s.s. se integraron en biopelículas en un 68% (17/25) datos que se aproximan a otros autores 77% (Won Song *et al.*, 2005), 59% (Ruzicka *et al.*, 2007); y 64% (Toro Crespo, 2011). De este sitio biológico, de las especies aisladas, la que tuvo producción de biopelículas fue *C. parapsilosis* s.s., como se observa en Tabla Nro. 8. No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,5$ ) en cuanto a formación de biopelículas entre entre aislamientos de *C. parapsilosis* s.s., procedentes de hemocultivos y de otros productos biológicos, en coincidencia con da Silva Ruiz, *et al.*, 2013. Tampoco hallaron diferencias significativas respecto a la formación de biopelículas de entre aislamientos de *C. parapsilosis* s.s., procedentes de hemocultivos y de otras localizaciones anatómicas (Won Song *et al.*, 2005; Toro Crespo, 2011).

Al analizar la capacidad de formación de biopelículas en relación con las distintas especies del complejo, todas presentaron esta capacidad. Situación de alerta, atentos a que estas organizaciones microbianas, proporcionan resistencia contra defensas del hospedero, agentes antimicrobianos, detergentes, y capacidad de comunicación intercelular que las convierten en comunidades difíciles de eliminar de los ambientes donde se establecen (Douglas, 2002; Al Fattani & Douglas, 2004; Mujica *et al.*, 2004; Betancourth *et al.*, 2004; Ruzicka *et al.*, 2007; Villanueva Reyes & Arenas, 2007; Pemán *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Castrillón Rivera *et al.*, 2013; Del Pozo, & Cantón, 2016; Mohammadi *et al.*, 2017; Febres *et al.*, 2018).

La infección por *C. parapsilosis s.l.* está fuertemente correlacionada con su capacidad para crecer como biopelículas según lo expresan varios investigadores (Kuhn *et al.*, 2002; Rossignol *et al.*, 2009).

La presencia de biopelículas y su relación con el desarrollo de la enfermedad, se puede categorizar como un factor de virulencia de gran importancia para la salud humana. Factor que asegura patogenicidad, que genera una mayor capacidad de infección de tejidos y establecimiento de la infección, a través del tiempo. Esto sirve de fundamento para sustentar que el formar biopelículas podría estar directamente relacionado con la posibilidad latente de un aumento de la resistencia antifúngica, favoreciendo la permanencia de *Candida* en el hospedador y desarrollando cronicidad en los procesos infecciosos (Li *et al.*, 2012; Rivera *et al.*, 2013; Febres *et al.*, 2018).

Evaluar el comportamiento de agentes infecciosos en relación con el atributo de formación de biopelículas, podrían ayudar a entender cuestiones tales como las fallas terapéuticas *in vivo* que no concuerdan con resultados de estudios de sensibilidad *in vitro* (Febres *et al.*, 2018). Estos conocimientos tienen que apuntar a la búsqueda de sustancias que no solo elimine al microorganismo en forma planctónica, sino también en estado sésil. Y a pesar de la existencia de antifúngicos efectivos, la mayoría tienen elevado costo, toxicidad o farmacocinética compleja. Por otra parte, la emergencia de cepas resistentes limita en

gran medida su utilidad terapéutica o lo hará en un futuro (Organización Mundial de la Salud, 2016; Ruiz & Marín, 2018).

Estos hechos han inspirado esta tesis y sustentados en experiencias previas en el uso de SSS, sobre las formas planctónicas de diferentes géneros fúngicos. En la SSS se suma la propiedad germicida de la sacarosa en altas concentraciones sumada a la acción antiséptica del eugenol y a la estabilidad que incorpora a la formulación, el polietilenglicol 400 (Medvedeff, *et al.*, 2001). Se demostró su bioactividad *in vitro*, frente a *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*, *Purpureocillium lilacinum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* (Medvedeff *et al.*, 2000; Medvedeff *et al.*, 2001; Ortt *et al.*, 2004; Medvedeff *et al.*, 2005; Medvedeff *et al.*, 2007).

Las altas concentraciones de soluto de la SSS, hacen posible la baja  $a_w$  de  $0,65 \pm 0,02$  de la misma; lo que implica escasa agua disponible para reacciones químicas y enzimáticas y con consecuencias en el crecimiento microbiano (Fennema, 1996; Carrillo-Inungaray *et al.*, 2010). Se necesita una  $a_w$  de 0,88 para el crecimiento de levaduras.

La  $a_w$  de SSS es lo suficientemente baja como para dificultar la actividad metabólica; y de hecho fue así en vista de los resultados obtenidos, en cuanto a la biactividad *in vitro* de la misma frente a formas sésiles y planctónicas sobre el complejo *C. parapsilopsis*.

La comparación de los resultados obtenidos se torna difícil, al no disponer de un método estandarizado en biopelículas *in vitro* para el estudio de la actividad de los antifúngicos (Pemán *et al.*, 2008), y al no haber experiencias previas de la SSS sobre biopelículas. Los datos recopilados abren camino a futuras experiencias para desarrollar nuevas estrategias preventivas o terapéuticas (Medvedeff *et al.*, 2005; Bich *et al.*, 2010).

Existe un fuerte motivo médico, pero también económico, para el desarrollo de nuevas estrategias antifúngicas sobre biopelículas debido al aumento constante de la resistencia de las biopelículas de *Candida* a los antifúngicos convencionales y la alta mortalidad causada por infecciones relacionadas. Una mejor delineación de la extensión y el

rol de la levadura en las biopelículas puede ser esencial para desplegar nuevas estrategias terapéuticas en el entorno clínico (Pemán *et al.*, 2008).

La erradicación de una infección es la meta a alcanzar que debe sumar esfuerzos de médicos infectólogos, personal de enfermería y micólogos (Maestre & Vera, 2004; Saúl García & Hernández Valles, 2014).

Más allá del conocimiento del complejo *C. parapsilosis*, sus posibles localizaciones y su rol en las infecciones fúngicas, es importante atender y analizar el perfil epidemiológico propio del género.

En el contexto de este trabajo, conviene hacer una autoevaluación de la presencia de esta levadura de piel que puede complicar severamente la vida de un paciente; se debe ¿a factores predisponentes; enfermedades y/o circunstancias que rodean al paciente?, ¿a la aplicación inapropiada de medidas de cuidados en el manejo del paciente? ¿a la capacidad de este complejo de generar biopelículas?

Ante estos interrogantes, se deberían programar los mecanismos para soslayar la exposición persistente a los patógenos fúngicos potenciales, determinando las áreas protegidas y las medidas recomendables para el personal de salud. Y a los que abrazamos la micología como especialidad nos resta conocer aun más de estas comunidades complejas y corporativas de levaduras y saber más de la farmacocinética de los antifúngicos, cuyo potencial efecto puede estar mermado en un ambiente en el que su penetración se ve dificultada. Sabemos que los antifúngicos son siempre probados *in vitro* sobre cultivos puros planctónicos, pero en una mayor aproximación a la realidad sería interesante seguir evaluando la biactividad sobre “el bunker biológico” que representan las biopelículas (Pemán & Salavert, 2013).

***En la actualidad, el tratamiento de las infecciones fúngicas desde su diagnóstico hasta la elección de la mejor opción terapéutica, continúa siendo un desafío. El diagnóstico y el tratamiento tempranos se asocian con un mejor pronóstico en la evolución de las mismas.***

## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSIONES**

Mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2 se determinó a que especies del complejo *C. parapsilosis* pertenecían las cepas estudiadas.

De las cepas clínicas estudiadas, 53 fueron confirmadas como integrantes del complejo *C. parapsilosis* y una resultó ser *C. guilliermondii*. *C. parapsilosis* s.s. (grupo I) fue la especie más frecuente (85%), seguida por *C. metapsilosis* (grupo III) (11%) y *C. orthopsilosis* (grupo II) (4%).

Se determinó, mediante un ensayo *in vitro*, la capacidad de formación de biopelículas de levaduras del complejo *C. parapsilosis* en un 68% (36/53). *C. parapsilosis* s.s. mostró capacidad de formación de biopelículas *in vitro*, en un 71% (32/45); *C. metapsilosis* formó biopelículas en un 33% (2/6) y el 100% (2/2) de *C. orthopsilosis* tuvo la capacidad de desarrollarlas.

Los datos de cuantificación mostraron que la mayoría de las cepas de *C. parapsilosis* s.s. formaban una capa de biopelícula variable con predominio de entramados más densos. La dos cepas de *C. metapsilosis* formaron biopelículas densas, mientras que en *C. orthopsilosis*, la densidad de la biopelícula varió.

Las cepas de *C. parapsilosis* s.s. aisladas de uñas de mano y de otros materiales biológicos (piel, urocultivo, uña pie) no mostraron mayor capacidad de producir biopelículas en comparación con las aisladas de hemocultivo ( $P > 0,5$ ).

La SSS inhibió el desarrollo, *in vitro*, de las formas planctónicas de las 53 cepas del complejo *C. parapsilosis* y en las tres cepas de referencia (ATCC 22019, DMic 14837 y DMic 134539), luego de 12 h de contacto. La SSS inhibió el desarrollo, *in vitro*, de las formas sésiles de las 53 cepas del complejo *C. parapsilosis* con capacidad de formar biopelículas, después de 24 h de contacto con la formulación de ensayo.

## **CAPÍTULO VII**

### **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Se pretende implementar el estudio molecular para identificar levaduras y ampliar el número de cepas del complejo *C. parapsilosis* correctamente identificadas en la colección de la UNAM, que es un desafío para contribuir al perfil epidemiológico molecular. Estos datos son de importancia en la salud pública, que aportarían las bases para la toma de decisiones. Incrementar los conocimientos en esta área, serían siempre fructíferos; dado que, en la actualidad, existe mayor número de individuos con riesgo de adquirir micosis que en décadas previas; con el agravante que, dentro de los procesos infecciosos, las micosis no se caracterizan por ser las primeras consideradas en la sospecha clínica. Importante problema de salud pública del cual no se dispone de suficiente información.

Se proyecta continuar el conocimiento del desarrollo de las biopelículas y las interacciones que existen dentro de ella, de importancia, tanto para el tratamiento eficaz de enfermedades como para el descubrir relaciones existentes dentro de estas estructuras y los genes implicados en su formación y desarrollo.

Se programa el estudio de estos consorcios no solo mono-especies sino de otras posibles sociedades microbianas multi-especie, de hongos entre sí, de bacterias y hongos; teniendo en cuenta que a diferencia de microorganismos libres, los microorganismos que componen una biopelícula en sus capas más profundas, se encuentran en un estado metabólico mínimo, impiden la acción de antibióticos que actúan a nivel de la síntesis de las componentes celulares o en la producción de metabolitos fundamentales, lo que constituye un serio problema en salud pública.

Se quiere avanzar en la comprensión de las interacciones de estos complejos ecosistemas microbianos y del papel fundamental que juegan las biopelículas en la etiopatogenia de las enfermedades, y programar acciones en consecuencia.

Optimizar la formulación de SSS e incorporar otros principios activos fitoorganicos, así como también aumentar el número de cepas a ensayar es otro reto pensado; el que intuye un futuro promisorio.

Se avizora el potencial de la formulación a base de una solución saturada de sacarosa, con eugenol y polietilenglicol 400, sobre su bioactividad en superficies susceptibles a biopelículas; lo que induce a pensar en su uso en el tratamiento de micosis superficiales. Esta solución altamente concentrada, de demostrada baja toxicidad y probada actividad antifúngica *in vitro*, resulta de interés clínico terapéutico y se podría pensar en dispositivos que permitan incorporar la SSS, para optimizar su efectividad y penetración a través de la biopelícula.

Se plantea la necesidad de continuar recomendando las prácticas hospitalarias adecuadas en el manejo de los pacientes, principalmente el correcto lavado de manos, para evitar la transmisión horizontal lo que representaría una gran oportunidad para modificar la frecuencia de infecciones por esta especie.

Aprovechar las sinergias de la medicina, la biología, la bioquímica, la genética; la enfermería y de otras disciplinas de la salud para dar respuesta y contribuir a resolver los problemas de salud que afectan a la población. La integración de actividades garantiza el éxito de cualquier estrategia que se proponga para mejorar la salud de los individuos, lo que implica el imperativo de planificar acciones, de gestionar adecuadamente y, por lo tanto, considerar los aportes de las ciencias como un proveedor de insumos para racionalización de actividades.

*Por último quiero expresar las palabras de una gran amiga Martha Medvedeff, una mujer admirable por su entusiasmo, dedicación y compromiso con la Micología,*

*que frecuentemente decía:*

*“Nos falta por hacer mucho”.*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abi-chacra ÉA, Souza LO, Cruz LP, Braga-Silva LA, Gonçalves DS, Sodré CL, et al. (2013). Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. *FEMS Yeast Res*; 13 (8): 831-848.
- Adam B, Baillie GS, Douglas LJ. (2002). Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of medical microbiology*; 51(4): 344-349.
- Al Fattani MA, Douglas LJ. (2004). Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 48 (9): 3291-3297.
- Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ. (2006). Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell*, 5 (10): 1770-1779.
- Alfonso C, López M, Arechavala A, Perrone, MC, Guelfand L, Bianchi M. (2010). Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance *Candida* Agar. *Rev Iberoam Micol*, 27 (2): 90-93.
- Ali HS, Kamal MM, Mohamed SB. (2009). In vitro clove oil activity against periodontopathic bacteria. *J Sci Tech*; 10 (1): 1-7.
- Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, Barcelona Candidemia Project Study Group. (2006). Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*; 44 (5) 1681-1685.
- Al-Obaid K, Ahmad S, Joseph L, Khan Z. (2018). *Lodderomyces elongisporus* a bloodstream pathogen of greater clinical significance. *New Microbes New Infect*; 26: 20-24.
- Alvarez, C. (2016). Candiduria en una UCI pediátrica. Agentes etiológicos, perfil de sensibilidad y capacidad de formación de biopelícula. Tesis de Maestría (UNNE). Disponible en: <http://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/470?locale-attribute=pt>. Capturado el: 30/09/2018.



- Arastehfar A, Wickes BL, Ilkit M, Pincus DH, Daneshnia F, Pan W, Boekhout T. (2019). Identification of mycoses in developing countries. *J Fungi*; 5 (4): 90. doi: 10.3390/jof5040090.
- Araújo D, Henriques M, Silva S. (2017). Portrait of *Candida species* biofilm regulatory network genes. *Trends Microbiol*; 25 (1): 62-75.
- Arenas Guzmán, R. (2013). *Micología médica ilustrada 4a*. Ed. McGraw Hill México.
- Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan ZU. (2009). Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol*; 58 (6): 745-752.
- Asadzadeh M, Ahmad S, Hagen F, Meis, JF, Al-Sweih N, Khan Z. (2015). Simple, low-cost detection of *Candida parapsilosis* complex isolates and molecular fingerprinting of *Candida orthopsilosis* strains in Kuwait by ITS region sequencing and amplified fragment length polymorphism analysis. *PLoS One*; 10 (11): e0142880. doi: 10.1371/journal.pone.0142880. eCollection 2015.
- Ataides FS, Costa CR, Jesuino RSA, Silva MDRR. (2015). Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* complex species isolated from culture collection of clinical samples. *Rev Soc Bras Med Trop*; 48 (4): 454-459.
- Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, Rodríguez-Tudela JL. (2011). Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. *Enferm Infec Microbiol Clín*, 29(1), 39-e1.
- Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, Kačániová M. (2017). Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*; 43(3): 313-351.
- Baldauf SL. (2003). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends Genet*; 19 (6): 345-351.
- Barbedo LS, Figueiredo-Carvalho MHG, Muniz MDM, Zancopé-Oliveira RM. (2017). Comparison of four molecular approaches to identify *Candida parapsilosis* complex species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 112 (3): 214-219.

- Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, Viscoli C. (2006). Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis*; 6 (1): 21.
- Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol*; 87 (1): 99-108.
- Benencia F, Courreges MC. (2000). In vitro and in vivo activity of eugenol on human herpesvirus. *Phytother Res*; 14 (7): 495-500.
- Betancourth M, Botero JE, Rivera SP. (2004). Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colomb Méd*; 35 (Supl 1): 34-39.
- Bich G, Vedoya C, Medvedeff M. (2010). Evaluación de la genotoxicidad de una formulación antifúngica por medio del test de *Allium* cepa. VI Jornada Científica, Fundación Barceló. Facultad de Medicina. Disponible en: [http://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=&id=40203&congresos=yes&detalles=yes&congr\\_id=1351275](http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=40203&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=1351275). Capturado el: 01/09/2012.
- Bizerra FC, Nakamura CV, De Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Yamada-Ogatta SF. (2008). Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*; 8 (3): 442-450.
- Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TIE. (2005). High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect*; 59 (2): 159-162.
- Bonifaz Trujillo, J. A. (2012). *Micología médica básica, 4a*. Ed McGraw Hill Mexico.
- Borghi E, Sciota R, Iatta R, Biassoni C, Montagna MT, Morace G. (2011). Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 30 (11): 1437-1441.
- Borman AM, Linton CJ, Oliver D, Palmer MD, Szekely A, Odds FC, Johnson EM. (2009). Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, and *Candida orthopsilosis*. *J Clin Microbiol*; 47 (7): 2307-2310.

- Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. (1994). Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*; 32 (2): 452-456.
- Briozzo J, Núñez L, Chirife J, Herszage L, D'aquino M. (1989). Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *J Appl Bacteriol*; 66 (1): 69-75.
- Calderone RA, Fonzi WA. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*; 9 (7): 327-335.
- Camacho-Cardoso JL, Martínez-Rivera MÁ, Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar L. J., López-Martínez, R., & Hernández-Hernández, F. (2017). Detección molecular de especies de *Candida* en especímenes de pacientes hospitalizados. *Gac Méd Méx*; 153 (5): 581-589.
- Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Alvarez M, Yagüe G. (2011). Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*; 55 (12): 5590-5596.
- Cantón E, Viudes A, Pemán J. (2001). Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberoam Micol*, 18: 51-55.
- Cao Y, Dai B, Wang Y, Huang S, Xu Y, Cao Y, Jiang Y. (2008). In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Ag*; 32 (1): 73-77.
- Carballo GM. (2010) Micosis superficiales. De la Clínica al diagnóstico de Laboratorio. Primera Edición. Editorial La Reforma. pp. 13-83.
- Carolis ED, Hensgens LA, Vella A, Posteraro B, Sanguinetti M, Senesi S, Tavanti A. (2014). Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. *Med Mycol*; 52 (2): 123-130.
- Carrillo-Inungaray ML, Ramírez-Zapata MR, Martínez-Castilleja JC. (2006). Efecto de solutos sobre el crecimiento de hongos deteriorativos de alimentos. *CYTA-J Food*, 5 (2): 142-146.

- Castrillo ML, Fonseca MI, Bich GA, Jerke G, Horianski MA, Zapata PD. (2012). Taxonomy and phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *nigri* isolated from yerba mate in Misiones (Argentina). *BAG*; 23 (2): 19-27.
- Castrillón Rivera LE, Palma Ramos A, Padilla Desgarenes MDC. (2013). Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev Mex*; 57 (5), 350-361.
- Cattana ME. (2016). *Candida parapsilosis* sensu lato. Identificación molecular de especies y estudio del perfil de sensibilidad a los antifúngicos. Tesis de Maestría (UNNE). Disponible en: <http://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/460?locale-attribute=en>, Capturado el: 07/08/2017.
- Cebeci NG, Tosun I, Bayramoğlu G, Buruk K, Aydın F. (2011). Genotypic identification and distribution patterns of *Candida parapsilosis* complex species (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*) isolated from clinical samples. *Mikrobiyoloji bulteni*; 45 (4): 723-728.
- Chee HY, Lee MH. (2007). Antifungal activity of clove essential oil and its volatile vapour against dermatophytic fungi. *Mycobiol*; 35 (4): 241-243.
- Chen YC, Lin YH, Chen KW, Lii J, Teng HJ, Li SY. (2010). Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diag Microbiol Infect Dis*; 68 (3): 284-292.
- Cheung C, Guo Y, Gialanella P, Feldmesser M. (2006). Development of candidemia on caspofungin therapy: a case report. *Infection*; 34 (6): 345-348.
- Chinduma ATM, Azócar PEB, Pareja CAM. (2017). Portación de levaduras en manos de estudiantes de las carreras de Medicina y Enfermería de la Universidad de Talca. *Bol Micol*; 32 (2): 8-14.
- Chirife J, Herszage L, Joseph A, Bozzini JP, Leardini N, Kohn ES. (1983b). *In vitro* antibacterial activity of concentrated polyethylene glycol 400 solutions. *Antimicrob Ag Chemother*; 24 (3): 409-412.
- Chirife J, Herszage L, Joseph A, Kohn ES. (1983a). *In vitro* study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: microbiological basis for the use of sugar in treating infected wounds. *Antimicrob Ag Chemother*; 23 (5): 766-773.

- Chirife J, Nuñez L, Ballesteros A, Bonzzini J, Herszage L, D'Aquino M. (1992). Estudios sobre la acción bactericida del aceite de clavo de olor dispersado en una solución concentrada de azúcar. *Rev Argent Microbiol*; 24: 32-39.
- Chirife J, Scarmato G, Herszage L. (1982). Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds. *The Lancet*, 319 (8271): 560-561.
- Constante CC, Monteiro AA, Alves SH, Carneiro LC, Machado MM, Severo LC, Pasqualotto, AC. (2014). Different risk factors for candidemia occur for *Candida* species belonging to the *C. parapsilosis* complex. *Med Mycol*; 52 (4): 403-406.
- Coogan MM, Fidel Jr PL, Komesu MC, Maeda N, Samaranayake LP. (2006). (B1) *Candida* and mycotic infections. *Adv Den Res*; 19 (1): 130-138.
- Corrales GS, Marín MPA, Agudo LG, Martos PG. (2015). Prevalencia de *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* en muestras clínicas. *Enf Infec Microbiol Clín*; 33 (4): 290-291.
- Costa-Orlandi CB, Sardi JC, Pitangui NS, De Oliveira HC, Scorzoni L, Galeane MC, et al. (2017). Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *J Fungi*; 3(2): 22.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*; 284 (5418): 1318-1322.
- Criseo G, Scordino F, Romeo O. (2015). Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *J Microbiol Met*; 111: 50-56.
- Cuenca-Estrella M, Rodríguez D, Almirante B, Morgan J, Planes AM, Almela M, Salvado M. (2005). In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002–2003. *J Antimicrob Chemother*; 55 (2): 194-199.
- Da Silva BV, Silva LB, de Oliveira DBC, da Silva PR, Ferreira-Paim K, Andrade-Silva LE, Andrade AA. (2015). Species distribution, virulence factors, and antifungal susceptibility among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *Mycopathologia*; 180 (5-6): 333-343.
- Da Silva Ruiz L, Khouri S, Hahn RC, Da Silva EG, de Oliveira VKP, Gandra RF, Paula CR. (2013a). Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's

- hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia*; 175 (3-4): 231-239.
- Da Silva Ruiz L, Montelli AC, de Fátima Sugizaki M, Da Silva EG, De Batista GCM, Moreira D, Paula CR. (2013b). Outbreak of fungemia caused by *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: molecular investigation through microsatellite analysis. *Rev Iberoam Micol*; 30 (2): 112-115.
- Davies DG, Marques CN. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol*; 191 (5): 1393-1403.
- De Bernardis F, Lorenzini R, Verticchio R, Agatensi L, Cassone A. (1989). Isolation, acid proteinase secretion, and experimental pathogenicity of *Candida parapsilosis* from outpatients with vaginitis. *J Clin Microbiol*; 27 (11): 2598-2603.
- De Freitas AR, Baeza LC, Faria MGI, Dota KFD, Martínez PG, Svidzinski TIE. (2014). Yeasts isolated from nosocomial urinary infections: Antifungal susceptibility and biofilm production. *Rev Iberoam Micol*; 31 (2): 104-108.
- De Llanos Frutos R, Fernández-Espinar MT, Querol A. (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek*; 85 (3): 175-185.
- De Luna E, Guerrero JA, Chew-Taracena T. (2005). Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica*; 15 (3): 351-370.
- De Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. (2011). Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect*; 17 (3): 418-424.
- Del Pilar Vercher M, Martínez JMG, Cantón E, Pemán J, García MMG, Gómez EV, del Castillo Agudo L. (2011). Differentiation of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* by specific PCR amplification of the RPS0 intron. *Int J Med Microbiol*; 301 (6): 531-535.
- Del Pozo JL, Cantón E. (2016). Candidiasis asociada a biopelículas. *Rev Iberoam Micol*; 33 (3): 176-183.

- Deveau A, Hogan DA. (2011). Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. En: *Quorum Sensing* Humana Press; pp. 219-233.
- Dizbay M, Fidan I, Kalkanci A, Sari N, Yalcin B, Kustimur S, Arman D. (2010). High incidence of *Candida parapsilosis* candidaemia in non-neutropenic critically ill patients: epidemiology and antifungal susceptibility. *Scand J Infect Dis*; 42 (2): 114-120.
- Donlan RM, & Costerton JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*; 15 (2): 167-193.
- Douglas LJ. (2002). Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol*; 19 (3): 139-143.
- Douglas LJ. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*; 11 (1): 30-36.
- Dunne WM. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*; 15 (2): 155-166.
- Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK. (1995). Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye*; 9 (1): 102-109
- Estrada-Barraza D, Martínez AD, Flores-Padilla L, Mendoza-De Elias R, Sánchez-Vargas LO. (2011). Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol*; 28 (1): 36-42.
- Farris JS. (1970). Methods for computing Wagner trees. *Syst Zool*; 19 (1): 83-92.
- Febres MMG, González L, Mendoza V, Ochoa M, Castrillo S, Sánchez J, Briceño A. (2018). Capacidad de formación de biopelículas en especies del género *Candida* de procedencia clínica. *Rev Med Risaralda*; 23 (2): 4-9.
- Felsenstein J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *Am Nat*; 125 (1): 1-15.
- Feng X, Ling B, Yang G, Yu X, Ren D, Yao Z. (2012). Prevalence and distribution profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* responsible for superficial candidiasis in a Chinese university hospital. *Mycopathologia*; 173 (4): 229-234.

- Feng X, Ling B, Yang X, Liao W, Pan W, Yao Z. (2015). Molecular identification of *Candida* species isolated from onychomycosis in Shanghai, China. *Mycopathologia*; 180 (5-6): 365-371.
- Fennema OR. (1996). Ch. 2: Water and Ice; En: *Food chemistry 3 Ed.*, Marcel Dekker Inc.; pp. 42-46.
- Figueiredo VT, de Assis Santos D, Resende MA, Hamdan JS. (2007). Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. *Mycopathologia*; 164 (1): 27-33.
- Figueras C, de Heredia CD, García JJ, Navarro M, Ruiz-Contreras J, Rossich R, Rumbao J Frick MA, Roselló EM. (2011). Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva. En: *An Pediat (Barc)*; 74 (5): 337-e1).
- Fisher JF, Kavanagh K, Sobel JD, Kauffman CA, Newman CA. (2011). *Candida* urinary tract infection: pathogenesis. *Clin Infect Dis*; 52 (suppl 6): S437-S451.
- Fonseca MI. (2012). Utilización de hongos de pudrición blanca de la provincia de Misiones en procesos de biopulpa: Aspectos bioquímicos y moleculares de sistemas ligninolíticos involucrados y prospección biotecnológica. *Univ. Nac. Tucumán. Fac. Bqca, Qca y Fcia. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de Recursos Naturales. 200p.*
- Gago S, Alastruey-Izquierdo A, Marconi M, Buitrago MJ, Kerhornou A, Kersey PJ, et al. (2014a). Ribosomic DNA intergenic spacer 1 region is useful when identifying *Candida parapsilosis* spp. complex based on high-resolution melting analysis. *Med Mycol*; 52 (5): 472-481.
- Gago S, García-Rodas R, Cuesta I, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A. (2014b). *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence*; 5 (2): 278-285.
- Galván B, Mariscal F. (2006). Epidemiología de la candidemia en UCI. *Rev Iberoam Micol*; 23 (12): 12-15.



- Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS. (2012). Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. *J Antimicrob Chemother*, 67 (11): 2739-2748.
- García-Salazar E, Escalante E, López-Álvarez MDR, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Reyes-Montes MDR, Frías De León MG. (2017). Variabilidad genética de aislados del complejo *Candida parapsilosis* en dos servicios de un hospital terciario de la Ciudad de México. *Investigación Clínica*; 58 (3): 227-237.
- Garzoni C, Nobre VA, Garbino J. (2007). *Candida parapsilosis* endocarditis: a comparative review of the literature. *Eu J Clin Microbiol Infect Dis*; 26 (12): 915-926.
- Ge YP, Boekhout T, Zhan P, Lu GX, Shen YN, Li M, Shao HF, Liu WD. (2012). Characterization of the *Candida parapsilosis* complex in East China: species distribution differs among cities. *Med Mycol*; 50 (1): 56-66.
- Gherbawy Y, Voigt K. (Eds.). (2010). *Molecular identification of fungi*. Berlin, Springer; pp: vii-xi).
- Godoy Martinez P, Nunes FG, Tomimori-Yamashita J, Urrutia M, Zaror L, Silva V, Fischman, O. (2009). Onychomycosis in São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*; 168 (3): 111-116.
- Gokce, G., Cerikcioglu, N., & Yagci, A. (2007). Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*, 164(6), 265.
- Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. (2008). Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 52 (4): 1506-1509.
- Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, Padovan ACB, Briones MRDS, Melo ASA, Colombo, AL. (2010). Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect*;16 (7): 885-887.

- González-Brambila M, López-Isunza F. (2007). Transporte de masa y reacción en una biopelícula. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*; 6 (2): 127-136.
- Grandcolas P, Deleporte P, Desutter-Grandcolas L, Daugeron C. (2001). Phylogenetics and Ecology: As many characters as possible should be included in the cladistic analysis. *Cladistics*; 17 (1): 104-110.
- Grau-Cerrato S, Ferrández-Quirante O. (2009). Farmacoeconomía del tratamiento de las candidiasis invasoras. *Rev Iberoam Micol*; 26 (1): 90-93.
- Guarro J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enf Infec Microbiol Clín*; 30 (1): 33-39.
- Guevara Granja MF. (2016). Primeros resultados de la exploración micológica en el Parque Nacional Sangay y en el Parque Nacional Llanganates. Tesis de Maestría de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).
- Guilarte C, Pardi G. (2009). Pruebas para identificar especies de *Candida* en cavidad bucal. *Acta Odontol Venez*; 47 (3): 201-205.
- Guilarte C., Pardi G, Perrone M. (2011). Detección de especies de *Candida* en Agar Candida cromogénico, a partir de cepas aisladas de muestras de cavidad bucal. *Acta Odontol Venez*; 49 (4): 1-7.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*; 59 (3):307-321.
- Gulati M, Nobile CJ. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*; 18 (5): 310-321.
- Guzman IM. (2008). Análisis fisiológico y genético molecular de dos cepas lignolíticas silvestres. Tesis de Grado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.
- Hall T. (1999). Bioedit: a user friendly-biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*; 41 (41):99-98.
- Hasegawa M, Kishino H, Saitou N. (1991). On the *Maximum Likelihood* method in molecular phylogenetics. *J Mol Evol*; 32: 443-445.

- Hays C, Duhamel C, Cattoir V, Bonhomme J. (2011). Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *J Med Microbiol*; 60(4): 477-480.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B*; 270 (1512): 313-321.
- Hebert PD, Landry JF. (2010). DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biol Lett*; 6 (3): 359-362.
- Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. (2006). *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. *Br J Biomed Sci*; 63 (1): 5-11.
- Hensgens LA, Tavanti A, Mogavero S, Ghelardi E, Senesi S. (2009). AFLP genotyping of *Candida metapsilosis* clinical isolates: evidence for recombination. *Fungal Genet Biol*; 46 (10): 750-758.
- Herszage L, Montenegro G, Joseph A. (1982). Traitement des plaies suppurées par l'application de saccharose. *Nouv Pres Méd*; 11 (2): 940.
- Herszage L, Montenegro JR, Joseph AL. (1980). Tratamiento de las heridas supuradas con azúcar granulado comercial. *Bol Trab Soc Argent Cir*; 41 (21-22): 315-330.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. T. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*; 111 (5): 509-547.
- Hillis DM, Dixon MT. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol*; 66 (4): 411-453.
- Hogan DA. (2006). Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot cell*; 5 (4): 613-619.
- Holland LM, Schröder MS, Turner SA, Taff H, Andes D, Grózer Z, et al. (2014). Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS Pathog*; 10 (9): e1004365.
- Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, et al. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*; 67 (7): 2982-2992.

- Horne D, Holm M, Oberg C, Chao S, Young DG. (2001). Antimicrobial effects of essential oils on *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Essential Oil Research*; 13 (5): 387-392.
- Howell SA, Hazen KC. (2011). *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. En: *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition*, American Society of Microbiology; pp. 1793-1821.
- Insua A, López-Piñón MJ, Freire R, Méndez J. (2003). Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae). *Genome*; 46 (4): 595-604.
- Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol*; 40 (1): 87-109.
- Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries BC. (2007). Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microbiol*; 73 (6): 1697-1703.
- Jayatilake JAMS, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. (2009). Candidal onychomycosis: a mini-review. *Mycopathologia*; 168 (4): 165-173.
- Kauffman CA. (2014). Diagnosis and management of fungal urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am*; 28 (1): 61-74.
- Khan MU, Ali S, Baig MA, Rafiq MA, Vasavada BC, Khan IA. (2007). *Candida parapsilosis* endocarditis 8 months after transient candidemia. *Int J Cardiol*; 118 (2): e58-e59.
- Kim SK, El Bissati K, Mamoun CB. (2006). Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiology*; 152 (10): 2885-2894.
- Kolaczowski B, Thornton JW. (2004). Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. *Nature*; 431 (7011): 980-984.
- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. (2002). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*; 70 (2), 878-888.

- Kuhn DM, Mukherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J, Hajjeh RA, et al. (2004). *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis*; 10 (6): 1074-1081.
- Kumar CG, Anand SK. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*; 42 (1-2): 9-27.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*; 33 (7):1870-1874.
- Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- Laffey SF, Butler G. (2005). Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*; 151 (4): 1073-1081.
- Lappin-Scott HM, Bass C. (2001). Biofilm formation: attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. *Am J Infect Control*; 29 (4): 250-251.
- Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. En: *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 28, No. 2, pp. 163-175). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema DJ, et al. (2010). Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol*; 300 (4): 265-270.
- Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. (2006). Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol*; 44 (3): 693-699.
- Lehmann PF, Lin DIMING, Lasker BA. (1992). Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol*; 30 (12): 3249-3254.
- Li Y, Ma Y, Zhang L, Guo F, Ren L, Yang, R, et al. (2012). In vivo inhibitory effect on the biofilm formation of *Candida albicans* by liverwort derived riccardin D. *PLoS One*; 7(4): e35543.
- Lima G, Nunes MO, Chang MR, Tsujisaki R, Nunes JO, Tairo CL, et al. (2017). Identification and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from the urine of patients in a

- university hospital in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 59. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5738760/#>. Capturado el: 22/04/2019.
- Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF. (1995). Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol*; 33 (7): 1815-1821.
- Lindsay D, Von Holy A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*; 64 (4): 313-325.
- Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. (2008). Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*; 46 (8): 2659-2664.
- López C, Giro L, Ramos L, Ramadán S, Bulacio L. (2005). Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Rev Argent Microbiol*; 37 (1): 16-21.
- López Martínez R. (2008). I. Introducción Importancia actual de la micología médica en México. *Gaceta Médica de México*; 144 (2): 121-122.
- Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, et al. (2002). Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*; 40 (7): 2363-2369.
- Maestre MM, Vera JM. (2004). Revisión breve. *Rev Esp Quimioterap*; 17(1): 26-28.
- Mah TFC, O'toole GA. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*; 9 (1): 34-39.
- Marengo DEA, Daza JA, Trujillo MC, Cuello JD, Plata EE. (2013). Quorum sensing: mecanismo de comunicación celular en *Candida albicans*. *Ciencia y Salud Virtual*; 5 (1): 109-117.
- Marr KA. (2004). Invasive *Candida* infections: the changing epidemiology. *Oncology*; 18 (14 Suppl 13): 9-14.
- Martí Carrizosa M. (2015). *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*: epidemiología de las candidemias, patrones de sensibilidad y mecanismos de

- resistencia a las equinocandinas. Tesis de doctorado, Facultat de Ciències, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Matheny PB, Zai-Wei GE, Hibbett DS. (2005). New Asian species of the genus *Anamika* (euagarics, hebelomatoid clade) based on morphology and ribosomal DNA sequences. *Mycolog Res*; 109 (11): 1259-1267.
- Medvedeff M, Vedoya M, Lloret MA, Espínola MA, Herszage L. (2000). Bioactividad de la solución saturada de sacarosa sobre *Sporothrix schenckii*. *Rev Iberoam Micol*, 17: 146-148.
- Medvedeff MG, Chade ME, Mereles BE, Vedoya MC. (2008). *Identificación de hongos levaduriformes de interés médico*. Ed. Universitaria UNaM.
- Medvedeff MG, Lloret MA, Vedoya MC, Espínola MA, Herszage L. (2001). Comparación in vitro de la acción fungicida de solución saturada de azúcar y nitrato de econazol. *Ars Pharmaceutica*; 42 (3-4): 203-207.
- Medvedeff MG, Lloret MA, Vedoya MC, Reza ME, Herszage L. (1997). Estudio in vitro de la acción fungicida del eugenol en solución sobresaturada de azúcar. *Rev. Argent. Micol*; 20 (1/3): 46-52.
- Medvedeff MG, Lloret MA, Vedoya MC, Zaneck M, Reza M, Herszage L. (1998). Efecto fungicida de la solución sobresaturada de azúcar, eugenol y polietilenglicol 400 sobre *Candida albicans*. *Rev Argent Micol*; 21 (3): 14-17.
- Medvedeff MG, Vedoya MC, Lloret MA, Espinola M, Miño OS, Herszage L. (2005). Una alternativa terapéutica para micosis superficiales. *Rev Mex Ciencias Farmacéuticas*; 36 (3): 14-20.
- Medvedeff MG, Vedoya MC, Lloret MA, Espinola MA, Wassan Z. (2007). Acción fungicida de solución de sacarosa y eugenol. Libro de las VI Jornadas Científico-Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UnaM. Editorial Universitaria de Misiones. ISBN 978-950-579-091-3: 115-118.
- Mendoza M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Rev Soc Ven Microbiol*; 25 (1): 15-23.

- Merino Guzmán G, Cedillo Ramírez L, Silva Andrade F, Muñoz García AA, Roldán C, Iracena E. (2011). Análisis morfológico de biopelículas de *Candida albicans* producidas en diferentes condiciones de pH y temperatura analizadas por microscopía óptica y de fuerza atómica. *Rev Mex Micología*; 33: 1-8.
- Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, Quindós, G. (2011). Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother*; 66 (10): 2315-2322.
- Mirhendi H, Bruun B, Schønheyder HC, Christensen JJ, Fursted K, Gahrn-Hansen B, et al. (2010). Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J Med Microbiol*; 59 (4): 414-420.
- Mohammadi R, Badiie P, Badali H, Abastabar M, Safa AH, Hadipour M, et al. (2015). Use of restriction fragment length polymorphism to identify *Candida* species, related to onychomycosis. *Adv Biomed Res*; 4:95. doi: 10.4103/2277-9175.156659.
- Mohammadi R, Mirhendi H, Hedayati MT, Badali H. (2017). Caspofungin-Non-Susceptible *Candida orthopsilosis* isolated from onychomycosis in Iran. *Iran J Public Health*; 46 (2): 235–241.
- Mohandas V, Ballal M. (2011). Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. *J Glob Infect Dis*; 3 (1): 4-8.
- Moreno X, Reviakina V, Panizo MM, Ferrara G, García N, Alarcón V, et al. (2017). Identificación molecular y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos de sangre del complejo *Candida parapsilosis* en Venezuela. *Rev Iberoam Micol*; 34 (3): 165-170.
- Mujica MT, Finkelievich JL, Jewtuchowicz V, Iovannitti CA. (2004). Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas: Período 1999-2001. *Rev Argent Microbiol*; 36 (3): 107-112.



- Nadeem SG, Hakim ST, Kazmi SU. (2010). Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan J Med*; 5 (1): 10.3402/ljm.v5i0.2144.
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*; 67 (3): 400-428.
- Navia DP, Villalba HS, Mosquera SA. (2010). Las biopelículas en la industria de alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias (Colombia)*; 8 (2): 25-37.
- Nei M, Kumar S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press.
- Neji S, Trabelsi H, Hadrich I, Cheikhrouhou F, Sellami H, Makni F, Ayadi, A. (2017). Molecular study of the *Candida parapsilosis* complex in Sfax, Tunisia. *Med Mycol*; 55 (2): 137-144.
- Németh T, Tóth A, Szenzenstein J, Horváth P, Nosanchuk JD, Grózer Z, et al. (2013). Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. *PLoS One*; 8 (7): e68704.
- Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, Campanha NH. (2014). Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis*; 20 (4): 329-344.
- Núñez L, D'aquino M, Chirife J. (2001). Antifungal properties of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution. *Braz J Microbiol*; 32 (2): 123-126.
- Odds FC, Bernaerts R. (1994). CHROMagar Candida a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1923-1929.
- Odds FC. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol*; 31 (3): S2-S5.
- Ommen P, Zobek N, Meyer RL. (2017). Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. *J Microbiol Meth*; 141: 87-89.
- Organización Mundial de la Salud (2016). Resistencia a los antimicrobianos. Disponible en: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/). Capturado el: 10/05/2019.
- Ortt D, Wassan MZ, Vedoya MC, Medvedeff MG, Espinola MA, Lloret MA. (2004). Acción fungicida *in vitro* de cinco formulaciones de sacarosa. Evento Científico 2004. ANAIS.

- SAEPE VIII Seminario Anual de Ensino. Pesquisa e Extensao do CEFET-PR. VIII Jornada de Inicicao Cientifica do CEFET-PR. Pato Branco: LabEditor. ISBN 85-904845-2-1: 218-221.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*; 54 (1): 49-79.
- Palomares JC, Cuenca Estrella M, Ferrer C, Colom MF. (2007). Diagnóstico micológico mediante técnicas de biología molecular. *Rev Iberoam Micol*, cap.20. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo20.pdf>. Capturada el: 18/07/2018.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin Jr DK, Calandra TF, Edwards Jr JE., et al. (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*: pp. 503-535.
- Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W., et al. (2003). A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis*; 37 (5): 634-643.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Meth*; 72 (2): 157-165.
- Pemán J, Cantón E, Valentín A. (2008). Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. *Rev Iberoam Micol*; 25 (2): 124-128.
- Pemán J, Martín-Mazuelos E, Calvo MCR. (Eds.). (2001). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica*. *Rev Iberoam Micol*.
- Pemán J, Salavert M. (2013). Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. *Enfer Infec Microbiol Clín*; 31 (5). 328-341.
- Pemán J, Zaragoza R. (2012). Hacia el diagnóstico temprano de la candidiasis invasora en el paciente crítico. *Rev Iberoam Micol*; 29(2): 71-75.
- Peña C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Rev Peru Biol*; 18 (2): 265-267.
- Penny D, Hendy MD, Steel MA. (1992). Progress with methods for constructing evolutionary trees. *Trends Ecol Evol*; 7 (3): 73-79.

- Pérez-García LA, Csonka K, Flores-Carreón A, Mellado-Mojica E, Németh T, López-Ramírez LA, et al. (2016). Role of protein glycosylation in *Candida parapsilosis* cell wall integrity and host interaction. *Front Microbiol*; 7, 306. doi: 10.3389/fmicb.2016.00306.
- Pfaller MA, Diekema DJ. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*; 20 (1): 133-163.
- Pincus DH, Orenga S, Chatellier S. (2007). Yeast identification past, present, and future methods. *Med Mycol*; 45 (2): 97-121.
- Pinto RSF. (2013). *Caracterización del gen ATC1 de Candida parapsilosis: clonación, estudio fenotípico e interacción con el sistema inmunitario* (Doctoral dissertation, Universidad de Murcia).
- Prandini THR, Theodoro RC, Bruder-Nascimento AC, Scheel CM, Bagagli E. (2013). Analysis of inteins in the *Candida parapsilosis* complex for simple and accurate species identification. *J Clin Microbiol*; 51 (9): 2830-2836.
- Pryce TM, Palladino S, Price DM, Gardam DJ, Campbell PB, Christiansen KJ, Murray RJ. (2006). Rapid identification of fungal pathogens in BacT/ALERT, BACTEC, and BBL MGIT media using polymerase chain reaction and DNA sequencing of the internal transcribed spacer regions. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 54 (4): 289-297.
- Quindós G, Carrillo-Muñoz AJ, Eraso E, Cantón E, Pemán J. (2007). Actividad antifúngica in vitro de voriconazol: Nuevos datos después de los primeros años de experiencia clínica. *Rev Iberoam Micol*; 24 (3): 198-208.
- Quindós G, Villar-Vidal M, Eraso E. (2009). Actividad de la micafungina contra las biopelículas de *Candida*. *Rev Iberoam Micol*; 26 (1): 49-55.
- Quindós G. (2014). Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol*; 31 (1): 42-48.
- Ramage G, Saville S P, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*; 4(4): 633-638.
- Ramage G, Walle KV, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. (2001). Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*; 18 (4): 163-170.

- Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL. (2008). A seed and feed model for the formation of *Candida albicans* biofilms under flow conditions using an improved modified Robbins device. *Rev Iberoam Micol*; 25 (1): 37-40.
- Rangel T, de Jesús R. (2011). *Identificación molecular y caracterización fenotípica de aislamientos clínicos del complejo Candida parapsilosis* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Ratón TO. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev Iberoam Micol*; 21: 15-19.
- Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. (2006). In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol*; 188 (10): 3572-3581.
- Riera F, Medeot M, Sartori L, Bergallo C, Minoli J, Vilchez V, et al. (2014). Candidemia epidemiology in Cordoba Argentina. Surveillance study of five institutions. *Rev Fac Cienc Med Univ Nac Cordoba (Córdoba, Argentina)*; 71 (2): 89-93.
- Rippon JW. (1990). Candidiasis y levaduras patógenas. *Medical Mycology, 3 Ed.* WB Saunders Company, pp. 611-614.
- Rivera LEC, Ramos AP, & Desgarenes MDPC. (2013). Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev Mex*; 57 (5): 350-361.
- Rivera LEC, Ramos AP, Padilla Desgarenes C. (2005). Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatología Rev Mex*; 49 (1): 12-27.
- Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdoba S, Canteros CE, Saporiti A. (2005). Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol*; 37 (4): 189-195.
- Rodríguez Tudela JL, Cuesta I, Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martínez L, & Cuenca-Estrella M. (2008). Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico. *Enferm Infecc Microbiol Clín*; 26: 47-53.
- Rossignol T, Ding C, Guida A, d'Enfert C, Higgins D, Mayordomo G. (2009). Correlation between Biofilm Formation and the Hypoxic Response in *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell*; 8 (4): 550-559.

- Rossman AY. (2007). Report of the planning workshop for all fungi DNA Barcoding. *Inoculum*; 58 (6): 1-5.
- Ruiz A, Marín E. (2018). Estudio *in vitro* de la Actividad Antifúngica de un Nuevo Extracto Natural. *Psychologia Latina, Vol. Especial*, 399-402.
- Ruiz-Aragón J, García-Martos P, Puerto JL, Marín P, Saldarreaga A, Moya P. (2003). Evaluación de un nuevo medio CHROMagar *Candida* para la identificación presuntiva de levaduras. *Rev Diagn Biol*; 52 (1): 19-22.
- Ruzicka F, Hola V, Votava M, Tejkalova R. (2007). Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiológica*; 52 (3): 209.
- Rycovska A, Valach M, Tomaska L, Bolotin-Fukuhara M, Nosek J. (2004). Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology*; 150 (5): 1571-1580.
- Sá MB. (2008). Actualización sobre el tratamiento de las infecciones fúngicas graves. *Rev Esp Quimioter*; 21 (1): 14-25.
- Sadeghi G, Ebrahimi-Rad M, Mousavi SF, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. (2018). Emergence of non-*Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. *J Mycol Med*; 28 (1): 51-58.
- Said N, Fernández J, Acevedo E. (2007). Aplicación de técnicas de Biología molecular y análisis bio-informático en la tipificación de levaduras nativas procedentes de diversos ambientes. *Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica*.
- Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*; 4 (4): 406-425.
- Sanchez R, Serra F, Tárraga J, Medin I, Carbonell J, Pullido L, de María A, Capella-Gutierrez S, Huerta-Cepas J, Gabaldon T, Dopazo J, Dopazo H. (2011). Phylemon 2.0: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics, phylogenomics and hypotheses testing. *Nucleic Acids Res*; 39 (2):470-474.

- Saúl García Y, Hernández Valles R. (2014). Aislamiento de *Candida* spp. en ambiente y personal que labora en una unidad de cuidados intensivos. *Rev Soc Venez Microbiol*; 34 (1): 27-32.
- Sayyada GN, Shazia TH, Shahana UK. (2010). Use of CHROMagar *Candida* for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan J Med*; 5: 10.3402/ljm.v5i0. 2144.
- Scherer S, Stevens DA. (1987). Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol*; 25 (4): 675-679.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*; 109 (16): 6241-6246.
- Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, et al. (2002). Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol*; 40 (4): 1244-1248.
- Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. (2009a). Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol*; 47 (8): 2392-2397.
- Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. (2009b). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol*; 47 (7): 681-689.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*; 36 (2): 288-305.
- Singaravelu K, Gácsér A, Nosanchuk J. (2014). Genetic determinants of virulence – *Candida parapsilosis*. *Rev Iberoam Micol*; 31 (1): 16-21.
- Sobel JD. (2007). Vulvovaginal candidosis. *The Lancet*; 369 (9577): 1961-1971.

- Solé Ollé M. (2006). *Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden onygenales*. Tesis de doctorado, Universitat Rovira i Virgili.
- Souza ACR, Ferreira RC, Gonçalves SS, Quindós G, Eraso E, Bizerra FC, et al. (2012). Accurate identification of *Candida parapsilosis* (sensu lato) by use of mitochondrial DNA and real-time PCR. *J Clin Microbiol*; 50 (7): 2310-2314.
- Sternberg C, Bjarnsholt T, Shirliff M. (2014). Methods for dynamic investigations of surface-attached in vitro bacterial and fungal biofilms. En: *Microbial Biofilms*. Humana Press, New York, NY, pp. 3-22.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*; 56 (1): 187-209.
- Takahashi K, Nei M. (2000). Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and Maximum Likelihood when a large number of sequences are used. *Mol Biol Evol*; 17 (8): 1251-1258.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101(30): 11030-11035.
- Tapia C, Correa N. (2015). *Candida parapsilosis* complex. *Rev Chil Infect*; 32 (5): 569-570.
- Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*; 43 (1): 284-292.
- Tavanti A, Hensgens LA, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. (2007). Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol*; 45 (5): 1455-1462.
- Tay ST, Na SL, Chong J. (2009). Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. *J Med Microbiol*; 58 (2): 185-191.
- Tiraboschi IN, Pozzi NC, Farías L, García S, Fernández NB. (2017). Epidemiología, especies, resistencia antifúngica y evolución de las candidemias en un hospital

- universitario de Buenos Aires, Argentina, durante 16 años. *Rev Chil Infect*; 34 (5): 431-440.
- Toro Crespo MD. (2011). Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área hospitalaria del HU Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009. Tesis de doctorado en Farmacia de la Universidad de Sevilla.
- Torres Rodríguez JM, Palacio Herranz A, Guarro Artigas J, Negroni Briz R, Pereiro Miguens M. (1993). Micología Médica. Ed. Masson, S.A.; cap. 19: pp. 191-201, cap. 25: pp. 247-255, cap. 27: pp. 263-271.
- Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. (2006). Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*; 27(5): 359-366.
- Tosun I, Akyuz Z, Guler NC, Gulmez D, Bayramoglu G, Kaklikkaya N, et al. (2013). Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. *Med Mycol*; 51 (5): 483-492.
- Trabasso P, Matsuzawa T, Fagnani R, Muraosa Y, Tominaga K, Resende MR, et al. (2015). Isolation and drug susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato and other species of *C. parapsilosis* complex from patients with blood stream infections and proposal of a novel LAMP identification method for the species. *Mycopathologia*; 179 (1-2): 53-62.
- Treviño-Rangel R, González-González J, Garza-González E, González G. (2012a). *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. *Medicina Universitaria*; 14 (56): 157-165.
- Treviño-Rangel R.DJ, Garza-González E, González JG, Bocanegra-García V, Llaca JM, González GM. (2012b). Molecular characterization and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* species complex of clinical isolates from Monterrey, Mexico. *Med Mycol*; 50 (7): 781-784.
- Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*; 21 (4): 606-625.



- Valach M, Prysycz LP, Tomaska L, Gacser A, Gabaldón T, Nosek J. (2012). Mitochondrial genome variability within the *Candida parapsilosis* species complex. *Mitochondrion*; 12 (5): 514-519.
- Valentín A, Cantón E, Pemán J, Quindós G. (2007). Actividad in vitro de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. *Rev Iberoam Micología*; 24 (4): 272-277.
- van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. (2009). *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol*; 35 (4): 283-309.
- Vijaya D, Dhanalakshmi TA, Kulkarni S. (2014). Changing trends of vulvovaginal candidiasis. *J Lab Physicians*; 6(1): 28-30.
- Villalobos A, Escobar M, Santerre A. (2005). Extracción de DNA y amplificación de secuencias de ITS en psilocybe (agaricales, fungi). *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*, 548-553.
- Villalobos JM, Castro JA, Avilés A, Peláez MC, Somogyi T, Sandoval L. (2016). *Candida parapsilosis*: principal causa de candidemia en un hospital de referencia para adultos de Costa Rica. *Rev Chil Infectol*; 33 (2): 159-165.
- Villanueva Reyes J, Arenas R. (2007). Candidiasis mucocutánea. Una revisión. *Rev Mex Micol*; 25: 91-104.
- Wang H, Xu Z, Gao L, Hao B. (2009). A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC Evol Biol*; 9 (1): 195, doi: 10.1186/1471-2148-9-195.
- Weems Jr JJ. (1992). *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis*; 14 (3): 756-766.
- White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor JL. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*; 18 (1): 315-322.

- Won Song J, Hee Shin J, Hyeon Shin D, Jung SI, Cho D, Jung Kee S, et al. (2005). Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med Mycol*; 43 (7): 657-661.
- Yong PVC, Chong PP, Lau LY, Yeoh RSC, Jamal F. (2008). Molecular identification of *Candida orthopsilosis* isolated from blood culture. *Mycopathologia*; 165 (2): 81-87.
- Zambrano MA, Londoño LS. (2006). Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad. *Univ Odontológica*; 25 (57): 19-25.
- Zaoutis TE, Foraker E, McGowan KL, Mortensen J, Campos J, Walsh TJ, Klein JD. (2005). Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric patients: a survey of 4 children's hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 52 (4): 295-298.
- Ziccardi M, Souza LO, Gandra RM, Galdino ACM, Baptista AR, Nunes APF, et al. (2015). *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. *Int J Med Microbiol*; 305 (8): 848-859.

## **ANEXO I**

### **MEDIOS DE CULTIVOS, SOLUCIONES, LÍQUIDOS DE MONTAJE Y COLORANTES**

#### Agar Sabouraud glucosado (AGS) Laboratorios Britania

Pluripeptona	10 g/L
Glucosa	40 g/L
Cloranfenicol	0,05 g/L
Agar	15 g/L

pH: 5,6 ± 0,2 a 25 °C

Los componentes se mezclaron y se distribuyeron en tubos de ensayo de 15 mL conteniendo 10 mL del mismo. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión, durante 15 min.

#### - Agar Sabouraud glucosado 20

Pluripeptona	10 g/L
Glucosa	20 g/L
Cloranfenicol	0,05 g/L
Agar	15 g/L

pH: 5,6 ± 0,2 a 25 °C

Los componentes se mezclaron y se distribuyeron en tubos de ensayo de 15 mL conteniendo 10 mL del mismo. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión, durante 15 min.

#### - Agar hongos y levaduras (AHL)

Extracto de levadura	5 g/L
Glucosa	20 g/L
Cloranfenicol	0,1 g/L
Agar	15 g/L

Los componentes se mezclaron y se distribuyeron en tubos de ensayo de 15 mL conteniendo 10 mL del mismo. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión, durante 15 min.

- CHROMagar Candida<sup>®</sup>

Peptona de soja	10,2 g/L
Mezcla cromogénica	22 g/L
Cloranfenicol	0,5 g/L
Agar	15 g/L
pH final 7,4 ± 0,2	

Se prepara según instrucciones del fabricante. Puede mantenerse varios días en heladera al abrigo de la luz. Las placas sembradas se incuban a 28 °C - 35 °C durante 48 a 72 horas.

- Agar leche con Tween 80 (AL)

Agar	20 g/L
Tween 80	10 ml/L
Leche	10 ml/L

Los componentes se mezclaron, se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión, durante 15 min, excepto la leche descremada en polvo (estéril) que fue agregada a 56 °C al medio estéril. Luego se coloca el medio de cultivo estéril en portaobjetos, en cámara húmeda.

Se utiliza para observar la producción de clamidosporas y tubo germinativo de *Candida albicans* y *C. dubliniensis* y del resto de las especies de *Candida*. Esta técnica tiene la ventaja que realiza dos métodos diagnósticos en una misma prueba. También permite ver producción o ausencia de pseudohifas y la disposición del micelio y blastosporas.

- Caldo Sabouraud glucosa (CGS)

Neopeptona (Difco)	10 g/L
Glucosa (Cicarelli)	40 g/L

Los componentes se mezclaron y se distribuyeron en tubos de ensayo. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión, durante 15 min.

- Caldo enriquecido (CE)

Extracto de levadura	0,01 g/L
Peptona	0,02 g/L
Dextrosa	0,02 g/L

Los componentes se mezclaron y se distribuyeron en tubos de ensayo de 15 mL conteniendo 10 mL del mismo. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión, durante 15 min.

- Azul de lactofenol

Fenol	0,1 gr
Acido láctico	8 mL
Agua destilada	10 mL
Glicerina	20 mL
Azul de anilina	0,5 g

Se disuelve calentando ligeramente en fenol, el ácido láctico, el agua destilada y la glicerina; se deja enfriar y se añade el azul de anilina. Se deja reposar durante 24 horas. Se filtra y se guarda en botella de color topacio.

- Tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS)

NaCl	8,0 g/L
KCl	0,2 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g/L

Se disuelven las sales en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,4 con HCl.

Añadir agua destilada hasta un volumen total de 1 L.

Safranina

Safranina	0,25 g
Etanol Absoluto	10 mL
Agua destilada	100 mL

Se disuelve el colorante en el agua.

- Solución saturada de sacarosa con eugenol y polietilenglicol 400 (SSS)

Solución saturada de azúcar (SSS) adicionada de eugenol (E) y polietilenglicol 400 (PEG): se preparó con 250 g de azúcar común a la que se agregó 100 mL de agua destilada. Se calentó a baño maría hasta su completa disolución, obteniéndose así un jarabe transparente. Una vez que adquirió temperatura ambiente se le agregó 0,4 cc de eugenol y 0,4 cc de PEG 400. La actividad agua de la solución de ensayo fue:  $a_w$ : 0,65 ± 0,02.

## **ANEXO II**

### **PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN, A PARTIR DE HONGOS LEVADURIFORMES**

Filtrar al micelio y lavar con 1 mL de solución de lavado conteniendo TRIS HCl 0,1 M, EDTA 0,02 M

- 1- Centrifugar a 12000 r.p.m. por 3 minutos. Descartar el sobrenadante.
- 2- Titular y macerar el tejido con una varilla de vidrio o plástico en presencia de 800  $\mu$ L de buffer de extracción compuesto por Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1,5M, EDTA 50 mM pH 8, proteinasa K 0,1 mg/ml,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, SDS 2%.
- 3- Incubar a 60  $^{\circ}$ C por una hora. Mezclar mediante vórtex cada 10 minutos.
- 4- Centrifugar por 5 minutos a 12000 r.p.m. Recuperar el sobrenadante. Registrar el volumen recuperado.
- 5- Adicionar igual volumen de cloroformo: alcohol isopropilico (24:1). Mezclar mediante vortex por 15 segundos.
- 6- Centrifugar por 3 min a 12000 r.p.m. Recuperar el sobrenadante.
- 7- Adicionar 200  $\mu$ L de acetato de potasio 3 M, mezclar por inversión.
- 8- Centrifugar por 3 minutos a 12000 r.p.m. Recuperar el sobrenadante.
- 9- Precipitar el ADN con 1 mL de etanol 100 %.
- 10- Dejar precipitando 24 h.
- 11- Centrifugar por 5 minutos a 12000 r.p.m. Eliminar el etanol.
- 12- Lavar el precipitado con 1 mL de etanol 70 %.
- 13- Centrifugar por 5 min a 12000 r.p.m. Eliminar el etanol, dejar secando a temperatura ambiente.
- 14- Resuspender en agua destilada libre de nucleasas.
- 15- Almacenar a -20  $^{\circ}$ C.

### **ANEXO III**

### **IMÁGENES FOTOGRÁFICAS**



**Figura Nro. 15: Centrifuga Presvac DCS 16-RV**



**Figura Nro. 16: Termociclador Equipo Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd. Life Express Thermal Cycler**



**Figura Nro. 17: Cuba electroforética SubSystem 70 modelo E-0310**





**Figura Nro. 18: Transiluminador**



**Figura Nro. 19: Incubadora con agitación orbital  
(Thermolyne ROSI 1000 Reciprocating Orbital Shaking Incubator)**



**Figura Nro. 20: Lector de Elisa a 490 nm (Rayto RT-2100C Microplate Reader)**