

ADHERENCIA DE *CANDIDA* A DISPOSITIVOS MÉDICOS DE USO RUTINARIO EN PACIENTES HOSPITALIZADOS

González Prado Hugo Israel (1), Cuéllar Cruz Mayra (2)

1 Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato. hi.gonzalezprado@ugto.mx

2 Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. mcuellar@ugto.mx

Resumen

La adhesión es el primer paso para que las especies de *Candida* puedan formar biopelículas en dispositivos médicos implantados en el hospedero humano. En este proceso la composición fisicoquímica del biomaterial así como las proteínas de pared celular (PPC) del patógeno juegan un papel preponderante. Sin embargo, aun cuando se han identificado *in vitro* PPC que participan en la formación de biopelículas mediante la adhesión a ciertos biomateriales, poco es conocido acerca de las PPC que participan en la adhesión a dispositivos médicos de uso rutinario. Por ello, en el presente trabajo se planteó cuantificar las PPC de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* a diferentes dispositivos médicos, así como evaluar la capacidad de adhesión de estos patógenos. Nuestros resultados muestran que las cuatro especies de *Candida* se adhieren con mayor avidez a los biomateriales fabricados de PVC, después a los de poliuretano y finalmente a los de silicón. Resultados que sugieren que las PPC son utilizadas por las especies de *Candida* como un primer paso para que puedan adherirse a la superficie del dispositivo, para permitir después que otras PPC como las adhesinas con ancla de glicosilfosfatidilinositol puedan crear uniones covalentes con el biomaterial, generando de esta manera una fuerte adherencia entre el patógeno y el dispositivo médico que conllevará a la formación de biopelículas y provocará en el hospedero humano algún tipo de candidiasis invasiva.

Abstract

Adhesion is the first step for *Candida* species to form biofilms on medical devices implanted in the human host. Both the physicochemical nature of the biomaterial and cell wall proteins (CWP) of the pathogen play a determinant role in the process. While it is true that some CWP have been identified *in vitro*, little is known about the CWP of pathogenic species of *Candida* involved in adhesion. On this background, we considered it important to quantify CWP of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* in adhesion to different medical devices. Our results indicate that the four species strongly adhere to polyvinyl chloride (PVC) devices, followed by polyurethane and finally by silicone. Results presented here suggest that these CWP participate in the initial event of adhesion and are probably followed by other proteins that covalently bind to the biomaterial thus providing conditions for biofilm formation and eventually the onset of infection.

Palabras Clave

Candida; Biopelículas; Adherencia; Dispositivos médicos; XTT

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Candida* son hongos que normalmente forman parte de la microbiota en individuos sanos. Sin embargo, cuando el sistema inmune del hospedero se encuentra comprometido, estos hongos se comportan como hongos patógenos oportunistas, y pueden colonizar órganos internos causando candidiasis invasiva (CI) [1]. Las tasas de mortalidad asociadas con CI en pacientes inmunodeprimidos es alta, que van desde el 30 al 40 % [2]. *Candida albicans* es la principal especie identificada en este tipo de infecciones, seguida por *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* [3, 4]. Los factores de virulencia y/o patogenicidad para que *Candida* pueda colonizar al hospedero involucra a las adhesinas, hidrolasas, estrés oxidativo, la capacidad de formar biopelículas, entre otras. De estos factores de virulencia, la formación de biopelículas ha tomado un interés importante porque ha sido asociada con infecciones nosocomiales, es decir con altas tasas de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados.

El primer paso en la formación de biopelículas para cualquier microorganismo es la adherencia a la superficie de biomateriales (dispositivos médicos) o células hospederas, seguido de la duplicación celular y finalmente la obtención de la biopelícula madura [5,6]. Las infecciones relacionadas con hongos, en este caso con especies de *Candida* son a menudo fuertemente vinculadas a catéteres y a dispositivos médicos [6].

Adherencia de *Candida* a biomateriales

Diversos dispositivos médicos implantados en pacientes proveen los substratos ideales para la colonización de *Candida* y la posterior formación de la biopelícula. Las especies de *Candida* pueden formar biopelículas en prácticamente cualquier biomaterial, como son dispositivos cardiovasculares del sistema nervioso central y del aparato urinario, fabricados con distintos materiales como polimetilmetacrilato, elastómero de silicona, poliuretano, cloruro de polivinilo, polipropileno y poliestireno entre otras [5].

Las infecciones nosocomiales frecuentemente se asocian con catéteres y dispositivos médicos. *C. albicans* es el patógeno aislado con mayor frecuencia en niños, neonatos y en unidades de cuidados intensivos y se asocia principalmente con el uso de catéteres venosos centrales [6]. Es por ello que resulta de gran importancia identificar los dispositivos médicos con mayor susceptibilidad a la adherencia de *C. albicans* y otras especies patógenas.

El objetivo del presente estudio fue caracterizar *in vitro* la dinámica temporal de la adherencia de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* en diferentes dispositivos médicos en presencia de metales pesados, con la finalidad de evaluar si aun cuando las especies de *Candida* se encuentran en una situación adversa son capaces de formar biopelículas. Para cumplir el objetivo planteado, se determinó la adherencia de las cuatro especies de *Candida* a varios dispositivos médicos por medio del ensayo del 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5[(fenilamino)-carbonil]-2H hidróxido de tetrazolio (XTT) y por medio de la cuantificación de proteínas de la pared celular (PPC) por el método de Lowry.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de dispositivos médicos

Los biomateriales en los cuales se evaluó la formación de biopelículas de las cuatro especies de *Candida* fueron dispositivos médicos de uso hospitalario con la siguiente composición química: (i) cloruro de polivinilo (PVC): equipo para venoclisis de pacientes pediátricos (MMC), catéter de alimentación nasogástrica para adultos ADK-30 y equipo para venoclisis de pacientes adultos; (ii) silicón: sonda de nelatón K-732, y sonda de alimentación K-732; (iii) poliuretano: catéter intravenoso para adultos FB.

Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. Krusei* y *C. parapsilosis* fueron crecidas en medio YPD (extracto de levadura 1% BD, Bacto peptona 2%

BD) suplementado con dextrosa 2%, (Sigma-Aldrich).

Formación de biopelículas

Las cuatro especies de *Candida* fueron crecidas en medio nuevo YPD por 48 h a 28°C. El cultivo se llevó a una $DO_{600\text{ nm}}$ 0.03 para llevar las cepas a fase estacionaria. Cumplido el lapso de tiempo, se ajustó la $DO_{600\text{ nm}}$ a 1.0 con 100 μL de cepa y estas fueron llevadas a un volumen de 100 ml de medio específico. Cada medio de cultivo fue suplemento con 1 mM del metal determinado. Posteriormente se colocaron y distribuyeron 200 μL de cada medio por cada dispositivo médico para cada especie, y se permitió la formación de la biopelícula. Una vez formada la biopelícula en los distintos biomateriales, los dispositivos médicos fueron sometidos a un lavado exhaustivo con CaCl_2 10 mM para remover las células planctónicas, que no forman parte de las biopelículas. El ensayo se realizó por triplicado.

Cuantificación del metabolismo celular por medio del ensayo del XTT

Los dispositivos médicos fueron colocados en las placas de poliestireno nuevas y estériles. Se preparó una solución de XTT a una concentración de 0.5 mg/mL en regulador fosfato salino (PBS, Sigma-Aldrich), al mismo tiempo se preparó una solución de menadiona (Sigma-Aldrich) 1 mM en dimetilsulfóxido (DMSO), estas dos soluciones se mezclaron agregando 1 μL de menadiona por cada 1 mL de XTT. A las biopelículas formadas previamente en diferentes medios de cultivo, se le añadieron 200 μL de la solución XTT/menadiona y enseguida la placa se colocó en el lector de placas (Varioskan Flash, Thermo Scientific) para cuantificar el compuesto reducido de la sal del tatrazolio llamada formazan. La lectura se efectuó a 492 nm durante 105 min para permitir la reacción de reducción de la molécula de tatrazolio.

Análisis estadístico

Las lecturas espectrofotométricas obtenidas del ensayo XTT se promediaron de acuerdo al dispositivo médico analizado. Los resultados

quedaron expresados en función de la reducción del XTT a 492 nm.

Cuantificación de proteínas de la pared celular por el método de Lowry

Los dispositivos médicos de las cajas petri fueron colocados en cajas petri nuevas y estériles. Las células sésiles fueron raspadas y lavadas con agua desionizada estéril. Las cuales, se colocaron en tubos eppendorf y se procedió a realizar la extracción de proteínas de pared celular de acuerdo al protocolo previamente descrito por Cuéllar-Cruz et al., 2013 [5]. La cuantificación de PPC se realizó mediante el ensayo modificado de Lowry con el kit RC-DC™ (BIO-RAD). En la cuantificación se utilizó una solución estándar de BSA a 1.35 mg/mL para la construcción de la curva estándar, la cual fue elaborada a partir de 10 diluciones de la solución estándar en la solución reguladora (1% PMSF, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol), aforados a 1 mL. La lectura fue realizada a 750 nm en un espectrofotómetro (Genesys, Thermo Scientific).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de evaluar la capacidad de adhesión y formación de biopelículas por cada especie de *Candida* a los distintos dispositivos médicos en presencia de los distintos metales, se analizó la habilidad de formar biopelículas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* a seis dispositivos médicos con distinta composición fisicoquímica. Como se observa en la Figura 1 en presencia del metal 1, *C. albicans* es capaz de formar biopelículas preferentemente en el catéter de venoclisis MMC, seguido de la sonda de alimentación K-732, catéter de alimentación ADK-30, catéter venoclisis FB, sonda gastrointestinal y sonda de nelatón K-732. *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* al igual que *C. albicans* se adhieren con mayor avidez al catéter de venoclisis MMC y en menor proporción a la sonda nelatón K-732. Interesantemente, en presencia de cualquier metal pesado las cuatro especies de *Candida* presentan la mayor adherencia al catéter de venoclisis MMC fabricado de cloruro de polivinilo (PVC) y al final a la sonda nelatón K-732 fabricada de silicón. Datos en

conjunto que muestran que las cuatro especies de *Candida* tienen una mayor capacidad de adherirse y formar biopelículas a los dispositivos fabricados de PVC que a los elaborados de silicón o poliuretano. Una posible explicación a la avidez de *Candida* de adherirse y formar biopelículas en los biomateriales fabricados de PVC sobre biomateriales fabricados con otros compuestos químicos, se debe a que en la adherencia tanto la composición química como física están implicadas. Así, los resultados encontrados en el presente trabajo son acordes a lo encontrado en otros trabajos en donde se ha reportado que la habilidad de estos patógenos por adherirse preferentemente a los biomateriales de PVC que a los fabricados de silicón, poliuretano, poliestireno, teflón, entre otros, se debe a que la composición fisicoquímica del PVC les favorece, ya que se ha mostrado que el PVC presenta una rugosidad mayor con respecto a estos materiales que presentan una superficie más lisa [7, 8], así como una alta hidrofobicidad. Características que permiten la perfecta combinación entre composición química y topografía de la superficie del PVC para que los microorganismos sean capaces de adherirse y formar las biopelículas a los biomateriales fabricados con esta composición.

Nuestros resultados también muestran que al parecer las especies de *Candida* son capaces de formar biopelículas aún en presencia de metales pesados, como se muestra en presencia de los metales 1, 2 y 3 (Figura 2).

En la adherencia, además de las propiedades físicas y químicas de los biomateriales, las PPC participan de manera preponderante en permitir que las especies de *Candida* se adhieran a los dispositivos médicos y se puedan formar las biopelículas. Por ello, se realizó la extracción y cuantificación de las PPC de las células sésiles de *Candida* en presencia de los tres metales. Como se muestra en la figura 2 *C. glabrata* es la especie en donde se observa una mayor concentración de PPC en presencia de los tres metales analizados. Mientras, las células sésiles de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* muestran una muy baja concentración de PPC en presencia de los tres metales (Figura 2).

Resultados que muestran que posiblemente en el caso de la baja concentración observada en tres especies pudiera deberse a la cantidad mínima de

material celular recuperado de las biopelículas formadas sobre los dispositivos médicos que poseen una extensión superficial reducida para su crecimiento. Por lo que será necesario realizar los experimentos varias veces. Estudios posteriores en los que se podría modificar la concentración de metal u optar por otro tratamiento.

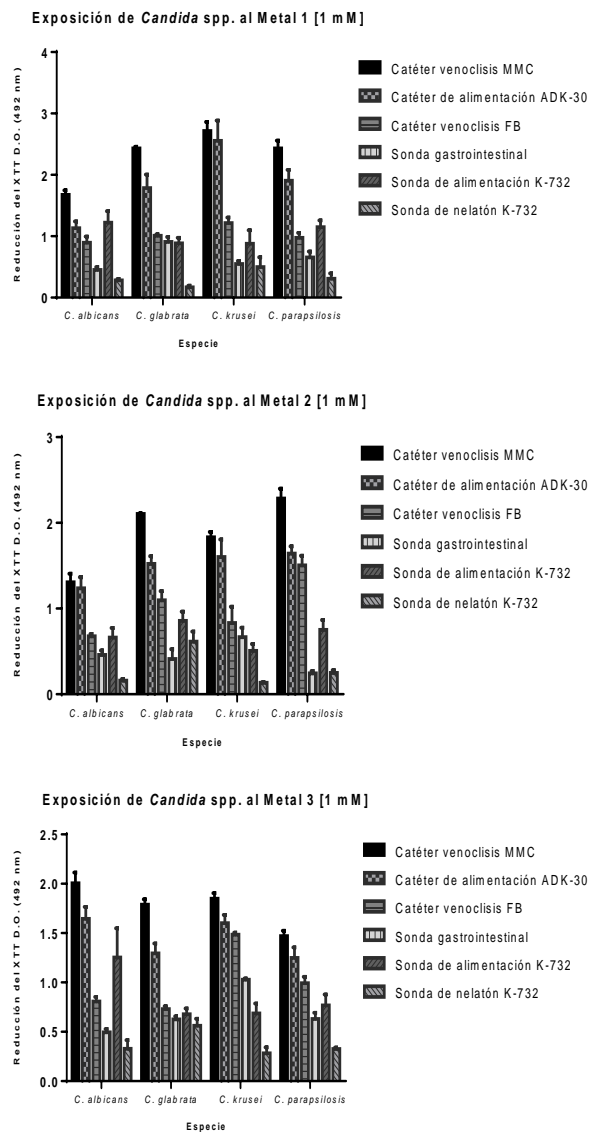


FIGURA 1: Ensayo de reducción del XTT por las células sésiles de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* en dispositivos médicos en presencia de los tres metales analizados [1 mM].

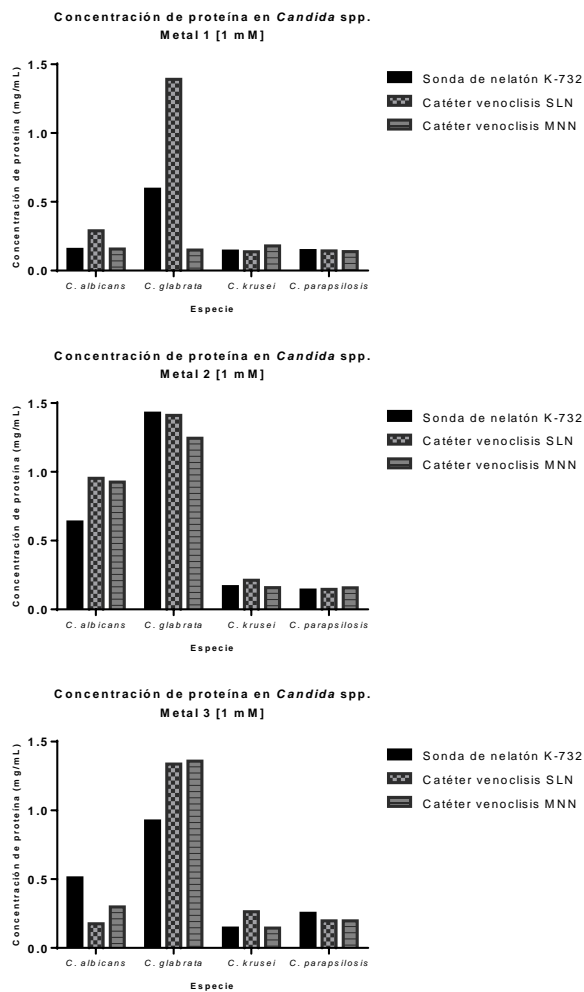


FIGURA 2: Concentración de proteína (mg/mL) de la pared celular de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* en dispositivos médicos con presencia de los tres metales analizados [1 mM].

CONCLUSIONES

La adherencia y formación de biopelículas de *Candida* a dispositivos médicos en presencia de los tres metales pesados a una concentración de 1 mM al parecer es factible, aunque se requiere realizar estudios completos que permitan conocer si los resultados preliminares encontrados son ciertos. La avidez de *Candida* a los biomateriales de PVC, indica que los pacientes que utilizan dispositivos médicos fabricados con esa

composición fisicoquímica podrían ser más susceptibles a contraer una infección por *Candida*.

AGRADECIMIENTOS

Uno de los autores HIGP, agradece a la DAIP de la Universidad de Guanajuato, a través del programa "Veranos de Investigación UG 2016" por la beca recibida para la realización de la estancia. A la Q.F.B María Cristina León García por su gran colaboración en el proceso experimental.

REFERENCIAS

- [1] Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Ruiz-Baca, E., & Zazueta-Sandoval, R. (2014). Differential Response of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to Oxidative and Nitrosative Stresses. *Current Microbiology*, 69(2) 1-9.
- [2] Pfaller, M.A. & Diekema, D.J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* (20), 133–163.
- [3] Miceli, M.H., Diaz, J.A. & Lee, S.A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* (11) 142–151.
- [4] Miramón, P., Kasper, L. & Hube, B (2013). Thriving within the host: *Candida* spp. interactions with phagocytic cells. *Med Microbiol Immunol*. doi:10.1007/s00430-013-0288-z.
- [5] Cuéllar-Cruz, M., Vega González, A. & Mendoza-Novelo, B., et al (2012). The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, (31) 2513–2527.
- [6] Castrillón-Rivera, L. E., Palma-Ramos, A. & Padilla-Desgarenes, M. C. (2013). Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev Mex*, 57(5), 350-357.
- [7] Estivill, D. et al. (2011). Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of Microbiological Methods*. 238-242.
- [8] Frade & Arthington-Skaggs BA. (2011). Effect of serum and Surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. *Mycoses*. 54:e154-e162.