

Pinilla Bermúdez, Gladys**
 Esteban Muñoz, Julián***
 Navarrete Ospina, Jeannette*
 Muñoz Molina, Liliana Constanza*
 Lindarte Celis, Daniela Alejandra*
 Molano Aponte, Jeimmy Alexandra*
 Montes Castillo, Jessica María*

Herramientas para el análisis de mecanismos de resistencia de *Candida albicans*

Candida albicans resistance mechanisms, tools for its analysis

Fecha de aceptación: mayo 2018

Resumen

Candida albicans es una levadura comensal que forma parte de la microbiota humana, pero que en pacientes inmunosuprimidos puede causar infecciones cutáneas, subcutáneas y sistémicas. Tiene la capacidad de formar una biopelícula, mediante la producción de polisacáridos extracelulares que le permite adherirse a prácticamente cualquier tipo de superficie, vivir en comunidades y evadir la acción del sistema inmunológico, aumentando considerablemente su resistencia a moléculas antimicrobianas en comparación con microorganismos en estado libre o planctónico. El fluconazol y la anfotericina B son los principales medicamentos usados contra la infección causada por este microorganismo; sin embargo, la resistencia a estos antifúngicos y otros azoles constituye un problema clínicamente importante.

En esta revisión se destaca la proteómica como una herramienta alternativa para el análisis de los mecanismos de resistencia de *C. albicans*.

Palabras clave: *Candida albicans, mecanismos de resistencia, proteómica.*

Abstract

Candida albicans is a commensal yeast of the human microbiota, but that in immunosuppressed patients can cause localized and systemic infections. It has the ability to form a biofilm, through the production of extracellular polysaccharides that allow it to adhere to virtually any type of surface, live in communities and evade the action of the immune system. This capacity increases its resistance to antimicrobial molecules compared to microorganisms in free or planktonic state. Fluconazole and amphotericin B are the main drugs used against the infection caused by this microorganism; however, resistance to these antifungals and other azoles is a growing problem.

In this review, proteomics is highlighted as an alternative tool for the analysis of *C. albicans* resistance mechanisms.

Keywords: *Candida albicans, resistance mechanisms, proteomics.*

Introducción

Candida es una levadura que se encuentra en el ser humano como flora normal en la piel y las mucosas, que a su vez tiene la capacidad de ser patógena debido a la presencia de factores predisponentes que le permiten la diseminación de ésta en el hospedero. Las infecciones causadas por esta levadura pueden ser asintomáticas y estar localizadas en áreas principalmente como boca, conducto gastrointestinal y vagina.¹

La alta incidencia de micosis causadas por *Candida* spp. hace necesario el diagnóstico precoz para realizar un tratamiento oportuno, ya que este hongo ha generado mecanismos de resistencia frente a los fármacos comunes en el

tratamiento terapéutico de candidiasis. Teniendo en cuenta que dicha resistencia se ha relacionado con la formación de biopelícula, la cual se considera un factor de persistencia de la infección, se están desarrollando alternativas terapéuticas que buscan inhibir su formación.¹

Actualmente, las especies de *Candida* se encuentran entre los principales responsables de micosis oportunistas. De éstas, la mayor parte de infecciones fúngicas son producidas por *Candida albicans* (más de 50%). Entre las diversas infecciones, en la actualidad la candidiasis vulvovaginal representa un problema de salud pública por su

* Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia.

** Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Colombia.

Correspondencia: Dra. Gladys Pinilla Bermúdez
 Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Calle 28 núm. 5B-02, Bogotá, Colombia.

Dirección electrónica: gpinillab@unicolmayor.edu.co
 Teléfono: 2418800, ext. 281

recurrencia, frecuencia y difícil tratamiento. Esto último posiblemente esté ligado a la producción de biopelícula, pues es su crecimiento adherida a superficie lo que le confiere esencialmente la mayor resistencia a los tratamientos como polienos, azoles y equinocandinas. Por ello es imperativo contar con una identificación pronta y precisa, no sólo para dar un tratamiento efectivo sino para prevenir la aparición de cepas resistentes a fármacos.²

Se ha encontrado que al menos siete especies causan patología, por lo que es importante la identificación y determinación de la especie, ya que la terapéutica puede ser diferente debido a que es posible que cada especie presente distintos mecanismos de resistencia a los antimicóticos de uso común.³

La candidiasis vulvovaginal (cv) es un problema actual de salud en el mundo, que afecta a todos los estratos sociales. Los mecanismos patogénicos de esta infección no son totalmente conocidos, pero el estado de crecimiento de *Candida* adherida a una superficie juega un papel importante.⁴

En diversos estudios se destaca que muchas bacterias y hongos se encuentran predominantemente como comunidades adheridas a la superficie, referidas como biopelículas. La formación de biopelícula se ve a menudo como una parte de su viabilidad, en la cual las células adquieren componentes fenotípicos que son distintos de sus homólogos planctónicos, por lo que la formación de biopelícula es crítica para numerosas interacciones que afectan la salud humana, y que dentro de estas interacciones se expresan una variedad de proteínas específicas que contribuyen en su formación y desarrollo.^{4,5}

Candidiasis

La candidiasis es una infección micótica producida por levaduras del género *Candida*, que va desde infección superficial, cutánea y mucocutánea, hasta una infección de

tipo sistémica. Se encuentra clasificada dentro de las micosis oportunistas, pues este microorganismo sólo resulta patológico en pacientes inmunocomprometidos, lo que les impide evitar el proceso de invasión.

En todo el mundo, la candidiasis presenta una incidencia y prevalencia alta, siendo la cuarta causa principal de infección del torrente sanguíneo a nivel nosocomial.^{6,7} Estos casos son producidos por al menos 17 especies diferentes de *Candida*; entre las más importantes encontramos *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. *Candida albicans* es la especie que se presenta con mayor frecuencia (40.3%), el resto corresponde a especies no *albicans*. *C. albicans* es la especie preponderante en las infecciones de mucosas (60-80%), especialmente en pacientes con irrupción en la barrera mucosa o cutánea, defectos en el número o función de los neutrófilos, disfunciones metabólicas o pacientes en edades extremas (recién nacidos, lactantes y adultos mayores).^{5,6,8,9} *Candida albicans* es la especie predominante que se aísla de infecciones causadas por el uso de dispositivos médicos (cuadro 1).¹⁰

La vulvovaginitis por *Candida* es responsable de un tercio de todos los casos presentados en mujeres en edad reproductiva; al menos 70% de ellas refiere haber tenido esta patología en algún momento de su vida, y alrededor de 8% de las mujeres presentaron infección recurrente producida con mayor frecuencia por *C. albicans* (al menos 90% de los casos).¹¹ La candidiasis vulvovaginal se presenta con un cuadro de incomodidad, irritación, ardor y prurito en la zona vulvovaginal. La mayor parte de las pacientes ignoran los síntomas hasta que el cuadro se autorresuelve, se tratan con terapéuticas alternativas o sin receta médica. En el examen clínico se puede encontrar eritema vulvar y vaginal, escoriaciones, secreción adherente blanca espesa e hinchazón, algunas pacientes tendrán poca o ninguna secreción. Para definir la etiología, es necesario realizar estudios complementarios que incluyen pruebas de humedad, prueba de olor y pH.⁸

Cuadro 1
Infecciones comunes asociadas a *Cándida albicans* que ocurren a través del uso de dispositivos médicos colonizados por una biopelícula o diseminados por la misma

Infecciones causadas por biopelícula de <i>Candida albicans</i>	
Aislada de dispositivos médicos	Infección diseminada a partir de biopelícula
Dentadura postiza	Infección en oído
Lentes de contacto	Placa dental
Tubos endotraqueales	Infección en piel
Catéter vascular central y periférico	Infección en pulmón
Catéter urinario	Septicemia
Stent cardiaco, marcapasos, válvula cardiaca	Infecciones vaginales por levaduras
Prótesis de cadera, implante ortopédico	Infección de una herida

Mecanismos patogénicos y de resistencia

Las micosis oportunistas causadas por *Candida albicans* se deben a sus factores de patogenicidad y virulencia. Esta levadura contiene en su pared celular manano (50 a 70%), quitina (20%), proteínas (3-6%), lípidos y carbohidratos (1-5%), los cuales son importantes en los procesos de adhesión al epitelio antes de invadirlo.¹²⁻¹⁵ Tiene la capacidad de obtener ácidos carboxílicos de cadena corta, producto del metabolismo de los azúcares, logrando un ambiente ácido óptimo para su crecimiento.

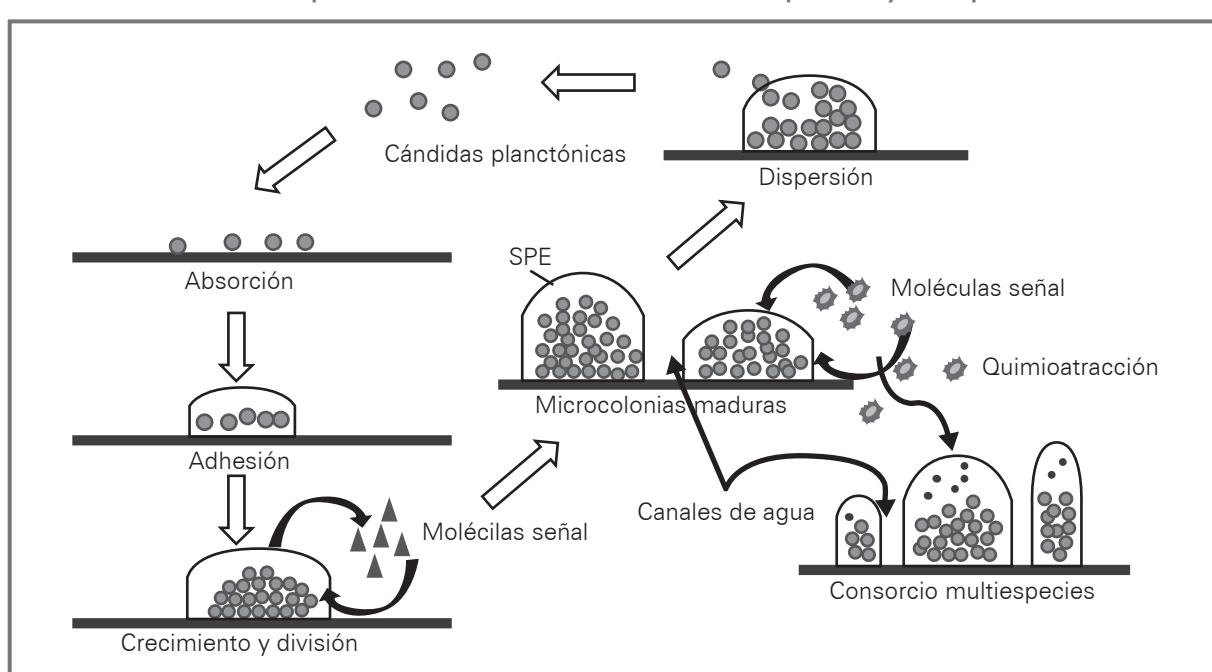
Candida albicans presenta una mayor capacidad de adherencia y penetración en relación con las otras especies de *Candida*, que se facilita por la transformación de levadura a micelio,¹⁶ lo que remarcó la patogenicidad de este microorganismo al tener la habilidad para cambiar su morfología entre levaduras, hifas y pseudohifas.¹⁷ Este agente es capaz de invadir tejidos y evadir la fagocitosis, por lo cual demuestra los diversos elementos de virulencia que se manifiestan en infecciones en tejidos profundos. Entre éstos se encuentran proteínas, esterasas, proteasas aspárticas secretoras, la capacidad de adherencia a las superficies de las células del hospedero, la producción de tubo germinativo y fosfolipasas.¹⁸⁻²² La fosfolipasa constituye un componente antigenérico principal, cuya producción

se asocia con una glicoproteína que se encuentra en la pared celular. Al ser una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de fosfolípidos, el mayor componente de las membranas celulares, se facilita su penetración a la célula.²³⁻²⁵

Entre sus mecanismos de resistencia el más estudiado y de mayor relevancia es la formación de biopelícula, la que se da en tres etapas básicas, de adhesión, crecimiento y maduración: 1) unión y colonización de células de levadura a una superficie, 2) crecimiento y proliferación de células de levadura para permitir la formación de una capa basal de células de anclaje, y 3) crecimiento de pseudohifas e hifas extensas concomitantes con la producción de matriz extracelular.^{26,27}

Se sabe que estructuralmente la biopelícula está constituida por tres componentes: la masa de células, la cual puede estar formada por una sola especie o por múltiples especies microbiológicas, los espacios intercelulares o canales, y la matriz extracelular que lo rodea compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias²⁸ (figura 1). La biopelícula es un mecanismo de resistencia intrínseca por la alta densidad de células dentro de ésta, los efectos de la matriz propios de la biopelícula, por la disminución de la tasa de crecimiento y limitación de nutrientes, la expresión de genes de resistencia, particularmente aquellos que codifican bombas de eflujo, y por la presencia de células "persistenter".

Figura 1
El ciclo de biopelícula. Proceso de formación de la biopelícula y su dispersión



De los aproximadamente 1 850 genes que presenta *C. albicans*, según García y colaboradores, 325 regulan para la formación y mantenimiento de la biopelícula. De éstos, 317 genes son expresados independientemente de la formación de hifa y 86 dependen del desarrollo micelial.²⁹ Diversos estudios destacan que la morfogénesis de la hifa es necesaria

para la formación de biopelícula, desde el contacto con la superficie celular comienza una regulación positiva de varios genes biosintéticos. Por ejemplo, existe una red transcripcional que controla el desarrollo de la biopelícula (*Efg1*, *Tec1*, *Bcr1*, *Brg1*, *Ndt80*, y *Rob1*), que son reguladores positivos principales de la transición de levadura a hifa. Cada uno de

éstos son necesarios para el desarrollo de biopelículas en modelos *in vitro* e *in vivo*.³⁰ Durante el desarrollo de la matriz del biofilm de *Candida* también se conoce que la proteasa S-aspartil se ha relacionado con el número de genes SAP en especies patógenas de *Candida*. Las proteinasas fúngicas pueden ayudar a evadir las defensas del huésped a través de la degradación directa de las moléculas asociadas con una enzima lisosomal intracelular y la activación del sistema del complemento.³⁰⁻³²

Una herramienta de análisis para evidenciar los mecanismos patogénicos de *Candida albicans* es a través del uso de la técnica de gene editing CRISPR-Cas9, la cual se puede observar en estudios recientes realizados con la finalidad de editar de forma precisa puntos específicos en el genoma de *Candida*, lo cual ha permitido dilucidar los distintos mecanismos genéticos que rigen la formación de la biopelícula y las fases que se requieren para llegar a ella.^{33,34}

El tratamiento de la candidemia se ha basado principalmente en antifúngicos que ahora incluyen tres clases principales de medicamentos: 1) azoles, los cuales se dividen en triazoles (fluconazol, voriconazol, itraconazol) e imidazol (miconazol, clotrimazol), 2) equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina) y 3) polienos (anfotericina B desoxicólico [AMB-d], anfotericina B liposomal [L-AMB], complejo lipídico anfotericina B [ABLC] y dispersión coloidal de anfotericina B [ABCD]) y nistatina.^{1,22} Sin embargo, actualmente nuevas alternativas terapéuticas como los péptidos antimicrobianos y las nanopartículas muestran resultados promisorios en ensayos clínicos.^{35,36}

Una de las razones principales por las que *C. albicans* presenta resistencia a los azoles es por la presencia de genes (MDR, CDR1, CDR2) codificantes para bombas de flujo de azoles; por otro lado, *C. albicans* tiene una organización particular en los lípidos asociados a la membrana. En una biopelícula precoz hay una mayor expresión de genes codificantes para ergosterol (ERG25 ERG6 y ERG16), lo que la hace más susceptible a los antimicóticos; a medida que la biopelícula madura, estos genes disminuyen y se elevan drásticamente los genes codificantes para bombas de flujo. De esta forma, un enriquecimiento o redistribución de esteroles en membranas de biopelícula explica su resistencia a los agentes antifúngicos derivados de azoles.^{37,38} La resistencia a las equinocandinas se asocia con mutaciones en los genes FKS (FKS1, FKS2 y FKS3) en *C. albicans* y especies relacionadas;²¹ la resistencia frente a los polienos como anfotericina B se relaciona con la matriz extracelular de la biopelícula, debido a la gran cantidad de proteínas y carbohidratos que la componen.²²

Análisis convencionales

Pruebas microbiológicas

Las pruebas microbiológicas en principio se utilizan para el diagnóstico. Usualmente se realiza un pretratamiento de las muestras cuyo objetivo es aumentar la probabilidad de observación y aislamiento de hongos mediante procedimientos como la centrifugación, que permite concentrar el hongo presente en dicha muestra, la lisis mediante centrifugación también favorece la liberación de los microorganismos in-

tracelulares en los hemocultivos en caso de la candidiasis sistémica, y la maceración en el caso de biopsias.³⁹

Las pruebas de rutina son las siguientes:

- a. Examen directo: con KOH o empleando tinciones (Gram, Wright, Giemsa o blanco de calcoflour) en el microscopio se observan blastoconidias redondas, ovaladas o alargadas de 4-8 mm, unigemantes o multigemantes, de pared delgada con pseudohifas o hifas, a excepción de *C. glabrata* que sólo produce blastoconidias.³⁹
- b. Histopatología: mediante el estudio de biopsias en las cuales se emplean tinciones como hematoxilina-eosina, plata metenamina de Gomori (Grocott-Gomori methenamine-silver stain, GMS) y ácido periódico-Schiff (PAS), que permiten diferenciar entre colonización e invasión.^{39,40}
- c. Cultivo: para observar el crecimiento del hongo se requiere de medios rutinarios para micología, como el agar Sabouraud, y en medios utilizados para bacterias (agar sangre, agar chocolate y caldos como el BHI). También están disponibles comercialmente medios cromógenos diferenciales, como el CHROMAGAR Candida® (Francia, Becton Dickinson) y Fungiscreen 4HTM (BioRad), los cuales permiten detectar infecciones causadas por varias especies de *Candida* que se deben usualmente incubar a 36 °C por un periodo de siete días. Igualmente están los medios específicos para *C. albicans*, CandiSelect® (Sanofi Diagnostic Pasteur, Francia), Fluoroplates® (Merck, Alemania), Murex CA 50® Diagnostic (Estados Unidos) y Albicans ID® (BioMerieux, Francia).^{37,41}

Las especies de este hongo crecen entre 48 y 72 horas, pero los cultivos se deben observar hasta por dos semanas. Las colonias son cremosas de color blanco o crema, brillantes o ligeramente opacas, de lisas a rugosas. Pueden observarse los filamentos que penetran en el agar.

Proteómica

La proteómica como nueva etapa de la investigación biológica busca determinar las propiedades funcionales y estructurales de las proteínas. Se han utilizado sistemas de espectrometría de masa (MALDI-TOF) para la identificación de *Candida* con una identificación acertiva hasta de 91%, utilizando menos de 30 min. Este sistema MALDI-TOF tiene una tasa de éxito de 100% para la identificación de aislamientos de *Candida*, frente al 92% utilizando métodos bioquímicos (VITEK 2 y API C AUX).^{42,43}

La disponibilidad de métodos específicos de diagnóstico para la detección e identificación de una candidemia depende del marco clínico. Para los hospitales pequeños que no atienden a pacientes trasplantados ni tratan a muchos pacientes hematológicos o inmunodeficientes, el requerimiento mínimo sugerido es la capacidad de evaluar la micromorfología de las colonias, complementada con la búsqueda de las principales especies de *Candida* utilizando el medio CHROMAGAR Candida, alguna prueba comercializada o un método simple para realizar las pruebas bioquímicas.⁴³ En los hospitales de tercer nivel, además de la micromorfología

y del CHROMagar Candida, se recomienda la identificación mediante sistemas comerciales manuales (API 20C, API 32C), sistemas comerciales automatizados (VITEK 2) o métodos moleculares. Se debe considerar el uso de métodos moleculares para la identificación de patógenos emergentes cuando las herramientas convencionales brinden una identificación inconsistente y cuando se debe identificar un brote de infecciones fúngicas.^{44,45}

En cuanto al análisis de las proteínas implicadas en la producción del biofilm, se han utilizado 2D-PAGE con geles teñidos por medio de sondas SYPRO leídas por medio de un generador de análisis fluorescente (como BioRad, BioSafe, Coomassie y Densitometer), y finalmente MALDI-TOF/MS usando Applied Biosystems Voyager-DE STR, comparando posteriormente los resultados obtenidos con las bases de datos del Stanford Genome Technology Center.^{43,45}

Con el creciente reconocimiento del papel de la biopelícula en la resistencia a los antifúngicos usados comúnmente en el tratamiento para la candidiasis, es necesario conocer los mecanismos por los cuales *Candida* forma la biopelícula. Usando herramientas proteómicas es posible dilucidar de mejor manera las proteínas de mayor importancia, como las proteínas de superficie, de las cuales alrededor de 70 son significativas en el crecimiento planctónico y en la formación de la biopelícula. Adicionalmente se han caracterizado ocho proteínas involucradas en el crecimiento y la formación de la biopelícula, seis reguladas positivamente y dos de forma negativa comparado con el crecimiento planctónico. Entre estas proteínas hay preponderancia de enzimas glucolíticas, con niveles más altos de expresión de la enolasa, alcohol deshidrogenasa y piruvato descarboxilasa encontradas en los extractos de biopelícula. Por esta razón, la biopelícula de *C. albicans* puede ser más resistente al alcohol y es posible que llegue a acumular etanol usando este mecanismo para defenderse de otros microorganismos a nivel competitivo, puesto que otros pueden no ser resistentes a altas concentraciones de alco-

hol. Adicionalmente, se conoce que durante el crecimiento planctónico *C. albicans* empieza a secretar las proteínas de la biopelícula, lo cual sugiere que la formación de la biopelícula comienza a darse incluso durante el crecimiento planctónico. Actualmente se conocen 34 proteínas secretadas desde la biopelícula y durante el crecimiento planctónico, por lo cual se ratifica la importancia de esta herramienta para el análisis de los mecanismos de resistencia de este microorganismo.⁴⁶

Otros avances diagnósticos

La prueba ELISA se ha utilizado para la detección de un antígeno de 65kDa producido por *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. La PCR para la detección de ácidos nucleicos ha brindado un método alternativo más rápido y más preciso que el hemocultivo para la detección de especies de *Candida* en las muestras de sangre. La PCR es una técnica con múltiples aplicaciones en el estudio de este agente infeccioso.⁴⁷⁻⁴⁹

La hibridación *in situ* fluorescente de ácido nucleico peptídico, o PNA-FISH, es un novedoso método molecular que ayuda a la rápida identificación de las especies clínicamente más relevantes de *Candida*. Después de hacer una tinción de Gram para comprobar la presencia de *Candida*, se pueden estudiar las preparaciones con PNA-FISH: se observará una fluorescencia que es específica para determinadas especies de *Candida*. A pesar de que es una prueba útil, la necesidad de emplear microscopía fluorescente, además del costo de los reactivos, limita el uso de este ensayo en los laboratorios clínicos en América Latina.⁵⁰⁻⁵³

La tinción fluorescente específica (FISH) de muestras de tejido basadas en inmunohistoquímica y marcadores genéticos se considera uno de los métodos más confiables para el diagnóstico de infección por *Candida*. La FISH es una técnica que utiliza sondas de oligonucleótidos fluorescentes que se unen específicamente a genes presentes en el genoma de la célula.⁵⁴

Referencias

- Moriyama, B., Gordon, L.A., McCarthy, M. et al., "NIH emerging drugs and vaccines for candidemia", *Public Access*, 2015, 57 (12): 718-733.
- Buitrón, R., Bonifaz, A., Amancio, O. et al., "Correlation between clinical characteristics and mycological tests in the vulvovaginitis by *Candida*", *Ginecol Obstet Mex*, 2007, 75 (2): 68-72.
- Ramage, G., Saville, S.P., Thomas, D.P. y López-Ribot, J.L., "*Candida* biofilms: an update", *Eukaryot Cell*, 2005, 4 (4): 633-638.
- Nobile, C.J. y Mitchell, A.P., "Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation", *Cell Microbiol*, 2006, 8 (9): 1382-1391.
- Mújica, M., Finquelievich, J., Jewtuchowicz, V. et al., "Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas", *Rev Argent Microbiol*, 2004, 36 (3): 107-112.
- Pfaller, M. y Diekema, D., "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem", *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20 (1): 133-163.
- Chen, L.-Y., Kuo, S.-C., Wu, H.-S. et al., "Associated clinical characteristics of patients with candidemia among different *Candida* species", *J Microbiol Immunol Infect*, 2013, 46 (6): 463-468.
- McCarty, T.P. y Pappas, P.G., "Invasive candidiasis", *Infect Dis Clin North Am*, 2016, 30 (1): 103-124.
- Kaaniche, F.M., Allela, R., Cherif, S. et al., "Invasive candidiasis in critically ill patients", *Trends Anaesth Crit Care*, 2016, 11: 1-5.
- Gulati, M. y Nobile, C.J., "*Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms", *Microbes Infect*, 2016, 18 (5): 310-321.
- Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M. y Corbellino, M., "Candidemia and invasive candidiasis in adults: a narrative review", *Eur J Intern Med*, 2016, 34: 21-28.
- Sánchez Hernández, E., "Diagnóstico de candidiasis y candidemia en neonatos", trabajo de grado par optar por el título de bacteriólogo, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2009, disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis332.pdf>.

13. Schwarzmüller, T., Ma, B., Hiller, E., Istel, F., Tscherner, M., Brunke, S. et al., "Systematic phenotyping of a large-scale *Candida glabrata* deletion collection reveals novel antifungal tolerance genes", *PLOS Pathog*, 2014, 10 (6): e1004211.
14. Azanza, J.R. y Montejo, M., "Farmacocinética y farmacodinamia. Interacciones y efectos secundarios. Comparación con otras equinocandinas", *Enferm Infect Microbiol Clin*, 2008, 26 (Suppl. 14): 14-20.
15. Kinoshita, H., Yoshioka, M., Ihara, F. et al., "Cryptic antifungal compounds active by synergism with polyene antibiotics", *J Biosci Bioeng*, Elsevier, 2016, 121 (4): 394-398.
16. Gallón, J., "Cambios morfológicos e inhibición del crecimiento de *Candida albicans* en presencia de una solución de sulfato de zinc", *nova*, 2015, 13 (23): 7-15.
17. Baena Del Valle, J., Gómez, C. y Gómez, D., "Coexistencia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* en infecciones nosocomiales en Cartagena de Indias (Colombia)", *nova*, 2011, 9 (15): 1-112.
18. Salas, I., García, J. y Miranda, K., "Factores de virulencia en cepas *Candida albicans*", *Rev Costarric Cienc Méd*, 2000, 21 (2): 43-49.
19. Perea, A. y Barberan, J., "Anfotericina B forma liposómica: un perfil farmacocinético exclusivo. Una historia inacabada", *Rev Esp Quimioter*, 2012, 25 (1): 17-24.
20. Brilhante, R.S., Paiva, M.A., Sampaio, C.M. et al., "Azole resistance in *Candida* spp. isolated from Catú Lake, Ceará, Brazil: an efflux-pump-mediated mechanism", *Brazilian J Microbiol*, 2016, 47 (1): 33-38.
21. Morace, G., Perdoni, F. y Borghi, E., "Antifungal drug resistance in *Candida* species", *J Glob Antimicrob Resist*, 2014, 2 (4): 254-259.
22. Fernández, T., Silva, S. y Henriques, M., "Candida tropicalis biofilm's matrix-involvement on its resistance to amphotericin B", *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2015, 83 (2): 165-169.
23. Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J. y Gow, N.A., "An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system", *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6 (1): 67-78.
24. Shibata, N., Kobayashi, H. y Suzuki, S., "Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan", *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2012, 88 (6): 250-265.
25. Mothibe, J.V. y Patel, M., "Pathogenic characteristics of *Candida albicans* isolated from oral cavities of denture wearers and cancer patients wearing oral prostheses", *Microb Pathog*, 2017, 110: 128-134.
26. Bedout, C. y Gómez, B., "Candida y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano", *Infectio*, 2010, 14 (2): S159-S171.
27. Pinilla, G., Bautista, A., Cruz, C. et al., "Determinación de factores de adhesión asociados a la formación de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*", *nova*, 2017, 15 (27): 67-75.
28. Herrera, M., "El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia", *nova*, 2004, 2 (2): 1-108.
29. García-Sánchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.M. y D'Enfert, C., "Candida albicans biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns", *Eukaryot Cell*, 2004, 3 (2): 536-545.
30. Nobile, C.J. y Johnson, A.D., "Candida albicans biofilms and human disease", *Annu Rev Microbiol*, 2015, 69: 71-92.
31. Cantón, E., Msrtin, E. y Espinel-Ingroff, A., "Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)", *Rev Iberoam Micol*, 2007, 15: 1.
32. Nobile, C.J., Fox, E.P., Nett, J.E. et al., "A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*", *Cell*, 2012, 148 (1-2): 126-138.
33. Huang, M. y Mitchell, A., "Marker recycling in *Candida albicans* through CRISPR-Cas9-induced marker excision", *mSphere*, 2017, 2 (2): e00050-17.
34. Min, K., Ichikawa, Y., Woolford, C.A. y Mitchell, A.P., "Candida albicans gene deletion with a transient CRISPR-Cas9 system", *mSphere*, 2016, 1 (3): e00130-16.
35. Hamid, S., Zainab, S., Faryal, R. et al., "Inhibition of secreted aspartyl proteinase activity in biofilms of *Candida* species by mycogenic silver nanoparticles", *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol*, 2017, (2016): 1-7.
36. Tsai, P.W., Yang, C.Y., Chang, H.T. y Lan, C.Y., "Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates", *PLOS One*, 2011, 6 (3).
37. Lattif, A., Pranab, K. y Mukherjee et al., "Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation", *Microbiology*, 2011, 157 (11): 3232-3242.
38. Luis, J. y Pozo, D., "Candidiasis asociada a biopelículas", *Rev Iberoam Micol*, 2016, 33 (3): 176-183.
39. Bedout, C. y Gómez, B., "Candida y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano", *Infectio*, 2010, 14 (2): S159-S171.
40. Muñoz, J.E., Rossi, D.C.P., Ishida, K. et al., "Antifungal activity of the biphosphinic cyclopalladate c7a against *Candida albicans* yeast forms in vitro and in vivo", *Front Microbiol*, 2017, 8: 1-10.
41. Colombo, A., Cortés, J., Zurita, J. et al., "Recomendaciones para el diagnóstico de la candidemia en América Latina", *Rev Iberoam Micol*, 2013, 30 (1): 150-157.
42. Mojica, T., Sánchez, O. y Bobadilla, L., "La proteómica, otra cara de la genómica", *nova*, 2003, 1 (1): 1-116.
43. Barraza, D., Martínez, A., Padilla, L. et al., "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*, 2011, 28 (1): 36-42.
44. Safavieh, M., Coarsey, C., Esiobu, N. et al., "Candida detection platforms for clinical and point-of-care applications", *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37 (4): 441-458.
45. Cassone, A., "Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects", *An Int J Obstet Gynaecol*, 2015, 122 (6): 785-794.
46. Thomas, D., Bachmann, S. y López-Ribot, J., "Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle", *Proteomics*, 2006, 6 (21): 5795-5804.
47. Bisha, B., Kim, H.J. y Brehm-Stecher, B.F., "Mejora de DNA-FISH para la detección citométrica de *Candida* spp.", *J Appl Microbiol*, 2011, 110: 881-892.
48. Pinilla, G., Cubillos, K. y Rodríguez, M., "Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)", *nova*, 2008, 6 (9): 65-75.
49. García, L., Luna, L., Velasco, T. y Guerra, B., "Nueva reacción en cadena de la polimerasa múltiple para el

- diagnóstico específico de especies implicadas en la candidiasis humana”, *Biomédica*, 2017, 37 (2): 200-208.
50. Taff, H., Mitchell, K., Edward, J. y Andes, D., “Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance”, *Future Microbiol*, 2013, 8 (10): 10.2217/fmb.13.101.
51. Giongo, J.L., De Almeida Vaucher, R., Fausto, V.P. et al., “Anti-Candida activity assessment of pelargonium graveolens oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies”, *Microb Pathog*, 2016, 100: 170-178.
52. Abdelhamed, A., Zhang, S., Watkins, T. et al., “Multicenter evaluation of *Candida* QuickFISH BC for identification of *Candida* species directly from blood culture bottles”, *J Clin Microbiol*, 2015, 53 (5): 1672-1676.
53. Rizk, M., Kong, E., Tsui, C. et al., “*Candida albicans* pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework”, *Infect Immun*, 2016, 84 (10): 2724-2739.
- Emami, S., Tavangar, P. y Keighobadi, M., “An overview
54. of azoles targeting sterol 14 α -demethylase for antileishmanial therapy”, *Eur J Med Chem*, 2017, 135: 241-259.