Universidad de Navarra
Facultad de Ciencias
Departamento de Microbiología y Parasitología

Estudio de la formación de la biopelícula de *Candida* spp. y evaluación de nuevas combinaciones farmacológicas

Autor
Marcelo Ernesto Fernández Rivero

Directores
Dr. José Luis del Pozo León
Dra. Emilia Cantón Lacasa

Pamplona
2017

Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias
Departamento de Microbiología y Parasitología

Estudio de la formación de la biopelícula de *Candida* spp. y evaluación de nuevas combinaciones farmacológicas

Memoria presentada por Don Marcelo Ernesto Fernández Rivero para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

Fdo. Marcelo Ernesto Fernández Rivero

Pamplona, 2017

Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias
Departamento de Microbiología y Parasitología

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

Los que suscriben, Don José Luis del Pozo León, Doctor en Medicina, Profesor Titular de Medicina y Director del Área de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica de la Clínica Universidad de Navarra y Dña. Emilia Cantón Lacasa, Doctora en Ciencias Biológicas e investigadora emérita del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la memoria de doctorado presentada por Don Marcelo Ernesto Fernández Rivero y que lleva por título: "Estudio de la formación de la biopelícula de *Candida* spp. y evaluación de nuevas combinaciones farmacológicas", ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Pamplona, 2017

VºBº de los Directores

Dr. José Luis del Pozo León

Dra. Emilia Cantón Lacasa

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad de Navarra y en especial a los profesionales del Servicio de Microbiología Clínica, el Área de Enfermedades Infecciosas y el Departamento de Microbiología por la excelente formación recibida durante mis años en esta institución. Agradezco a los Dres. José Leiva, Manuel Rubio, Mirian Fernández, Gabriel Reina, Aitziber Aguinaga, José Ramón Yuste, Begoña Alonso y a todo el personal técnico y de enfermería por la paciencia y dedicación para enseñar.

De igual manera quiero agradecer al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y al Hospital Universitario La Fe de Valencia la oportunidad brindada para desarrollar en sus instalaciones gran parte de esta tesis doctoral. Agradezco a los Dres. Javier Pemán, Paula Ramírez, María Ángeles Tormo, Eva Romá, Miguel Salavert y al resto de facultativos e investigadores. La ayuda de todos ellos ha sido imprescindible para que este proyecto saliese adelante.

De una forma muy especial quiero expresar todo mi agradecimiento a la Dra. Emilia Cantón y al Dr. José Luis del Pozo, ambos directores de esta tesis doctoral. Gracias Emilia por la paciencia y la dedicación con la que has ejercido la dirección de esta tesis, gracias por tu permanente disponibilidad para orientar y corregir el trabajo diario, gracias por todos los consejos y enseñanzas que has sabido transmitirme. Gracias José Luis por haberme ofrecido este proyecto y por la confianza depositada en mi durante estos años, gracias por la sabiduría con la que has guiado cada uno de mis pasos, gracias por contar conmigo aún en la distancia.

A todos los alumnos de la Universidad de Navarra y de la Universidad de Valencia que han brindado su ayuda y colaboración durante la fase experimental de este trabajo: Iosune Martínez, Iván Beltrán, Laura Abarca, Isidro Jarque, Blanca Lozano, Silvia Jericó, Borja Ferrero, Gladys Olivera y Salvador Soláz. Gracias a todos por su inestimable ayuda.

A mis compañeros de residencia y doctorado, con lo que he compartido estos años de formación como microbiólogo clínico e investigador: Melania Iñigo, Alejandra Pérez, Carla Andrea Alonso, Andrea Rojo, María de la Soledad Escolano, Cesar Bustos, Ana Zapata, Carmen Losa, Leticia Armendáriz, Miguel Ángel Casares, Marta Rúa, Mercedes Cervera, Miglė Žiemytė, Katherina Guzmán, Alba Ruiz y Oihana Sabalza. Alcanzar esta meta ha sido posible gracias a la ayuda desinteresada de cada uno de ellos.

A todas las personas que han estado a mi lado de una manera u otra durante mis años de formación académica: Dickran Halachian, Ridel Meriño, Pedro Enrique Peña, Luis Sebastián, José Manuel López, Manuel Campos, Sergio Carpio, Brenda Rocamonde, Raúl Soriano, Maribel Sanchís, Sergio Ripoll, Beatriz Fora, Margarita Salinas, Leticia López, Patrick Pendavis, José Azcona, Santiago Pereira y Cristina Bazal. Gracias por vuestros consejos, ayuda y compañía en los momentos más difíciles.

A toda mi familia dispersa a lo largo de Cuba, Estados Unidos de América y España. Vuestro cariño y ayuda han sido fundamentales para poder llegar hasta aquí. Agradezco especialmente a mis padres, Marcelo Fernández y Ofelia Rivero por la sabiduría y la dedicación con la que han guiado mis años de formación académica.

ABREVIATURAS

AMB	Anfotericina B
AND	Anidulafugina
ASTM	*American Society for Testing Materials*
ATCC	*American Type Culture Collection*
BHA	*Brain Heart Infusion* Agar
CAS	Caspofungina
CBR	*CDC Biofilm Reactor*
CLA	Claritromicina
CLSI	*Clinical Laboratory Standards Institute*
CMI_{50}	Concentración de antifúngico que inhibe al 50% de los aislados
$CMIB_{50}$	Concentración más baja de antifúngico que produce una reducción de la actividad metabólica de la biopelícula ≥50% con respecto a la actividad metabólica de la biopelícula sin antifúngico.
$CMIB_{80}$	Concentración más baja de antifúngico que produce una reducción de la actividad metabólica de la biopelícula ≥80% con respecto a la actividad metabólica de la biopelícula sin antifúngico.
$CMIB_{90}$	Concentración más baja de antifúngico que produce una reducción de la actividad metabólica de la biopelícula ≥90% con respecto a la actividad metabólica de la biopelícula sin antifúngico.
CVC	Catéter venoso central
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAR	Farnesol
FC	5-Fluorocitosina
HCS	Hidrofobicidad celular superficial
MCF	Micafungina
NAC	N-acetilcisteína
PBS	Tampón fosfato salino estéril
POS	Posaconazol
PTFE	Politetrafluoroetileno
RIF	Rifampicina
TRB	Terbinafina
UHMW	Polietileno de ultra alto peso molecular
XTT	*(2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfopheny]- 2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt)*
YNBG	Yeast Nitrogen Base suplementado con glucosa 100 mM

INDICE

1 INTRODUCCIÓN *15*

1.1 INFECCION FÚNGICA RELACIONADA CON DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS 17

1.1.1 Epidemiología y patogenia de la infección relacionada con dispositivos biomédicos 17

1.1.2 Infección fúngica relacionada con catéter venoso central de larga duración. 19

1.1.3 Infección fúngica relacionada con prótesis osteoarticulares 23

1.1.4 Infección fúngica relacionada con prótesis valvulares 25

1.1.5 Infección fúngica relacionada con dispositivos de drenaje de líquido cefalorraquídeo 27

1.2 BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP. 27

1.2.1 Mecanismos de adhesión de *Candida* spp. a superficies inertes 29

1.2.2 Crecimiento y maduración de la biopelícula de *Candida* spp. 30

1.2.3 Regulación del desarrollo de la biopelícula de *Candida* spp. 32

1.2.4 Resistencia de la biopelícula de *Candida* spp. a los antifúngicos 33

1.2.5 Nuevas estrategias terapéuticas para la erradicación de la biopelícula de *Candida* spp. 37

1.3 BIOMATERIALES 39

1.3.1 Definición y clasificación de los biomateriales 40

1.3.2 Politetrafluoroetileno 41

1.3.3 Titanio 43

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS *47*

2.1 HIPÓTESIS 49

2.2 OBJETIVOS 50

2.2.1 Objetivo general 50

2.2.2 Objetivos específicos 50

3 MATERIALY MÉTODOS *51*

3.1 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE LOS AISLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA* SPP. 53

3.1.1 Aislados de origen clínico 53

3.1.2 Cepas de referencia 53

3.1.3 Determinación de la capacidad de formación de biopelícula sobre placas de poliestireno mediante tinción con cristal violeta 54

3.1.4 Determinación de la capacidad de formación de biopelícula mediante el ensayo de reducción del XTT en placas de poliestireno 57

3.2 ESTUDIO DE LA HIDROFOBICIDAD CELULAR SUPERFICIAL 60

3.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LAS CEPAS EN FASE DE CRECIMIENTO PLANCTÓNICO 61

3.3.1 Método de microdilución comercial Sensititre YeastOne® 61

3.3.2 Método de referencia de microdilución en caldo M27-A3 62

3.4 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LAS CEPAS EN FASE DE CRECIMIENTO EN BIOPELÍCULA 63

3.5 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP. FORMADA SOBRE PTFE Y TITANIO 65

3.5.1 Características técnicas y operacionales del CDC Biofilm Reactor 65

3.5.2 Biomateriales 67

3.5.3 Preparación del inóculo 68
3.5.4 Cinéticas de formación de la biopelícula de *Candida* spp. 68
3.5.5 Cuantificación de las células viables presentes en la biopelícula 68

3.6 ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LA BIOPELÍCULA DE 24 HORAS DE *CANDIDA* SPP. SOBRE SUPERFICIES DE PTFE 71

3.7 ACTIVIDAD DE LOS ANTIMICROBIANOS SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP. FORMADA SOBRE PTFE Y TITANIO 72
3.7.1 Cinética de la actividad de los antifúngicos sobre la biopelícula de *Candida* spp. formada en PTFE y titanio utilizando el CBR 72
3.7.2 Cinética de la actividad de anfotericina B y anidulafungina combinadas 73
3.7.3 Cinética de la actividad de los compuestos con actividad desestructuradora 73

3.8 ANÁLISIS DE DATOS 74
3.8.1 Análisis cinético y estadístico 74
3.8.2 Interacción entre fármacos 75

4 RESULTADOS 77

4.1 SÍNTESIS DEL TRABAJO REALIZADO 79

4.2 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN LOS AISLADOS CLÍNICOS 82

4.3 ESTUDIO DE LA HIDROFOBICIDAD CELULAR SUPERFICIAL 84

4.4 ACTIVIDAD DE LOS FÁRMACOS SOBRE LOS AISLADOS BIOCAN 86
4.4.1 Actividad de los antifúngicos sobre las células planctónicas de los aislados BIOCAN 86
4.4.2 Actividad de los antifúngicos sobre las biopelículas de los aislados BIOCAN 87
4.4.3 Actividad de los compuestos con actividad desestructuradora sobre las biopelículas de los aislados BIOCAN 88

4.5 CINÉTICA DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP. SOBRE SUPERFICIES DE PTFE Y TITANIO 89
4.5.1 Cinética de formación de las biopelículas de *C. albicans* sobre PTFE y titanio 89
4.5.2 Cinética de formación de las biopelículas de *C. parapsilosis* sobre PTFE y titanio 91
4.5.3 Cinética de formación de las biopelículas de *C. krusei* sobre PTFE y titanio 93
4.5.4 Cinética de formación de las biopelículas de *C. tropicalis* sobre PTFE y titanio 95
4.5.5 Cinética de formación de la biopelícula de *C. glabrata* sobre PTFE y titanio 97
4.5.6 Comparación del número de células adheridas sobre cada biomaterial según la especie de *Candida* 99
4.5.7 Relación entre la hidrofobicidad celular superficial y el número de células adheridas en cada biomaterial 99

4.6 SELECCIÓN DEL AISLADO PARA LOS ENSAYOS DE CINÉTICA DE LETALIDAD Y OTROS ESTUDIOS 101

4.7 CINÉTICA DE LETALIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *C. TROPICALIS* FORMADA SOBRE PTFE Y TITANIO 103
4.7.1 Cinética de letalidad de anfotericina B sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 103
4.7.2 Cinética de letalidad de 5-fluorocitosina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 104
4.7.3 Cinética de letalidad de terbinafina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 106
4.7.4 Cinética de letalidad de caspofungina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 108
4.7.5 Cinética de letalidad de anidulafungina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 110
4.7.6 Cinética de letalidad de micafungina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 112
4.7.7 Cinética de letalidad de posaconazol sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 114

4.7.8 Comparación de la cinética de letalidad de los antifúngicos sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 116

4.8 ACTIVIDAD COMBINADA DE ANFOTERICINA B Y ANIDULAFUNGINA SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *C. TROPICALIS* 117

4.9 ACTIVIDAD DE ANFOTERICINA B O ANIDULAFUNGINA COMBINADAS CON RIFAMPICINA, EDTA, N-ACETILCISTINA, CLARITROMICINA Y FARNESOL SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *C. TROPICALIS* 119

4.9.1 Actividad de anfotericina B combinada con rifampicina, EDTA, N-acetilcisteína, claritromicina y farnesol sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 119

4.9.2 Actividad de anidulafungina combinada con rifampicina, EDTA, N-acetilcisteína, claritromicina y farnesol sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 121

4.10 ACTIVIDAD DE ANFOTERICINA B COMBINADA CON RIFAMPICINA Y EDTA SOBRE LA BIOPELÍCULAS DE OTRAS ESPECIES DE *CANDIDA* SPP. 125

4.10.1 Actividad de anfotericina B combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. albicans* B2 125

4.10.2 Actividad de anfotericina B combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. parapsilosis* B4 126

4.10.3 Actividad de anfotericina B combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. krusei* B7 127

4.10.4 Actividad de anfotericina B combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. glabrata* B13 128

4.11 ACTIVIDAD DE ANIDULAFUNGINA COMBINADA CON RIFAMPICINA Y EDTA SOBRE LA BIOPELÍCULAS DE OTRAS ESPECIES DE *CANDIDA* SPP. 129

4.11.1 Actividad de anidulafungina combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. albicans* B2 129

4.11.2 Actividad de anidulafungina combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. parapsilosis* B4 130

4.11.3 Actividad de anidulafungina combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. krusei* B7 132

4.11.4 Actividad de anidulafungina combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. glabrata* B13 133

5 DISCUSIÓN 135

5.1 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE LOS AISLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA* SPP. 139

5.2 INFLUENCIA DEL BIOMATERIAL EN LA CINÉTICA DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP. 140

5.3 INFLUENCIA DE LA HIDROFOBICIDAD CELULAR SUPERFICIAL EN LA CINÉTICA DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA 141

5.4 ACTIVIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP. 142

5.4.1 Eficacia del uso de antifúngicos a concentraciones elevadas como solución de sellado de catéteres venosos centrales. 142

5.4.2 Efecto de la combinación de antifúngicos sobre la biopelícula de *C. tropicalis*. 144

5.4.3 Efecto del biomaterial sobre la sensibilidad de las biopelículas de *C. tropicalis* a los antifúngicos. 145

5.4.4 Resistencia de la biopelícula de *Candida* spp. a los antifúngicos. 145

5.5 ACTIVIDAD DE COMPUESTOS DESESTRUCTURADORES COMBINADOS CON ANTIFÚNGICOS SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP. 149

5.5.1 Ácido etilendiaminotetraacético 150
5.5.2 Rifampicina 152
5.5.3 N-acetilcisteína 153
5.5.4 Claritromicina 155
5.5.5 Farnesol 156

5.6 FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO 157

5.7 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN 158

6 CONCLUSIONES 161

7 BIBLIOGRAFÍA 165

8 PUBLICACIONES 185

8.1 COMUNICACIONES EN CONGRESOS 187

8.1.1 Efficacy of anidulafungin plus clarithromycin against *C. tropicalis* biofilms growing on PTFE and titanium 187

8.1.2 Eficacia de la anidulafungina en combinación con N-acetilcisteína, claritromicina y rifampicina frente a biofilms de *C. tropicalis* 189

8.1.3 Efficacy of anidulafungin plus ethylenediaminetetraacetic acid against *C. tropicalis* biofilms 190

8.1.4 Cinética de formación de biofilms de levaduras sobre superficies de titanio en un CDC Biofilm Reactor 192

8.1.5 Actividad de Anfotericina B y Anidulafungina frente a biofilms de *Candida* no *albicans* 194

8.1.6 Cinética de formación de biofilms de *Candida* spp. sobre discos de PTFE en un CDC Biofilm Reactor 196

8.2 PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS 198

8.2.1 Actividad de anfotericina B, anidulafungina, solas y combinadas, frente a biopelículas de *Candida tropicalis* formadas sobre teflón® y titanio 198

8.2.2 Activity of Amphotericin B and Anidulafungin Combined with Rifampicin, Clarithromycin, Ethylenediaminetetraacetic Acid, N-Acetylcysteine and Farnesol Against *Candida tropicalis* Biofilms 207

8.2.3 Time kill assays of amphotericin B plus anidulafungin against *Candida tropicalis* biofilms formed on two different biomaterials 218

9 ANEXO 227

9.1 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO 229

9.1.1 Agar Infusión Cerebro Corazón 229
9.1.2 Agar glucosado de Sabouraud 230
9.1.3 CHROMagar® *Candida* 230
9.1.4 Base Nitrogenada de Levadura suplementada con glucosa 231
9.1.5 Medio RPMI 1640 233

9.2 SOLUCIONES Y REACTIVOS 233

9.2.1 Tampón fosfato salino estéril 233
9.2.2 Solución de 2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolio-5-Carboxanilida (XTT) 235
9.2.3 2-metil-1,4-maftoquinona (menadiona) 235
9.2.4 Solución XTT-Menadiona 235

9.3 DISOLUCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS FÁRMACOS EMPLEADOS 236

1 INTRODUCCIÓN

1.1 INFECCION FÚNGICA RELACIONADA CON DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS

1.1.1 Epidemiología y patogenia de la infección relacionada con dispositivos biomédicos

Los dispositivos biomédicos implantables como catéteres, prótesis osteoarticulares, válvulas cardiacas o neuroestimuladores son herramientas esenciales para el tratamiento de un gran número de enfermedades. Su utilización, ha permitido mejorar la calidad de vida de muchos pacientes y reducir la morbi-mortalidad asociada a un gran número de patologías. Sin embargo, la utilización de estos dispositivos no está exenta de problemas ya que pueden verse afectados tanto por fallos mecánicos y estructurales como por procesos infecciosos asociados a su uso. Se considera que al menos la mitad de todas las infecciones nosocomiales están asociadas a dispositivos biomédicos (Kojic y Darouiche 2004). Este tipo de infecciones implican interacciones muy complejas entre la superficie del biomaterial, el tejido del hospedador y el microorganismo. En 1989, Anthony G. Gristina acuñó la frase "carrera por la superficie" para referirse a la importancia de los procesos biológicos que se producen en la superficie de un biomaterial tras ser implantado y que finalmente deciden el futuro éxito o fracaso del dispositivo (Gristina et al. 1989).

Si los primeros colonizadores de la superficie son células de los tejidos del hospedador como fibroblastos o células endoteliales, estas migran y cubren la superficie, formando un tejido conectivo que integra y protege al dispositivo. Sin embargo, si los primeros colonizadores de la superficie son microorganismos, se desarrolla una comunidad biológica estructurada denominada biopelícula microbiana, la cual se autorregula mediante moléculas de *quorum sensing* y crece embebida en una matriz extracelular que la aísla del medio externo y la protege del sistema inmune del hospedador. Esta matriz extracelular impide hasta cierto punto la difusión de los antimicrobianos al interior de la biopelícula (Valentin et al. 2012), dificultando su erradicación y desencadenando un proceso infeccioso cuyo tratamiento eficaz pasa en la mayoría de ocasiones por la retirada del dispositivo.

El *National Institute of Healh* de Estados Unidos considera que las biopelículas microbianas están implicadas en alrededor del 80% de las infecciones que se producen en

la actualidad (Nobile y Johnson 2015). La mayor parte de las infecciones relacionadas con dispositivos biomédicos están causadas por bacterias, siendo especialmente frecuente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y otros estafilococos coagulasa negativos (Del Pozo JL. Patel 2009). Esto es debido a que la mayor parte de los dispositivos se contaminan con microorganismos procedentes de la microbiota cutánea del propio paciente o del personal sanitario, ya sea durante el proceso de inserción o tras la incorrecta manipulación de los mismos en el caso de algunos dispositivos intravasculares (Trampuz y Widmer 2006).

Sin embargo, en los últimos años, ciertos factores como el uso de tratamientos antibióticos de amplio espectro, unido al mayor número de pacientes inmunocomprometidos, sometidos a intervenciones quirúrgicas complejas y a largos periodos de estancia en unidades de críticos, han dado lugar a un aumento en la colonización de piel y mucosas por parte de hongos, siendo especialmente frecuente las levaduras del género *Candida* spp.

El estudio sobre la prevalencia de la infección en unidades de críticos (EPIC II), llevado a cabo en 1265 unidades de críticos de 76 países mostró que *Candida* spp. es el tercer patógeno en frecuencia en unidades de críticos (17%). después de *S. aureus* (20.5%) y *Pseudomonas aeruginosa* (19.9%) (Vincent et al. 2009). La colonización multifocal por *Candida* spp. es el primer paso para el desarrollo de una posterior candidiasis invasiva, un proceso infeccioso que ha experimentado un incremento notable en frecuencia y en gravedad en los últimos años (Pemán y Salavert 2012). Gran parte de estos estudios han identificado la presencia de dispositivos biomédicos, especialmente cardiovasculares y genitourinarios, como factor de riesgo para el desarrollo de una infección por *Candida* spp. (Pemán et al. 2013).

Los resultados del estudio prospectivo nacional sobre candidemia, realizado en 29 hospitales españoles en 2010 y 2011 (CANDIPOP) registró un total de 752 episodios, lo que supone una incidencia de 10.4 episodios por cada 10^5 habitantes y año siendo *Candida albicans* la especie más frecuente (45,4%), seguida de *Candida parapsilosis* (24,9%), *Candida glabrata* (13,4%), *Candida tropicalis* (7,7%), *Candida krusei* (2,0%) (Puig-Asensio et al. 2014). Por su parte, el estudio equivalente francés AmarCAND registró una mortalidad global del 52.9% (Leroy et al. 2009). En los últimos años se ha observado la

emergencia de nuevas especies con sensibilidad disminuida a más de una familia de antifúngicos. Recientemente se han reportado en España los primeros casos de infección nosocomial causados por la levadura multirresistente *Candida auris* (Ruiz Gaitán et al. 2017).

Candida spp. también es capaz de formar biopelículas sobre la superficie de múltiples dispositivos biomédicos. Esta biopelícula se desarrolla de manera similar a la biopelícula bacteriana con la particularidad de que en su estructura coexisten las diferentes formas de desarrollo del hongo, tanto blastosporas, pseudohifas e hifas verdaderas (Nobile y Johnson 2015). Aunque la incidencia de infección candidiásica asociada a dispositivos es mucho menor en comparación con las infecciones bacterianas, estas conllevan una mayor mortalidad y afectan especialmente a pacientes con un deterioro del sistema inmune.

1.1.2 Infección fúngica relacionada con catéter venoso central de larga duración.

Los catéteres venosos centrales de larga duración son dispositivos vasculares implantados mediante un procedimiento quirúrgico o percutáneo y cuya duración es superior a los 14 días. El riesgo de sepsis asociada a este tipo de dispositivos, se incrementa con el tiempo de cateterización, la incorrecta manipulación de las conexiones, la localización del catéter (femoral), la administración de nutrición parenteral y la inmunosupresión del paciente debido a una neutropenia, enfermedad hematológica o tratamiento quimioterápico. Los microorganismos que con mayor frecuencia causan infecciones relacionadas con catéteres venososos centrales de larga duración son los estafilococos coagulasa negativos, seguidos de *S. aureus*, enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y *Candida* spp. (Bustos et al. 2014).

En España, el uso de catéteres venosos centrales se ha incrementado de manera significativa en los últimos años. La incidencia de bacteriemia relacionada con catéter en el estudio nacional de infección nosocomial en unidades de críticos (ENVIN-UCI) fue de 5 episodios por cada 1.000 días de catéter (Alvarez-Lerma et al. 2007). Algunos autores han observado que hasta el 89% de los pacientes diagnosticados de candidemia portaban un catéter venoso central (Almirante et al. 2005). Las especies de *Candida* presentes en la piel cercana al punto de inserción del catéter colonizan la zona intraluminal del mismo formando una biopelícula que facilita la posterior diseminación hematógena del

microorganismo (Ramage et al. 2006). Además, la administración de alimentación parenteral a través de estos dispositivos ofrece una ventaja selectiva para el hongo, debido a la presencia de glucosa y otros nutrientes en el lumen del mismo (Crump y Collignon 2000).

El diagnóstico de una candidemia asociada a catéter puede realizarse de manera conservadora, lo cual tiene especial sentido en los catéteres venoso centrales de larga duración. La obtención de sangre para hemocultivo, extraída en paralelo de vena periférica y del catéter permite discernir si el dispositivo es el foco de la infección ya que el fundamento de la técnica radica en demostrar que el número de ufc/ml de sangre extraída del catéter es mayor que el número de ufc/ml de sangre extraída de vena periférica. Los hemocultivos convencionales basados en la velocidad de crecimiento de los microorganismos como el BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, USA) o el BACTEC™ (Becton Dickinson, USA) poseen ciertas desventajas en la detección de *Candida* spp. en sangre debido sobre todo a la reducida velocidad de crecimiento de las levaduras. Más del 50% de los hemocultivos realizados mediante estas técnicas poseen un tiempo de detección superior a las 36 horas (Nunes et al. 2013). En los últimos años, la utilización de la espectrometría de masas mediante la tecnología MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fligh*) ha permitido reducir de manera significativa el tiempo de respuesta en la identificación microbiana. Estudios recientes han utilizado la espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación de *Candida* spp. directamente desde frasco de hemocultivo y han logrado la identificación correcta del 95.9% de *C. albicans* y el 86.5% de las *Candida* no *albicans*, en 30 minutos tras la positivización del mismo (Spanu et al. 2012).

En la actualidad, comienzan a estar disponibles nuevos sistemas que permiten la detección directa de *Candida* spp. en sangre obtenida mediante venopunción y de catéter, sin necesidad de realizar un hemocultivo. Uno de ellos, el T2 *Candida*® (T2 Biosystems, Lexington, EE. UU), es un sistema automatizado que basa su funcionamiento en la combinación de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos y resonancia magnética nuclear. Esta técnica permite detectar hasta 1 ufc/ml de levadura en apenas 3 a 4 horas y posee unos valores de sensibilidad y especificidad superiores al 95% (Neely et al. 2013). El sistema reduce en más de 60 horas el tiempo actualmente necesario para detectar la

presencia de *Candida* spp. en sangre mediante los sistemas convencionales de hemocultivo. (Beyda et al. 2013).

Ante la sospecha de una infección asociada a catéter, la *Infectious Diseases Society of America* recomienda iniciar tratamiento antifúngico empírico siempre que se trate de un paciente con alguno de los siguientes factores de riesgo: nutrición parenteral, prolongado tratamiento antibiótico de amplio espectro, enfermedad hematológica, receptor de trasplante de médula u órgano sólido, cateterización femoral o colonización multifocal por *Candida* spp. (Mermel et al. 2009). Estas guías recomiendan la utilización de equinocandinas de manera empírica y solo recomiendan utilizar fluconazol en pacientes sin exposición previa a este antifúngico en los últimos 3 meses e ingresados en unidades con bajo riesgo de infección por *C. krusei* o *C. glabrata*.

La estrategia de sellado antimicrobiano es una técnica mediante la cual se instila en el interior del catéter 2 - 5 mL de una solución concentrada de antibiótico con el objetivo de exponer la superficie interior del mismo a altas concentraciones de antimicrobiano, con el objetivo de erradicar los microorganismos adheridos en la superficie interior y esterilizar el biomaterial. Por norma general, la solución de sellado contiene el antibiótico a una concentración al menos 1.000 veces superior a la concentración mínima inhibitoria para ese antibiótico y microorganismo en particular. La tasa de éxito del tratamiento de la bacteriemia relacionada con catéter venoso central, mediante la combinación de tratamiento sistémico y sellado antibiótico, se sitúa en valores cercanos al 70 - 80% en el caso de los estafilococos coagulasa negativos.

Sin embargo, en la actualidad no existen estrategias de sellado antifúngico que permitan realizar un manejo conservador de la candidemia asociada a catéter y la mayor parte de las guías clínicas coinciden en recomendar la retirada del dispositivo cuando la infección está causada por *Candida* spp. tanto en candidemias complicadas (sepsis grave, tromboflebitis, endocarditis etc.) como no complicadas. Disponer de una estrategia de sellado antifúngico para catéteres venosos centrales puede ser de gran ayuda, especialmente en aquellos pacientes con trombocitopenia severa o algún tipo de coagulopatía, que requieren de un acceso venoso central para la administración de medicación o alimentación parenteral y en los cuales la retirada e inserción de una nueva vía central puede conllevar numerosos problemas.

En los últimos años, se ha incrementado el número de estudios *in vitro*, modelos animales y series clínicas que evalúan la eficacia de diversas estrategias de sellado antifúngico de catéter venoso central (Bouza et al. 2014). Diversos autores coinciden en concluir que los azoles poseen una actividad limitada sobre la biopelícula de *Candida* spp. y se ha sugerido que la resistencia de la biopelícula a esta familia de antifúngicos está mediada por la hiperexpresión de bombas de expulsión activa (Ramage et al. 2002a). Por su parte, anfotericina B y las equinocandinas han demostrado ser eficaces sobre la biopelícula de *C. albicans*, la exposición a estos antifúngicos en un rango amplio de concentraciones no ha logrado la erradicación completa de la biopelícula y algunos autores han sugerido que este hecho podría estar relacionado con la presencia de células latentes con actividad metabólica disminuida o *persisters* (Kuhn et al. 2002b).

La combinación de antifúngicos con otras moléculas como anticoagulantes, antibióticos, o moléculas inhibidoras del *quorum sensing* se ha planteado como estrategia para incrementar la acción de los antifúngicos sobre la biopelícula de *Candida spp.* Estas moléculas han demostrado su eficacia sobre biopelículas bacterianas y existen pocos estudios que avalen su utilización sobre la biopelícula fúngica. (Walraven y Lee 2013). Percival y cols. obtuvieron una reducción significativa de la biopelícula de *C. albicans* en presencia de EDTA una concentración de 40.000 mg/L (Percival et al. 2005). Por su parte, Del Pozo y cols. observaron un efecto sinérgico en la combinación de anfotericina B con rifampicina sobre biopelículas de *Candida* spp. (Del Pozo et al. 2011).

Algunos estudios han utilizado el modelo animal de infección asociada a catéter en ratón para estudiar la eficacia *in vivo* del sellado antifúngico. Schinabeck y cols. evaluaron la actividad de soluciones de sellado de anfotericina B liposomal y fluconazol, sobre la biopelícula de *C. albicans*, ambos a una concentración de 10.000 mg/L y aplicados 8 horas diarias durante 7 días. Estos autores obtuvieron una tasa de rescate del catéter del 100% en el caso de la anfotericina B liposomal, sin embargo, solo alcanzaron un 28% con fluconazol (Schinabeck et al. 2004). Shuford y cols. estudiaron la eficacia de caspofungina a 6.670 mg/L, también sobre la biopelícula de *C. albicans* y obtuvieron una tasa de rescate del catéter del 100% (Shuford et al. 2006).

Estudios previos han descrito el uso de soluciones de sellado *in vivo* para el rescate de catéteres en pacientes cuya situación clínica no permitía el recambio del dispositivo.

DiMondi y cols. utilizaron una solución de sellado de anfotericina B liposomal durante 6 días para el sellado de un catéter de hemodiálisis, combinada con micafungina intravenosa en un paciente con múltiples episodios de fungemia por *C. albicans* y cuya vasculopatía impedía la retirada o recambio del dispositivo. Los autores desescalaron finalmente a fluconazol oral y el catéter pudo ser nuevamente utilizado para la hemodiálisis (Paul Dimondi et al. 2014).

Recientemente, un estudio piloto prospectivo ha evaluado el uso de una solución de sellado de anfotericina B liposomal a 2.000 mg/L instalada en el catéter entre 8 y 12 horas diarias durante 14 días y combinada con tratamiento sistémico en 12 pacientes con fungemias por *C. albicans*, *C. parpasilosis* y *C. glabrata* entre otras especies. En este estudio, la variable principal de valoración, definida como 2 días consecutivos con cultivos negativos tras 5 días de sellado antifúngico, se alcanzó en el 77% de los casos (McGhee et al. 2016).

1.1.3 Infección fúngica relacionada con prótesis osteoarticulares

Las prótesis osteoarticulares restauran la función de las articulaciones y con ello favorecen la independencia y la calidad de vida de los pacientes. Durante el año 2010, en Estados Unidos se implantaron un total de 332.000 prótesis de cadera y 719.000 prótesis de rodilla, con una incidencia de infección protésica de entre el 2 y el 2,4% (Tande y Patel 2014) (Kurtz et al. 2012). En España, la incidencia de infección de prótesis de cadera y rodilla entre los años 2001 y 2005 fue del 1,86 y 1,62% respectivamente (Rodriguez-Baño et al. 2008). A estas cifras hay que unir el gran número de prótesis de codo, hombro y tobillo que también son implantadas diariamente en todo el mundo, además de los materiales de osteosíntesis. En más de un 60% de los casos, el origen de la infección protésica se encuentra en la contaminación del sitio quirúrgico por microorganismos procedentes de la microbiota epitelial del paciente o del personal sanitario (Barberan 2006). En menor medida, también se puede producir una inoculación de microorganismos en la articulación debido a una diseminación hematógena desde un foco distante. Los microorganismos Gram positivos como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Corynebacterium* spp. y *Propionibacterium* spp. son los microorganismos implicados con mayor frecuencia en las infecciones protésicas.

Los hongos son patógenos poco frecuentes en este tipo de infecciones y se considera que causan menos del 1% de las mismas, siendo *C. albicans* y *C. parapsilosis* los más frecuentemente implicados (Azzam et al. 2009). Sin embargo, es posible que esta cifra esté subestimada ya que en algunos estudios, el aislamiento de una levadura en líquido articular se interpretó incorrectamente como una contaminación (Kuiper et al. 2013).

La infección de prótesis articular puede clasificarse en cuatro categorías: infección postquirúrgica precoz, infección hematógena aguda, cultivos intraoperatorios positivos y la infección crónica tardía. El tratamiento de la infección postquirúrgica precoz y hematógena aguda puede realizarse con desbridamiento quirúrgico y retención del dispositivo acompañado de tratamiento antimicrobiano durante 8 semanas, siempre que este no es encuentre aflojado y no exista una afectación significativa del tejido periprotésico. Sin embargo, en el caso de la infección crónica tardía y los cultivos intraoperatorios positivos, es necesaria la retirada del dispositivo en uno o dos tiempos y el tratamiento antimicrobiano durante 6 semanas (Ariza et al. 2008).

En el caso de la infección protésica de origen fúngico, la *Infectious Diseases Society of America* recomienda la retirada del dispositivo y algunos autores sugieren la realización de recambio protésico en dos tiempos, el desbridamiento quirúrgico, la utilización de cementos espaciadores con antifúngicos y el tratamiento sistémico con anfotericina B o fluconazol durante las 6 semanas posteriores a la reimplantación (Kuiper et al. 2013) (Osmon et al. 2013) (Wang et al. 2015). Durante la cirugía, se toman muestras de tejido periprotésico que contengan signos evidentes de inflamación para estudio microbiológico e histopatológico. Además, el dispositivo retirado se estudia mediante cultivo tras sonicación, un procedimiento que aumenta de manera significativa la sensibilidad del mismo (Trampuz et al. 2007).

El proceso de sonicación consiste en la generación de ultrasonidos que dan lugar a cavitaciones y micro-burbujas en el fluido las cuales producen un efecto vibratorio sobre la superficie del biomaterial. De esta manera, se facilita la liberación de los microorganismos adheridos a la superficie, aumentando de manera considerable la sensibilidad del cultivo cuantificado del caldo tras sonicación. Estudios previos han comparado los resultados obtenidos mediante cultivo del tejido periprotésico y cultivo de la prótesis tras sonicación, observando una sensibilidad del 60,8% y del 78,5% y una

especificidad del 99,2% y 99,8% respectivamente. Sin embargo, cuando se trataba de pacientes sometidos a tratamiento antibiótico previo, la sensibilidad era de 45% y 75% respectivamente (Trampuz et al. 2007).

La escasa incidencia de la infección protésica por *Candida* spp. ha impedido que los distintos estudios puedan obtener conclusiones válidas en relación con la eficacia de la técnica como herramienta diagnóstica de la infección fúngica. El caldo obtenido tras sonicación y el líquido sinovial extraído de la articulación pueden ser inoculados en frascos de hemocultivo que contengan agentes quelantes de antimicrobianos. De esta forma, se aumenta la sensibilidad y especificidad del cultivo, especialmente en pacientes que han recibido algún tipo de tratamiento o profilaxis previa a la cirugía. Mediante esta técnica, se han podido detectar el 72% de los patógenos bacterianos tras un día de incubación (Portillo et al. 2015), sin embargo, una vez más, la metodología no ha sido estudiada en profundidad para levaduras. En los últimos años, algunos autores han propuesto la realización de PCR multiplex del caldo tras sonicación, las cuales incluyen oligonucleótidos para la identificación de *Candida* spp. (Portillo et al. 2012).

1.1.4 Infección fúngica relacionada con prótesis valvulares

Las prótesis valvulares son dispositivos indispensables para el tratamiento de un gran número de valvulopatías. La endocarditis infecciosa afecta a un 3% de los pacientes con enfermedad valvular, de los cuales un 74% se desarrolla sobre válvula nativa y un 26% sobre prótesis valvular (Tornos et al. 2005).

La endocarditis sobre válvula protésica de desarrollo tardío es la más frecuente y se asemeja a la endocarditis sobre válvula nativa, ya que los microorganismos alcanzan la válvula por diseminación hematógena tras manipulación dental, gastrointestinal o genitourinaria, aislándose con mayor frecuencia *S. aureus*, seguido de los estreptococos del grupo *viridans*. La endocarditis sobre válvula protésica de desarrollo precoz es menos frecuente y se desarrolla tras una contaminación del dispositivo durante el acto quirúrgico, siendo los microorganismos más frecuentes los estafilococos coagulasa negativos y *S. aureus*. Los pacientes con candidemia poseen un riesgo elevado de desarrollo de endocarditis sobre la válvula protésica, la cual debe sospecharse en presencia de hemocultivos negativos, vegetaciones voluminosas e infección metastásica y

perivalvular. *C. albicans* seguida de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* son las responsables de la mayor parte de los episodios descritos en la bibliografía (Kojic y Darouiche 2004).

La mortalidad asociada a la endocarditis protésica de origen fúngico es alta, y está comprendida entre 37% y el 72% según los estudios realizados (Lefort et al. 2012) (Ellis et al. 2001). La observación de vegetaciones y otras alteraciones estructurales sobre las válvulas protésicas mediante la realización de ecocardiografía transesofágica posibilita un diagnóstico temprano y por tanto influye favorablemente en la supervivencia del paciente. Disponer de una confirmación microbiológica mediante aislamiento del hongo en sangre en esencial para asegurar el diagnóstico y las guías actuales recomiendan la extracción de tres hemocultivos. Aunque la técnica posee una sensibilidad del 90% para la detección de patógenos bacterianos (Beynon et al. 2006), esta se reduce hasta valores cercanos al 50% en el caso de *Candida* spp (Ellis et al. 2001).

Algunos autores han propuesto la utilización de técnicas de biología molecular para la detección de *Candida* spp. como el sistema LightCycler® SeptiFast (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) o el uso de marcadores serológicos como los anticuerpos anti-manano y los antígenos de manano y β-1,3-glucano para la mejora del diagnóstico microbiológico de esta infección (Lefort et al. 2012).

Las guías clínicas de la *European Society of Cardiology* recomiendan la utilización de voriconazol, combinado con anfotericina B liposomal o una equinocandina, acompañado del reemplazo quirúrgico de la válvula (Habib et al. 2015). Aunque las equinocandinas están siendo ampliamente utilizadas para el tratamiento de la candidemia no existen ensayos clínicos controlados que hayan evaluado la eficacia de estas en el tratamiento de la endocarditis de origen fúngico. Baddley y cols. han reportado el uso de caspofungina tanto en monoterapia como en tratamiento combinado con anfotericina B liposomal en el contexto de endocarditis sobre válvula protésica causada por *C. albicans* y otras especies como *C. parapsilosis* y *C. glabrata* (Baddley et al. 2008).

1.1.5 Infección fúngica relacionada con dispositivos de drenaje de líquido cefalorraquídeo

Los dispositivos de drenaje de líquido cefalorraquídeo son fundamentales para el tratamiento de la hipertensión intracraneal y su implantación es uno de los procedimientos neuroquirúrgicos más habituales en el mundo. Las infecciones relacionadas con estas derivaciones afectan aproximadamente al 5% de los dispositivos implantados y provocan alrededor del 50% de las meningitis nosocomiales en adultos (Jiménez-Mejías y García-Cabrera 2008). La contaminación del dispositivo se produce principalmente durante el acto quirúrgico de inserción, aunque las derivaciones ventrículo-peritoneales pueden ser colonizadas por parte de la microbiota fecal tras la perforación de un asa intestinal. Los estafilococos son los microrganismos más comúnmente involucrados en estas infecciones, seguidos de *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp. y bacilos Gram negativos.

La incidencia de la infección fúngica puede llegar al 17% siendo *C. albicans* y *C. tropicalis* las especies aisladas con mayor frecuencia (Kojic y Darouiche 2004). El riesgo de colonización del dispositivo y posterior desarrollo de una meningitis se ve incrementado cuando se trata de pacientes inmunocomprometidos y sometidos a tratamiento antibiótico de amplio espectro.

La administración intravenosa de anfotericina B liposomal es la elección terapéutica recomendada, sin embargo, estudios recientes han evaluado la eficacia de las equinocandinas para el tratamiento de estas infecciones. Jans y cols. utilizaron caspofungina para el tratamiento de una meningitis por *C. albicans* asociada a drenaje ventrículoperitoneal con resultados favorables (Jans et al. 2013). Aunque se considera indispensable la retirada del dispositivo para controlar la infección, recientemente, algunos autores han reportado la eficacia de una solución de sellado antifúngico del drenaje utilizando micafungina a una concentración de 1.500 mg/L (Auriti et al. 2016).

1.2 BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP.

Candida spp. es capaz de adherirse y desarrollar una biopelícula sobre un gran número de superficies, tanto materiales inertes como tejidos vivos. La formación de esta

comunidad biológica comprende cuatro principales estadios temporales que guardan similitud con los que acontecen en la formación de la biopelícula bacteriana (Figura 1.1).

En una primera fase, las blastosporas de *Candida* spp. contactan con una superficie y se adhieren a ella, reclutando nuevas células planctónicas hacia la superficie recién colonizada e iniciando un proceso de proliferación celular desde las capas basales inicialmente adheridas (Nobile y Johnson 2015). Estudios previos con modelos *in vitro* en agitación han observado que la duración de esta primera parte comprende un periodo de aproximadamente 12 horas, tras las cuales se pueden observar agregados celulares sobre la superficie colonizada (Chandra et al. 2001a).

En una segunda fase, comienza el desarrollo de pseudohifas e hifas verdaderas acompañado de un intenso proceso de biosíntesis de la matriz polimérica extracelular rica en carbohidratos y proteínas cuya composición varía según las especies. De esta forma, alrededor de 20 a 24 horas después de la adhesión de las primeras células se obtiene una biopelícula madura, que continuará sintetizando nueva matriz extracelular y dispersando células planctónicas que intentarán colonizar nuevas superficies (Ramage et al. 2001a).

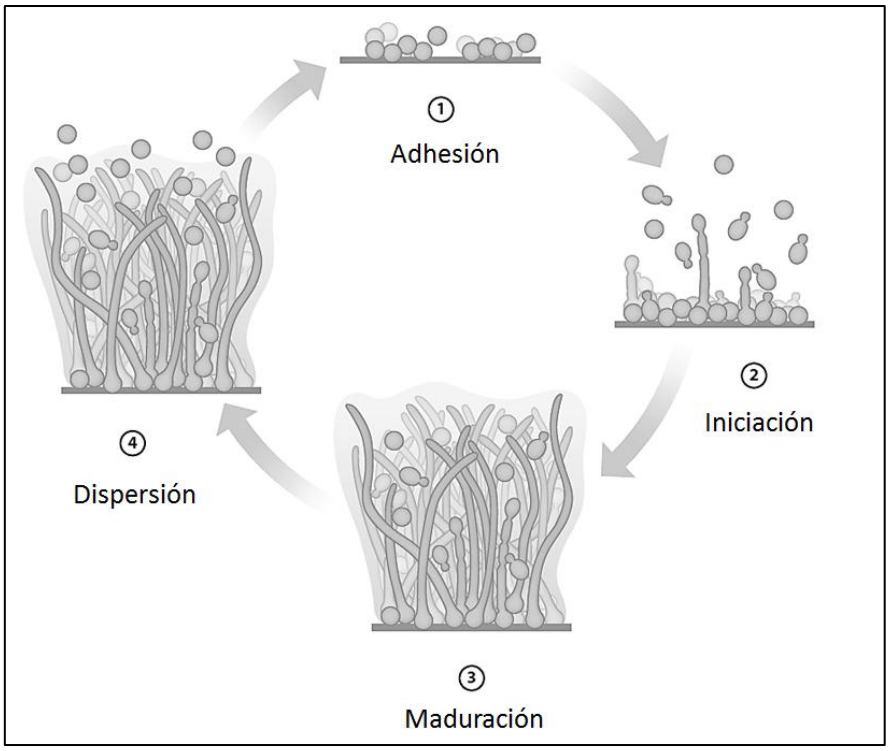


Figura 1.1. Representación esquemática del desarrollo de la biopelícula de *C. albicans*. Tomado de Nobile y cols. (Nobile y Johnson 2015)

La mayor parte de los estudios relacionados con la biopelícula de *Candida* spp. han sido realizados sobre *C. albicans* y se desconoce en gran medida el proceso de formación de la biopelícula de otras especies. Es de especial interés tener en cuenta que existen especies como *C. krusei* y *C. glabrata* que son incapaces producir pseudomicelio. Esta característica puede influir de manera notable en la citoarquitectura o en la composición de la biopelícula, generando diferencias significativas con respecto al modelo de formación de la biopelícula de *C. albicans* que se ha descrito.

1.2.1 Mecanismos de adhesión de *Candida* spp. a superficies inertes

Un elemento que juega un papel fundamental en la adherencia de un microorganismo a una superficie es el equilibrio termodinámico que existe entre las energías superficiales del biomaterial, la célula microbiana y el medio líquido que rodea a ambos. Normalmente, la energía superficial de un microorganismo es menor que la energía superficial del líquido en el cual está inmerso. Esta diferencia provoca que las células microbianas se adhieran preferentemente a materiales hidrófobos, los cuales poseen los valores más bajos de energía superficial dentro de esta triple interacción (Tuson y Weibel 2013). Estudios previos, realizados con *C. albicans* y *C. parapsilosis*, han observado que los aislados más hidrófobos, que poseen por tanto menor energía superficial, son los que presentan una mayor capacidad de adherencia en una gran variedad de tejidos y superficies (Gallardo-Moreno et al. 2002) (Masuoka y Hazen 2004).

C. albicans es capaz de regular el grado de hidrofobicidad celular superficial mediante la modificación de la composición y conformación espacial de las fibrillas de manoproteínas presentes en la superficie de su pared celular, la cual se ve modificada a lo largo de las distintas fases de crecimiento y desarrollo del microorganismo. Por una parte, las manoproteínas de las células hidrófobas poseen mayor concentración de fosfolipomananos (Masuoka y Hazen 2004) y, por otra parte, su conformación en la superficie de las células hidrófobas es corta y agregada mientras que en las células hidrófilas son largas y están espaciadas uniformemente (Hazen y Hazen 1992) (Trinel et al. 1993). El grado de hidrofobicidad celular superficial varía también según la especie de *Candida* estudiada. *C. tropicalis* es la especie más hidrófoba seguida de *C. parapsilosis, C. glabrata* y *C. albicans* (Silva-Dias et al. 2015).

Candida spp. dispone de mecanismos específicos de adherencia que le permiten el anclaje a receptores orgánicos e inorgánicos presentes en el sustrato. Se han descrito múltiples adhesinas implicadas en la adherencia de *C. albicans* como pueden ser las proteínas con secuencia tipo aglutinina Als1 y Als3, las cuales poseen dominios hidrófobos ricos en aminoácidos serina-treonina y forman agregados que favorecen la aglutinación de las células fúngicas (Liu y Filler 2011) (Otoo et al. 2008). También se han descrito otras adhesinas como la proteína asociada a la pared de la hifa Hwp1, la proteína de adherencia aumentada a poliestireno Eap1 y la proteína relacionada con la hidrofobicidad celular superficial Csh1 (Modrzewska y Kurnatowski 2015).

Existen pocos estudios relacionados con la identificación de adhesinas en otras especies del género *Candida*. Se han descrito algunas proteínas con secuencias similares a las Als de *C. albicans*, como pueden ser la lectina dependiente de calcio Epa1p en *C. glabrata* y la proteína con anclaje a glicosilfosfatidilinositol Pga30 en *C. parapsilosis* (Silva et al. 2012).

1.2.2 Crecimiento y maduración de la biopelícula de *Candida* spp.

El desarrollo de la biopelícula de *Candida* spp. conlleva un intenso proceso de biosíntesis de una matriz extracelular rica en carbohidratos y proteínas. Estudios previos han observado que la matriz extracelular de *C. albicans* está compuesta principalmente de carbohidratos (39.6%), especialmente glucosa (32.2%) aunque también es posible encontrar pequeñas cantidades de proteínas (5%), hexosaminas (3.3%), fósforo (0.5%) y ácido urónico (0.1%) (Al-Fattani y Douglas 2006). Las moléculas de glucosa se encuentran formando principalmente β-1,3-glucano, el cual es no solo el componente fundamental de la pared celular sino también el carbohidrato más abundante de la matriz extracelular.

Estudios previos han observado la presencia de ADN extracelular formando parte de la matriz de la biopelícula de *Candida* spp. Aunque algunos autores han sugerido que este material genético es liberado tras la muerte celular fruto de la escasez de nutrientes en el interior de la biopelícula (Martins et al. 2010), existen estudios que ponen de manifiesto su importancia en determinadas especies. Al-Fattani y cols. observaron que el tratamiento

con DNasa I no afecta la biopelícula de *C. tropicalis*, sin embargo, provoca la desestructuración de la biopelícula de *C. albicans* (Al-Fattani y Douglas 2006).

La composición de la matriz extracelular puede variar según especies. *C. tropicalis* posee una matriz formada principalmente por hexosaminas (27.4%) con pequeñas cantidades de carbohidratos (3.3%) y proteínas (3.3%) de manera tal que la glucosa (0.5%) es un componente minoritario (Al-Fattani y Douglas 2006). Las hexosaminas presentes en la matriz de *C. tropicalis* se encuentran formando un polisacárido β-1,6 resistente a quitinasa, el cual también está presente en otras biopelículas como la de *S. epidermidis*. *C. parapsilosis* también desarrolla una biopelícula con abundantes carbohidratos mientras que *C. glabrata* se caracteriza por desarrollar una biopelícula rica en proteínas (Silva et al. 2009).

La biopelícula madura es una compleja red de microcolonias y canales de agua cuya citoarquitectura presenta diferencias significativas entre especies. *C. albicans* muestra organización bifásica, con una capa de blastosporas adheridas al biomaterial, que posee una profundidad de una o dos células, las cuales se encuentran metabólicamente activas. Estas células basales están cubiertas por una fina capa de matriz extracelular libre de células y consistente en un denso agregado de β-1,3-glucano similar a la pared celular. Por encima se sitúa una capa de abundantes hifas inmersas en matriz extracelular, las cuales también se encuentran metabólicamente activas (Chandra et al. 2001a) (Kuhn et al. 2002a).

Estudios previos relacionados con la citoarquitectura de las biopelículas de otras especies del género *Candida* muestran una gran heterogeneidad estructural, que varía según el aislado en estudio y el biomaterial que actúa como sustrato. En general, *C. glabrata* muestra una biopelícula formada exclusivamente por blastosporas que se constituyen en capas de varias células de profundidad, íntimamente unidas, formando agregados. *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* muestran una biopelícula bifásica, con capas basales de blastosporas que pueden estar ausentes en algunos aislados e hifas en mayor o menor proporción que se muestran en forma de largos filamentos (Silva et al. 2009).

1.2.3 Regulación del desarrollo de la biopelícula de *Candida* spp.

A medida que la biopelícula de *Candida* spp. crece, el aumento del número de células presentes en su interior puede poner en riesgo el desarrollo de la comunidad biológica, debido a la escasez de nutrientes fundamentales para continuar su crecimiento. En estas situaciones de sobrepoblación, se produce un aumento significativo en la síntesis y liberación de moléculas implicadas en la autorregulación de la densidad celular mediante mecanismos de percepción del quórum (*quorum sensing*) (Hogan 2006).

El Farnesol es un sesquiterpeno acíclico que posee un importante papel en el control de la transición morfológica levadura – micelio y ha sido descrito como la principal molécula de *quorum sensing* en *C. albicans*. En presencia de alta densidad celular, se produce un aumento de la concentración de Farnesol en el interior de la biopelícula, cuya consecuencia directa es la inhibición de la transición dimórfica de blastospora a hifa la cual es un proceso fundamental en la morfogénesis de la biopelícula de *C. albicans* (Ramage et al. 2002b). La acción del Farnesol desencadena la desestructuración de la biopelícula y la liberación de nuevas células planctónicas que intentarán colonizar nuevas superficies. Farnesol actúa sobre genes reguladores implicados en la formación de la hifa, como pueden ser el correpresor Tup1 y el factor de transcripción Efg1 además de afectar la expresión de adhesinas como Csh1, implicada en la adherencia y formación de la biopelícula (Cao et al. 2005). Además, estudios recientes han observado que el Farnesol posee capacidad para inducir la apoptosis en *C. albicans* (Shirtliff et al. 2009). También es producido por otras especies del género *Candida* como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, sin embargo, la concentración alcanzada en estas especies es mucho menor que en *C. albicans* (Weber et al. 2008).

El Tirosol es un derivado del alcohol fenetílico que también está implicado en la regulación de la transición levadura-micelio y ha demostrado tener propiedades como molécula de *quorum sensing* en *C. albicans*, especialmente en etapas más tempranas del desarrollo de la biopelícula, durante las cuales, al contrario que el Farnesol, estimula la transición dimórfica de blastospora a hifa, favoreciendo la formación de la biopelícula (Alem et al. 2006). Estudios previos han observado que la producción de Tirosol es elevada en *C. tropicalis* y en menor medida también es producido por *C. parapsilosis* y *C. glabrata* (Cremer et al. 1999).

1.2.4 Resistencia de la biopelícula de *Candida* spp. a los antifúngicos

Es ampliamente reconocido por la comunidad científica que las biopelículas muestran una mayor resistencia a los antimicrobianos. Estudios previos, han observado que la actividad de los antifúngicos sobre una biopelícula de *Candida* spp. puede llegar a ser hasta 2.000 veces menor en comparación con la actividad de los mismos sobre *Candida* spp. en fase de crecimiento planctónico (Hawser y Douglas 1995). La resistencia antifúngica de la biopelícula de *Candida* spp. es de origen multifactorial y puede ser explicada por diversos mecanismos según la especie, el antifúngico implicado y la fase de maduración de la biopelícula. En la actualidad, se consideran como principales mecanismos de resistencia 1) la presencia de *persisters* o células en estado latente con actividad metabólica reducida, 2) la respuesta adaptativa frente a un estrés ambiental mediante bombas de expulsión activa o mecanismos de impermeabilidad, 3) el efecto inóculo fruto de la elevada densidad celular en el interior de la biopelícula y 4) la limitada difusión de los antifúngicos a través de la matriz extracelular.

Difusión de los antifúngicos a través de la matriz extracelular

La matriz extracelular de la biopelícula supone una barrera natural a la difusión de antifúngicos en su interior. Los primero estudios relacionados con la difusión de antifúngicos en la biopelícula mostraron que anfotericina B, 5-fluorocitosina y fluconazol poseen mayor actividad sobre la biopelícula en fases iniciales de su desarrollo, sin embargo, sobre biopelículas maduras la tasa de difusión se reduce de manera significativa (Chandra et al. 2001b). Algunos autores han observado que el β-1,3-glucano, principal componente de la matriz extracelular de *C. albicans*, actúa de manera similar a un agente quelante, atrapando y dificultando la difusión de azoles, equinocandinas, pirimidinas y polienos (Nett et al. 2010). La tasa de difusión de los antifúngicos varía dependiendo de la especie estudiada. Las biopelículas de *C. krusei* y *C. glabrata* son más permeables a los antifúngicos, mientras que las biopelículas de *C. albicans*, *C. parpasilosis* y especialmente las de *C. tropicalis* dificultan en mayor medida la difusión de los mismos (Al-Fattani y Douglas 2004) (Samaranayake et al. 2005).

Estos resultados sugieren que la citoarquitectura y la composición de la matriz extracelular influye sobre la tasa de difusión del antifúngico. *C. tropicalis*, cuya matriz

está compuesta principalmente de hexosaminas unidas mediante un enlace β-1,6 formando un polisacárido similar a la quitina, forma la biopelícula más impermeable a los antifúngicos dentro de las especies estudiadas del género *Candida* spp. (Al-Fattani y Douglas 2006). Sin embargo, cuando se expone la biopelícula a los antifúngicos durante un periodo prolongado de tiempo para favorecer la difusión de los mismos hasta las capas más inferiores, no se obtiene una erradicación total de las células viables (Al-Fattani y Douglas 2004). Este hecho, nos indica que el efecto barrera que ejerce la matriz extracelular no es el único mecanismo de resistencia que posee la biopelícula de *Candida* spp.

Respuesta adaptativa frente al estrés ambiental

Candida spp. dispone de mecanismos de respuesta encaminados a proteger la célula ante la presencia de moléculas potencialmente tóxicas como pueden ser los antifúngicos. Uno de estos mecanismos son las bombas de expulsión o *efflux*, las cuales se encuentran en la membrana externa y se encargan del transporte activo de moléculas tóxicas hacia el exterior celular. *C albicans* dispone de una superfamilia de transportadores tipo ABC, codificados en los genes CDR, cuya sobreexpresión induce un mecanismo de resistencia que afecta especialmente a los azoles y que no es activo sobre las equinocandinas (Mukherjee et al. 2003).

Estudios previos han observado que las células de *C. albicans* sensibles a fluconazol en su fase de crecimiento planctónico, son capaces de crecer y madurar en presencia de concentraciones de fluconazol superiores a 1.024 mg/L en fase planctónica (Ramage et al. 2002a). Sin embargo, un gran número de autores coinciden en afirmar que el mecanismo de bombas de expulsión solo explicaría la resistencia de *Candida* spp. a los azoles en las etapas más tempranas del desarrollo de la biopelícula (Mukherjee et al. 2003).

Candida spp. también es capaz de regular la permeabilidad de su membrana celular, mediante la modificación de su fluidez y asimetría, para dificultar la difusión al interior de la célula de moléculas tóxicas como los antifúngicos. Los aislados de *Candida* spp. que muestran un mayor nivel de resistencia a los polienos y azoles poseen una membrana que se caracteriza por tener una concentración reducida de ergosterol, el cual es remplazado por esteroles metilados como el lanosterol. La ausencia de ergosterol reduce

la fluidez de la membrana y por tanto aumenta su impermeabilidad, lo cual dificulta la difusión de los antifúngicos a través de la misma y genera resistencia a azoles en una biopelícula madura. Estudios previos han observado que la cantidad de ergosterol que contiene la membrana plasmática de las células en la biopelícula es alrededor del 50% de la cantidad de ergosterol presente en las células planctónicas (Mukherjee et al. 2003).

Los componentes de la pared celular también pueden ser modificados para aumentar su impermeabilidad y limitar o impedir la entrada de antifúngicos al interior de la célula. Un componente fundamental de la pared celular es el β-1,3-glucano, cuya concentración puede verse afectada por la acción de las equinocandinas sobre la β-1,3-glucano sintasa. Esta familia de antifúngicos se caracteriza por inducir tolerancia a elevadas concentraciones, fenómeno que es conocido como "efecto paradójico". Estudios previos han observado que en presencia de elevadas concentraciones de caspofungina y micafungina, se produce un aumento en la cantidad de quitina presente en la pared celular, lo cual actúa como mecanismo de compensación ante la pérdida de β-1,3-glucano y aumenta la impermeabilidad de la membrana al paso de antifúngicos (Bizerra et al. 2011) (Kaneko et al. 2010).

Este mecanismo de compensación está regulado por la proteína fosfatasa dependiente de calcio, calcineurina, y la proteína de choque térmico Hsp90, las cuales también están implicadas en la resistencia a azoles (Ramage et al. 2012).

Células latentes con actividad metabólica reducida

En los últimos años, el concepto microbiológico de la "persistencia" ha adquirido mayor relevancia debido a su importancia en el desarrollo de las enfermedades infecciosas crónicas y la resistencia de las biopelículas a los antimicrobianos (Lewis 2007). Las células persistentes o *persisters* son variantes latentes de las células normales formadas de manera aleatoria en el interior de la biopelícula y se caracterizan por una actividad metabólica reducida y la ausencia de división celular.

Los *persisters* no son resistentes sino tolerantes al antimicrobiano, ya que no han adquirido un mecanismo de resistencia, sino que es su estado de latencia metabólica el que les permite sobrevivir. Una vez la célula sale de su estado de latencia, es capaz de

regenerar la población celular inicial con idéntica sensibilidad que la original (Balaban et al. 2004). Estudios previos han observado que la biopelícula de *Candida* spp. muestra un patrón bifásico de letalidad, ya que, tras la muerte de una mayoría de células sensibles, permanece una segunda población de células que toleran la presencia del antifúngico.

Algunos autores han sugerido que estas células persistentes pueden ser similares a las células quiescentes de *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales son termotolerantes, osmotolerantes y resistentes a la acción de una gran variedad de compuestos que actúan sobre la pared celular del hongo (LaFleur et al. 2006). *Candida* spp. es capaz de generar clamidosporas a partir de las hifas, las cuales se caracterizan por ser células esféricas asexuales de pared celular gruesa y lisa, que permiten al hongo sobrevivir en condiciones adversas (Martin et al. 2005). Sin embargo, no se ha demostrado la presencia de clamidosporas en el interior de la biopelícula y su implicación en la persistencia es discutida en la actualidad.

Densidad celular y tasa de crecimiento de la biopelícula

Es ampliamente reconocido por la comunidad científica que la actividad de los antimicrobianos se ve disminuida en presencia de una densidad celular elevada, fenómeno conocido como "efecto inóculo". Se ha observado que la sensibilidad planctónica de *C. albicans* a fluconazol se reduce hasta un 40% en presencia de una densidad celular de 10^7 ufc/ml (Perumal et al. 2007). Por este motivo, los métodos estandarizados para el estudio de la sensibilidad de los hongos a los antifúngicos como el documento M27-A3 de la *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) recomiendan ajustar el inóculo microbiano a 10^3 ufc/ml (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008).

La densidad celular en el interior de la biopelícula de *Candida* spp. se encuentra en valores cercanos a 10^8 ufc/ml. Estudios previos han observado que al disgregar la biopelícula y devolver las células a forma planctónica, la suspensión celular resultante sigue mostrando los mismos valores de resistencia azoles que la biopelícula (Perumal et al. 2007). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que, en presencia de densidades celulares elevadas, uno de los efectos del farnesol como molécula de *quorum sensing* es activar la expresión de las bombas de expulsión activa, que confieren resistencia a azoles y polienos (Enjalbert y Whiteway 2005).

1.2.5 Nuevas estrategias terapéuticas para la erradicación de la biopelícula de *Candida* spp.

En la actualidad hay interés en el estudio y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas eficaces sobre la biopelícula de *Candida* spp. como la combinación de antifúngicos con diversos compuestos como extractos naturales, aceites esenciales, agentes quelantes, mucolíticos, antibióticos enzimas y agentes del *quorum sensing* (Bink 2011). El mecanismo de acción de estas moléculas es muy diverso, sin embargo, como norma general ejercen su efecto mediante la desestructuración de la citoarquitectura de la biopelícula ya sea por la rotura de enlaces célula - matriz, la inhibición de ciertas actividades enzimáticas y/o la modulación de la expresión génica.

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es agente quelante capaz de unirse a metales como el calcio formando complejos indisolubles. El EDTA ha sido tradicionalmente utilizado para el tratamiento de la intoxicación por metales pesados (Flora y Pachauri 2010) y en los últimos años algunos autores han evaluado su actividad sobre la biopelícula de *Candida* spp. El EDTA altera drásticamente la estructura de la biopelícula, especialmente cuando esta es expuesta al quelante en sus etapas más tempranas de desarrollo. El principal efecto del EDTA es la inhibición de la transición levadura – micelio y la consecuente reducción de la expresión de la adhesina Hwp1 y de manoproteínas de superficie, lo cual produce una biopelícula desestructurada consistente en agregados de blastosporas (Ramage et al. 2007).

La eficacia del EDTA es reducida sobre biopelículas maduras, lo que sugiere que metales como el calcio son indispensables en etapas tempranas del desarrollo de la misma. El secuestro de calcio puede afectar a la actividad de la calmodulina, la cual ejerce un papel fundamental en el ensamblaje de los microtúbulos y el proceso de filamentación (Gil et al. 1994). Raad y cols. observaron en modelos *in vitro* de sellado antifúngico de catéteres venosos centrales que EDTA mejora la actividad de anfotericina B (Raad et al. 2008). El hecho de que el EDTA disponga de propiedades anticoagulantes y antimicrobianas, ha llevado a algunos autores a sugerir su utilización en lugar como anticoagulante de heparina para el cuidado de los catéteres venosos centrales.

La N-acetilcisteína (NAC) es un derivado del aminoácido L-cisteína y se caracteriza por tener un grupo sulfhidrilo, cuya oxidación da lugar a un puente disulfuro entre dos moléculas. Esta característica le aporta una gran capacidad reductora y es por ello que la molécula se comporta como antioxidante, mucolítico y antiinflamatorio. NAC ha sido utilizada para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la intoxicación por paracetamol y la enfermedad cardíaca isquémica (Atkuri et al. 2007). Algunos autores han observado que la cantidad de matriz extracelular presente en la biopelícula bacteriana se reduce en presencia de NAC, hecho que podría ser explicado por la acción de los grupos sulfhidrilo sobre los puentes disulfuro establecidos tanto entre los componentes de la matriz como en las enzimas implicadas en la síntesis de estos últimos (Olofsson et al. 2003) (Dinicola et al. 2014). Pocos estudios han evaluado la eficacia de NAC sobre la biopelícula de *Candida* spp. Algunos autores han observado efecto sinérgico entre la NAC y la anfotericina B o el fluconazol sobre la biopelícula de *C. albicans* (Venkatesh et al. 2009).

NAC ha sido utilizado en combinación con tigeciclina como estrategia de sellado antibiótico para la erradicación de la biopelícula bacteriana obteniéndose resultados alentadores (Justo y Bookstaver 2014), sin embargo, no tenemos estudios de sellado antifúngico de catéter que hayan evaluado la actividad de NAC. Otras moléculas antioxidantes como el citrato también han mostrado ser efectivas sobre la biopelícula estafilocócica (Bosma et al. 2010), lo cual refuerza la hipótesis de la reducción de determinados enlaces en la matriz como estrategia para la desestructuración de la biopelícula.

Los antibióticos como la rifampicina, tetraciclinas como tigeciclina, minociclina o doxiciclina y los macrólidos como claritromicina o azitromicina también han sido estudiados en combinación con antifúngicos sobre la biopelícula de *Candida* spp. Rifampicina se une a la RNA polimerasa inhibiendo de esta forma la transcripción y ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de las infecciones relacionadas con la biopelícula bacteriana (Trampuz y Widmer 2006). Algunos estudios han observado actividad sinérgica entre la rifampicina y la anfotericina B sobre las biopelículas de *C. albicans, C. parapsilosis, C. krusei* y *C. glabrata* (El-Azizi 2007) (Del Pozo et al. 2011), que podría ser debido a que un aumento de la permeabilidad producido por la

anfotericina B afectaría no solo de la pared celular sino también de la matriz de β-1,3 glucano, lo cual facilitaría que la rifampicina alcance el ribosoma fúngico.

Los macrólidos como claritromicina también han demostrado sinergismo sobre las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* (Del Pozo et al. 2011). Algunos autores han reportado la eficacia de una solución de sellado con eritromicina en el rescate de un catéter venoso central colonizado con *S. aureus* y *C. parapsilosis* (Wu y Lee 2007). La eficacia de los macrólidos podría deberse a su capacidad para estimular la actividad de ciertas enzimas como las hexosaminidasas, produciendo cambios significativos en la matriz extracelular (Gerbaux et al. 1996).

Otras muchas moléculas de diverso origen y función han sido estudiadas como estrategia sobre la biopelícula de *Candida* spp. Las DNasas han mostrado una mejora de la actividad de polienos y equinocandinas, pero no la de los azoles (Martins et al. 2012). El quitosano, que se sintetiza mediante desacetilación de la quitina, posee propiedades antimicrobianas y ha sido utilizado para recubrir superficies inertes y evitar la formación de la biopelícula de *Candida* spp. (Carlson et al. 2008). El farnesol, molécula del *quorum sensing* de *Candida* spp., que induce la desestructuración y dispersión de la biopelícula, también ha mostrado actividad sinérgica no solo con antifúngicos sino también con NAC sobre la biopelícula bacteriana y fúngica (Katragkou et al. 2015) (Gomes et al. 2012).

1.3 BIOMATERIALES

El estudio de las características estructurales y superficiales de los biomateriales es esencial para comprender en su conjunto la triple interacción que se produce entre el huésped, el microorganismo y la superficie durante las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos. *Candida* spp. es capaz de adherirse y desarrollar una biopelícula madura sobre sustratos inertes de diversa composición y estructura. Las propiedades fisicoquímicas de estos materiales y en especial sus características superficiales influyen de una manera significativa sobre la biopelícula resultante. Es por ello que, en la actualidad, una de las estrategias más importantes en el control de estas infecciones pasa por el desarrollo de nuevas superficies que sean capaces de impedir la adherencia de los microorganismos y la posterior formación de la biopelícula.

1.3.1 Definición y clasificación de los biomateriales

Según la *European Society for Biomaterials*, un biomaterial se define como "un material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo" (Williams 1987). Una propiedad fundamental de los biomateriales es la biocompatibilidad la cual está definida por la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como la "capacidad de un material para estar en contacto con un sistema biológico sin producir un efecto adverso" (Williams 2003).

La evaluación de la seguridad de los biomateriales se realiza mediante estudios *in vivo* de la toxicidad, inflamación, irritación, sensibilidad, carcinogenicidad, mutagenicidad, respuesta alérgica y hemocompatibilidad del biomaterial, según la norma ISO 10993-1:2009 (International Organization for Standardization 2009).

Tras la implantación del dispositivo, se desencadena una interacción bidireccional en la que el biomaterial induce en el huésped alteraciones tisulares como la hipersensibilidad o la inflamación y al mismo tiempo el huésped altera las propiedades físicas o mecánicas del biomaterial (Davis 2003). Sin embargo, en esta descripción clásica de biocompatibilidad, no se tiene en cuenta la capacidad que poseen los microorganismos para colonizar la superficie del material implicado y desencadenar un proceso infeccioso que influye de manera negativa en la biocompatibilidad del implante. La biocompatibilidad es por tanto un concepto complejo en el cual es necesario tener en cuenta el biomaterial, el huésped y la biopelícula microbiana formada en los casos de infección.

El análisis de las características superficiales del biomaterial es fundamental para entender la interacción de este con el entorno biológico que lo rodea. Las propiedades fisicoquímicas de la superficie definen el tipo de interacciones moleculares que pueden llegar a establecerse con las células adyacentes. En función de estas interacciones, se pueden definir dos categorías: biomateriales bioinertes y bioactivos o biodegradables (Hench y Thompson 2010). En los biomateriales bioinertes (primera generación) no se producen interacciones moleculares entre el biomaterial y el medio biológico y por tanto la interfaz entre ambos solo es capaz de transmitir esfuerzos mecánicos.

En los biomateriales bioactivos o biodegradables (segunda generación) se produce una interacción molecular positiva entre el biomaterial y el entorno fisiológico la cual puede favorecer procesos de regeneración tisular, osteointegración, etc. Los biomateriales de tercera generación que comienzan a aparecer en el mercado, se caracterizan por inducir una respuesta celular muy específica mediante la modulación de la respuesta génica de las células del hospedador (Hench y Polak 2002).

La funcionalización de superficies es una nueva estrategia que persigue una mejor integración del biomaterial en el entorno fisiológico en el que va a ser implantado. Consiste en la modificación de la superficie con grupos funcionales que favorecen los procesos adhesión, proliferación y angiogénesis del tejido del hospedador. Muchos estudios demuestran la eficacia de esta estrategia en la regeneración ósea, utilizando factores morfogenéticos que estimulan la proliferación y diferenciación de las células progenitoras pluripotentes. La funcionalización de superficies para conseguir un efecto antimicrobiano es una estrategia novedosa que está siendo explorada en la actualidad. La unión covalente de antibióticos y anticuerpos en la superficie, los sistemas de liberación controlada de antimicrobianos, las superficies superomnifóbicas, la realización de modificaciones microestructurales de la superficie o la utilización de ondas acústicas superficiales son algunas de las nuevas tecnologías que se encuentran en desarrollo para impedir la adherencia microbiana y el desarrollo de las biopelículas. Estas nuevas tecnologías, están demostrado ser eficaces sobre biopelículas de *Candida* spp. (Coenye et al. 2011) (Cuéllar-Cruz et al. 2012).

El elevado número de aplicaciones biomédicas que poseen los biomateriales hacen de estos un grupo muy heterogéneo, con una gran diversidad de características y propiedades estructurales, encaminadas a adaptar el dispositivo de la mejor manera posible al entorno fisiológico, al tiempo previsto de utilización y a la función asignada. Según su composición, los biomateriales se pueden clasificar en 4 categorías: polímeros plásticos, metales, biocerámicas y las resinas compuestas o *composites* (Park y Lakes 2007).

1.3.2 Politetrafluoroetileno

El politetrafluoroetileno (PTFE) es un polímero termoplástico fluorocarbonado, descubierto en 1938 por el químico Roy J. Plunkett y comercializado bajo el nombre de

Teflón® por la firma multinacional DuPont. El PTFE es un material duro, rígido, insoluble, inerte y no inflamable. Su resistencia química y térmica es excepcional dentro de los polímeros. Además, es extremadamente resistente a la corrosión y a la acción de los disolventes.

El PTFE es un derivado del polietileno en el cual los cuatro átomos de hidrógeno han sido sustituidos por átomos de flúor (Dupont 1996). La fórmula química del monómero de tetrafluoroetileno es $CF_2=CF_2$. Estos monómeros se polimerizan en largas cadenas de hasta 50.000 grupos $-CF_2-$ cada una. Los enlaces C-C y C-F poseen una elevada fuerza de unión (Figura 1.2). Los átomos de carbono y flúor coinciden en tamaño, de manera tal que estos últimos forman una lámina continua sobre la cadena carbonada protegiéndola del ataque químico. La molécula se empaqueta formando un sólido denso y compacto con un punto de fusión elevado que le aporta estabilidad química y térmica.

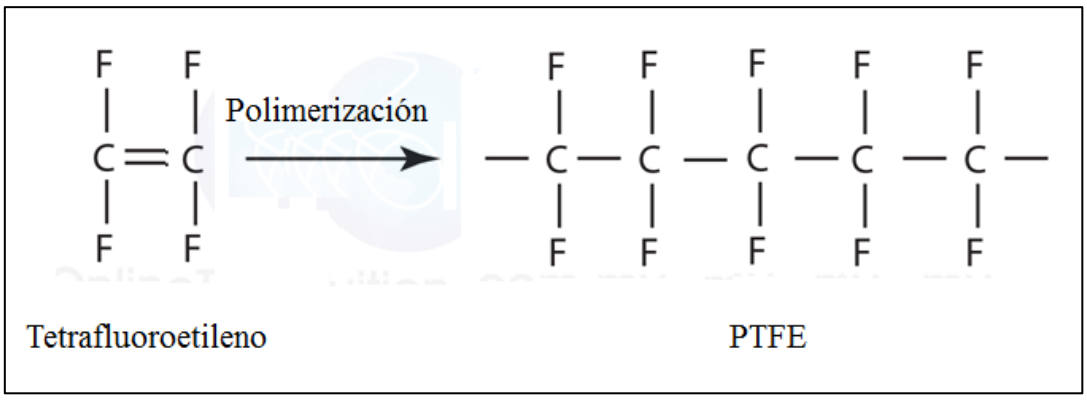


Figura 1.2. Esquema de la estructura molecular del tetrafluoroetileno y el PTFE.

El PTFE posee un coeficiente de fricción muy bajo, inferior a 0,1, motivo por el cual la superficie del material es resbaladiza y cérea al tacto. Además, su superficie se caracteriza por tener una tensión superficial también baja, de 20 dinas/cm^2, lo cual reduce el número de interacciones que puede realizar con el entorno, y le aporta a la superficie una elevada hidrofobicidad.

La hidrofobicidad de una superficie se define por el ángulo de contacto que se establece entre la superficie del sólido y el líquido con el cual entra en contacto (Figura 1.3). En las superficies hidrófilas se producen interacciones no covalentes entre la molécula de agua y la superficie, como pueden ser los puentes de hidrógeno. En este caso, la gota de agua se extiende sobre la superficie generando ángulos de contacto inferiores a 90 grados. Sin embargo, en las superficies hidrófobas las fuerzas de repulsión que es

establece entre la molécula de agua y la superficie hace que la gota de agua repose sobre esta, pero sin mojarla, generando ángulos de contacto superiores a 90 grados.

En el caso del PTFE, el ángulo de contacto tiene un valor de 110º y por tanto se comporta como una superficie altamente hidrófoba. Esto quiere decir que la superficie del PTFE no establece interacciones con sustancias polares como el agua, sin embargo, sí que puede establecer interacciones hidrofóbicas con lípidos y proteínas que contengan residuos hidrófobos. Esto es de especial interés en las fases tempranas del desarrollo de la biopelícula ya que las adhesinas de superficie de *Candida* spp. como las proteínas Als o Chs1 poseen dominios hidrófobos ricos en serina y treonina, que le permiten a la levadura adherirse a superficies hidrófobas. De la igual forma, las levaduras con una hidrofobicidad celular superficial alta podrían adherirse más fácilmente en esta superficie.

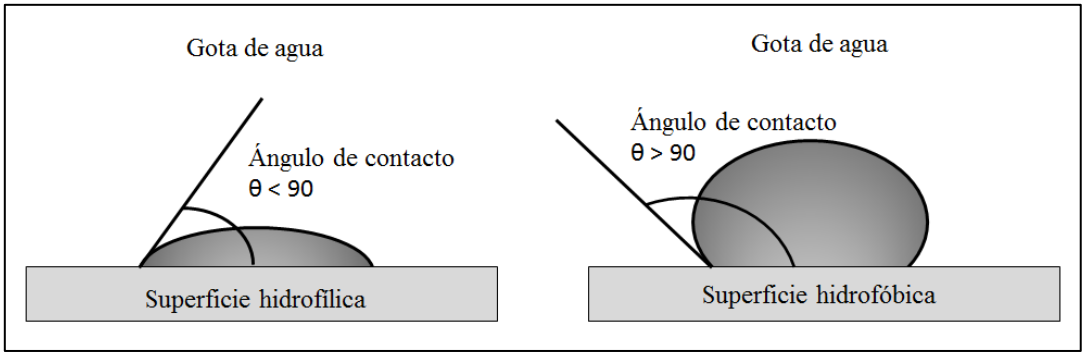


Figura 1.3. Representación esquemática del ángulo de contacto formado entre la gota de agua y superficies hidrófilas e hidrófobas.

1.3.3 Titanio

El titanio (Ti) es un metal de transición con número atómico 22. Se encuentra en la naturaleza como dióxido de titanio (TiO_2) formando un mineral llamado rutilo. El titanio no aleado, conocido como titanio comercialmente puro contiene entre un 98.64% y un 99.5% de titanio. Se clasifica en diversos grados (1, 2, 3 y 4) en función de los elementos intersticiales presentes en la estructura, tales como oxígeno, nitrógeno, carbono o hierro. El titanio comercialmente puro es la forma de menor resistencia mecánica y de mayor resistencia a la corrosión y ductilidad (Leyens y Peters 2003).

El titanio es un metal alotrópico y por tanto puede adquirir más de una forma cristalográfica. Se denomina fase alfa (α-Ti) a la estructura cristalina hexagonal compacta

que se obtiene por debajo de los 882 ºC y fase beta (β-Ti) a la estructura cúbica centrada en el cuerpo que se obtiene por encima de dicha temperatura (Figura 1.4). Por este motivo, las aleaciones de titanio se clasifican en función de la fase cristalográfica más abundante. De esta forma, se consideran fundamentalmente tres categorías: aleaciones alfa, aleaciones alfa-beta y aleaciones beta y cada una de las fases puede ser estabilizada utilizando distintos aleantes. La fase alfa puede ser estabilizada utilizando α-estabilizantes como aluminio y estaño mientras que la fase beta puede ser estabilizada utilizando β-estabilizantes como el vanadio, molibdeno, niobio, cobre, hierro, cromo, manganeso o níquel.

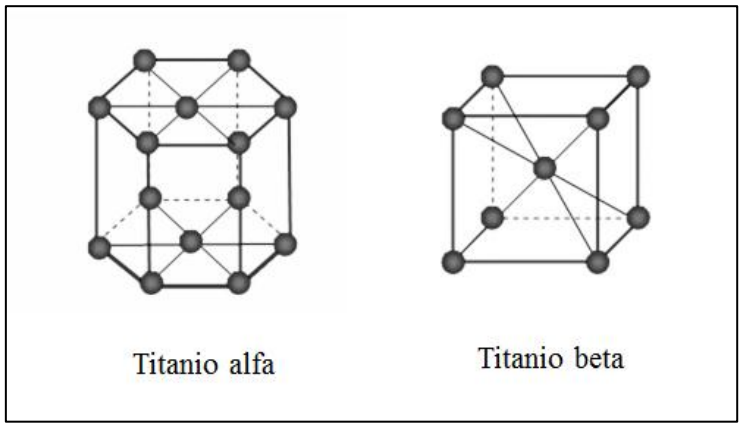


Figura 1.4. Estructuras cristalinas del titanio: Estructura hexagonal compacta (titanio alfa) y estructura cúbica centrada en el cuerpo (titanio beta).

Las aleaciones alfa-beta poseen cantidades equivalentes de α y β-estabilizantes, generando una mezcla de estructuras cristalográficas α y β a temperatura ambiente. Estas aleaciones tienen propiedades equilibradas, mostrando buenas propiedades mecánicas y plásticas. Se caracterizan por una adecuada resistencia a la fatiga sin perder propiedades favorables a temperaturas elevadas, así como una buena resistencia a la tracción sin una reducción significativa de tenacidad. La aleación Ti-6Al-4V pertenece a este grupo, acapara más del 45% de la producción de titanio y es ampliamente utilizada como biomaterial para la fabricación de dispositivos biomédicos.

El titanio, especialmente la aleación Ti-6Al-4V, posee un módulo elástico muy similar al del hueso y por tanto evita los fenómenos de apantallamiento de tensiones (Niinomi y Nakai 2011). Este es un problema habitualmente relacionado con la utilización de biomateriales metálicos para el reemplazo de hueso. Se produce cuando el biomaterial utilizado posee un módulo elástico superior al del hueso. En estas situaciones, al aplicar

una carga sobre el conjunto hueso-prótesis, la tensión es soportada principalmente por el biomaterial, dejando al hueso libre de función, fenómeno que desemboca en una reabsorción ósea.

El titanio es un biomaterial con un alto grado de osteointegración (Schenk 2001). Tras la colocación del implante se produce una intensa actividad de migración y diferenciación celular mediante la cual las células mesenquimales dan lugar a fibroblastos y osteoblastos que cubren la superficie del mismo. Las células osteogénicas generan una nueva matriz ósea que da lugar a un hueso neoformado, que queda sólidamente unido al biomaterial. La osteointegración se define como "el proceso por el cual se logra una fijación rígida, clínicamente asintomática, del biomaterial, y que se mantiene en el hueso durante la carga funcional". A nivel histológico, la osteointegración conlleva un proceso de osteogénesis en la interfaz entre el tejido óseo y el material inerte que desemboca en una unión estructural y funcional de ambas partes.

La utilización de materiales metálicos en el medio fisiológico conlleva la aparición de fenómenos de corrosión en medio húmedo. La corrosión del biomaterial provoca la liberación al entorno de iones metálicos y otros productos de degradación con importantes efectos citotóxicos. Sin embargo, el titanio es muy reactivo en contacto con el oxígeno y el agua, es por ello que, en milisegundos, su superficie experimenta una oxidación pasiva y estable que genera una capa de óxidos amorfos de titanio (TiO, TiO_2, TiO_3) que ejerce un papel protector frente a la acción corrosiva del medio fisiológico. Por todo ello el titanio destaca dentro de los biomateriales metálicos por una excelente resistencia a la corrosión (Kim et al. 1997).

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Las especies de *Candida* son capaces de adherirse y formar biopelículas sobre diversos biomateriales. Los antifúngicos para uso clínico disponibles en la actualidad poseen una actividad limitada sobre estas biopelículas. Las infecciones asociadas a biopelículas de *Candida* spp. están condicionadas fundamentalmente por 1) la capacidad del microorganismo para adherirse al dispositivo implantado y 2) la resistencia de esta biopelícula a los antifúngicos. Se conoce que determinados compuestos como el EDTA, los macrólidos o las moléculas de *quorum sensing* son capaces de desestructurar biopelículas bacterianas, sin embargo, se conoce poco sobre su efecto sobre biopelículas de *Candida* spp. (Walraven y Lee 2013). La utilización de combinaciones de antifúngicos con estas moléculas podría ser una estrategia terapéutica eficaz para el tratamiento de las infecciones relacionadas con biopelículas de *Candida* spp.

En este trabajo se plantean las siguientes hipótesis:

1. Las propiedades físico-químicas de los biomateriales utilizados para la fabricación de dispositivos biomédicos condicionan la cinética de adherencia y la sensibilidad a los antifúngicos de biopelículas de *Candida* spp.

2. Los antifúngicos poseen una actividad reducida frente a biopelículas de *Candida* spp. Su actividad depende de la concentración utilizada, el aislado y el biomaterial sobre el que se forma la biopelícula.

3. La utilización de combinaciones de antifúngicos puede ser más eficaz que la monoterapia sobre biopelículas de *Candida* spp.

4. El uso combinado de moléculas con capacidad desestructuradora de la biopelícula con antifúngicos podría facilitar la erradicación de las biopelículas de *Candida* spp.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Describir la cinética de adherencia y densidad la formación de biopelículas de *Candida* spp. sobre biomateriales hidrófobos e hidrófilos. Desarrollar una estrategia terapéutica basada en la combinación de antifúngicos y moléculas desestructuradoras de la biopelícula desarrollada sobre ambos tipos de biomateriales.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Estudiar la capacidad de adherencia, hidrofobicidad celular superficial y sensibilidad a los antifúngicos de las células planctónicas y de las biopelículas de aislados clínicos y cepas de referencia de *C. albicans, C. parapsilosis, C. krusei, C. glabrata* y *C. tropicalis.*

2. Estudiar de la cinética de crecimiento de las biopelículas de *C. albicans, C. parapsilosis, C. krusei, C. glabrata y C. tropicalis*.

3. Estudiar la cinética de letalidad de anfotericina B, 5-fluorocitosina, terbinafina, caspofungina, anidulafungina, micafungina y posaconazol sobre biopelículas desarrolladas en PTFE y titanio.

4. Estudiar la cinética de letalidad del ácido etilendiaminotetraacético, rifampicina, N-acetilcisteína, claritromicina y farnesol, combinados con polienos y equinocandinas sobre biopelículas desarrolladas sobre PTFE y titanio.

3 MATERIALY MÉTODOS

3.1 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE LOS AISLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA* SPP.

3.1.1 Aislados de origen clínico

Se determinó la capacidad de formación de biopelícula de 90 cepas de *Candida* spp. aisladas en hemocultivo, catéter, y líquidos biológicos (bilis, líquido ascítico, líquido pleural y líquido sinovial) procedentes de pacientes de la Clínica Universidad de Navarra durante el periodo 2008 - 2013, los cuales se mantuvieron conservados a -80 ºC en crioviales Crioteca®-Skim Milk (Microkit SL, Madrid, España) en la biblioteca de cepas del Servicio de Microbiología Clínica (Tabla 3.1).

Se verificó la pureza e identificación de cada aislado mediante cultivo en CHROMagar® *Candida* (CHROMagar, Paris, France), tarjetas colorimétricas VITEK 2 YST ID y galerías colorimétricas API® *Candida* (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France).

Tabla 3.1. Especies utilizadas en el estudio y localización de aislamiento

Especie	Hemocultivo	Catéter	Líquidos biológicos	Total
C. albicans	17			17
C. parapsilosis	7	3	5	15
C. krusei	3	2	10	15
C. tropicalis	1	1	7	9
C. glabrata	13	6	15	34
Total	**41**	**12**	**37**	**90**

3.1.2 Cepas de referencia

En los ensayos de adherencia se incluyó una cepa de referencia de cada una de las especies estudiadas, las cuales fueron adquiridas de la *American type culture collection* (ATCC). Las cepas ATCC®, recibidas en forma de liófilo, se rehidrataron y subcultivaron para obtener las cepas de reserva (primer subcultivo) y de trabajo (segundo subcultivo) las cuales se almacenaron en crioviales Crioteca®-Skim Milk (Microkit SL, Madrid, España) y se conservaron a -80 ºC hasta su uso. Las cepas ATCC® utilizadas fueron *C. albicans* ATCC® 90028, *C. parapsilosis* ATCC® 22019, *C. krusei* ATCC® 6258, *C. tropicalis* ATCC® 750 y *C. glabrata* ATCC® 90030.

3.1.3 Determinación de la capacidad de formación de biopelícula sobre placas de poliestireno mediante tinción con cristal violeta

La tinción con cristal violeta (técnica de Christensen) es una de las técnicas más utilizadas para determinar la capacidad de formación de biopelícula de los microorganismos sobre superficies inertes y se realiza utilizando placas de poliestireno (Christensen et al. 1985). La biopelícula se forma en el pocillo de la placa durante un periodo determinado de tiempo, habitualmente 24 horas. Posteriormente, se lava cada pocillo para retirar las células planctónicas, se fija con metanol y se tiñe con cristal violeta, un colorante básico que posee afinidad por las moléculas cargadas negativamente, tanto de la pared del microorganismo como de la matriz extracelular. Finalmente, tras la tinción se mide la densidad óptica de cada pocillo a una longitud de onda de 570 nm (DO_{570}) la cual es proporcional a la cantidad de biomasa adherida. Stepanović y cols., modificaron el procedimiento original y añadieron un último paso de decoloración con ácido acético, lo cual permite que el colorante adherido a las paredes del pocillo se libere (Stepanović et al. 2000).

Se estudió la capacidad de formación de biopelícula de los 90 aislados de *Candida* spp. en placas de poliestireno de 96 pocillos (MicroTest^{TM}, Becton Dickinson Labware, NJ, USA), siguiendo la metodología previamente descrita por Stepanović y cols. (Stepanović et al. 2000) con ligeras modificaciones (Figura 3.1).

Las cepas BIOCAN se cultivaron al menos dos veces en agar Sabouraud durante 24 horas a 37 ºC para asegurar la pureza y viabilidad. A partir de este cultivo se resuspendieron 1 - 3 colonias en 10 mL de *Yeast Nitrogen Base* suplementado con glucosa 100 mM (YNBG) y se incubaron en agitación orbital de 150 rpm, 12 horas a 37 ºC para obtener un cultivo en fase de crecimiento exponencial. Tras la incubación, se ajustó la densidad celular de la suspensión a 2 McFarland ($1x10^8$ ufc/mL) y se realizó una dilución 1:100 de la misma en YNBG.

Se estudió cada aislado por triplicado, añadiendo 0,2 mL de inóculo en tres pocillos consecutivos. En cada placa se ensayaron un total de 11 aislados, separados entre ellos por una columna de pocillos vacíos con el fin de evitar posibles contaminaciones. Además, en cada placa se utilizó como control negativo tres pocillos consecutivos a los que solo se añadió YNBG. Las placas se incubaron a 37 ºC durante 24 horas.

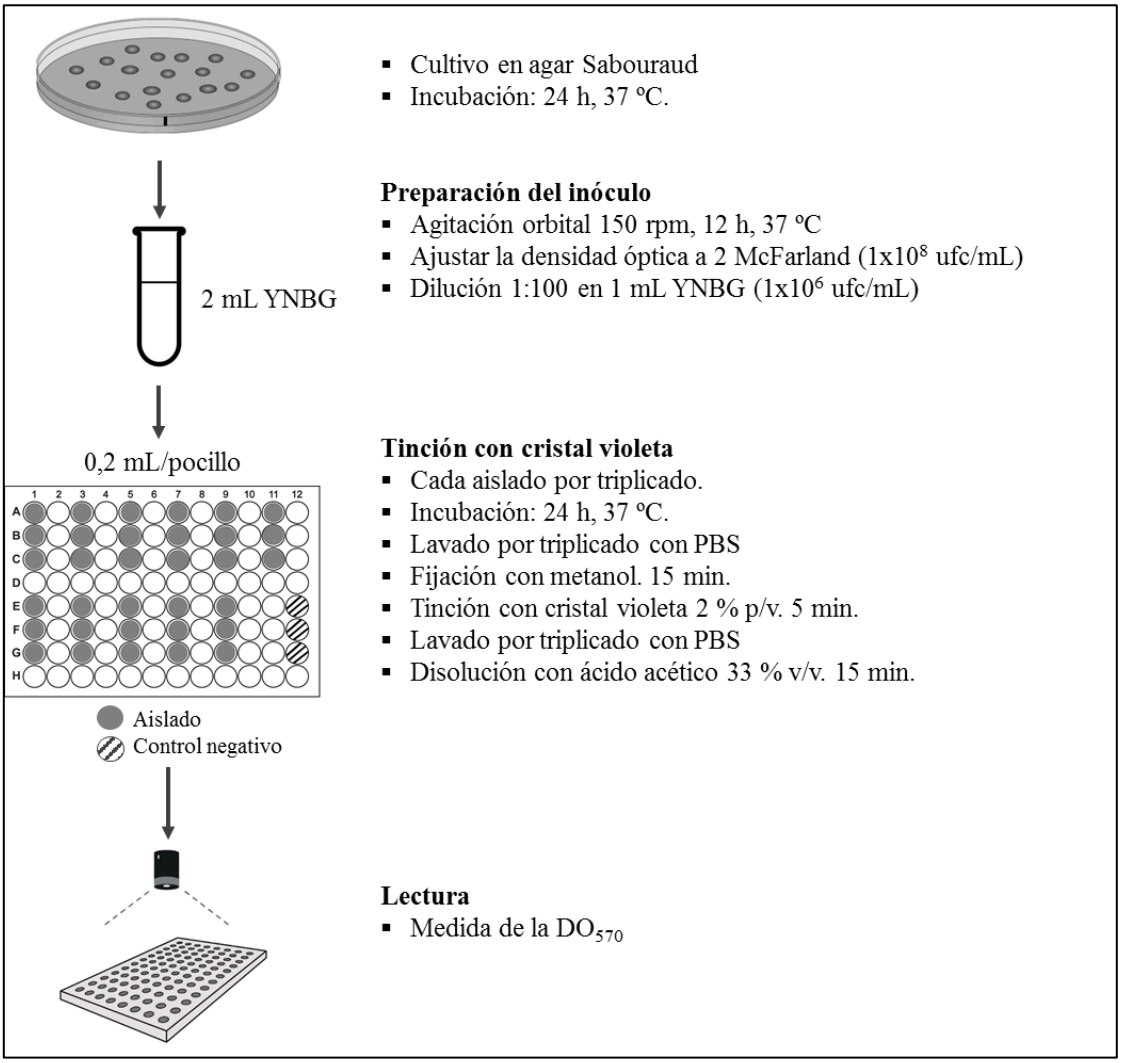


Figura 3.1. Protocolo de trabajo para la determinación de la capacidad de adherencia en placas de poliestireno mediante tinción con cristal violeta.

Tras la incubación, se retiró el YNBG y se lavó cada uno de los pocillos por triplicado, con 0,25 mL de PBS estéril, para retirar las células planctónicas. Se añadió metanol durante 15 minutos a cada pocillo para fijar la biopelícula y a continuación, se añadieron 0,2 mL por pocillo de cristal violeta (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) al 2% (p/v) durante 5 minutos para teñirlas.

Se lavó cada uno de los pocillos por triplicado, con 0,25 mL de PBS estéril, para retirar el exceso de colorante y el cristal violeta retenido en la biopelícula se solubilizó añadiendo 0,2 mL por pocillo de ácido acético glacial (Sharlau, España) al 33% (v/v). Posteriormente se midió la DO_{570} utilizando un espectrofotómetro para placas de microtitulación (Multiskan Ascent, ThermoLab systems). El mismo procedimiento se realizó con los tres pocillos control negativo a los que solo se añadió medio de cultivo.

Se definió el punto de corte de la técnica como la suma de la DO_{570} del control negativo más tres veces su desviación estándar (DOc). La capacidad de formación de biopelícula se clasificó en cuatro categorías en función de la DO_{570} de cada aislado según la clasificación propuesta por Stepanović y cols. (Stepanović et al. 2000): no formadoras, poco formadoras, moderadamente formadoras y fuertemente formadoras (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Clasificación de la capacidad de formación de biopelícula de los aislados mediante la tinción con cristal violeta.

DO_{570}	**Clasificación**
$DO < DO_C$	No formadora
$DO_C < DO < 2DO_C$	Poco formadora
$2DO_C < DO < 4DO_C$	Moderadamente formadora
$4DO_C < DO$	Fuertemente formadora

Tras el ensayo, se seleccionaron los 2 aislados clínicos más capacidad de formación de biopelícula de cada especie y junto a las cepas de referencia *C. albicans* ATCC® 90028, *C. parapsilosis* ATCC® 22019, *C. krusei* ATCC® 6258, *C. tropicalis* ATCC® 750 y *C. glabrata* ATCC® 90030 formaron el conjunto de cepas BIOCAN (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Cepas de conjunto BIOCAN.

Especie	Aislado	Origen
C. albicans	B1	Hemocultivo
	B2	Hemocultivo
	ATCC® 90028	Cepa de referencia
C. parapsilosis	B4	Catéter intravascular
	B5	Catéter intravascular
	ATCC® 22019	Cepa de referencia
C. krusei	B7	Líquido ascítico
	B8	Catéter de drenaje intraabdominal
	ATCC® 6258	Cepa de referencia
C. tropicalis	B10	Hemocultivo
	B11	Catéter de drenaje biliar
	ATCC® 750	Cepa de referencia
C. glabrata	B12	Hemocultivo
	B13	Líquido pleural
	ATCC® 90030	Cepa de referencia

3.1.4 Determinación de la capacidad de formación de biopelícula mediante el ensayo de reducción del XTT en placas de poliestireno

El ensayo de reducción del XTT es una técnica espectrofotométrica que permite detectar la actividad metabólica de las células presentes en la biopelícula y por tanto es de gran utilidad para estudiar la capacidad de formación de biopelícula y sensibilidad de la misma a los antimicrobianos (Pierce et al. 2008). El 2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolio-5-Carboxanilida (XTT) es una sal de tetrazolio que se reduce por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas dando lugar a un cristal de formazán soluble de color rojo, que puede medirse a una longitud de onda de 492 nm. La DO_{492} es proporcional a la cantidad de células viables presentes sobre la superficie (Ramage y López-Ribot 2005). Para facilitar y acelerar la reducción del XTT, se incorpora en la reacción un dador de electrones, que habitualmente es la 2-metil-1,4-maftoquinona (menadiona).

Se evaluó la capacidad de formación de biopelícula de los aislados del conjunto BIOCAN mediante el ensayo de reducción del XTT en placas de poliestireno de 96 pocillos (MicroTest^{TM}, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) siguiendo la metodología previamente descrita por Valentín y cols. (Valentin et al. 2012) con ligeras modificaciones (Figura 3.2).

El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 horas en agar Sabouraud. A partir de este cultivo se inoculó un tubo con 2 mL de medio de peptona, extracto de levadura y glucosa (YPD), el cual se incubó a 30 ºC durante 24 horas en agitación orbital a 100 rpm. Posteriormente se realizó un lavado mediante centrifugación de las células (5 min, 2500 rpm), recogiéndolas finalmente en PBS. Se ajustó la cantidad de células a $1x10^7$ ufc/mL, mediante lectura de la transmitancia del 45% a una longitud de onda de 530 nm. Finalmente se realizó una dilución 1:10 en medio RPMI 1640 (sin bicarbonato, con glutamina y ajustado a pH 7 con MOPS 0,1 M), siendo la concentración celular final de $1x10^6$ ufc/mL. Cada aislado se estudió por cuadruplicado, añadiendo 0,2 mL de inóculo en tres pocillos consecutivos. Se incluyeron en cada ensayo la cepa de referencia *C. albicans* SC5314 como control positivo, debido a su capacidad para formar biopelícula. Además, se incluyó una cepa no formadora de *C. albicans* (CA-2). En cada placa se incluyeron también cuatro pocillos consecutivos en los que solo se añadió RPMI y que actuaron como blanco.

Tras la incubación, se retiró el RPMI y las células planctónicas no adheridas se eliminaron mediante lavado por triplicado de cada pocillo con 0,25 mL de PBS estéril. Se preparó una solución de XTT- menadiona 1 µM disolviendo 1,2 µL de menadiona en 12 mL de XTT (1 mg/mL). Se añadieron 0,1mL de la solución XTT- menadiona a cada uno de los pocillos de la placa y posteriormente esta se incubó en oscuridad a 37 ºC durante 2 horas. Posteriormente se determinó la DO_{492}, utilizando un espectrofotómetro para placas de microtitulación (Multiskan Ascent, ThermoLab systems).

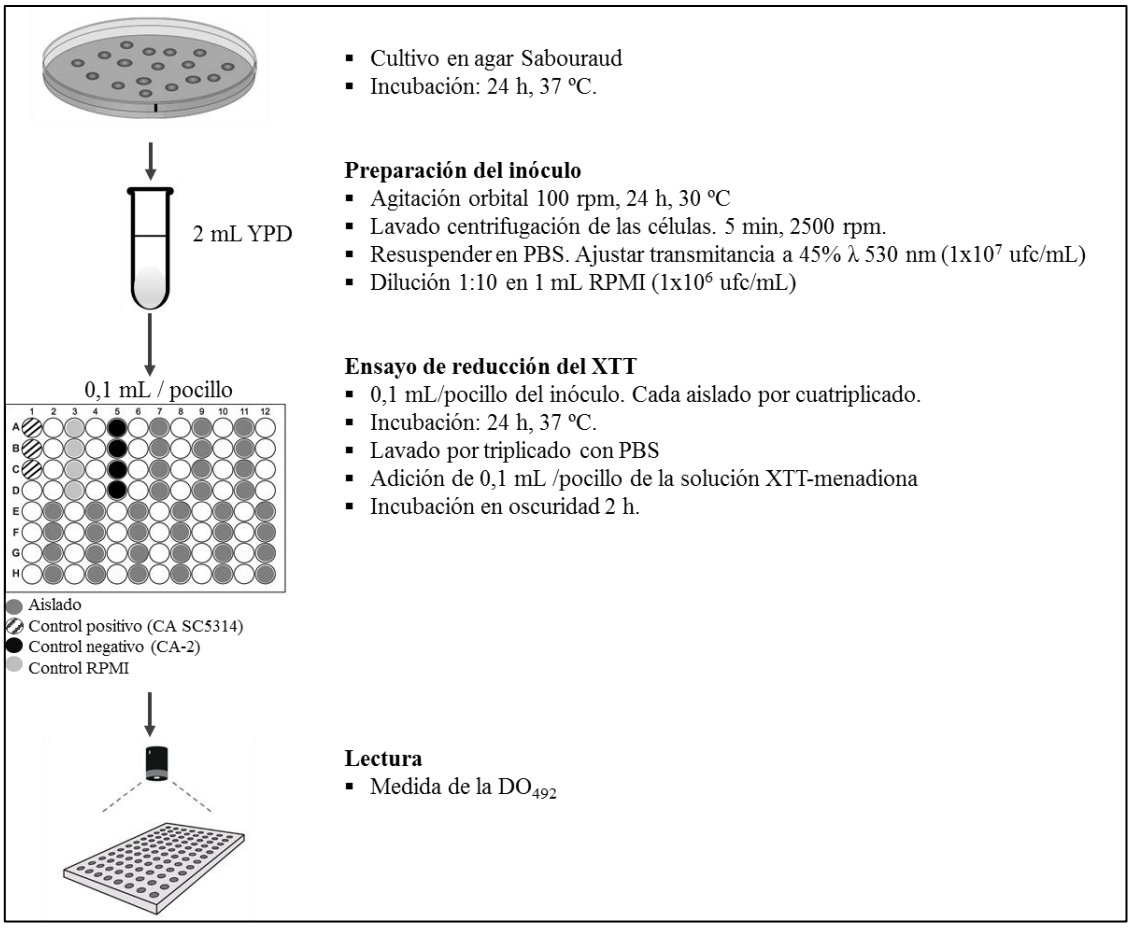


Figura 3.2. Protocolo de trabajo para la determinación de la capacidad de adherencia en placas de poliestireno mediante el método de reducción del XTT.

Para interpretar los resultados, se utilizó la clasificación previamente descrita por Valentín y cols. (Valentin et al. 2012) con algunas modificaciones. Los aislados de *Candida* spp. se consideraron no formadores de biopelícula cuando la DO_{492} fue menor de 0,2. La capacidad de adherencia de los aislados con DO_{492} mayor de 0,2 se clasificó en tres categorías identificadas con la misma nomenclatura que en la tinción de cristal violeta para facilitar el análisis comparativo entre ambas técnicas (Tabla 3.4). A la DO_{492} promedio de cada aislado se restó la DO_{492} de los pocillos que contenían solo RPMI (blanco).

Tabla 3.4. Clasificación de la capacidad de formación de biopelícula de los aislados mediante el método de reducción del XTT.

DO_{492}	**Clasificación**
DO < 0,200	No formadora
0,200 < DO < 0,399	Poco formadora
0,400 < DO < 0,999	Moderadamente formadora
DO > 1.000	Fuertemente formadora

3.2 ESTUDIO DE LA HIDROFOBICIDAD CELULAR SUPERFICIAL

La etapa más temprana del proceso de adherencia de un microorganismo a una superficie inerte es un proceso inespecífico basado en las fuerzas de atracción y repulsión electrostática en el que la hidrofobicidad de ambas superficies (microorganismo y biomaterial) juega un papel muy importante (Jabra-Rizk et al. 2001). El test de adhesión microbiana a hidrocarburos es un ensayo bifásico agua-xileno en el cual las células hidrófobas quedan retenidas en xileno, produciendo como consecuencia una reducción de la DO_{600} del cultivo inicial (Rosenberg 2006).

La hidrofobicidad celular superficial (HCS) se determinó mediante protocolo descrito por Gelis y cols. (Gelis et al. 2012) (Figura 3.3).

1. Los aislados se cultivaron en agar Sabouraud durante 24 horas a 37 ºC.
2. A partir de este cultivo se inoculó un tubo con 2 mL de YPD, el cual se incubó en agitación orbital durante 24 horas a 30 ºC.
3. Tras la incubación las células se sometieron a un lavado mediante centrifugación en PBS por triplicado y se añadieron a un tubo con 3 mL de PBS y se ajustó a una DO_{600} de 1.
4. Se añadió 150 µL de xileno y se incubó 10 minutos a 30 ºC, tras lo cual se realizó una agitación vorticial durante 1 minuto. Tras la agitación se dejó la suspensión a temperatura ambiente durante 20 minutos para favorecer la separación de las fases.
5. Se retiró el xileno y se midió la DO_{600} final de la fase acuosa.

La hidrofobicidad celular superficial se calculó como el porcentaje de reducción de la DO_{600} de la fase acuosa inicial, según queda expresado en la siguiente ecuación:

$$\boldsymbol{HCS}\ (\%) = \mathbf{100} \times \frac{\boldsymbol{DO_{600}\ fase\ acuosa\ inicial - DO_{600}\ fase\ acuosa\ final}}{\boldsymbol{DO_{600}\ fase\ acuosa\ inicial}}$$

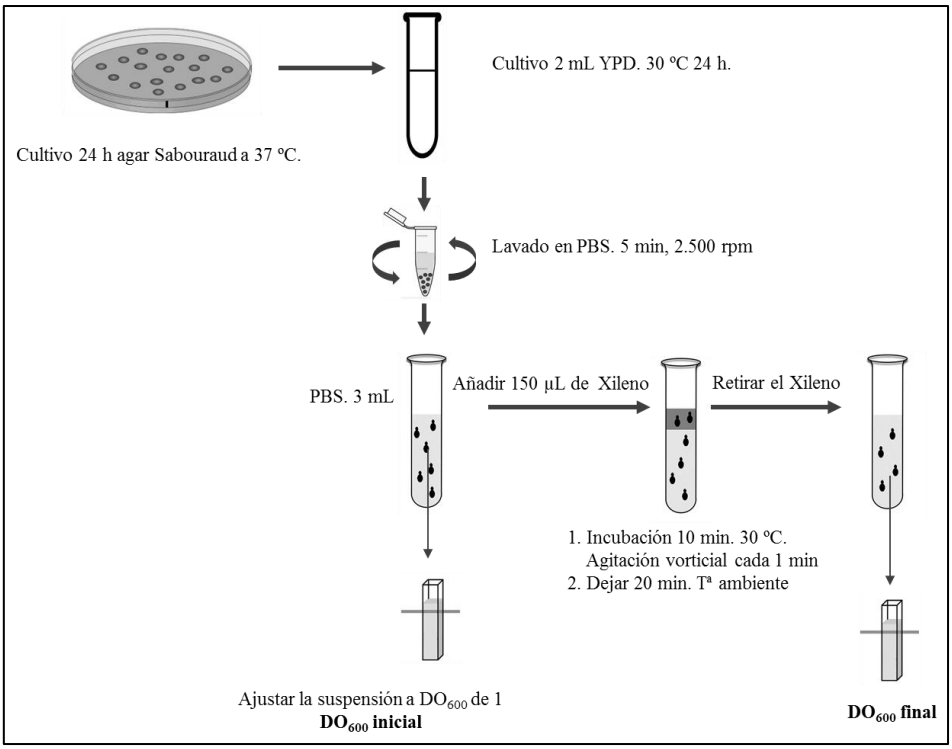


Figura 3.3. Protocolo de trabajo para la determinación de hidrofobicidad celular superficial en aislados de *Candida* spp.

3.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LAS CEPAS EN FASE DE CRECIMIENTO PLANCTÓNICO

3.3.1 Método de microdilución comercial *Sensititre YeastOne*®

El panel comercial Sensititre YeastOne® YO10 (Sensititre; Thermo Scientific, USA) es un método colorimétrico de microdilución en caldo el cual incorpora un indicador de crecimiento de óxido-reducción (resazurina) que cambia de color azul a rosa en presencia de crecimiento fúngico en el pocillo y facilita la lectura visual del mismo (Cantón et al. 2013).

Este método ha demostrado una buena correlación y reproducibilidad cuando se compara con el método de referencia M27-A3 del CLSI (Cantón et al. 2005). El panel consiste en una placa de microtitulación de 96 pocillos que contienen resazurina y concentraciones dobles seriadas de anfotericina B, caspofungina, anidulafungina, micafungina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol y 5-fluorocitosina (Figura 3.4). El panel contiene como medio de cultivo RPMI suplementado con 1,5% de glucosa y ajustado a pH 7 ± 0,1 utilizando ácido morfolino propano sulfónico (MOPS).

Se ensayó la sensibilidad de los aislados BIOCAN en fase de crecimiento planctónico. El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 horas en agar Sabouraud. Se resuspendieron de 3 a 5 colonias en un tubo de agua destilada hasta alcanzar una turbidez de 0,5 en la escala McFarland ($1x10^6$ ufc/mL). Se inoculó 20 µL de esta suspensión en 11 mL de medio de cultivo ($1x10^3$ ufc/mL). Se rehidrató el panel añadiendo 0,1 mL de esta suspensión a cada pocillo y se incubó durante 24 - 48 horas a 37 ºC.

La lectura se realizó a las 24 horas, comprobando previamente el cambio de color de azul a rosa del pocillo control. En caso contrario, se dejó incubar más tiempo hasta observar dicho cambio de color. La CMI del antifúngico es la concentración más baja del mismo en la que no se produce cambio de color, es decir, el primer pocillo azul.

Control positivo	AND 0,015	AND 0,03	AND 0,06	AND 0,12	AND 0,25	AND 0,5	AND 1	AND 2	AND 4	AND 8	AMB 0,12
MFG 0,008	MFG 0,015	MFG 0,03	MFG 0,06	MFG 0,12	MFG 0,25	MFG 0,5	MFG 1	MFG 2	MFG 4	MFG 8	AMB 0,25
CAS 0,008	CAS 0,015	CAS 0,03	CAS 0,06	CAS 0,12	CAS 0,25	CAS 0,5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	AMB 0,5
5-FC 0,06	5-FC 0,12	5-FC 0,25	5-FC 0,5	5-FC 1	5-FC 2	5-FC 4	5-FC 8	5-FC 16	5-FC 36	5-FC 64	AMB 1
POS 0,008	POS 0,015	POS 0,03	POS 0,06	POS 0,12	POS 0,25	POS 0,5	POS 1	POS 2	POS 4	POS 8	AMB 2
VOR 0,008	VOR 0,015	VOR 0,03	VOR 0,06	VOR 0,12	VOR 0,25	VOR 0,5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	AMB 4
ITR 0,015	ITR 0,03	ITR 0,06	ITR 0,12	ITR 0,25	ITR 0,5	ITR 1	ITR 2	ITR 4	ITR 8	ITR 16	AMB 8
FLC 0,12	FLC 0,25	FLC 0,5	FLC 1	FLC 2	FLC 4	FLC 8	FLC 16	FLC 32	FLC 64	FLC 128	FLC 256

Figura 3.4. Distribución de los antifúngicos y sus concentraciones en el planel de microdilución comercial *Sensititre YeastOne*® YO10.

3.3.2 Método de referencia de microdilución en caldo M27-A3

El método de referencia M27-A3 es una técnica microdilución en caldo estandarizada por el *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) para la realización de pruebas de sensibilidad a antifúngicos en las levaduras del género *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008). La sensibilidad a anfotericina B y a anidulafungina de los aislados BIOCAN en fase de crecimiento planctónica se estudió siguiendo esta metodología.

Se preparó una solución madre de anfotericina B (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y anidulafungina (Pfizer, Madrid, España) en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 1.600 mg/L, la cual se diluyó 1:10 en DMSO y 1:50 en RPMI. A partir de esta concentración se prepararon las concentraciones de ensayo mediante diluciones dobles aditivas y se añadió 0,1 ml de cada una de estas a su respectivo pocillo en la placa.

Se preparó una suspensión 0,5 McFarland en agua estéril a partir de un cultivo de 24 horas en agar Sabouraud. Posteriormente esta suspensión se diluyó 1:1.000 en RPMI para alcanzar $1x10^3$ ufc/mL. Se añadieron 0,1 mL de inóculo en los pocillos de la columna 2 a la 12. Los pocillos de la columna 1 contenían solo RPMI y actuaron como control de esterilidad. La columna 12 no contenía antifúngico y actuó como control de crecimiento. Como control de pureza del cultivo, y del inóculo se sembraron 10 µL de la columna 12 en CHROMagar *Candida*. El panel se incubó a 37 ºC durante 24 horas.

La CMI obtenida mediante lectura visual se definió como la concentración más baja de antifúngico que produce una inhibición aparente del crecimiento ≥50% en anidulafungina y de 100% en anfotericina B. La CMI obtenida mediante lectura espectrofotométrica se definió como la concentración más baja de antifúngico cuya DO_{405} es ≤50% del pocillo control de crecimiento en anidulafungina, y ≤5% del pocillo control de crecimiento en anfotericina B.

3.4 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LAS CEPAS EN FASE DE CRECIMIENTO EN BIOPELÍCULA

El ensayo de reducción del XTT, previamente descrito, no solo es útil para determinar la capacidad de adherencia de *Candida* spp. en placas de poliestierno, sino que, además es una metodología adecuada para estudiar la sensibilidad a los antifúngicos de la biopelícula de *Candida* spp. (Pierce et al. 2008). Mediante esta técnica, la actividad del antifúngico se ve reflejada en la reducción de la actividad metabólica de la biopelícula expuesta durante 48 horas al antifúngico comparada con la actividad metabólica la biopelícula no expuesta (control).

La sensibilidad a anfotericina B y a anidulafungina de los aislados BIOCAN en fase de crecimiento en biopelícula se estudió según la metodología descrita por Valentín y cols. (Valentin et al. 2012). A partir de un cultivo de 24 horas en agar Sabouraud se preparó el inóculo siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.4 y se añadieron 0,1 mL a cada uno de los pocillos de las columnas 2 a la 12. Para formar la biopelícula, la placa se incubó durante 24 horas a 37 ºC (Figura 3.5). Tras la incubación, se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pocillos tres veces con PBS para eliminar las células no adheridas. Se añadió al panel diluciones dobles seriadas de los antifúngicos (0,03 a 16 mg/L) siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.2, incluyendo siempre los pocillos de control de esterilidad y de control de crecimiento.

Las placas con antifúngico se incubaron durante 48 horas a 37 ºC. Tras la incubación, se retiró el medio de cultivo y se lavaron nuevamente tres veces con PBS para eliminar las células planctónicas. Se añadieron 0,1 mL de la solución de XTT-menadiona a cada pocillo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.4 y se incubaron en oscuridad 2 horas a 37 ºC. Tras la incubación, se realizó una lectura espectrofotométrica de la placa a DO_{492}. Por cada aislado se prepararon tres filas de pocillos (columnas 2 a 12). La CMI de la biopelícula (CMIB) se definió como la concentración más baja de antifúngico capaz de producir una reducción de la DO_{492} ≥50% ($CMIB_{50}$), ≥80% ($CMIB_{80}$) y ≥90% ($CMIB_{90}$), con respecto al control de crecimiento.

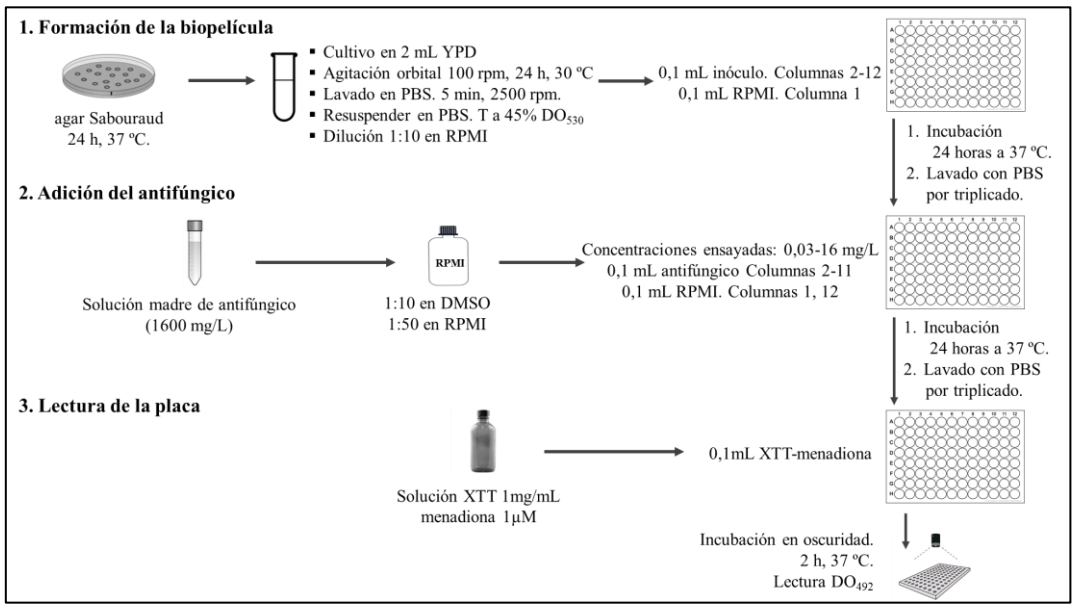


Figura 3.5. Protocolo de trabajo para la determinación la sensibilidad a anfotericina B y anidulafungina mediante el ensayo de reducción del XTT.

3.5 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP. FORMADA SOBRE PTFE Y TITANIO

3.5.1 Características técnicas y operacionales del *CDC Biofilm Reactor*

El *CDC Biofilm Reactor* (CBR) consiste en un vaso de un litro, cubierto por una tapa fabricada en polietileno de ultra alto peso molecular (UHMW) la cual aloja 8 columnas de polipropileno que actúan como portadiscos (Figura 3.6). Cada portadiscos es capaz de alojar en su parte inferior hasta un máximo de tres muestras del biomaterial en estudio, presentadas en forma de discos, los cuales se aseguran a su soporte mediante el ajuste de un tornillo lateral. Cada disco actúa como superficie de crecimiento de la biopelícula y puede ser retirado asépticamente del dispositivo para su posterior análisis. Una vara de vidrio, unida a la tapa superior y situada en el eje central del vaso, actúa como eje de rotación sobre el cual gira una veleta de agitación magnética. Esta veleta permite la mezcla y homogenización del medio de cultivo. El CBR va colocado sobre una placa de agitación magnética no climatizada que permite controlar la velocidad de agitación rotacional. Todo el equipo es autoclavable y reutilizable.

Biosurface Technologies Corporation (Bozeman, MT, USA) suministró las cuatro unidades CBR (modelo CBR 90-1) utilizadas en el estudio. Debido al desgaste y fractura de algunos componentes plásticos, así como la oxidación de los componentes metálicos, algunos portadiscos fueron reemplazados durante el estudio por recambios originales (Portadiscos CBR-2203).

La *American Society for Testing and Materials* (ASTM) ha estandarizado el CBR (método E2562–12) para el estudio de la biopelícula microbiana en condiciones de movimiento continuo del medio de cultivo. El método permite estudiar tanto la colonización y formación del biopelícula microbiana sobre los biomateriales como la actividad de agentes antimicrobianos, biocidas y desinfectantes sobre la misma (Goeres et al. 2005).

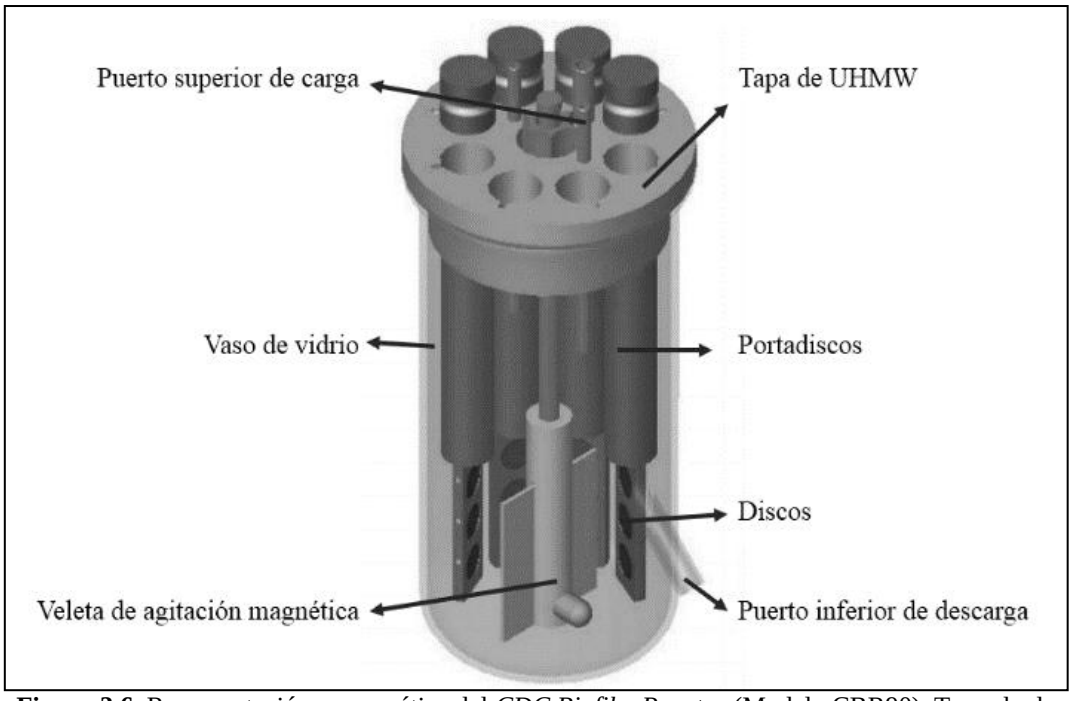


Figura 3.6. Representación esquemática del *CDC Biofilm Reactor* (Modelo CBR90). Tomado de Biosurface Technologies Corp. (http://www.biofilms.biz/).

El CBR puede operar de dos maneras:

1) *Batch mode* durante el cual los puertos de carga y descarga de fluidos se mantienen cerrados de manera tal que no se realiza recambio del medio de cultivo.

2) *Continuous flow mode* durante el cual se hace circular medio de cultivo fresco a través del dispositivo, utilizando una bomba peristáltica para introducir medio de cultivo fresco, antibióticos, desinfectantes, etc. a través del puerto superior de carga y retirando fluidos mediante el puerto de descarga lateral, conectado a un depósito de desechos. En este modo de operación, es posible controlar la reposición y concentración de nutrientes y antimicrobianos en el interior del CBR modificando la impulsión de la bomba peristáltica.

Además, el CBR puede operar en condiciones anaerobias utilizando el modelo CBR 90-3, el cual incluye juntas de silicona situadas en las entradas de los portadiscos y entre el vaso de vidrio y la tapa de UHMW.

3.5.2 Biomateriales

El CBR permite estudiar una gran variedad de biomateriales, con distinta composición y diversas propiedades fisicoquímicas y estructurales, como pueden ser: polímeros plásticos, metales, cerámicas, entre otros. Para poder estudiar un biomaterial en el CBR, este debe ser presentado en forma de disco y debe ajustarse a unas dimensiones de 1,27 cm de diámetro y 0,3 cm de alto (Figura 3.7).

Una unidad CBR es capaz de alojar en su interior hasta un máximo de 24 discos y por tanto ofrece hasta un máximo de 24 oportunidades de muestreo. En el presente trabajo se estudió la formación y erradicación de la biopelícula de *Candida* spp. sobre discos de PTFE (Modelo RD 128-PTFE) y titanio comercialmente puro (Modelo RD128-Ti), ambos suministrados por *Biosurface Technologies Corp*. Cada unidad CBR fue equipada con 12 discos de PTFE distribuidos en 4 portadiscos y 12 discos de titanio comercialmente puro distribuidos en otros 4 portadiscos. Esta distribución nos permitió extraer de cada unidad CBR 3 discos de PTFE y 3 discos de titanio cada 24 horas para realizar las cinéticas de crecimiento o curvas de letalidad con una duración máxima de 96 horas.

La posibilidad de combinar dos biomateriales en una misma unidad CBR asegura una mejor comparación de los resultados obtenidos entre ambos biomateriales ya que estos están sometidos a las mismas condiciones experimentales.

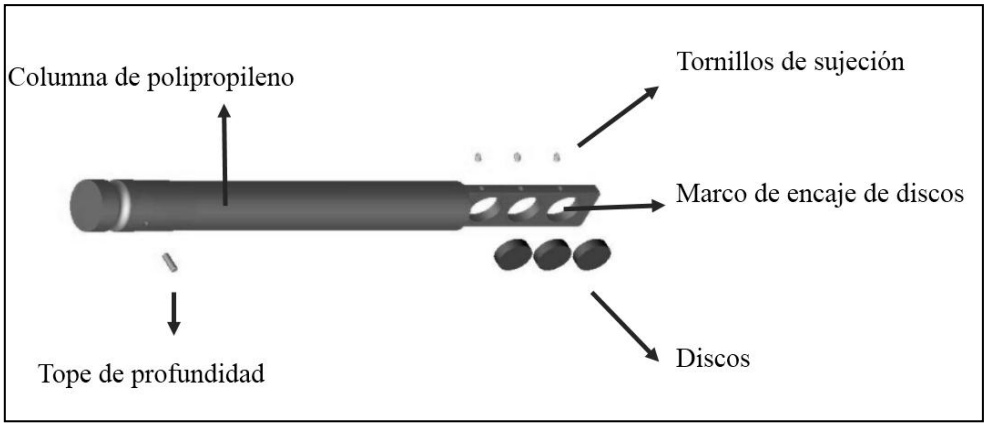


Figura 3.7. Representación esquemática del portadiscos (Modelo CBR-2203). Tomado de Biosurface Technologies Corp. (tomado de: http://www.biofilms.biz/).

3.5.3 Preparación del inóculo

Las cepas se resembraron al menos dos veces en agar Sabouraud (24 horas a 37 ºC) para asegurar su pureza y viabilidad. A partir de este cultivo se resuspendieron 1-3 colonias en 10 mL de YNBG y se incubaron en agitación orbital de 150 rpm, durante 12 horas a 37 ºC para obtener un cultivo en fase de crecimiento exponencial. Tras la incubación, se ajustó la densidad celular de la suspensión a 2 McFarland ($1x10^8$ ufc/mL).

3.5.4 Cinéticas de formación de la biopelícula de *Candida* spp.

El CBR se equipó con 12 discos de PTFE y 12 discos de titanio y se cargó con 400 mL de YNBG y con 1 mL del inóculo de *Candida* spp. La concentración final en el CBR estuvo comprendida entre 8×10^4 a $2{,}7\times10^5$ ufc/mL. El CBR se colocó en la placa de agitación magnética y la velocidad de rotación se ajustó a 125 rpm y se operó en *batch mode* durante 96 horas. La temperatura en el interior del mismo se mantuvo en 30 ± 1 ºC durante todo el experimento.

A las 24, 48, 72 y 96 horas se extrajeron 3 discos de PTFE y 3 discos de titanio para determinar el número de células viables presentes en la superficie de los mismos, mediante un procedimiento de agitación vorticial, sonicación y cultivo cuantificado.

3.5.5 Cuantificación de las células viables presentes en la biopelícula

En cada uno de los puntos temporales del experimento se extrajeron dos portadiscos del CBR, uno equipado con tres discos de PTFE y otro equipado con tres discos de titanio. Se realizó una retirada aséptica de los discos (Figura 3.8), liberándolos de su marco de sujeción y colocándolos en una placa estéril húmeda. Cada uno de ellos se lavó con 14 mL de PBS para retirar las formas planctónicas no adheridas al biomaterial. Una vez retiradas las células no adheridas, el disco se colocó en un tubo con 1 mL de YNBG.

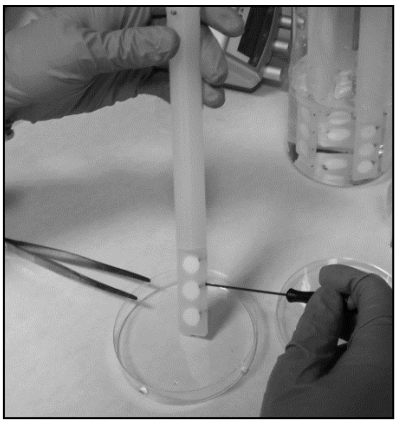


Figura 3.8. Extracción de los discos del CBR.

Para desprender la biopelícula adherida a la superficie del biomaterial, cada tubo, conteniendo un disco en su interior, se sometió a agitación vorticial a 2.500 rpm durante 1 minuto, sonicación a 50 kHz en un baño sonicador (P-Selecta, Ultrasons H, Barcelona, España) durante 5 minutos y nueva agitación vorticial durante 1 minuto (Figura 3.9).

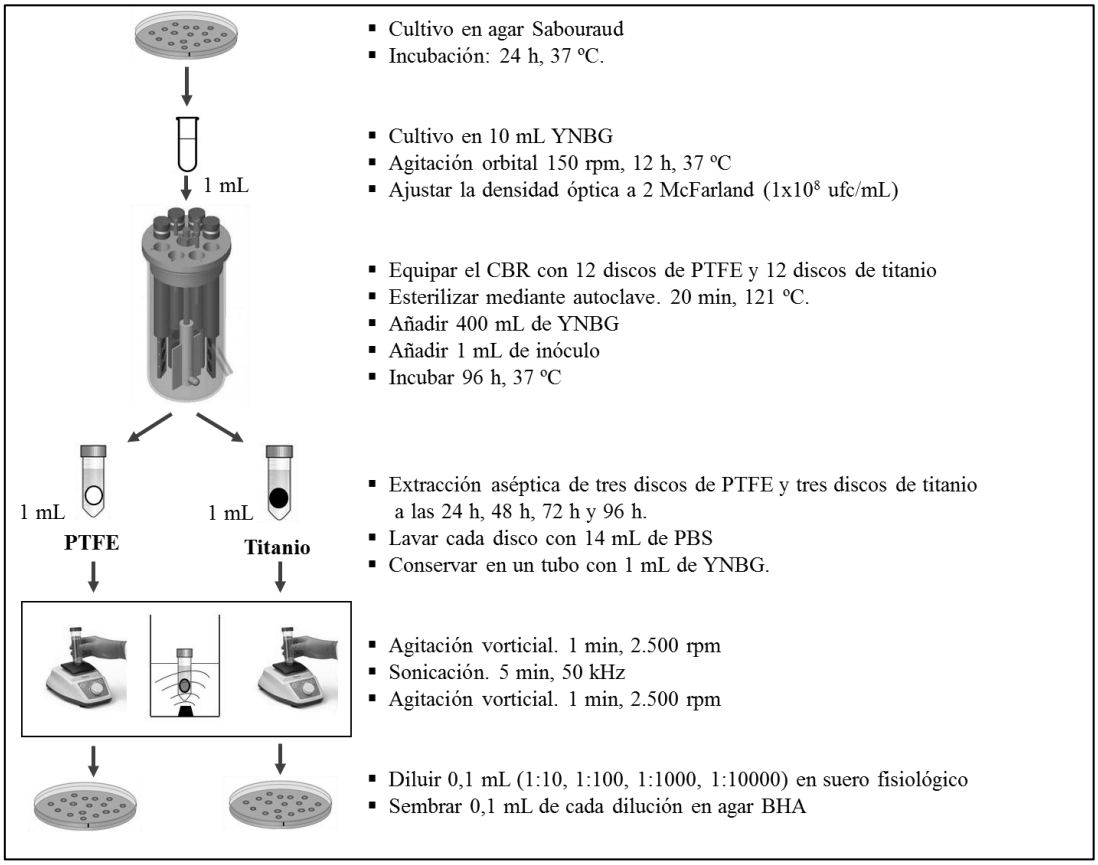


Figura 3.9. Protocolo de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de la biopelícula de *Candida* spp.

Para determinar el número de células viables adheridas por unidad de superficie de material, el caldo obtenido tras sonicación se diluyó en suero fisiológico (1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000) y 0,1 mL de cada dilución se cultivó en agar BHA (Becton Dickinson, EE. UU). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 ºC (Figura 3.10).

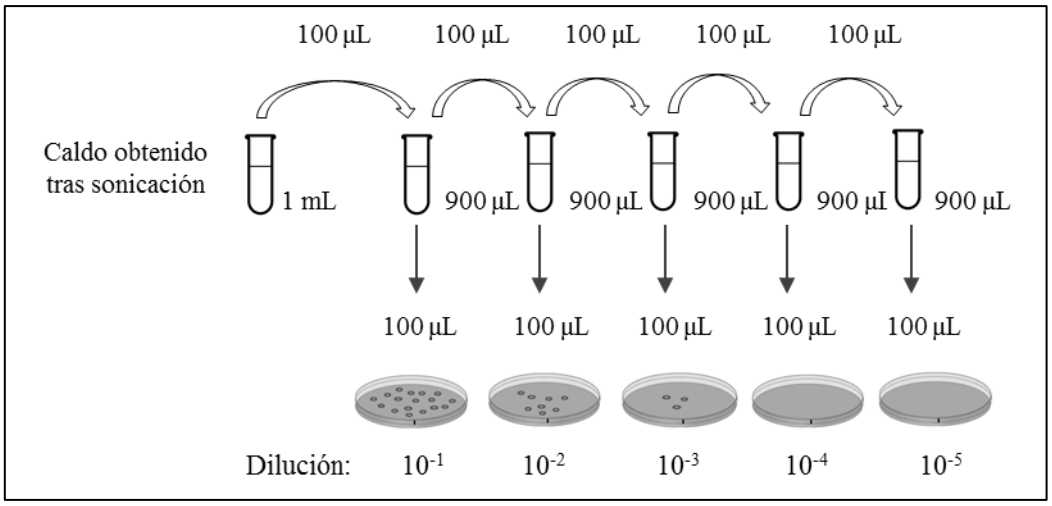


Figura 3.10. Protocolo de trabajo para cuantificar el número de células viables presentes en la biopelícula.

Los resultados del cultivo tras sonicación, expresados en ufc/mL se transformaron en Log_{10} del número de células adheridas por unidad de superficie (ufc/cm^2) según la ecuación descrita por Goeres y cols. (Goeres et al. 2005), teniendo en cuenta que el área de cada superficie del disco es 1,267 cm^2.

$$\boldsymbol{Log_{10}\, ufc/cm^2 = 2 \times (\, Log_{10}(media\, ufc/placa) + Log_{10}(volumen\, caldo\, tas\, sonicación) + Log_{10}(dilución) - Log_{10}(sembrado) - Log_{10}(área\, del\, disco))}$$

Con el fin de minimizar el sesgo, los dos biomateriales se ensayaron en el mismo CBR. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El límite inferior de detección de células viables de este modelo fue de 10 ufc/mL.

3.6 ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LA BIOPELÍCULA DE 24 HORAS DE *CANDIDA* SPP. SOBRE SUPERFICIES DE PTFE

Se estudió mediante microscopía electrónica la biopelícula de *Candida* spp. de 24 horas de maduración formada en PTFE utilizando la microscopía electrónica de barrido criogénica (cryo-SEM). Esta técnica es un tipo de microscopía electrónica en el cual las muestras se observan tras congelación en nitrógeno. Posee especial interés para el estudio de la biopelícula ya que, al no requerir ninguna tinción, fijación o cristalización previa, es posible observar la estructura nativa de la muestra.

Para ello, se preparó una unidad CBR con discos de PTFE, 400 mL de YNBG y 1 mL de inóculo de la levadura según la metodología descrita previamente en el apartado 3.5.3. Se extrajo un disco de PTFE de un CBR tras 24 horas de cultivo. Se lavó con 14 mL de PBS para retirar las células planctónicas y se conservó en 1 mL de YNBG para su transporte al cryo-SEM (Figura 3.11).

El disco se sumergió en nitrógeno nieve a -210 ºC para congelar la muestra y conservar las características morfológicas. Posteriormente se cargó en un *Cryo-trans System* CT 1500 C (Oxford Instruments, Reino Unido) y se transfirió al microscopio electrónico de barrido JSM 5410, (Jeol, Japón). Se realizó una sublimación de la escarcha superficial a -90 ºC durante 25 minutos y se recubrió con oro en condiciones de vacío (0.2 kPa, 40 mA). La observación microscópica se realizó a una distancia de 15 mm y utilizando un voltaje de 10 kV.

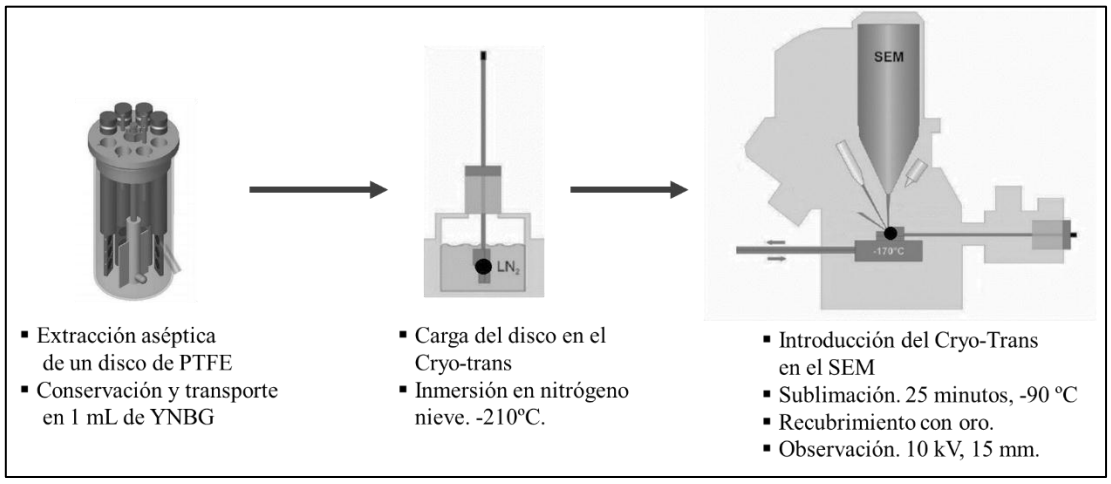


Figura 3.11. Protocolo de trabajo para la observación de la biopelícula de *Candida* spp. mediante microscopía electrónica de barrido criogénica (cryo-SEM).

3.7 ACTIVIDAD DE LOS ANTIMICROBIANOS SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP. FORMADA SOBRE PTFE Y TITANIO

3.7.1 Cinética de la actividad de los antifúngicos sobre la biopelícula de *Candida* spp. formada en PTFE y titanio utilizando el CBR

Se evaluó la actividad de anfotericina B, 5-fluorocitosina, terbinafina, anidulafungina, caspofungina, micafungina y posaconazol sobre la biopelícula del aislado *C. tropicalis* B10 formada sobre superficies de PTFE y titanio. Se seleccionó un rango de concentraciones incluyendo la concentración máxima (Cmax) alcanzada en suero tras la administración de una dosis estándar para cada uno de los antifúngicos ensayados (Tabla 3.5) (Cifani et al. 2012)(Maertens et al. 2014) (Catalán González y Montejo González 2008)(Hosseini-Yeganeh y McLachlan 2002)(Vermes et al. 2000). Los antifúngicos se disolvieron según su coeficiente de solubilidad en agua o DMSO (Apartado 9.3). La concentración de DMSO fue inferior al 1% en todos los ensayos.

Tabla 3.5. Concentraciones de los antifúngicos ensayadas sobre las biopelículas de *Candida* spp. formadas en PTFE y titanio.

Antifúngico	Disolvente	Concentraciones ensayadas (mg/L)
Anfotericina B	Agua	1,5, 5, 10, 20, 40
Posaconazol	DMSO	1, 2, 4, 8
Caspofungina	DMSO	4, 8, 16, 32
Anidulafungina	Agua	4, 8, 16, 32
Micafungina	Agua	4, 8, 16, 32
Terbinafina	Agua	1, 2, 4
5-Fluorocitosina	Agua	10, 20, 40

Se preparó la unidad CBR con discos de PTFE y titanio, 400 mL de YNBG y 1 mL de inóculo de *C. tropicalis* B10, según la metodología descrita previamente. Tras 24 horas de cultivo y antes de añadir el fármaco, se extrajeron tres discos de PTFE y tres discos de titanio (tiempo 0) y se determinó el número de células viables adheridas en su superficie (Log_{10} ufc/cm^2) mediante el procedimiento de agitación vorticial y cultivo tras sonicación previamente descrito en el apartado 3.5.5. Se extrajeron 3 discos de PTFE y tres discos de titanio tras 24, 48 y 72 horas de exposición al fármaco para determinar el número de células viables en su superficie. Los resultados se expresaron como diferencia en el

número de células viables (Δ Log_{10} ufc/cm^2) en cada punto experimental con respecto al tiempo 0.

3.7.2 Cinética de la actividad de anfotericina B y anidulafungina combinadas

La actividad de anfotericina B combinada con anidulafungina sobre las biopelículas, de 24 horas de maduración de *Candida* spp. formadas sobre superficies de PTFE y titanio, se estudió a las concentraciones de 40 mg/L y 8 mg/L respectivamente. A las 24, 48 y 72 horas de exposición, se extrajeron discos siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado 3.5.5. Anfotericina B y anidulafungina se disolvieron en agua (Apartado 9.3) antes de ser añadidas al CBR.

3.7.3 Cinética de la actividad de los compuestos con actividad desestructuradora

La actividad de anidulafungina y anfotericina B combinadas con rifampicina, claritromicina, ácido etilendiaminotetraacético, N-acetilcisteína y farnesol sobre la biopelícula de *Candida* spp. formada en PTFE y titanio se determinó, utilizando concentraciones cercanas a la concentración máxima alcanzada en suero tras la administración de una dosis estándar (Cmax). Se dejó madurar la biopelícula durante 24 horas en el CBR y posteriormente se añadió anidulafungina 8 mg/L combinada con los compuestos desestructuradores de la biopelícula a las concentraciones indicadas en la Tabla 3.6. Se extrajeron discos de PTFE y titanio a las 24, 48 y 72 horas de exposición a las combinaciones ensayadas, siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado 3.5.5.

La actividad de anfotericina B combinada con rifampicina, claritromicina, ácido etilendiaminotetraacético, N-acetilcisteína y farnesol, se estudió sobre la biopelícula de *Candida* spp. formada en PTFE y titanio, en este caso, a concentraciones que se utilizan habitualmente en la terapia de sellado antimicrobiano de catéteres venosos centrales. Los ensayos se realizaron sobre biopelículas de 24 horas de maduración en el CBR a las concentraciones indicadas en la Tabla 3.6. El número de células viables adheridas a los discos tras 24, 48 y 72 horas de exposición, se determinó siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado 3.5.5. Los antifúngicos y los compuestos ensayados

se disolvieron según su coeficiente de solubilidad en agua o DMSO (Apartado 9.3). La concentración de DMSO fue inferior al 1% en todos los ensayos.

Tabla 3.6. Concentraciones de los diversos compuestos ensayados en combinación con anfotericina B y anidulafungina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada en PTFE y titanio.

Compuesto	**Concentraciones ensayadas**	
	Anidulafungina 8 mg/L	Anfotericina B 1.000 mg/L
EDTA	30 mg/L	30.000 mg/L
Rifampicina	10 mg/L	1.000 mg/L
N-acetilcisteína	40 mg/L	4.000 mg/L
Claritromicina	5 mg/L	1.000 mg/L
Farnesol	30 µM	300 µM

3.8 ANÁLISIS DE DATOS

3.8.1 Análisis cinético y estadístico

La cinética de crecimiento se estudió utilizando la tasa de crecimiento K (Log_{10} ufc/cm^2*h^{-1}), definida como el incremento en número de células viables adheridas por unidad de tiempo, la cual se obtuvo a partir de la ecuación: $N_t=N_0 \times e^{-kt}$, donde N_t expresa el número de células adheridas en el tiempo t, N_0 el número de células adheridas en el inicio del experimento y t el tiempo de incubación. La cinética de letalidad se determinó ajustando los datos a una regresión lineal o regresión cuadrática. La bondad de los ajustes se evaluó mediante el coeficiente de determinación r^2. La concordancia entre técnicas se analizó utilizando el Índice de Kappa y el coeficiente de correlación de Pearson.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico R (versión 3.3.2). Se realizó un modelo de regresión lineal con triple interacción (tiempo, biomaterial y antifúngico) para detectar diferencias significativas en los recuentos de células viables y en las cinéticas de letalidad en los distintos biomateriales. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p<0,05$. La estadística descriptiva del conjunto de datos incluyó tanto medidas de centralidad (media, mediana) como de dispersión (desviación estándar, rango intercuartílico).

3.8.2 Interacción entre fármacos

La interacción entre antimicrobianos y sustancias con capacidad desestructuradora de la biopelícula se clasificó siguiendo los criterios previamente establecidos para los análisis de curvas de letalidad (Lewis et al. 2002) (Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2016). La interacción se definió como sinérgica cuando hubo una disminución en células viables (ufc/cm^2) a las 72 horas ≥ 2 Log_{10} en comparación con el fármaco más activo, aditiva si la diferencia en células viables era <2 Log_{10} y ≥ 1 Log_{10}, indiferente si la diferencia en células viables es <1 Log_{10} y antagónico cuando hay un incremento en células viables ≥ 2 Log_{10} con respecto al fármaco menos activo.

4 RESULTADOS

4.1 SÍNTESIS DEL TRABAJO REALIZADO

1. Se ha determinado la capacidad de formación de biopelícula de 90 aislados clínicos procedentes de pacientes de la Clínica Universidad de Navarra mediante la tinción con cristal violeta.
2. Se seleccionaron los dos aislados de cada especie con más capacidad de formación de biopelícula y junto con una cepa de referencia ATCC® de cada especie se constituyó el conjunto BIOCAN (15 cepas). Se confirmó nuevamente la capacidad de formación de biopelícula de estas cepas mediante el ensayo de reducción del XTT.
3. Se estudió la hidrofobicidad celular superficial de las cepas BIOCAN mediante el Test de Adhesión Microbiana a Hidrocarburos.
4. Se determinó la sensibilidad de las células planctónicas de las cepas BIOCAN a los antifúngicos mediante el método comercial Sensititre *YeastOne*® y el método de microdilución en caldo M27-A3.
5. La sensibilidad a anfotericina B y anidulafungina de las biopelículas formadas por las cepas BIOCAN se evaluó mediante el ensayo de reducción del XTT.
6. Se estudió la cinética de formación de la biopelícula de las cepas BIOCAN sobre PTFE y titanio en el *CDC Biofilm Reactor* durante 96 horas.

Se seleccionó la cepa de *C. tropicalis* B10 para continuar con el estudio debido a que fue la cepa con mayor recuento de células viables adheridas a la superficie de PTFE y titanio a las 24 horas, tuvo uno de los valores más altos de hidrofobicidad celular superficial y los recuentos celulares durante 96 horas tuvieron el menor rango intercuartílico dentro del conjunto BIOCAN. Además, *C. tropicalis* fue la especie que presentó la CMIB más alta a anfotericina B y anidulafungina.

7. La cinética de letalidad de 7 antifúngicos (anfotericina B, 5-fluorocitosina, terbinafina, caspofungina, anidulafungina, micafungina y posaconazol) se estudió sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10, formada sobre PTFE y titanio (Figura 4.2).

8. La cinética de letalidad de la combinación de anfotericina B y anidulafungina se estudió sobre las biopelículas de *C. tropicalis* B10, B11 y ATCC® 750 formadas sobre PTFE y titanio.

9. La cinética de letalidad de anfotericina B y anidulafungina, combinadas con EDTA, N-acetilcisteína, rifampicina, claritromicina o farnesol se estudió sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada en PTFE y titanio.

Se seleccionó el EDTA y la rifampicina por haber mostrado efecto sinérgico o aditivo al combinarse con anfotericina B y anidulafungina sobre la biopelícula de *C. tropicalis*. Se decidió estudiar la eficacia de estos dos compuestos sobre la biopelícula de la cepa de cada especie del grupo BIOCAN que presentó mayor número de células adheridas a las 24 horas sobre PTFE y titanio.

10. La cinética de letalidad de anfotericina B y anidulafungina, combinadas con EDTA y rifampicina se estudió sobre la biopelícula de *C. albicans* B2, *C. parapsilosis* B4, *C. krusei* B7 y *C. glabrata* B13. formada en PTFE y titanio.

Las concentraciones utilizadas y los aislados en los que se han realizado los ensayos descritos se especifican en las Figuras 4.1 y 4.2.

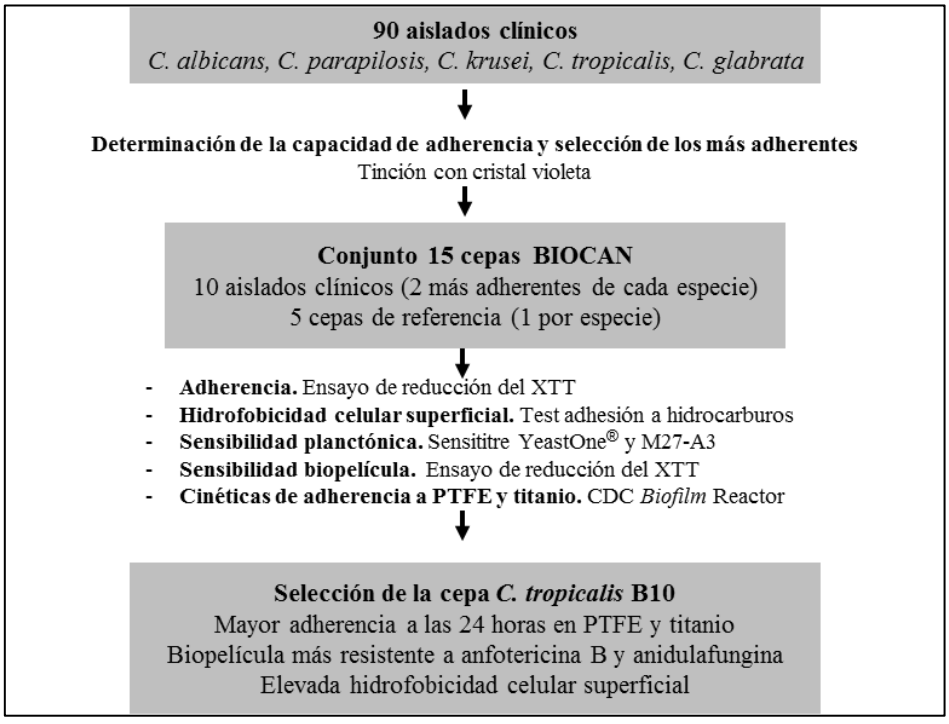


Figura 4.1 Esquema de los puntos 1 al 7 de la síntesis.

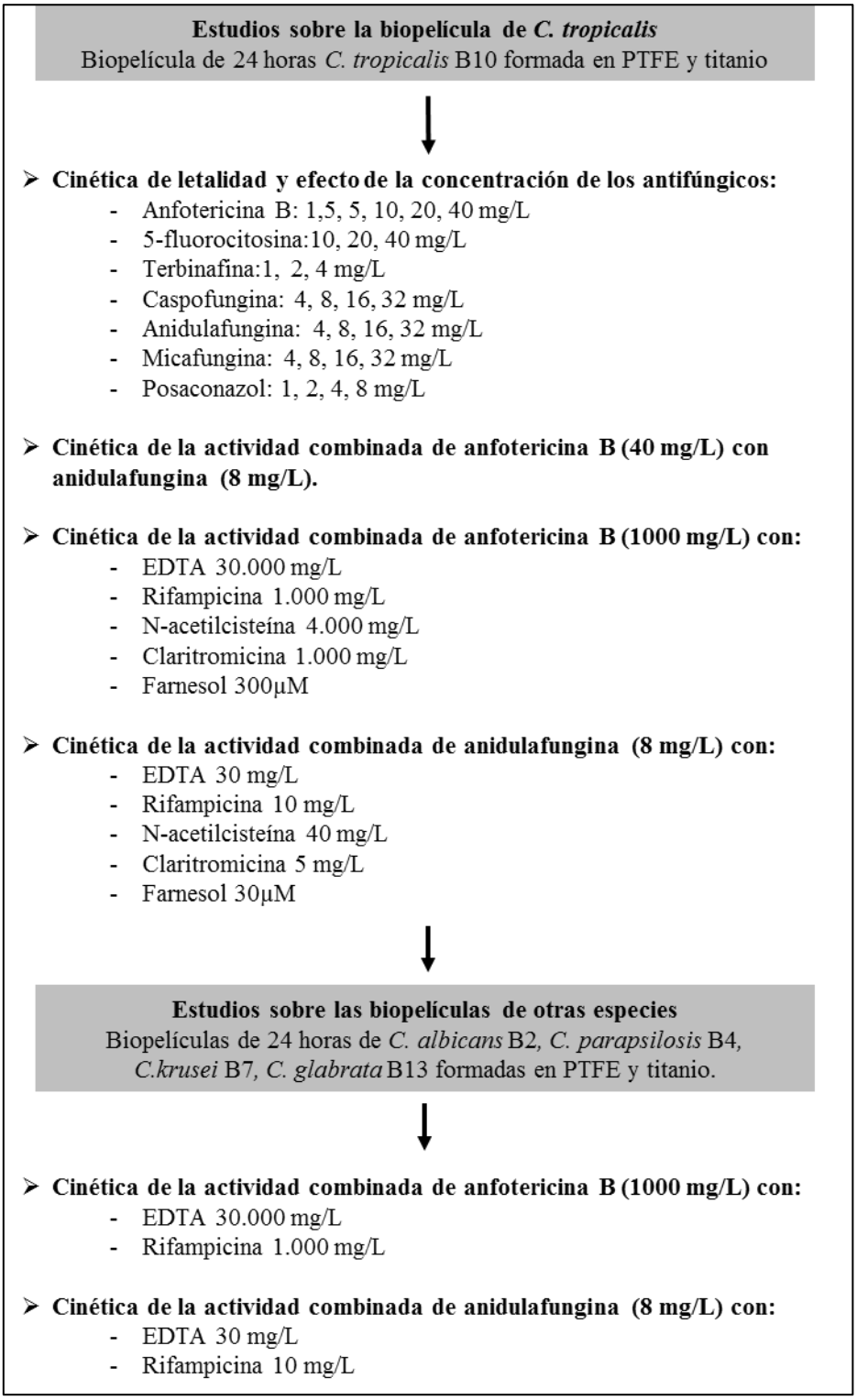


Figura 4.2 Esquema de los puntos 8 al 11 de la síntesis.

4.2 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN LOS AISLADOS CLÍNICOS

Se estudió la capacidad de formación de biopelícula de 90 aislados clínicos de *Candida* spp. mediante la tinción con cristal violeta (Tabla 4.1). En total, el 63% (57) de los aislados estudiados presentó algún grado de formación de biopelícula. Por especies, el 100% de los aislados de *C. tropicalis* tuvieron algún grado de formación de biopelícula, seguidos de *C. parapsilosis* y *C. krusei* (73%), *C. albicans* (53%) y *C. glabrata* (50%). Además, *C. tropicalis* mostró el mayor porcentaje de aislados clasificados como moderada y fuertemente formadores (88%), seguidos de *C. parapsilosis* (53%), *C. krusei (*33%), *C. glabrata* (32%) y *C. albicans* (23%).

Tabla 4.1 Origen y distribución de las cepas según su capacidad de formación de biopelícula.

Especie	Nº de aislados	Capacidad de formación de biopelícula				Total de aislados formadores (%)
		No	Poco	Moderada	Fuerte	
C. albicans						
Hemocultivo	17	8	5	3	1	**9 (53)**
C. parapsilosis						
Bilis	4	2	2			
Catéter Intravascular	3				3	
Hemocultivo	7	2	1	2	2	
Líquido ascítico	1				1	
Total	**15**	**4**	**3**	**2**	**6**	**11 (73)**
C. krusei						
Bilis	3	1	2			
Catéter de drenaje intraabdominal	2	1			1	
Hemocultivo	3	1	2			
Líquido ascítico	5	1	2	1	1	
Líquido pleural	2			1	1	
Total	**15**	**4**	**6**	**2**	**3**	**11 (73)**
C. tropicalis						
Bilis	3		1		2	
Catéter de drenaje biliar	1				1	
Hemocultivo	1				1	
Líquido ascítico	2				2	
Líquido pleural	1			1		
Líquido sinovial	1				1	
Total	**9**		**1**	**1**	**7**	**9 (100)**
C. glabrata						
Bilis	10	4	3	1	2	
Catéter de drenaje intraabdominal	2	1	1			
Catéter Intravascular	4	4				
Hemocultivo	13	7	2	4		
Líquido ascítico	1		1			
Líquido pleural	4	1		1	2	
Total	**34**	**17**	**7**	**6**	**4**	**17 (50)**
Total (%)	**90**	**33 (37)**	**22 (23)**	**14 (16)**	**21 (23)**	**57 (63)**

Por región anatómica, el mayor porcentaje de aislados clínicos con capacidad de formación de biopelícula se localizó en el grupo de los procedentes de líquidos biológicos (excepto sangre) (76%), seguido de los aislados de sangre (56%) y catéteres (50%) (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Distribución de los aislados clínicos según la procedencia y su capacidad de formación de biopelícula

Región anatómica	Nº de aislados	Capacidad de formación de biopelícula				Total de aislados formadores (%)
		No	Poco	Moderada	Fuerte	
Catéteres	12	6	1	0	5	**6 (50)**
Sangre	41	18	10	9	4	**23 (56)**
Otros Líquidos biológicos	37	9	11	5	12	**28 (76)**
Total	**90**	**33**	**22**	**14**	**21**	**57 (63)**

Se seleccionaron los dos aislados clínicos más formadores de cada especie que, junto con las cepas de referencia ATCC® formaron el conjunto de cepas BIOCAN. Posteriormente se confirmó la capacidad de formación de biopelícula de las cepas BIOCAN mediante el ensayo de reducción del XTT (Tabla 4.3).

Tabla 4.3 Capacidad de formación de biopelícula de los aislados BIOCAN determinada mediante la tinción con cristal violeta (CV) y ensayo de reducción del XTT.

Aislado	Origen	Clasificación CV	Clasificación XTT
C. albicans			
B1	Hemocultivo	Moderada	Poco
B2	Hemocultivo	Moderada	Poco
ATCC® 90028	Cepa de referencia ATCC®	Moderada	Moderada
C. parapsilosis			
B4	Catéter intravascular	Fuerte	Moderada
B5	Catéter intravascular	Fuerte	Moderada
ATCC® 22019	Cepa de referencia ATCC®	Fuerte	Poco
C. krusei			
B7	Líquido de drenaje intraabdominal	Fuerte	Poco
B8	Catéter de drenaje intraabdominal	Fuerte	Poco
ATCC® 6258	Cepa de referencia ATCC®	Fuerte	Fuerte
C. tropicalis			
B10	Hemocultivo	Fuerte	Fuerte
B11	Catéter de drenaje Biliar	Fuerte	Fuerte
ATCC® 750	Cepa de referencia ATCC®	Poco	Poco
C. glabrata			
B12	Hemocultivo	Moderada	Moderada
B13	Líquido pleural	Fuerte	Moderada
ATCC® 90030	Cepa de referencia ATCC®	Poco	Moderada

No se encontró concordancia entre la clasificación de la capacidad de formación de biopelícula por tinción de cristal violeta y reducción del XTT, índice de Kappa 0,167 ± 0,176 (IC 95 %= -0,178 a 0,511). Aunque no se obtuvo correlación entre la DO_{570} obtenida en la tinción con cristal violeta y la DO_{492} obtenida en el ensayo de reducción del XTT (R= 0,764, R^2= de 0,58), se observó en estas variables una tendencia a variar en el mismo sentido en todas las especies estudiadas (Figura 4.3). Los aislados clínicos B10 y B11 de *C. tropicalis* destacaron por presentar, al mismo tiempo, los valores más altos de DO tanto mediante la tinción con cristal violeta como por el ensayo de reducción del XTT.

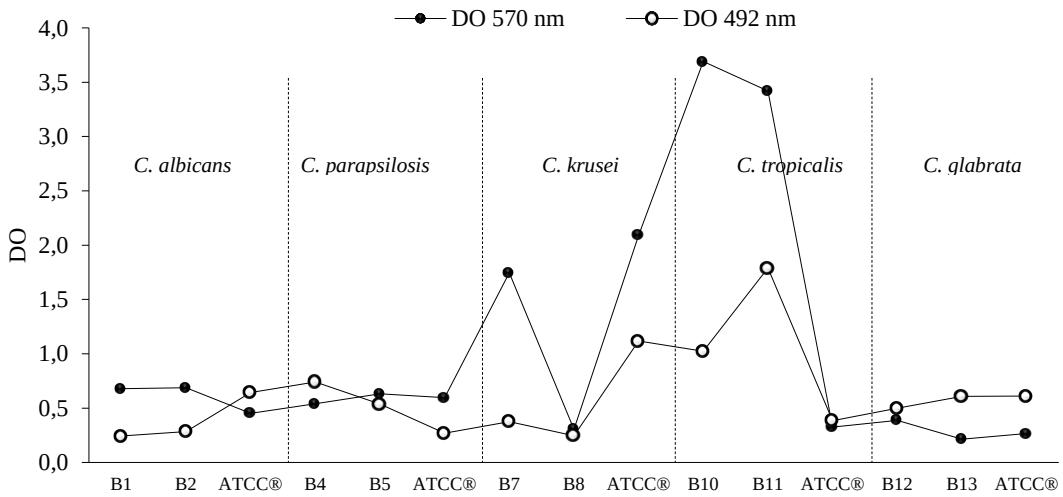


Figura 4.3. Representación gráfica de los valores de absorbancia obtenidos con cristal violeta (DO_{570}) y el ensayo de reducción del XTT (DO_{492}).

4.3 ESTUDIO DE LA HIDROFOBICIDAD CELULAR SUPERFICIAL

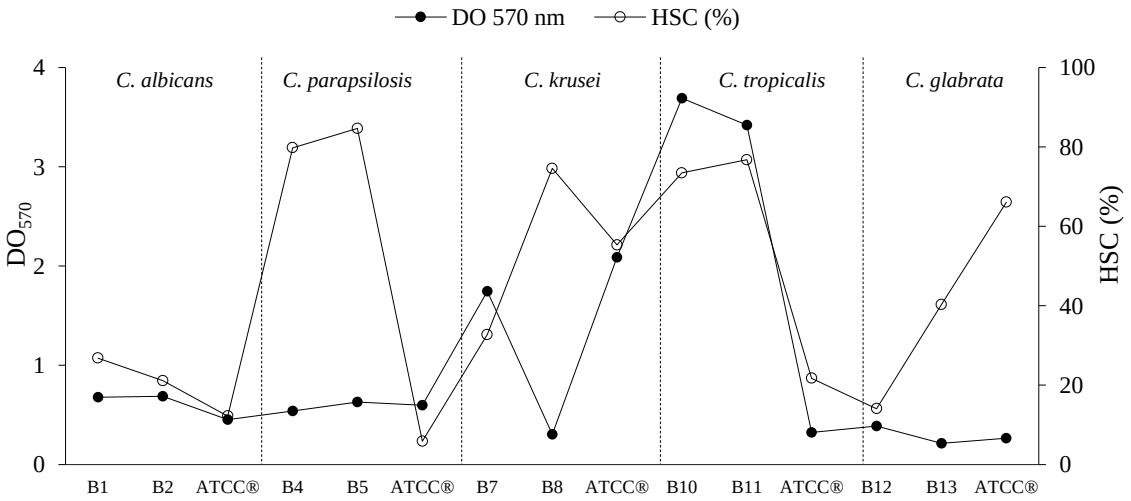
Se midió la hidrofobicidad celular superficial de los aislados BIOCAN mediante el test de adhesión microbiana a hidrocarburos. La hidrofobicidad dependió del aislado estudiado (Tabla 4.4). Los aislados clínicos de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* tuvieron los valores más elevados de hidrofobicidad, superiores al 70%. Sin embargo, las cepas de referencia ATCC® de estas dos especies mostraron valores de hidrofobicidad inferiores al 22%. Para *C. krusei* y *C. glabrata* la hidrofobicidad fue más variable. Los valores estuvieron comprendidos entre el 14 y el 75%. *C. albicans* fue la especie con menor hidrofobicidad celular superficial, inferior al 30% los tres aislados analizados.

Tabla 4.4 Hidrofobicidad celular superficial (HCS) de los aislados BIOCAN

Aislado	DO_{600} inicial	DO_{600} final	HSC (%)
C. albicans			
B1	0,903	0,661	26,8
B2	0,852	0,672	21,1
ATCC® 90028	0,883	0,775	12,2
C. parapsilosis			
B4	0,742	0,150	79,8
B5	0,300	0,046	84,7
ATCC® 22019	0,340	0,320	5,9
C. krusei			
B7	0,580	0,390	32,8
B8	0,590	0,150	74,6
ATCC® 6258	0,470	0,210	55,3
C. tropicalis			
B10	0,490	0,130	73,5
B11	0,560	0,130	76,8
ATCC® 750	0,460	0,360	21,7
C. glabrata			
B12	0,640	0,550	14,1
B13	0,620	0,370	40,3
ATCC® 90030	0,560	0,190	66,1

Al comparar capacidad de adherencia, determinada mediante la tinción con cristal violeta (DO_{570}) con la hidrofobicidad celular superficial, se observó una tendencia a variar en el mismo sentido, especialmente en *C. albicans* y *C. tropicalis* (Figura 4.4). Algunos aislados como *C. parapsilosis* B4 y B5, *C. krusei* B8 y *C. glabrata* B13 y ATCC® 90030, mostraron unos valores de hidrofobicidad celular superficial proporcionalmente más elevados con respecto a su capacidad de formación de biopelícula.

Figura 4.4. Representación gráfica de los valores de absorbancia obtenidos con la tinción de cristal



violeta (DO_{570}) y la hidrofobicidad celular superficial. Cada punto representa un aislado BIOCAN.

4.4 ACTIVIDAD DE LOS FÁRMACOS SOBRE LOS AISLADOS BIOCAN

4.4.1 Actividad de los antifúngicos sobre las células planctónicas de los aislados BIOCAN

Los aislados BIOCAN en fase de crecimiento planctónico fueron sensibles a los antifúngicos testados mediante el panel comercial Sensititre YeastOne® (Tabla 4.5), interpretado según el *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Sin tener en cuenta las resistencias intrínsecas naturales a fluconazol en *C. krusei* y *C. glabrata*, solamente la cepa de referencia *C. krusei* ATCC® mostró una sensibilidad intermedia a 5-fluorocitosina (CMI_{50}: 8 mg/L).

Tabla 4.5 Actividad de los antifúngicos sobre cada uno de los aislados BIOCAN en fase de crecimiento planctónico, determinado mediante el panel comercial Sensititre YeastOne®.

	Antifúngico								
Aislado	**AMB**	**AND**	**MCF**	**CAS**	**5FC**	**PZ**	**VOR**	**ITR**	**FLZ**
C. albicans									
B1	0,12	0,015	0,008	0,015	0,06	0,015	0,008	0,015	0,125
B2	0,25	0,015	0,008	0,03	0,006	0,015	0,008	0,015	0,25
ATCC® 90028	0,25	0,015	0,008	0,06	0,125	0,015	0,008	0,06	0,5
C. parapsilosis									
B4	0,25	0,25	0,125	0,25	0,125	0,015	0,008	0,03	0,25
B5	0,25	1	0,5	0,25	0,125	0,03	0,008	0,06	0,5
ATCC® 22019	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,03	0,015	0,06	1
C. krusei									
B7	0,5	0,06	0,06	0,125	4	0,125	0,125	0,125	16
B8	0,25	0,015	0,06	0,125	4	0,25	0,25	0,125	32
ATCC® 6258	0,5	0,015	0,06	0,125	8	0,125	0,125	0,125	32
C. tropicalis									
B10	0,25	0,25	0,008	0,25	0,06	0,125	0,125	0,125	2
B11	0,5	0,125	0,008	0,06	0,06	0,25	0,125	0,125	0,5
ATCC® 750	0,12	0,015	0,008	0,015	0,06	0,06	0,03	0,06	0,5
C. glabrata									
B12	0,5	0,015	0,008	0,125	0,06	4	2	8	64
B13	0,5	0,015	0,008	0,125	0,06	0,5	0,25	0,5	16
ATCC® 90030	0,12	0,03	0,015	0,06	0,06	0,125	0,03	0,125	4

AMB Anfotericina B, AND anidulafungina, MCF micafungina, CAS caspofungina, 5FC 5-fluorocitosina, PZ posaconazol, VOR voriconazol, ITR itraconazol, FLZ fluconazol

La CMI de anfotericina B y anidulafungina en los aislados BIOCAN, por el método de referencia M27-A3 se muestra en la Tabla 4.5. La CMI_{50} de anidulafungina estuvo comprendida entre 0,016 y 0,25 mg/L, excepto para los tres aislados de *C. parapsilosis*, cuyas CMI_{50} fueron de 1 mg/L. La CMI_0 de anfotericina B, estuvo comprendida entre 0,25 y 1 mg/L.

4.4.2 Actividad de los antifúngicos sobre las biopelículas de los aislados BIOCAN

La $CMIB_{50}$ de anidulafungina para las biopelículas de *C. tropicalis* fue mayor de 16 mg/L mientras que para el resto de especies estuvo comprendida entre ≤0,03 y >16 mg/L. La $CMIB_{90}$ de anidulafungina para las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* fue mayor de 16 mg/L mientras que para las de *C. krusei* y *C. glabrata* estuvieron comprendidas entre 0,06 y > 16 mg/L (Tabla 4.6).

La $CMIB_{50}$ de anfotericina B para los aislados BIOCAN estuvo comprendida entre 0,03 y 1 mg/L mientras que la $CMIB_{90}$ fue igual o mayor de 8 mg/L para las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, excepto para las cepas de referencia cuyas CMI_{90} fueron 0,5, 0,5 y 4 mg/L, respectivamente. La $CMIB_{90}$ *para C. krusei* y *C. glabrata* estuvo comprendida entre 0,5 y 2 mg/L.

Tabla 4.6 Actividad de anfotericina B y anidulafungina sobre las células planctónicas y en biopelícula de los aislados BIOCAN, determinada mediante el método M27-A3 y el ensayo de reducción del XTT, respectivamente.

	Anfotericina B				**Anidulafungina**			
Aislado	**CMI**	**$CMIB_{50}$**	**$CMIB_{80}$**	**$CMIB_{90}$**	**CMI**	**$CMIB_{50}$**	**$CMIB_{80}$**	**$CMIB_{90}$**
C. albicans								
B1	0,25	0,12	1	8	0,016	>16	>16	>16
B2	0,25	0,06	1	8	0,016	4	>16	>16
ATCC® 90028	0,25	0,03	0,12	0,5	0,12	≤0.03	>16	>16
C. parapsilosis								
B4	1	0,06	0,25	>8	1	8	>16	>16
B5	1	0,25	0,5	>8	1	4	>16	>16
ATCC® 22019	0,5	0,06	0,12	0,5	1	2	>16	>16
C. krusei								
B7	1	0,12	0,5	0,5	0,12	0.03	0,12	0,12
B8	1	0,12	0,5	0,5	0,25	0,06	0.12	0,25
ATCC® 6258	0,5	0,25	0,5	0,5	0,016	≤0.03	0,5	>16
C. tropicalis								
B10	0,25	0,25	4	>8	0,03	>16	>16	>16
B11	0,25	1	>8	>8	0,016	>16	>16	>16
ATCC® 750	0,5	0,12	2	4	0,03	>16	>16	>16
C. glabrata								
B12	0,5	0,06	0,25	0,5	0,06	≤0.03	0,06	0,06
B13	0,25	0,016	1	2	0,06	≤0.03	0,06	0,12
ATCC® 90030	0,25	0,03	0,12	2	0,03	≤0.03	0,12	0,12

En la Figura 4.5 se muestra la correlación entre la capacidad de formación de biopelícula, medida mediante la tinción con cristal violeta (DO_{570}) y Log_2 de la CMIB de la biopelícula de *Candida* spp. a anfotericina B. Se observó una correlación exponencial positiva (R^2= 0,6) entre estas dos variables. Las $CMIB_{50}$ más elevadas se correspondieron con una mayor densidad óptica. Sin embargo, no se obtuvo correlación entre la capacidad de formación de biopelícula medida mediante el ensayo de reducción del XTT (DO_{492}) y la CMIB.

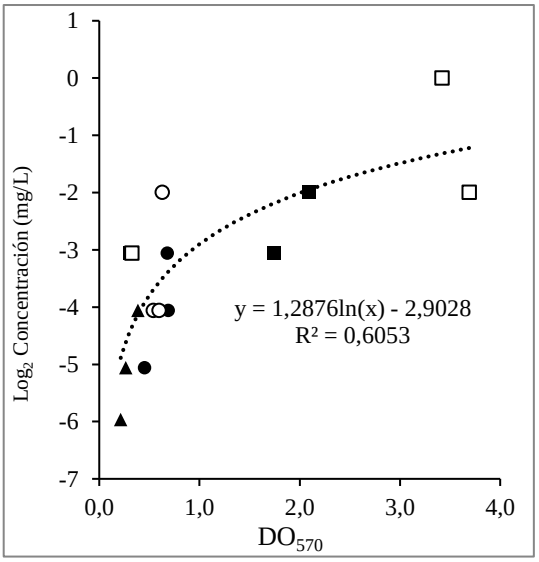


Figura 4.5. Análisis de correlación entre la capacidad de formación de biopelícula, determinada mediante la tinción con cristal violeta (DO_{570}) y la $CMIB_{50}$ de anfotericina B. Cada punto representa una cepa de *C. albicans* (●), *C. parapsilosis* (○), *C. krusei* (■), *C. tropicalis* (□) o *C. glabrata* (▲).

4.4.3 Actividad de los compuestos con actividad desestructuradora sobre las biopelículas de los aislados BIOCAN

Los compuestos con actividad desestructuradora de la biopelícula seleccionados en este estudio no mostraron actividad sobre las biopelículas de los aislados BIOCAN. La $CMIB_{50}$ y $CMIB_{90}$ de EDTA, rifampicina, N-acetilcisteína, claritromicina y farnesol para las biopelículas de los aislados BIOCAN fueron > 1.000 mg/L, >20 mg/L, >80 mg/L, >128 mg/L y >200 µM, respectivamente.

4.5 CINÉTICA DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP. SOBRE SUPERFICIES DE PTFE Y TITANIO

4.5.1 Cinética de formación de las biopelículas de *C. albicans* sobre PTFE y titanio

La cinética de adhesión de *C. albicans* a PTFE y titanio se estudió durante 96 horas en el CBR. El número de células viables se incrementó de manera exponencial sobre PTFE y sobre titanio durante las primeras 24 horas, tras las cuales se observó una fase estacionaria que se prolongó hasta el final del experimento, a excepción de la cepa de referencia, que continuó adhiriéndose sobre titanio hasta las 96 horas (Figura 4.6).

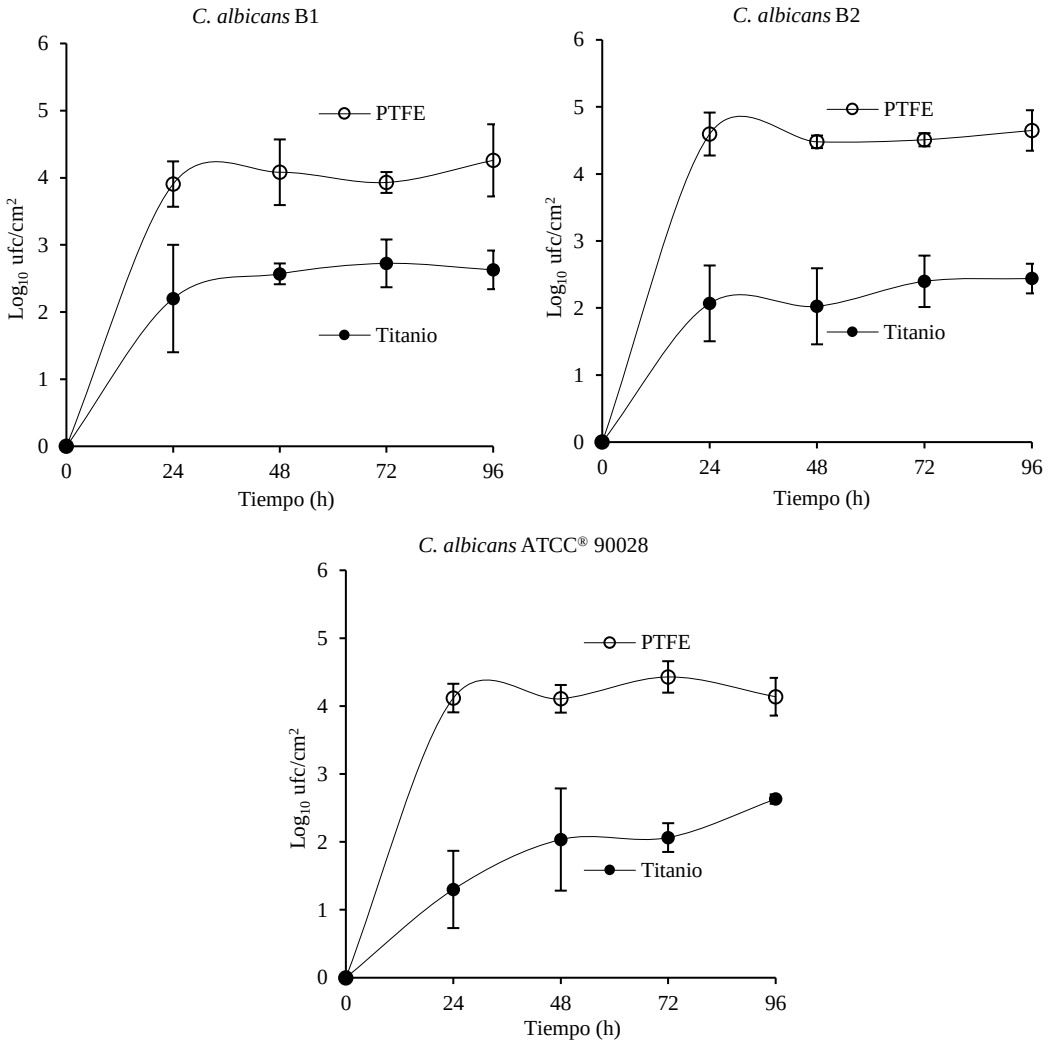


Figura 4.6. Cinética de formación de la biopelícula de *C. albicans*. sobre discos de PTFE y titanio durante 96 horas en un *CDC Biofilm Reactor*. Cada punto representa la media y la desviación estándar de tres discos.

La velocidad de adhesión (K), expresada en Log_{10} ufc/cm^2*h^{-1}, fue siempre mayor sobre PTFE que sobre titanio, tanto para los aislados clínicos B1 (K_{PTFE}= 0,16, $K_{Titanio}$= 0,09) y B2 (K_{PTFE}= 0,19, $K_{Titanio}$= 0,09) como para la cepa de referencia (K_{PTFE}= 0,17, $K_{Titanio}$= 0,02).

La media de células viables adheridas, en los 4 puntos, sobre PTFE fue de 4,04±0,38 Log_{10} ufc/cm^2 en el aislado B1, 4,56±0,21 Log_{10} ufc/cm^2 en el aislado B2 y 4,20±0,24 Log_{10} ufc/cm^2 en la cepa de referencia, mientras que, sobre titanio, la media de células adheridas fue de 2,53±0,45 Log_{10} ufc/cm^2 en B1, 2,23±0,44 Log_{10} ufc/cm^2 en B2 y 2,07±0,61 Log_{10} ufc/cm^2 en la cepa de referencia. Los recuentos de células viables adheridas fueron, para todas las cepas, significativamente mayores sobre PTFE que sobre titanio ($p<0.01$). Al comparar en un mismo biomaterial los recuentos celulares obtenidos en cada cepa observamos que sobre PTFE, el número de células adheridas del aislado clínico B2 fue significativamente mayor que las obtenidas en el aislado clínico B1 y la cepa de referencia ($p\leq0,01$). Por el contrario, sobre titanio, no se obtuvieron diferencias significativas entre ninguno de los aislados estudiados ($p>0,05$) (Figura 4.7).

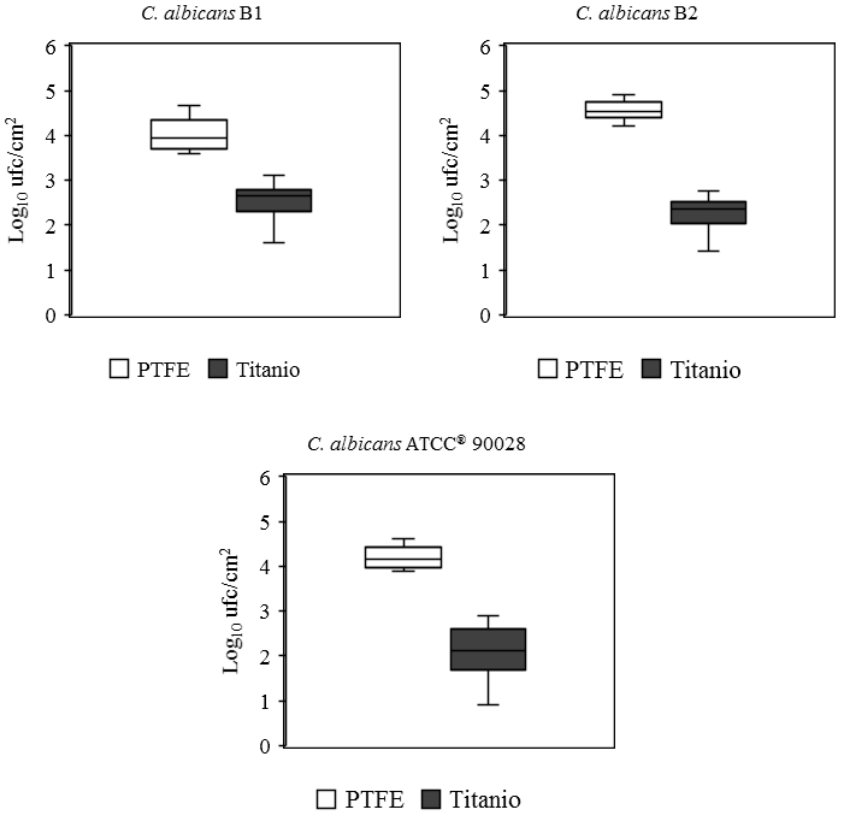


Figura 4.7. Representación gráfica de la mediana, cuartiles y valores máximos y mínimos de células viables adheridas de *C. albicans* sobre cada biomaterial y cepa ensayada.

4.5.2 Cinética de formación de las biopelículas de *C. parapsilosis* sobre PTFE y titanio

En *C. parapsilosis*, la cinética de adherencia sobre ambos biomateriales mostró diferencias con respecto a *C. albicans*. En este caso, el número de células viables se incrementó de manera exponencial sobre ambos biomateriales. El máximo de células viables se alcanzó a las primeras 48 horas en los aislados clínicos B4 y B5 mientras que, en la cepa de referencia, el recuento máximo se alcanzó a las 72 horas sobre PTFE y a las 24 horas sobre titanio. Posteriormente se observó una fase estacionaria en B4 y en la cepa de referencia mientras que en el aislado clínico B5 se obtuvo una reducción significativa del número de células ($p<0,01$) (Figura 4.8).

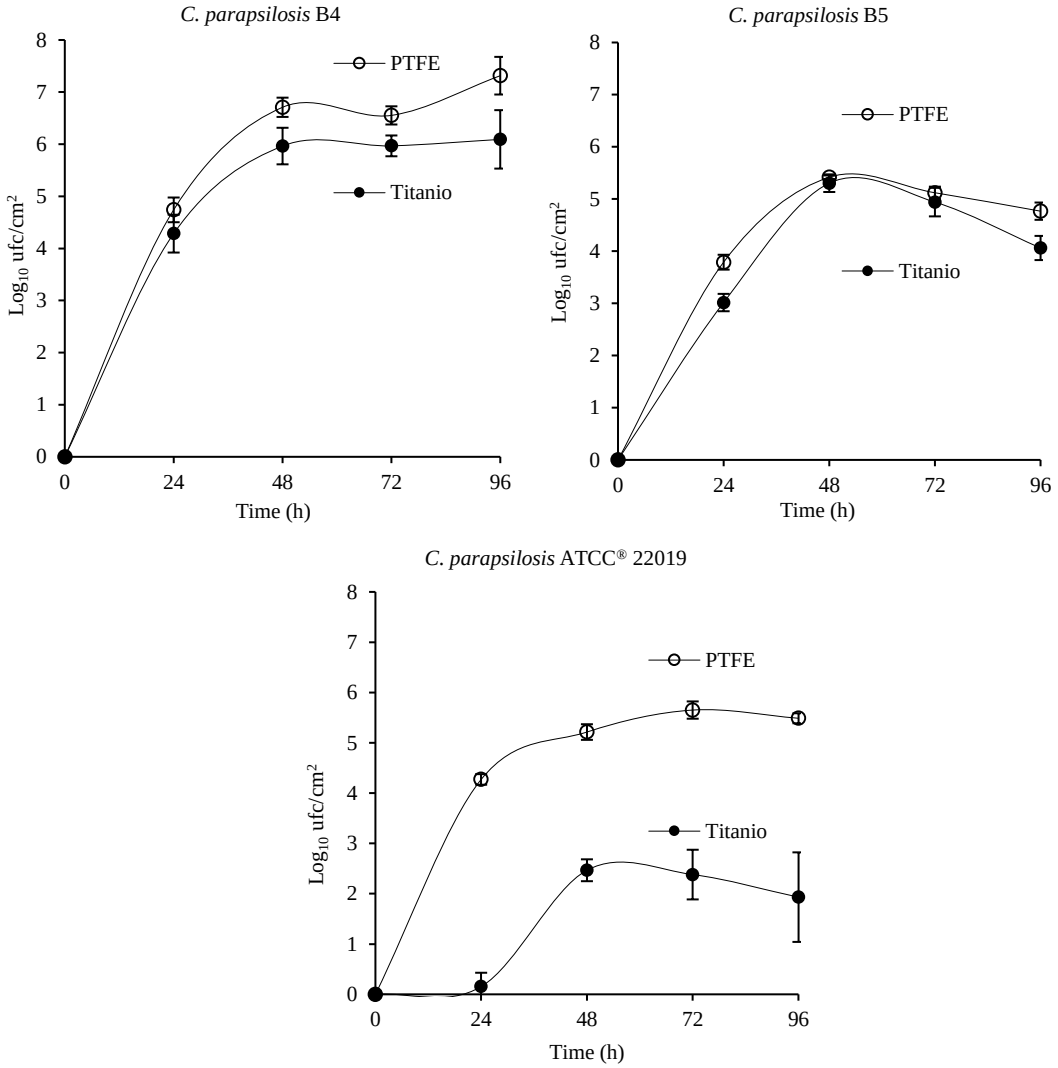


Figura 4.8. Cinética de crecimiento de la biopelícula de *C. parapsilosis* sobre discos de PTFE y titanio durante 96 horas en un *CDC Biofilm Reactor*. Cada punto representa la media y la desviación estándar de tres discos.

La velocidad de adhesión K (Log_{10} ufc/cm^2*h^{-1}) fue similar en PTFE y sobre titanio para los aislados clínicos B4 (K_{PTFE}=0,14, $K_{Titanio}$=0,12) y B5 (K_{PTFE}=0,11, $K_{Titanio}$=0,11). Sin embargo, en la cepa de referencia la velocidad obtenida sobre PTFE fue superior a la obtenida sobre titanio (K_{PTFE}=0,11, $K_{Titanio}$=0,05).

En los aislados clínicos B4 y B5 el número de células adheridas sobre PTFE fue similar al obtenido sobre titanio. En B4 se obtuvo un recuento medio de células viables de 6,26±1,03 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y 5,58±0,85 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio mientras que en el aislado clínico B2 se obtuvo un recuento medio de 4,72±0,65 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y 4,35±0,98 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio. Sin embargo, en la cepa de referencia los recuentos de células viables adheridas fueron, significativamente mayores sobre PTFE que sobre titanio (5,16±0,57 vs. 1,74±1,08 Log_{10} ufc/cm^2) ($p<0.01$). Sobre PTFE no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los aislados estudiados ($p>0,05$) mientras que, sobre titanio, el número de células viables adheridas de los aislados clínicos B4 y B5 fue significativamente superior al obtenido en la cepa de referencia ($p<0,01$) (Figura 4.9).

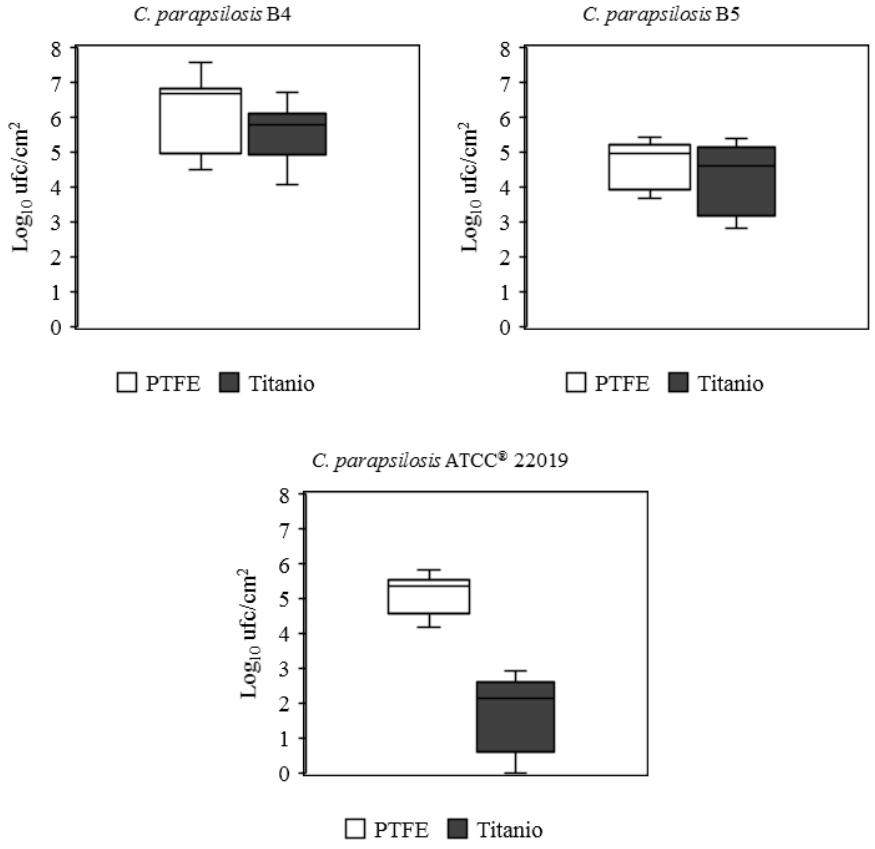


Figura 4.9. Representación gráfica de la mediana, cuartiles y valores máximos y mínimos de células viables adheridas de *C. parapsilosis* en cada biomaterial y cepa ensayada.

4.5.3 Cinética de formación de las biopelículas de *C. krusei* sobre PTFE y titanio

Los aislados clínicos B6, B7 de *C. krusei* y la cepa de referencia mostraron una cinética de formación de la biopelícula similar. El número de células viables se incrementó de manera exponencial sobre PTFE y sobre titanio durante las primeras 24 horas, tras las cuales se obtuvo una reducción significativa del número de células en las 3 cepas estudiadas y en ambos biomateriales ($p<0,01$) (Figura 4.10). Sobre PTFE, la velocidad de adhesión K (Log_{10} ufc/cm^2*h^{-1}) fue similar a la obtenida sobre titanio para los aislados clínicos B7 (K_{PTFE}=0,18, $K_{Titanio}$=0,17) y B8 (K_{PTFE}=0,19, $K_{Titanio}$=0,17) y ligeramente superior a la obtenida sobre titanio en el caso de la cepa de referencia (K_{PTFE}=0,20, $K_{Titanio}$=0,15).

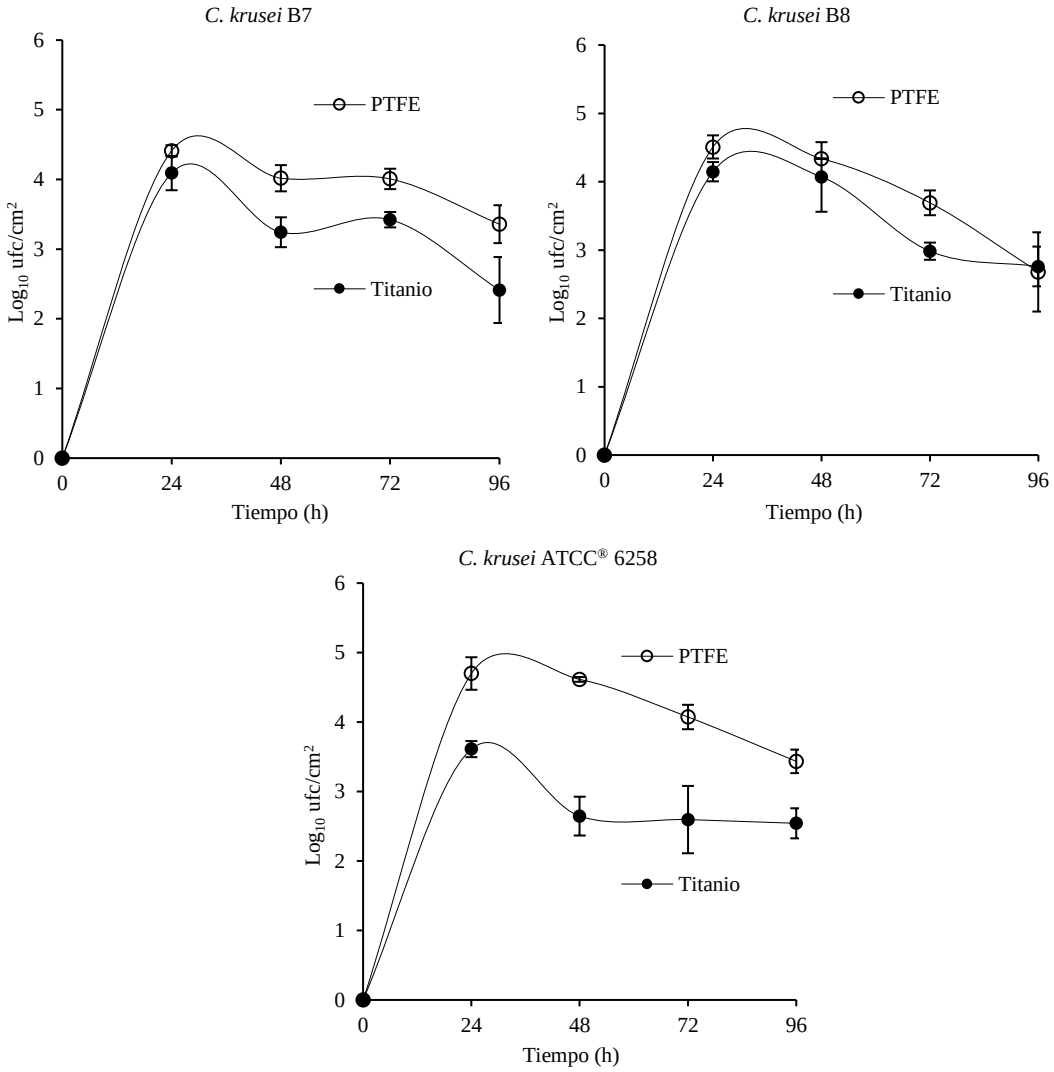


Figura 4.10. Cinética de crecimiento de la biopelícula de *C. krusei* sobre discos de PTFE y titanio durante 96 horas en un *CDC Biofilm Reactor*. Cada punto representa la media y la desviación estándar de tres discos.

En el aislado clínico B7 se obtuvo un recuento medio de células viables de 3,95±0,42 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y 3,29±0,67 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio, en el aislado B8 este recuento fue de 3,76±0,91 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y 3,49±0,7 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio. En la cepa de referencia recuento medio fue de 4,2±0,55 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y 2,85±0,53 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio.

En general, el número de células adheridas sobre PTFE fue ligeramente superior a las obtenidas sobre titanio. Solo se encontró diferencia significativa en el caso de la cepa de referencia ($p \leq 0,01$). Al comparar las biopelículas formadas por las distintas cepas sobre un mismo biomaterial no se obtuvieron diferencias significativas ni sobre PTFE ni sobre titanio ($p > 0,05$). (Figura 4.11).

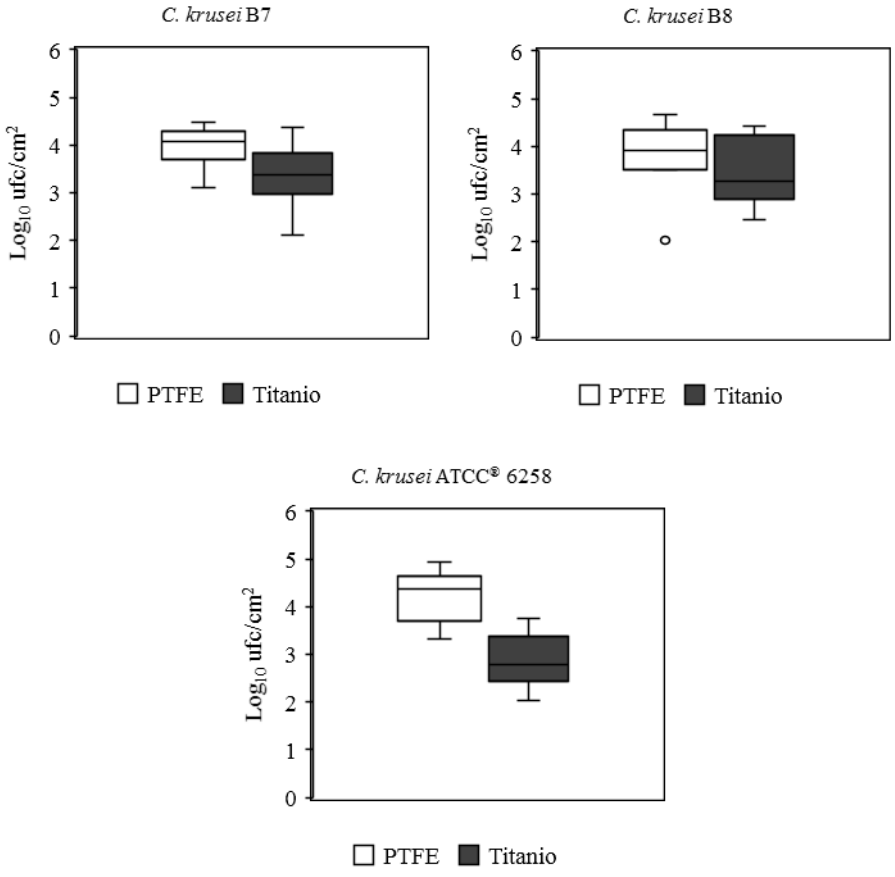


Figura 4.11. Representación gráfica de la mediana, cuartiles y valores máximos y mínimos de células viables adheridas de *C. krusei* en cada biomaterial y cepa ensayada.

4.5.4 Cinética de formación de las biopelículas de *C. tropicalis* sobre PTFE y titanio

La cinética de adhesión de dos aislados clínicos de *C. tropicalis*, al igual que en *C. parapsilosis*, fue distinta de la obtenida en la cepa de referencia. El número de células viables en las biopelículas de los aislados clínicos B10 y B11 se incrementó de manera exponencial sobre PTFE y sobre titanio durante las primeras 24 horas, tras las cuales se observó una fase estacionaria. Sin embargo, en la cepa de referencia, el número de células adheridas continuó creciendo sobre titanio hasta las 48 horas, tras las cuales experimentó una reducción significativa ($p<0,01$) (Figura 4.12).

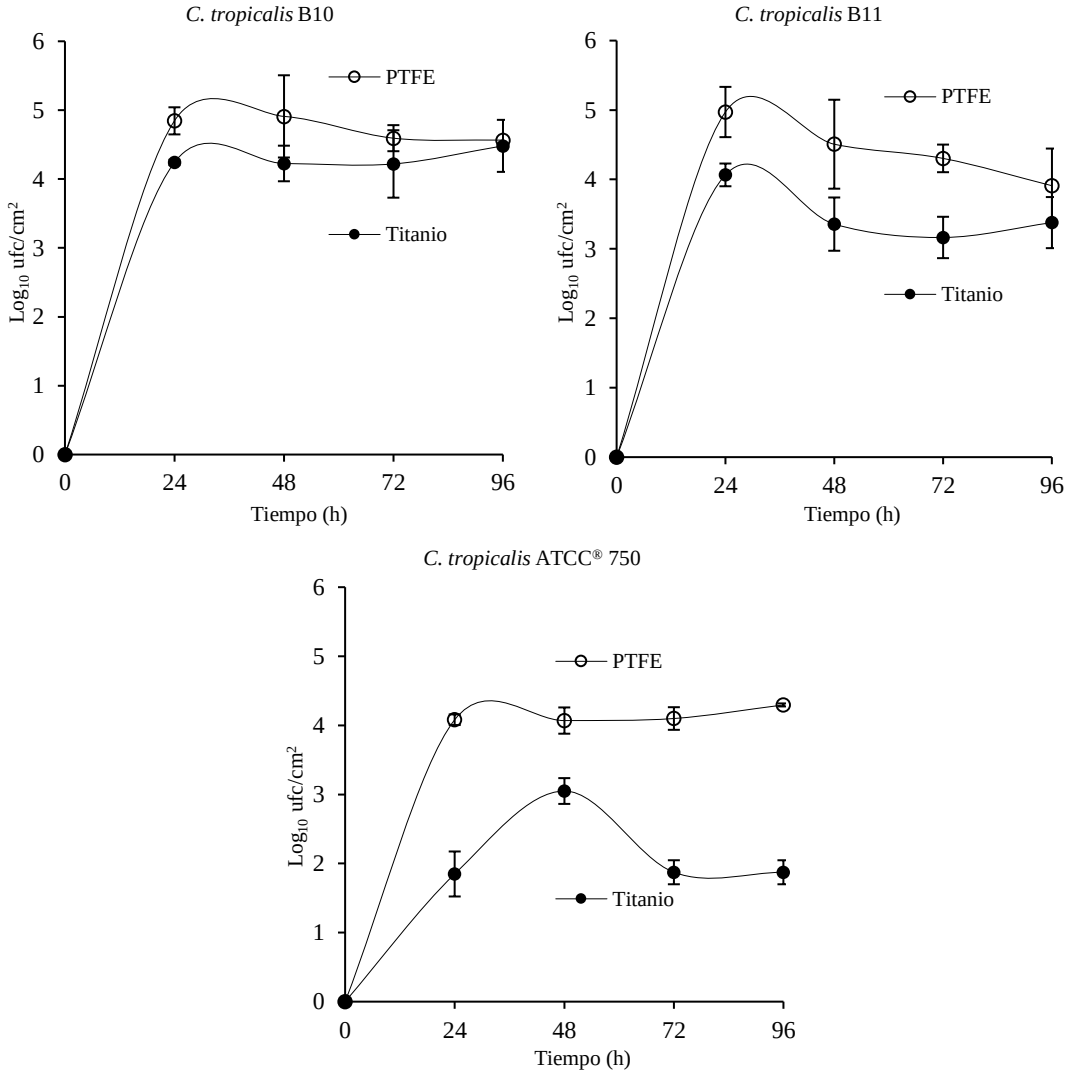


Figura 4.12. Cinética de crecimiento de la biopelícula de *C. tropicalis* sobre discos de PTFE y titanio durante 96 horas en un *CDC Biofilm Reactor*. Cada punto representa la media y la desviación estándar de tres discos.

La velocidad de adhesión K (Log_{10} ufc/cm^2*h^{-1}) se comportó de distinta forma según la cepa. Los aislados clínicos B10 (K_{PTFE}=0,2, $K_{Titanio}$=0,18) y B11 (K_{PTFE}=0,21, $K_{Titanio}$=0,17) mostraron una velocidad similar en ambos biomateriales mientras que la cepa de referencia se adhirió más rápido sobre PTFE (K_{PTFE}=0,17, $K_{Titanio}$=0,06).

Sobre PTFE, el recuento medio de células viables fue de 4,73±0,32 Log_{10} ufc/cm^2 en B10, 4,42±0,56 Log_{10} ufc/cm^2 en B11 y 4,14±0,15 Log_{10} ufc/cm^2 en la cepa de referencia. Sobre titanio, el recuento fue de 4,29±0,31 Log_{10} ufc/cm^2, 3,49±0,45 Log_{10} ufc/cm^2 y 2,17±0,57 Log_{10} ufc/cm^2 respectivamente.

En la cepa de referencia, el número de células viables adheridas sobre PTFE fue significativamente mayor que las adheridas sobre titanio ($p<0.01$). En los aislados clínicos, no hubo diferencias significativas ($p>0,05$). Sobre titanio, el número de células adheridas en la cepa de referencia, fue significativamente en los aislados clínicos ($p<0,01$) (Figura 4.13).

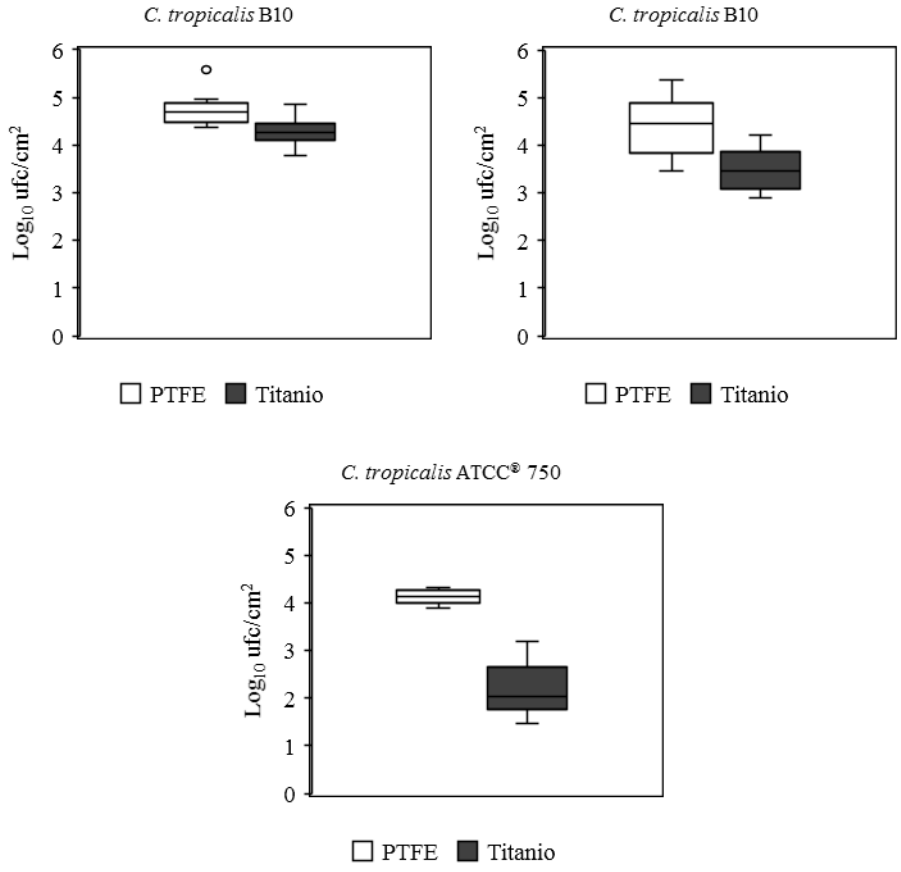


Figura 4.13. Representación gráfica de la mediana, cuartiles y valores máximos y mínimos de células viables adheridas de *C. tropicalis* en cada biomaterial y cepa ensayada.

4.5.5 Cinética de formación de la biopelícula de *C. glabrata* sobre PTFE y titanio

Las tres cepas estudiadas de *C. glabrata* mostraron distinto comportamiento cinético. El número de células viables se incrementó de manera exponencial sobre PTFE y sobre titanio durante las primeras 24 horas en el aislado clínico B13, 48 horas en la cepa de referencia y 72 horas en el aislado clínico B14. Posteriormente se observó una fase estacionaria en los aislados clínicos mientras que en la cepa de referencia se obtuvo una reducción significativa en el número de células adheridas a PTFE ($p<0,01$) (Figura 4.14).

La velocidad de adhesión K (Log_{10} ufc/cm^2*h^{-1}) fue mayor sobre PTFE que sobre titanio, tanto para los aislados clínicos B13 (K_{PTFE}=0,19, $K_{Titanio}$=0,13) y B14 (K_{PTFE}=0,11, $K_{Titanio}$=0,05) como para la cepa de referencia (K_{PTFE}=0,11, $K_{Titanio}$=0,09).

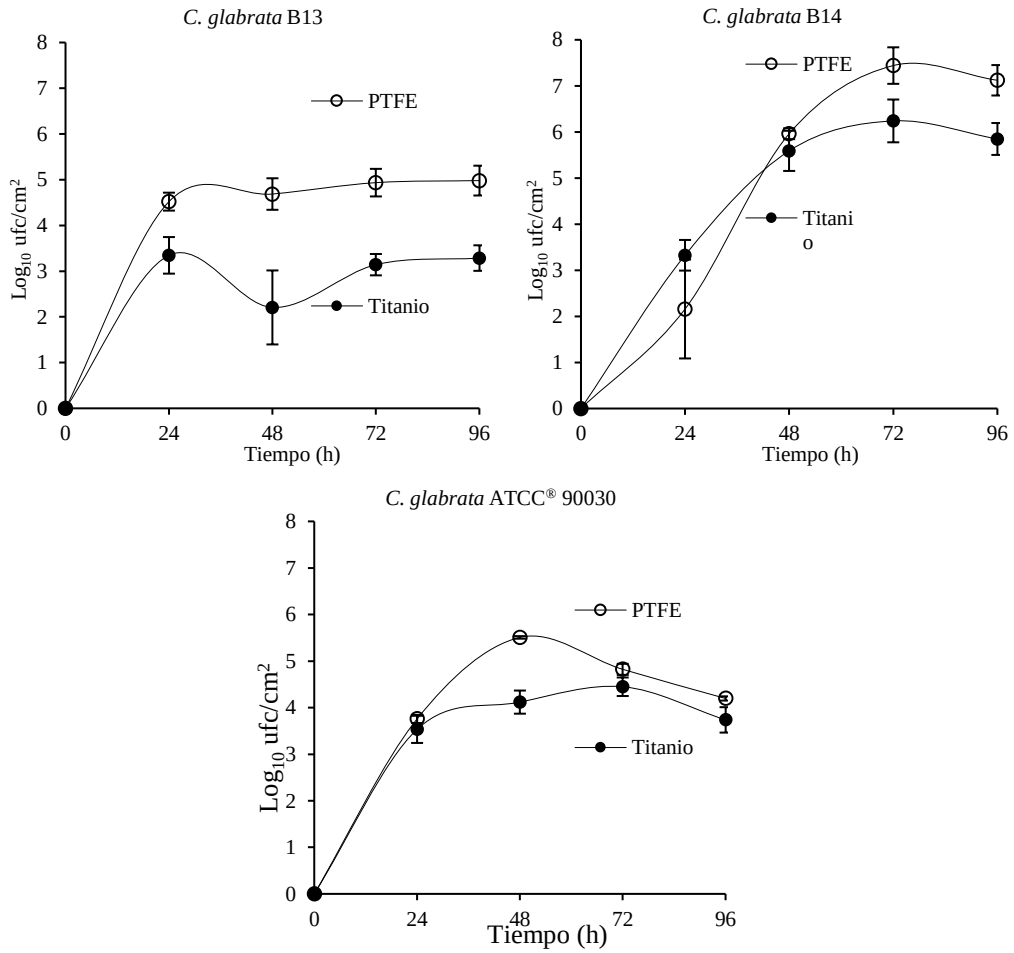


Figura 4.14. Cinética de crecimiento de la biopelícula de *C. glabrata* sobre discos de PTFE y titanio durante 96 horas en un *CDC Biofilm Reactor*. Cada punto representa la media y la desviación estándar de tres discos.

El recuento medio de células viables sobre PTFE fue de 4,78±0,32 Log_{10} ufc/cm^2 en B13, 5,67±2,25 Log_{10} ufc/cm^2 en B14 y 4,57±0,69 Log_{10} ufc/cm^2 en la cepa de referencia. Sobre titanio, estos recuentos fueron de 2,99±0,64 Log_{10} ufc/cm^2, 5,25±1,23 Log_{10} ufc/cm^2 y 3,96±0,43 Log_{10} ufc/cm^2 respectivamente. En el aislado B13 el número de células adheridas sobre PTFE fue significativamente mayor que sobre titanio ($p<0,01$), sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre biomateriales en el caso del aislado B14 y la cepa de referencia ($p>0,05$).

Sobre titanio, el aislado B13 mostró un número de células viables adheridas, significativamente superior que el del aislado B14 ($p<0,01$) y la cepa de referencia ($p=0,01$). Sobre PTFE, no se obtuvieron diferencias significativas entre los recuentos de las distintas cepas estudiadas ($p>0,05$) (Figura 4.15).

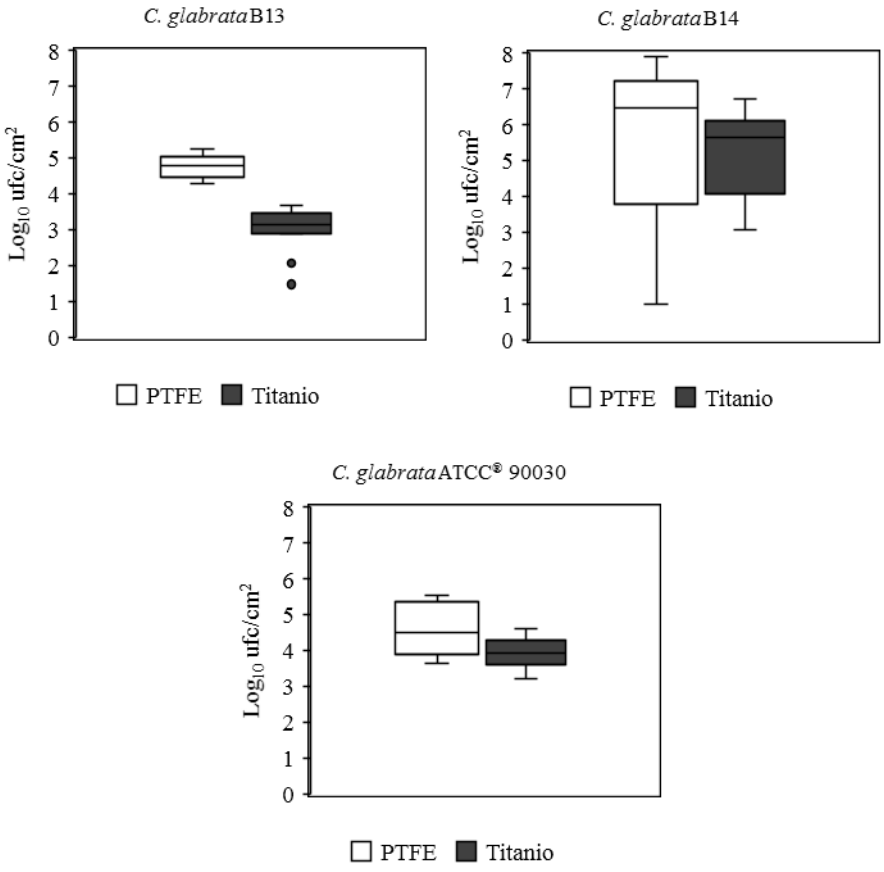


Figura 4.15. Representación gráfica de la mediana, cuartiles y valores máximos y mínimos de células viables adheridas de *C. glabrata* en cada biomaterial y cepa ensayada.

4.5.6 Comparación del número de células adheridas sobre cada biomaterial según la especie de *Candida*

Los recuentos de células viables obtenidas para cada uno de los aislados del conjunto BIOCAN se agruparon por especies para estudiar las posibles diferencias en la capacidad de formación de biopelícula. En la Tabla 4.7 se exponen en logaritmo de los recuentos medios obtenidos en cada biomaterial y la diferencia obtenida entre ambos para cada especie.

El promedio de células viables adheridas sobre PTFE fue significativamente mayor en todas las especies ($p<0,01$). Sobre PTFE, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* mostraron mayor capacidad de adherencia que *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis* ($p<0,01$). Sobre titanio *C. albicans* mostro menor capacidad de formación de biopelícula que el resto de las especies ($p<0,01$).

Tabla 4.7. Células viables adheridas sobre PTFE y titanio, durante las 96 horas de ensayo, agrupadas según las especies estudiadas del conjunto BIOCAN.

Especies	Nº de aislados	Log_{10} ufc/cm^2		$^1\Delta$ Log_{10} ufc/cm^2
		PTFE	Titanio	
C. albicans	3	4,27 ± 0,35	2,28 ± 0,52	1,98
C. parapsilosis	3	5,37 ± 0,99	3,88 ± 1,90	1,49
C. krusei	3	3,98 ± 0,66	3,21 ± 0,68	0,77
C. tropicalis	3	4,43 ± 0,45	3,31 ± 0,99	1,11
C. glabrata	3	5,01 ± 1,42	4,07 ± 1,24	0,94

Los datos representan la media ± desviación estándar de tres aislados.
[1] Diferencia en el número de células adheridas sobre PTFE y titanio

4.5.7 Relación entre la hidrofobicidad celular superficial y el número de células adheridas en cada biomaterial

Al relacionar el número de células adheridas a titanio a las 24 horas con la hidrofobicidad celular superficial observamos que cuanto mayor es la hidrofobicidad, mayor es el número de células positivas, siendo la correlación de tipo exponencial positivo ($r^2= 0,71$) (Figura 4.16 A). Sin embargo, sobre PTFE, no se obtuvo correlación alguna.

Cuando relacionamos la diferencia entre el número de células adheridas a PTFE y titanio a las 24 horas observamos que los aislados con menor hidrofobicidad celular superficial tuvieron la mayor diferencia en el número de células adheridas entre ambos biomateriales. Por ejemplo, la cepa menos hidrófoba (*C. parapsilosis* ATCC® 22019) fue la que tuvo la mayor diferencia en el número de células adheridas (> 4 Log_{10} ufc/cm^2) (Figura 4.6). Sin embargo, las cepas más hidrófobas (HCS> 75%) la diferencia en el número de células adheridas en ambos biomateriales, fue menor de ≤ 1 Log_{10} ufc/cm^2 (Figura 4.16 B).

Se analizó también la relación entre la velocidad de adhesión (K= Log_{10} ufc/cm^2*h^{-1}) con la hidrofobicidad celular superficial. Aunque sobre titanio, no se obtuvo correlación entre estas variables, se observó una tendencia a variar en el mismo sentido (Figura 4.17). Sin embargo, sobre PTFE no se observó esta tendencia.

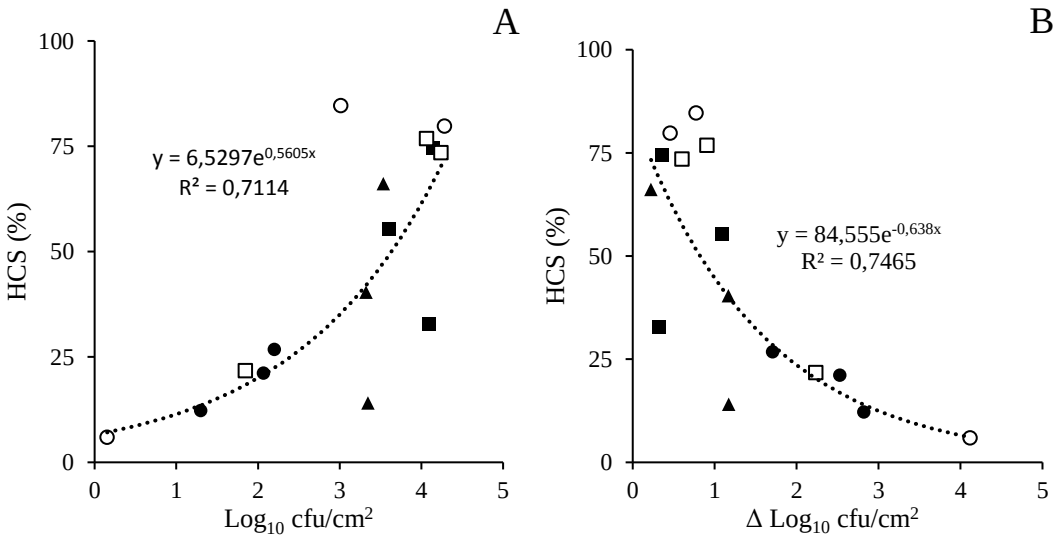


Figura 4.16. Correlación entre la hidrofobicidad celular superficial y 1) el número de células adheridas a titanio a las 24 horas (A) y 2) la diferencia en el número de células adheridas en ambos biomateriales a las 24 horas (B). Cada punto representa una cepa de *C. albicans* (●), *C. parapsilosis* (○), *C. krusei* (■), *C. tropicalis* (□) o *C. glabrata* (▲)

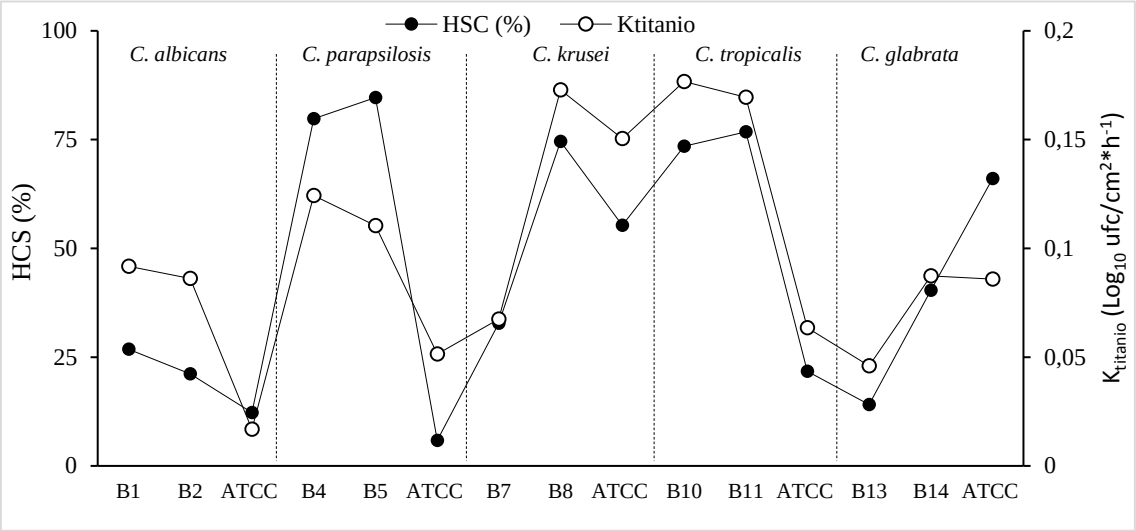


Figura 4.17. Representación gráfica de los valores de hidrofobicidad celular superficial (HCS) y velocidad de adhesión a titanio ($K_{titanio}$). Cada punto representa un aislado BIOCAN.

4.6 SELECCIÓN DEL AISLADO PARA LOS ENSAYOS DE CINÉTICA DE LETALIDAD Y OTROS ESTUDIOS

C. tropicalis fue la especie que presentó mayor capacidad de formación de biopelícula en placa de poliestierno y valores más altos de CMIB para AMB y AND. Además, fue una de las especies con mayor hidrofobicidad celular superficial. El aislado clínico B10 de *C. tropicalis* fue la cepa que presentó el mayor número de células viables adheridas tanto a PTFE como a titanio en las primeras 24 horas de cultivo en el CBR. Además, mantuvo un recuento estable de células adheridas durante las 96 horas de cultivo en el CBR, mostrando el menor rango intercuartílico de todo el conjunto BIOCAN. Por este motivo se eligió este aislado para los ensayos de cinética de letalidad de antifúngicos y la combinación de los mismos con compuestos con actividad desestructuradora de la biopelícula, previstos en los apartados 8, 9 y 10 del plan de trabajo.

Previamente, la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada sobre PTFE se estudió en el microscopio electrónico de barrido cryo-SEM para confirmar la presencia de una biopelícula madura sobre el biomaterial a las 24 horas. Tras 6 horas de incubación en el CBR se observó la presencia de blastosporas aisladas y pseudohifas adheridas a la superficie (Figura 4.18 A, B).

Tras 12 horas de incubación, sobre la superficie del biomaterial se pudieron observar agregados celulares consistentes en acúmulos de blastosporas, con algunas pseudohifas de gran tamaño (Figura 4.18 C, D). Finalmente, tras 24 horas de incubación, se observó la presencia de una mezcla de blastosporas y pseudohifas, inmersas en un abundante material extracelular (Figura 4.18 E, F).

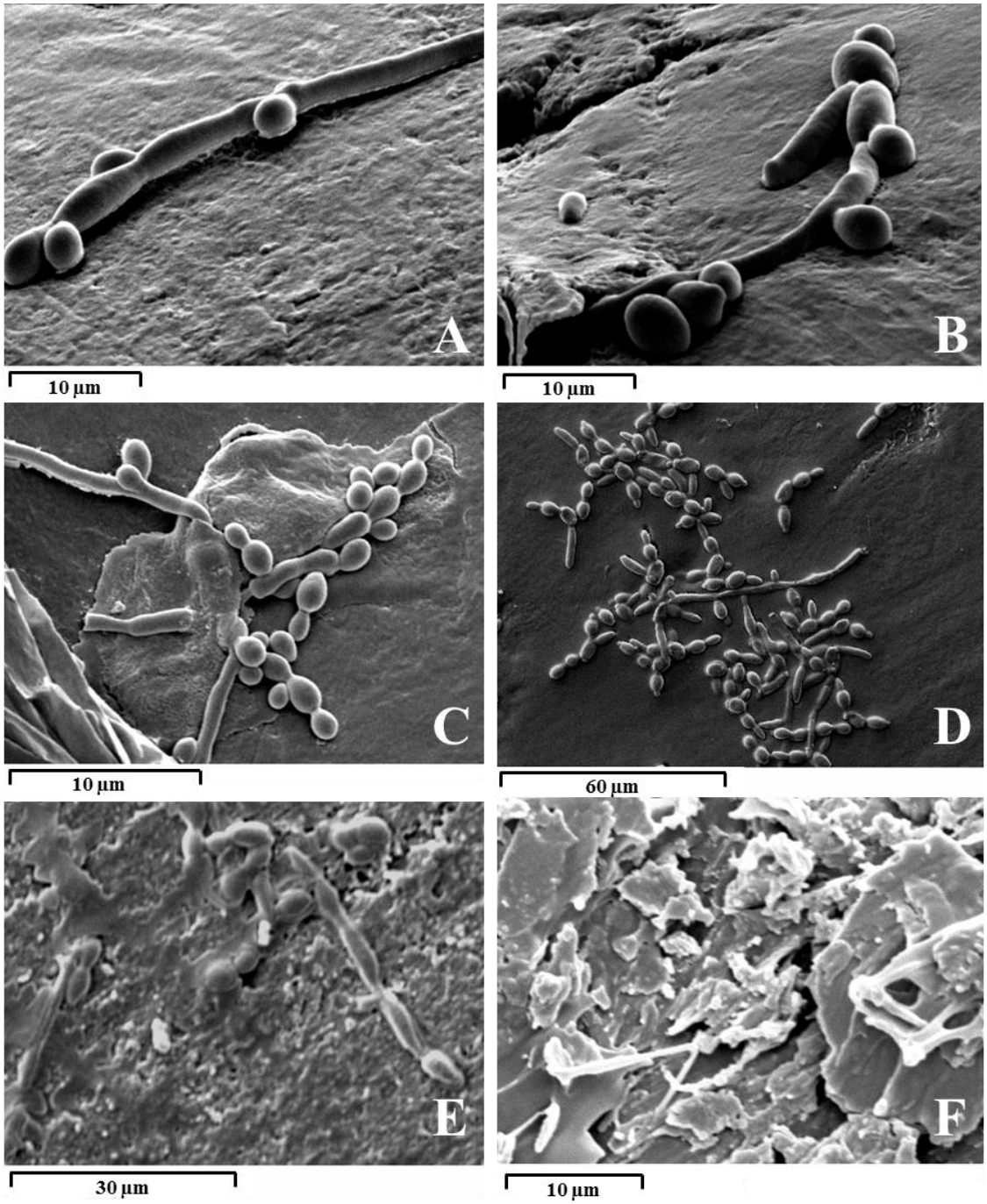


Figura 4.18. Blastosporas y pseudohifas de *C. tropicalis* adheridas a PTFE tras 6 (A, B), 12 (C, D) y 24 horas (E, F) de cultivo en el CBR.

4.7 CINÉTICA DE LETALIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *C. TROPICALIS* FORMADA SOBRE PTFE Y TITANIO

4.7.1 Cinética de letalidad de anfotericina B sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10

Se determinó la cinética de letalidad de 5 concentraciones de anfotericina B (1,5, 5, 10, 20 y 40 mg/L), durante 72 horas, sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada sobre PTFE y titanio (Figura 4.19). Con la concentración más baja ensayada (1,5 mg/L) no se produjo letalidad, sino un incremento significativo de células viables (promedio de los tres tiempos experimentales) de 2,76±0,19 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y de 0,63±0,21 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio ($p \leq 0,01$).

Con 5 mg/L, el número de células viables adheridas en ambos biomateriales se mantuvo próximo al del tiempo 0. Los incrementos fueron de 0,37±0,23 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y 0,08±0,97 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. A partir de esta concentración, la anfotericina B redujo el número de células viables adheridas tanto en PTFE como en titanio ($p<0,01$). La reducción media obtenida con 10 mg/L fue de 0,8±0,54 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 2,29±0,33 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio.

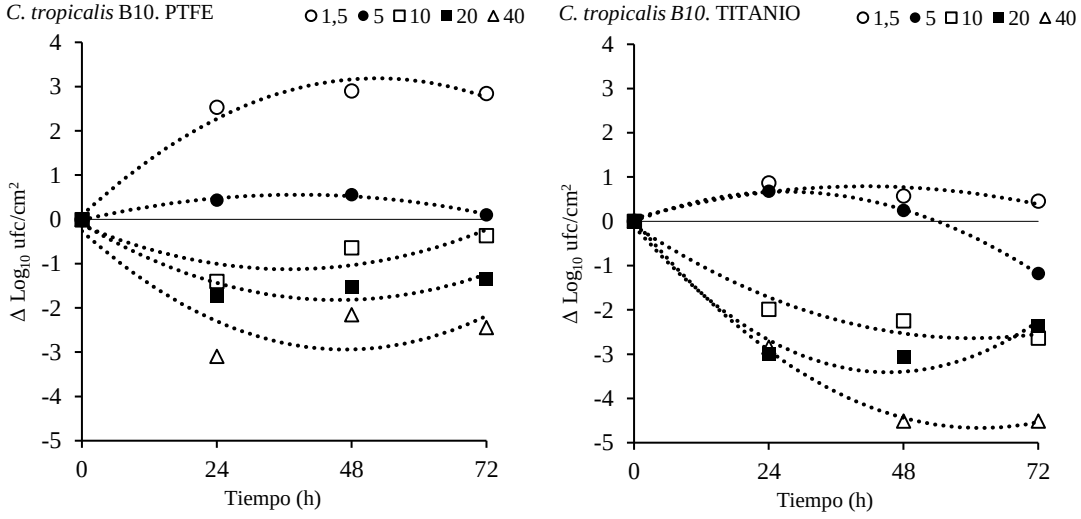


Figura 4.19. Cinética de letalidad para anfotericina B sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10, formada sobre PTFE y titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma. Concentraciones expresadas en mg/L.

Con 20 mg/L, la reducción fue de 1,53±0,2 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 2,82±0,39 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. La máxima reducción se alcanzó con 40 mg/L y fue de 3,09±1,08 Log_{10} ufc/cm^2 (99,63% letalidad) en PTFE y de 4,51 Log_{10} ufc/cm^2 (99,99% letalidad) en titanio. En este último biomaterial, se logró con 40 mg/L la erradicación de la biopelícula preformada mientras que en PTFE, la superficie permaneció colonizada con un total de 2,44±0,98 Log_{10} ufc/cm^2.

El efecto de AMB sobre la biopelícula de *C. tropicalis* se ajustó a una cinética lineal en PTFE y titanio (R^2= 0,99) (Figura 4.20). La constante de reducción (K) fue similar en ambos biomateriales (1,6 *vs.* 1,4).

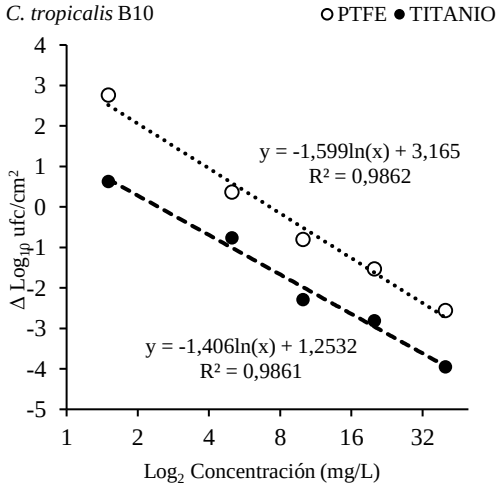


Figura 4.20. Relación entre el Log_2 de la concentración de anfotericina B y la diferencia de células viables con respecto al tiempo 0 (Δ Log_{10} ufc/cm^2) presentes en la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada en PTFE y titanio. Cada dato experimental representa la media de 12 discos extraídos del CBR a las 24, 48 y 72 horas. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma.

4.7.2 Cinética de letalidad de 5-fluorocitosina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10

La actividad de 5-fluorocitosina (10, 20 y 40 mg/L) se ensayó sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en PTFE y titanio (Figura 4.21). En presencia de 10 mg/L, se obtuvo una reducción en el número de células viables adheridas (promedio de los tres tiempos experimentales) de 1,17±0,11 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 0.08±0.09 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio.

En el ensayo con 20 mg/L esta reducción fue de 1,95±0,12 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE mientras que en titanio fue de 1,31±0,27 Log_{10} ufc/cm^2. Las células viables adheridas, se redujeron en presencia de 40 mg/L un promedio de 2,23±0,15 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,31±0,27 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. la máxima reducción en el número de células viables se alcanzó en presencia de 5-fluorocitosina (40 mg/L) a las 72 horas sobre ambos biomateriales y fue de 2,35±0,18 Log_{10} ufc/cm^2 (99,55% letalidad) en PTFE y de 1,63±0,05 Log_{10} ufc/cm^2 (97,63% letalidad) en titanio.

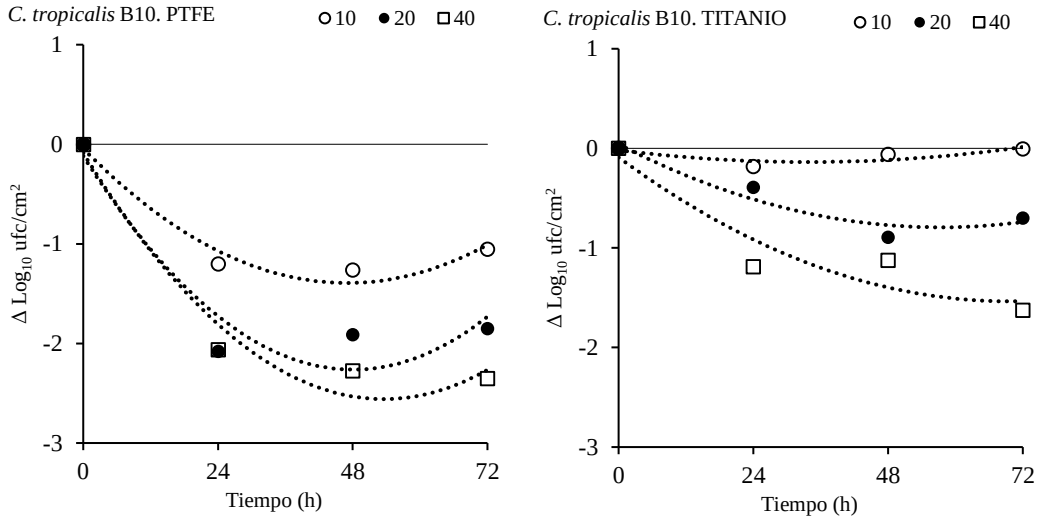


Figura 4.21. Curvas de letalidad para 5-fluorocitosina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10, formada en PTFE y titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma. Concentraciones expresadas en mg/L.

La reducción del número de células viables en la biopelícula sobre PTFE, fue significativa, en todas las concentraciones ensayadas ($p<0,01$). Sin embargo, en titanio, las diferencias no fueron significativas. ($p>0,05$). Todas las concentraciones de 5-fluorocitosina ensayadas fueron significativamente más activas sobre la biopelícula formada en PTFE ($p<0,01$). Sin embargo, no se logró la erradicación completa de la biopelícula formada en ninguno de los dos biomateriales ensayados. La relación entre la reducción de células viables y el Log_2 de la concentración de 5-fluorocitosina se ajustó a una cinética lineal en ambos biomateriales (R^2=0,93-0,99) (Figura 4.22). La constante de reducción (K) fue similar en ambos biomateriales (K_{PTFE}: -0,89 y $K_{TITANIO}$: -0,76).

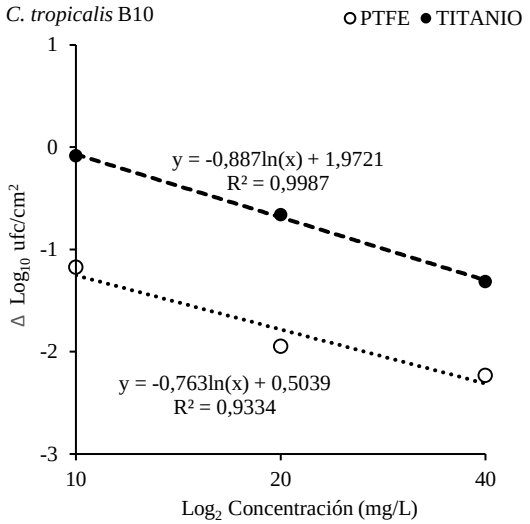


Figura 4.22. Relación entre el Log_2 de la concentración de 5-fluorocitosina y la diferencia de células viables con respecto al tiempo 0 (Δ Log_{10} ufc/cm^2) presentes en la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada sobre PTFE y titanio. Cada dato experimental representa la media de 12 discos extraídos del CBR a las 24, 48 y 72 horas. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma.

4.7.3 Cinética de letalidad de terbinafina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10

Las cinéticas de letalidad de terbinafina (1, 2 y 4 mg/L) sobre la biopelícula de *C. tropicalis* se estudiaron durante 72 horas en el CBR (Figura 4.23). Las células adheridas, en el ensayo con 1 mg/L, se redujeron (promedio de los tres tiempos experimentales) en 1,18±0,17 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y en 0,5±0,17 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio. Con 2 mg/L, la reducción fue de 1,66±0,14 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 0,16±0,23 Log_{10} ufc/cm^2. En el ensayo con 4 mg/L, la reducción fue de 1,82±0,17 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE mientras que en titanio fue de 0,09±0,11 Log_{10} ufc/cm^2. Durante los ensayos con terbinafina, la máxima reducción de células viables se obtuvo con 1 mg/L tras 24 horas de exposición a terbinafina y fue de 2,02 Log_{10} ufc/cm^2 (99,04% letalidad) en PTFE y 0,68±0,03 Log_{10} ufc/cm^2 (79,01% letalidad) en titanio.

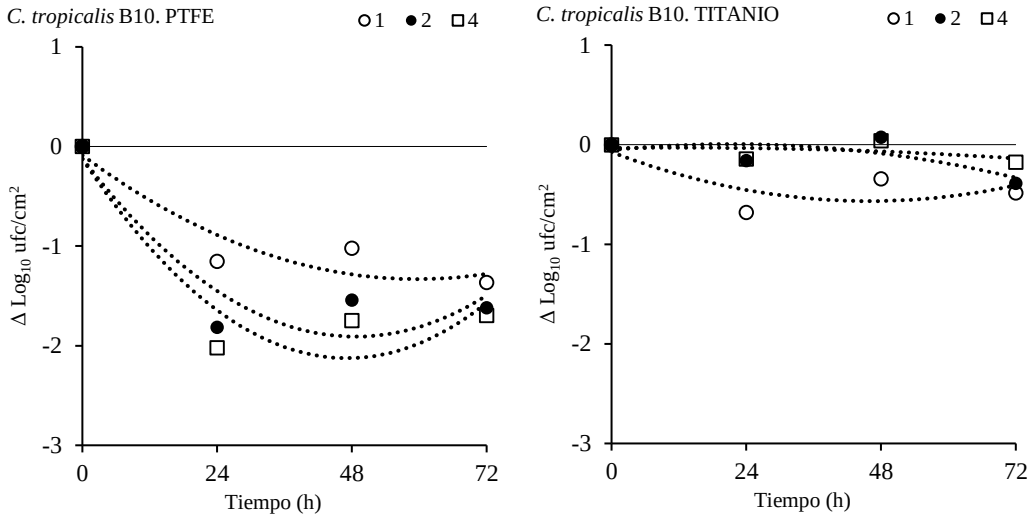


Figura 4.23. Curvas de letalidad para terbinafina sobre la biopelícula del aislado clínico B10 de *C. tropicalis*, formada en PTFE y titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma. Concentraciones expresadas en mg/L.

La terbinafina fue significativamente más activa sobre las biopelículas formadas en PTFE que sobre las formadas en titanio ($p<0,01$). En titanio, no se obtuvieron diferencias significativas entre las biopelículas expuestas al antifúngico y el control de crecimiento ($p>0,05$). A las concentraciones ensayadas, no se consiguió la erradicación completa de la biopelícula formada en ambos biomateriales.

En la Figura 4.24 se muestra la relación entre el Log_{10} de la reducción de células viables en función del Log_2 de la concentración de terbinafina (R^2= 0,86-0,92). En PTFE, la constante de reducción de las células viables (K) fue de -0,46, mientras que, en titanio, el número de células se incrementó con la concentración (K= 0,29).

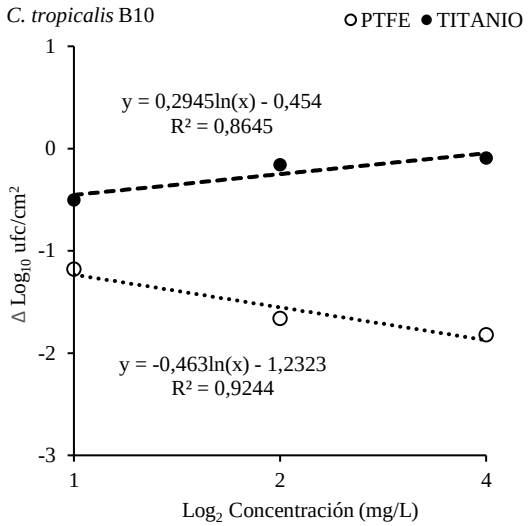


Figura 4.24. Relación entre el Log_2 de la concentración de terbinafina y la diferencia de células viables con respecto al tiempo 0 (Δ Log_{10} ufc/cm^2) presentes en la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada sobre PTFE y titanio. Cada dato experimental representa la media de 12 discos extraídos del CBR a las 24, 48 y 72 horas. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma.

4.7.4 Cinética de letalidad de caspofungina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10

La cinética de letalidad de caspofungina, sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada sobre PTFE y titanio se estudió durante 72 horas a las concentraciones de 4, 8, 16 y 32 mg/L (Figura 4.25). En el ensayo con 4 mg/L la reducción de células viables (promedio de los tres tiempos experimentales) fue de 0,4±0,08 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 0,19±0,11 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. Con 8 mg/L, esta reducción en PTFE fue de 0,37±0,29 Log_{10} ufc/cm^2 mientras que en titanio fue de 0,07±0,06 Log_{10} ufc/cm^2. Tras la exposición a 16 mg/L de caspofungina, las células viables adheridas se redujeron 0,6±0,57 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y se incrementaron 0,53±0,06 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. Finalmente, en el ensayo con 32 mg/L, se observó una reducción en PTFE de 1,62±0,12 Log_{10} ufc/cm^2 mientras en titanio, hubo un incremento de 0,39±0,06 Log_{10} ufc/cm^2. La máxima reducción en el número de células viables se obtuvo tras 72 horas de exposición a 32 mg/L de caspofungina en PTFE (1,75 Log_{10} ufc/cm^2, 98,22% letalidad) y 4 mg/L en titanio (0,3±0,41 Log_{10} ufc/cm^2, 50,29% de letalidad).

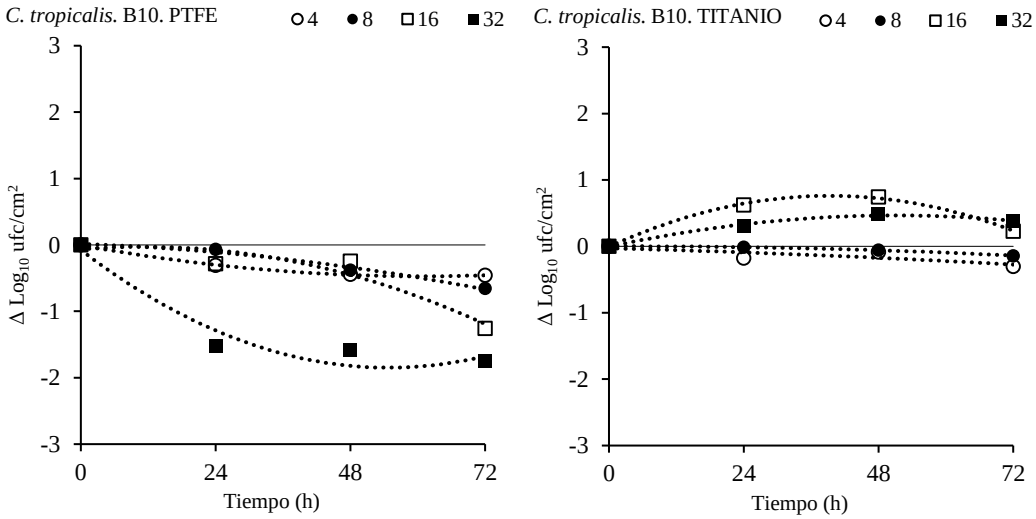


Figura 4.25. Curvas de letalidad para caspofungina sobre la biopelícula del aislado clínico B10 de *C. tropicalis,* formada en PTFE y titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma. Concentraciones expresadas en mg/L.

No hubo diferencias significativas entre el número de células viables expuestas a 4 y 8 mg/L de caspofungina con respecto al tiempo 0 en ambos biomateriales ($p>0,05$). Sin embargo, con 32 mg/L se obtuvieron diferencias significativas en PTFE y en titanio con 16 mg/L ($p<0,01$).

Todas las concentraciones ensayadas fueron significativamente más activas sobre la biopelícula formada en PTFE ($p<0,01$). No se alcanzó la erradicación completa de la biopelícula formada en ambos biomateriales a las concentraciones ensayadas.

La reducción de células viables en función de la concentración de caspofungina fue lineal en ambos biomateriales (R^2= 0,56-0,93) (Figura 4.26). En PTFE, la constante de reducción (K) fue de -0,05, mientras que, en titanio, esta constante fue positiva (K= 0,02).

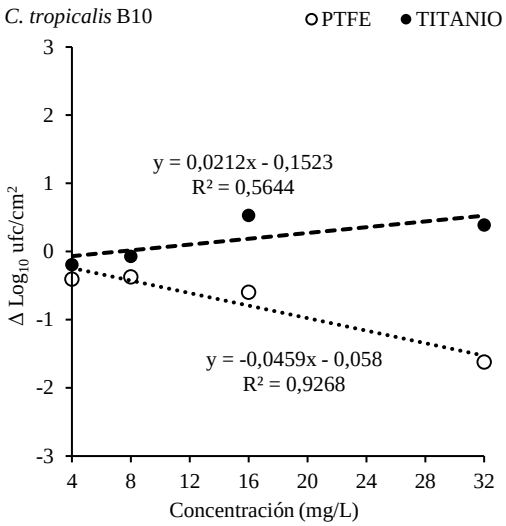


Figura 4.26. Relación entre el Log_2 de la concentración de caspofungina y la diferencia de células viables con respecto al tiempo 0 (Δ Log_{10} ufc/cm^2) presentes en la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada sobre PTFE y titanio. Cada dato experimental representa la media de 12 discos extraídos del CBR a las 24, 48 y 72 horas. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma.

4.7.5 Cinética de letalidad de anidulafungina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10

La cinética de letalidad de anidulafungina (4, 8, 16 y 32 mg/L) sobre *C. tropicalis* se estudió durante 72 horas en el CBR (Figura 4.27). En el ensayo con 4 mg/L se obtuvo un incremento (promedio de los tres tiempos experimentales) en el número de células viables en PTFE de 0,65±0,4 Log_{10} ufc/cm^2 mientras que, en titanio, se observó una reducción de 0,51±0,66 Log_{10} ufc/cm^2. Tras la exposición a 8 mg/L, se obtuvo una reducción en el número de células viables de 0,31±0,11 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 0,61±0,25 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. En presencia de 16 mg/L la reducción de células adheridas en PTFE fue de 1,67±0,98 Log_{10} ufc/cm^2 y de 1,45±1,16 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. Finalmente, en el ensayo con 32 mg/L, se obtuvo una reducción de 0,76±0,14 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y de 1,18±0,59 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. En PTFE la máxima reducción de células viables se alcanzó a las 72 horas con 16 mg/L y fue de 2,36±0,25 Log_{10} ufc/cm^2 (99,56% letalidad). En titanio, esta también se obtuvo con 16 mg/L, pero a las 48 horas y fue de 2,41±0,55 Log_{10} ufc/cm^2 (99,6% de letalidad).

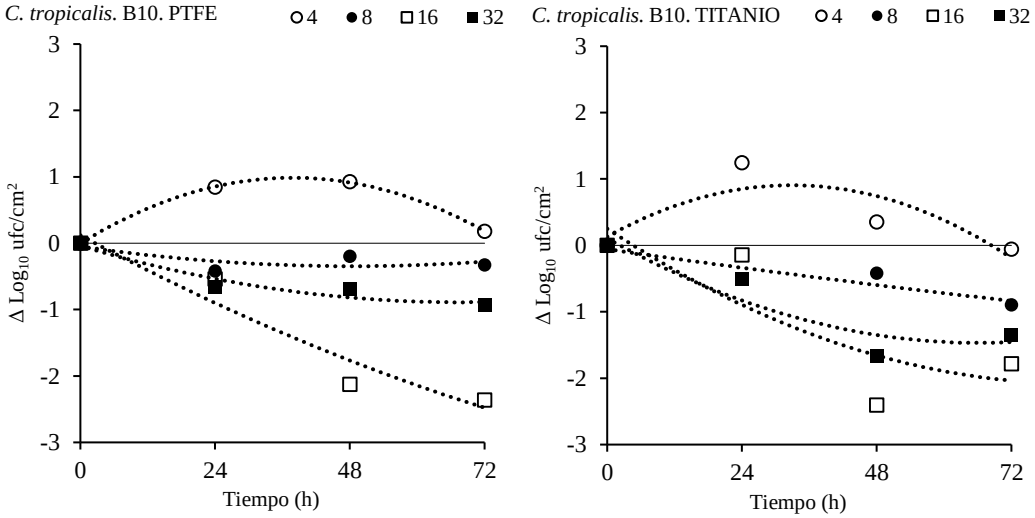


Figura 4.27. Curvas de letalidad para anidulafungina sobre la biopelícula del aislado clínico B10 de *C. tropicalis*, formada en PTFE y titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma. Concentraciones expresadas en mg/L

Las biopelículas formadas sobre ambos biomateriales y expuestas a 4, 8 y 32 mg/L de anidulafungina no mostraron diferencias significativas con respecto al control positivo ($p>0,05$). En cambio, en el ensayo con 16 mg/L, la reducción fue significativa solo en PTFE ($p= 0,02$). La actividad de anidulafungina fue similar en ambos biomateriales y no se obtuvieron diferencias significativas ellos ($p>0,05$). Al final del experimento, ambos biomateriales permanecieron colonizados en todas las concentraciones ensayadas.

La relación entre el número de células viables y la concentración de anidulafungina fue lineal hasta 16 mg/L (R^2=0,92-0,99) (Figura 4.28). Con 32 mg/L, paradójicamente, la actividad de anidulafungina disminuyó. La constante de reducción obtenida sobre ambos biomateriales fue similar (K_{PTFE}: -0,19, $K_{TITANIO}$: -0,15).

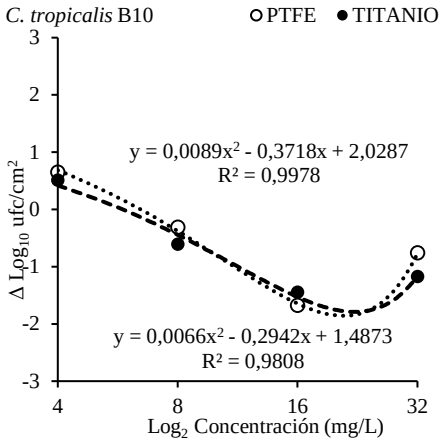


Figura 4.28. Relación entre el Log_2 de la concentración de anidulafungina y la diferencia de células viables con respecto al tiempo 0 (Δ Log_{10} ufc/cm^2) presentes en la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada sobre PTFE y titanio. Cada dato experimental representa la media de 12 discos extraídos del CBR a las 24, 48 y 72 horas. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma.

4.7.6 Cinética de letalidad de micafungina sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10

Se estudió la cinética de letalidad de 4, 8, 16 y 32 mg/L de micafungina sobre la biopelícula de *C. tropicalis*, formada sobre en PTFE y titanio durante 72 horas en el CBR (Figura 4.29). En el ensayo con 4 mg/L, se obtuvo un incremento (promedio de los tres tiempos experimentales) en el número de células viables de 0,99±0,79 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y de 1,18±0,81 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. Tras la exposición a 8 mg/L, el número de células adheridas se redujo 1,21±0,38 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,66±0,5 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio y con 16 mg/L la reducción fue de 0,35±0,16 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 0,24±0,17 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. Finalmente, con 32 mg/L, tanto en PTFE y titanio, no se obtuvo letalidad sino un incremento del número de células adheridas de 0,43±0,16 Log_{10} ufc/cm^2 y 0,44±0,16 Log_{10} ufc/cm^2 respectivamente.

La máxima reducción de células viables se alcanzó con 8 mg/L a las 72 horas en ambos biomateriales y fue de 1,59±0,12 Log_{10} ufc/cm^2 (97,41% letalidad) en PTFE y 2,23±0,18 Log_{10} ufc/cm^2 (99,41% de letalidad) en titanio.

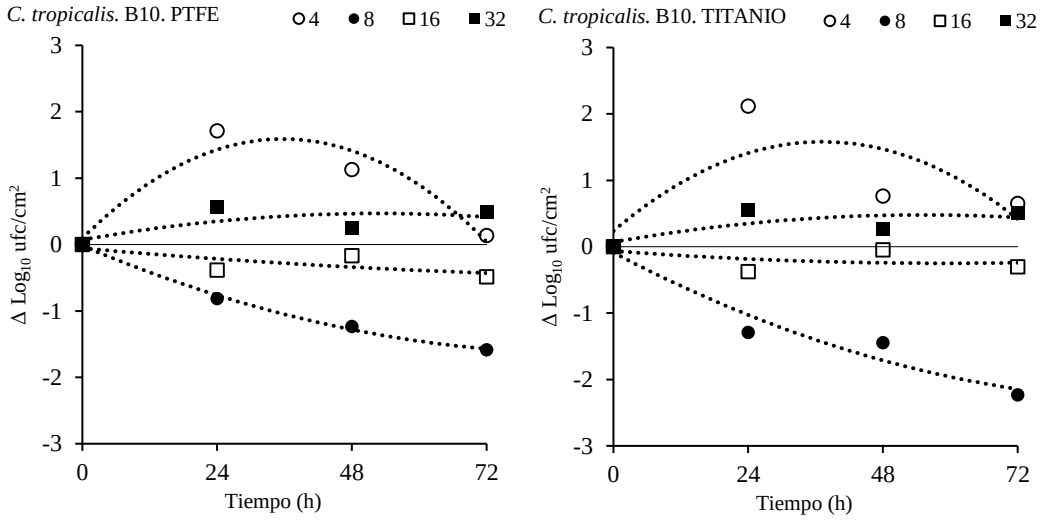


Figura 4.29. Curvas de letalidad para micafungina sobre la biopelícula del aislado clínico B10 de *C. tropicalis*, formada en PTFE y titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma. Concentraciones expresadas en mg/L.

Tanto la reducción como el incremento de las células viables presentes en las biopelículas expuestas a 4, 16 y 32 mg/L en ambos biomateriales, no mostraron diferencias significativas con respecto al tiempo 0 ($p>0,05$). Sin embargo, la reducción obtenida con 8 mg/L fue significativa en ambos biomateriales ($p<0,01$).

La actividad de micafungina no mostró diferencias significativas entre biomateriales ($p>0,05$). Además, no se alcanzó la erradicación completa de la biopelícula formada en ambos biomateriales a las concentraciones ensayadas.

En la Figura 4.30 se muestra la relación entre la diferencia de células viables con respecto al tiempo 0 y el Log_2 de la concentración de micafungina. A partir de 8 mg/L, se obtuvo un incremento lineal del número de células adheridas con la concentración (R^2= 0,85-0,95). Observamos que la cinética fue igual en ambos biomateriales. (K_{PTFE}: 0,08, $K_{TITANIO}$: 0,07).

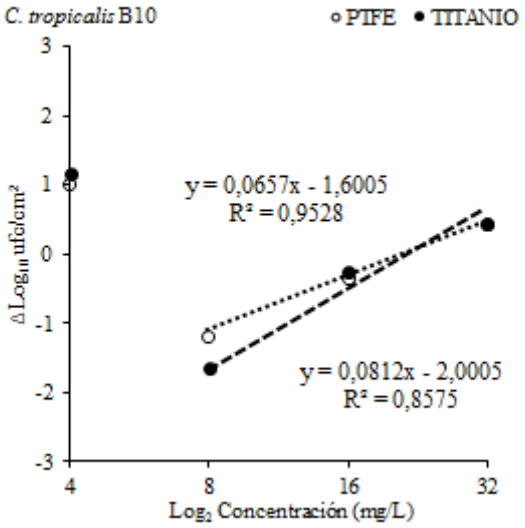


Figura 4.30. Relación entre el Log_2 de la concentración de micafungina y la diferencia de células viables con respecto al tiempo 0 (Δ Log_{10} ufc/cm^2) presentes en la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada sobre PTFE y titanio. Cada dato experimental representa la media de 12 discos extraídos del CBR a las 24, 48 y 72 horas. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma.

4.7.7 Cinética de letalidad de posaconazol sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10

Se llevaron a cabo ensayos de cinética de letalidad con posaconazol (1, 2, 4 y 8 mg/L) sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en PTFE y titanio (Figura 4.31). Con 1 mg/L se obtuvo una reducción (promedio de los tres tiempos experimentales) en el número de células viables de 0,18±0,05 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE mientras que en titanio se obtuvo un incremento de 0,12±0,08 Log_{10} ufc/cm^2. Tras la exposición a 2 mg/L, se obtuvo un incremento en el número de células adheridas tanto en PTFE como en titanio y fue de 0,39±0,01 Log_{10} ufc/cm^2 y 0,08±0,05 Log_{10} ufc/cm^2 respectivamente. Con 4 mg/L también se observó un incremento de células viables de 0,45±0,04 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y de 0,45±0,09 Log_{10} ufc/cm^2, en titanio. Finalmente, tras la exposición a 8 mg/L también se observó en PTFE y titanio un incremento en el recuento celular y fue 0,74±0,14 Log_{10} ufc/cm^2 y 0,57±0,09 Log_{10} ufc/cm^2 respectivamente.

El máximo incremento de células viables en PTFE se alcanzó con 8 mg/L a las 24 horas y fue de 0,84±0,16 Log_{10} ufc/cm^2 (85,4% de crecimiento). Sin embargo, en titanio, este se alcanzó con 8 mg/L y a las 72 horas fue de 0,68±0,09 Log_{10} ufc/cm^2 (79% de crecimiento).

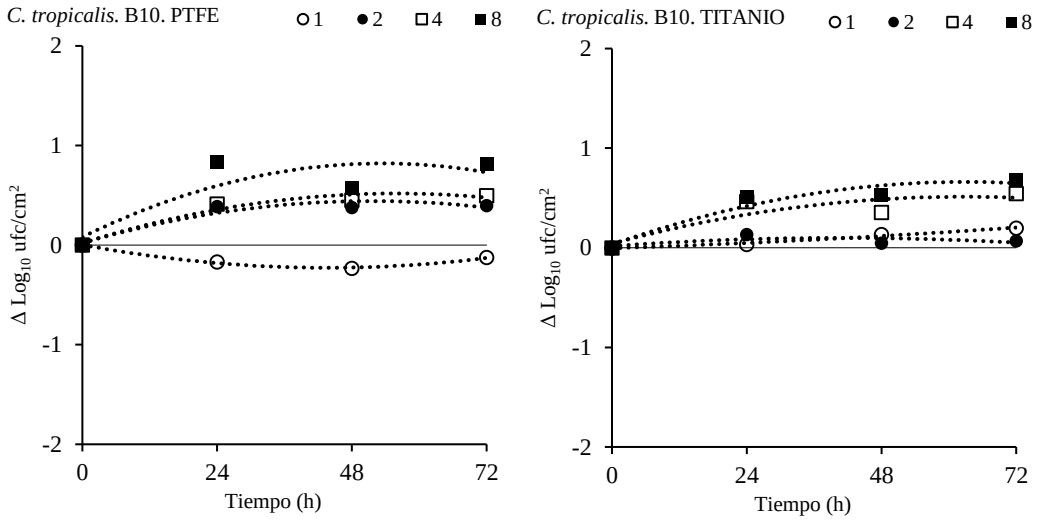


Figura 4.31. Curvas de letalidad para posaconazol sobre la biopelícula del aislado clínico B10 de *C. tropicalis,* formada en PTFE y titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma. Concentraciones expresadas en mg/L.

Las biopelículas expuestas a 1 mg/L en PTFE y a 1 y 2 mg/L en titanio no mostraron diferencias significativas con respecto al control de crecimiento mientras que las expuestas a 4 y 8 mg/L experimentaron un incremento significativo del número de células adheridas en ambos biomateriales. La actividad de posaconazol no mostró diferencias significativas entre PTFE y titanio ($p>0,05$). Además, no se alcanzó la erradicación completa de la biopelícula formada en ambos biomateriales a las concentraciones ensayadas.

El incremento en el número de células viables función de la concentración de posaconazol se ajustó a una cinética lineal tanto en PTFE como en titanio (R^2= 0,74-0,84) (Figura 4.32). Las constantes de crecimiento obtenidas fueron similares sobre ambos biomateriales (K_{PTFE}:0,1, $K_{TITANIO}$: 0,07).

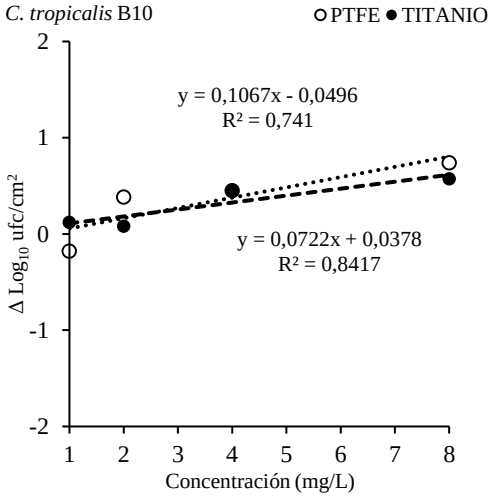


Figura 4.32. Relación entre el Log_2 de la concentración de posaconazol y la diferencia de células viables con respecto al tiempo 0 (Δ Log_{10} ufc/cm^2) presentes en la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada sobre PTFE y titanio. Cada dato experimental representa la media de 12 discos extraídos del CBR a las 24, 48 y 72 horas. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma.

4.7.8 Comparación de la cinética de letalidad de los antifúngicos sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10

La Tabla 4.8 muestra la reducción logarítmica alcanzada con cada antifúngico y la diferencia observada entre biomateriales. AMB fue el antifúngico más activo sobre las biopelículas formadas tanto en PTFE como en titanio (Figura 4.33). Terbinafina y caspofungina fueron activos sobre la biopelícula formada en PTFE, sin embargo, no presentaron actividad sobre las células viables presentes en la biopelícula formada sobre titanio. Además, se observó un efecto paradójico en la actividad de anidulafungina y micafungina en ambos biomateriales. La biopelícula de *C. tropicalis* fue capaz de crecer sobre ambos biomateriales en todos los ensayos con posaconazol.

Tabla 4.8. Máxima reducción logarítmica alcanzada tras la exposición a los antifúngicos en PTFE y titanio a la concentración máxima ensayada.

Antifúngico (mg/L)	**Diferencia logarítmica con respecto al tiempo 0**		**[1]Δ Log_{10}**
	PTFE	**Titanio**	
Anfotericina B (40)	-2,56	-3,95	1,39
Posaconazol (8)	0,74	0,57	0,17
Terbinafina (4)	-1,82	0,09	1,91
Fluorocitosina (40)	-2,23	-1,31	0,92
Caspofungina (32)	-1,62	0,39	1,23
Anidulafungina (32)	-0,76	1,18	1,94
Micafungina (32)	0,43	0,44	0,01

[1] Diferencia entre los valores obtenidos en PTFE y titanio

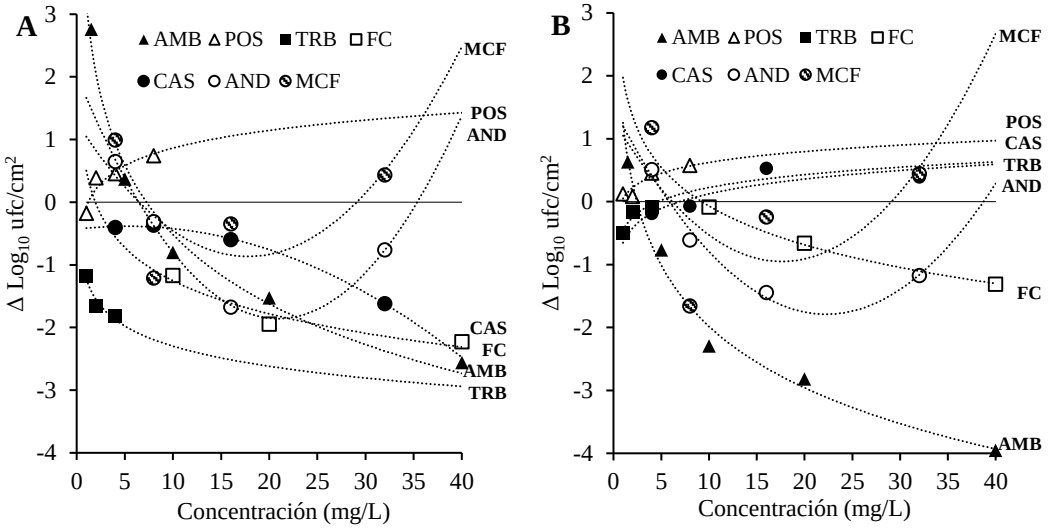


Figura 4.33. Relación entre la concentración de anfotericina B (AMB), posaconazol (POS), terbinafina (TRB), 5-fluorocitosina (FC), caspofungina (CAS), anidulafungina (AND) o micafungina (MCF) y la diferencia de células viables con respecto al tiempo 0 (Δ Log_{10} ufc/cm^2) presentes en la biopelícula de *C. tropicalis* B10 formada sobre PTFE (A) y titanio (B). Cada dato experimental representa la media de 12 discos extraídos del CBR a las 24, 48 y 72 horas. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma.

4.8 ACTIVIDAD COMBINADA DE ANFOTERICINA B Y ANIDULAFUNGINA SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *C. TROPICALIS*

Estudiamos la actividad de anfotericina B 40 mg/L (AMB) y/o anidulafungina 8 mg/L (AND), sobre las biopelículas formadas en PTFE y titanio por los aislados clínicos B10 y B11 y la cepa de referencia ATCC® 750 de *C. tropicalis* (Figura 4.34). AMB fue el antifúngico más activo sobre las biopelículas formadas en ambos biomateriales. En PTFE AMB produjo una reducción de las células viables en un rango de 0,69 a 3,56 Log_{10} ufc/cm^2 según la cepa (promedio: 2,23±0,89 Log_{10} ufc/cm^2). En titanio, esta reducción se situó en un rango de 1,49 a 4,51 Log_{10} ufc/cm^2 (promedio: 2,91±1,04 Log_{10} ufc/cm^2).

AND fue significativamente menos eficaz que AMB sobre las tres cepas ensayadas y en ambos biomateriales. En PTFE la reducción promedio de células viables (0,78 ± 0,5 Log_{10} ufc/cm^2) se situó en un rango de 0,03 a 1,58 Log_{10} ufc/cm^2 mientras que en titanio el rango fue de 0,42 a 1,16 Log_{10} ufc/cm^2 (0.8±2.26 Log_{10} ufc/cm^2).

Considerando los tres aislados estudiados, el promedio de reducción de células viables adheridas en PTFE fue de 1,8±1,07 Log_{10} ufc/cm^2 (rango: 0,22 a 3,54 Log_{10} ufc/cm^2) y en titanio de 1,97±0,49 Log_{10} ufc/cm^2 (rango: 1,36 a 2,84 Log_{10} ufc/cm^2). La interacción se clasificó como indiferente.

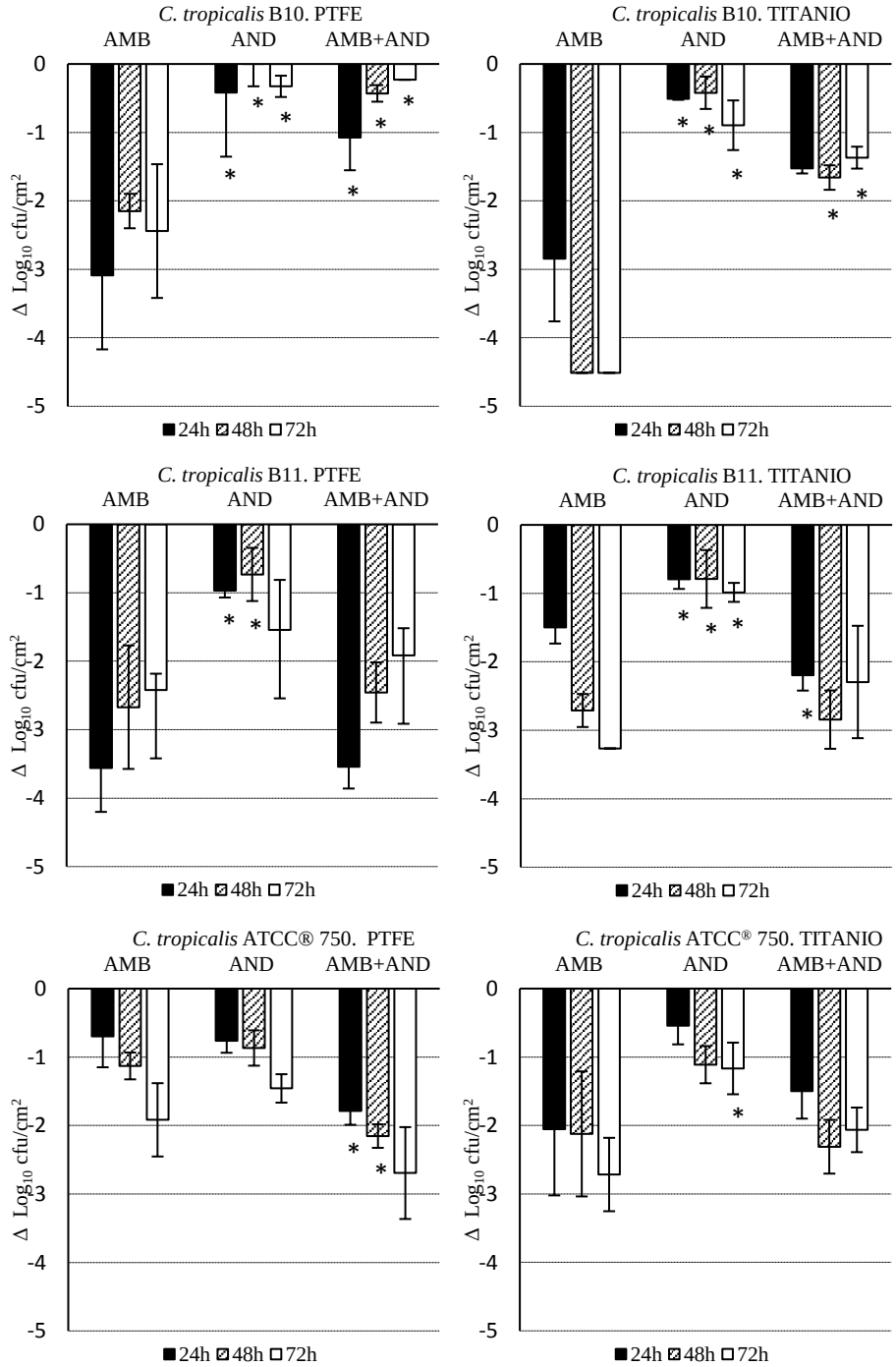


Figura 4.34. Actividad de la anfotericina B (40 mg/L) y la anidulafungina (8 mg/L) solas y combinadas sobre la biopelícula de *C. tropicalis*. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. Los asteriscos indican que la diferencia es significativa comparada con la anfotericina B sola en el mismo tiempo experimental.

La actividad de la combinación AMB+AND fue dependiente de la cepa ensayada. AMB redujo su actividad de manera significativa ($p<0,05$) cuando se combinó con AND sobre los aislados clínicos B10 y B11. En la Figura 4.35 se representa la cinética de la actividad de la combinación de anfotericina B y anidulafungina comparada con la actividad de los antifúngicos solos, sobre la biopelícula del aislado clínico B10

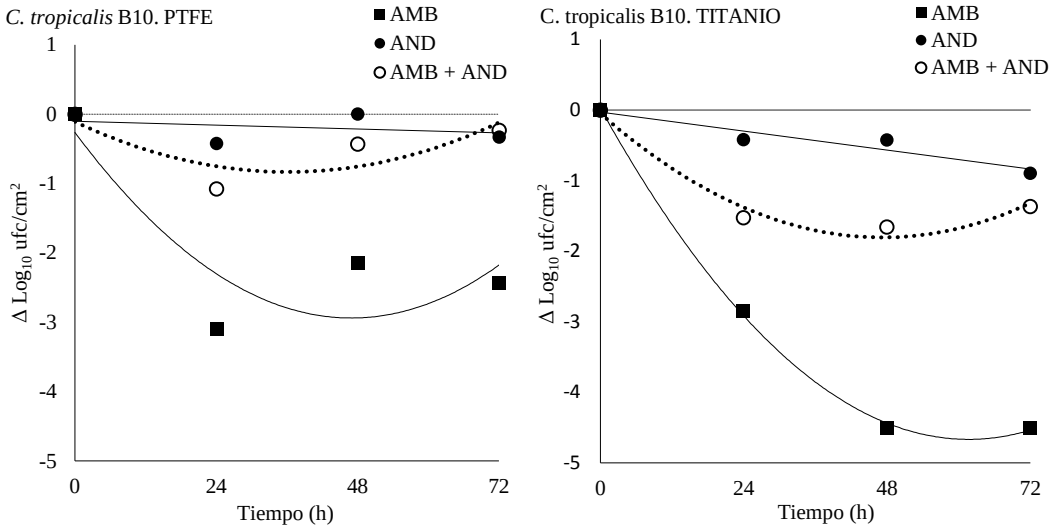


Figura 4.35. Curva de letalidad de la biopelícula de *C. tropicalis* en presencia de anfotericina B (40 mg/L) y anidulafungina (8 mg/L) solas y combinadas. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas.

4.9 ACTIVIDAD DE ANFOTERICINA B O ANIDULAFUNGINA COMBINADAS CON RIFAMPICINA, EDTA, N-ACETILCISTINA, CLARITROMICINA Y FARNESOL SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *C. TROPICALIS*

4.9.1 Actividad de anfotericina B combinada con rifampicina, EDTA, N-acetilcisteína, claritromicina y farnesol sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10

Estudiamos la actividad de anfotericina B (1.000 mg/L) sola y combinada con rifampicina (1.000 mg/L), EDTA (30.000 mg/L), N-acetilcisteína (4.000 mg/L), claritromicina (1.000 mg/L) y farnesol (300 µM) sobre las biopelículas formadas en PTFE y titanio por el aislado clínico *C. tropicalis* B10 (Figura 4.36). En el ensayo con AMB, se obtuvo una reducción promedio de células viables de 0,25±0,58 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y de 0,58±0,55 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio.

La combinación AMB+RIF produjo una reducción de células viables con respecto al tiempo 0 de 2,26±0,48 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,66±0,21 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. AMB+RIF fue significativamente más eficaz que AMB a partir de las 24 horas en PTFE y la interacción se clasificó como sinérgica. En titanio, esta combinación fue significativamente más eficaz que AMB durante las primeras 48 horas ($p<0,01$) y la interacción se clasificó como sinérgica.

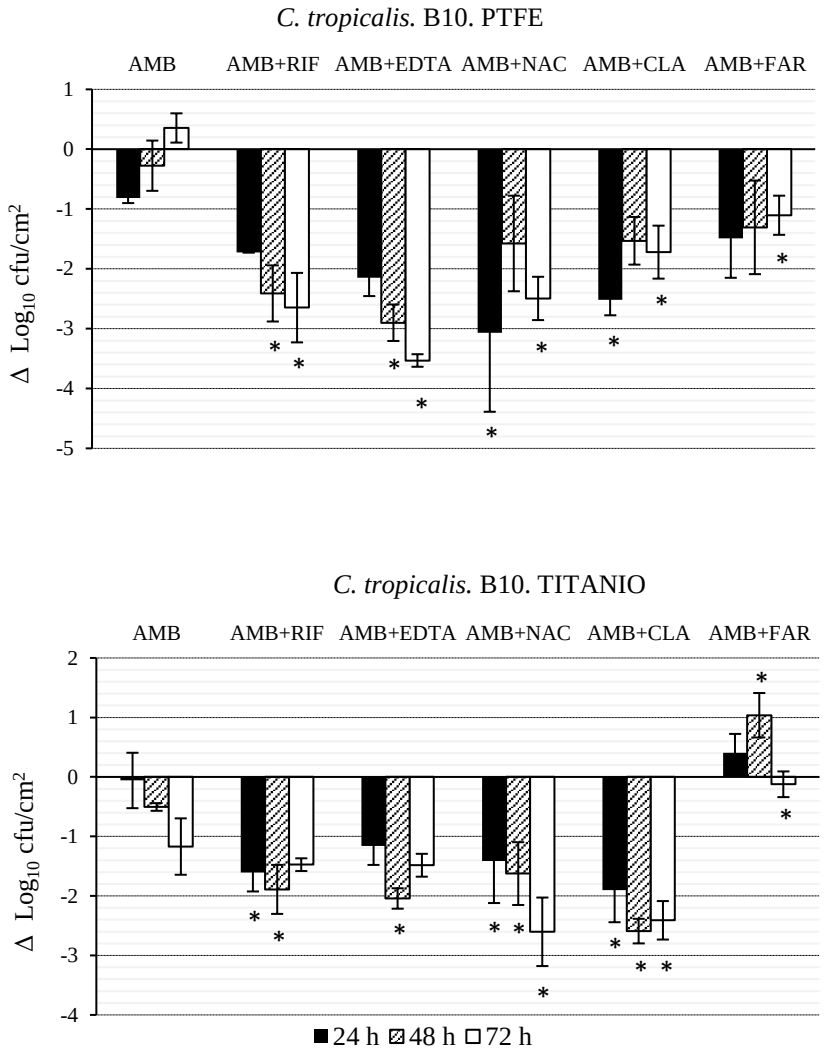


Figura 4.36. Actividad de la anfotericina B (1.000 mg/L) sola y combinada con rifampicina (1.000 mg/L), EDTA (30.000 mg/L), NAC (4.000 mg/L), claritromicina (1.000 mg/L) y farnesol (300 µM) sobre la biopelícula de *C. tropicalis*, formada sobre PTFE y Titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma. Los asteriscos indican que la diferencia es significativa ($p<0,05$) con respecto al antifúngico solo en el mismo tiempo experimental.

El número de células viables presentes en la biopelícula se redujo en presencia de AMB+EDTA un promedio de 2,86±0,69 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,56±0,44 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. En PTFE, esta combinación fue significativamente más eficaz que AMB sola a partir de las 24 horas ($p<0,01$) y la interacción se clasificó como sinérgica. En titanio, AMB+EDTA solo fue más activa que AMB a las 48 horas y la interacción se clasificó como indiferente.

En el ensayo AMB+NAC, se obtuvo una reducción de las células viables de 2,38±0,75 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,88±0,63 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. En PTFE, esta combinación fue significativamente más eficaz que AMB ($p<0,01$) y la interacción se clasificó como sinérgica. En titanio, AMB+NAC también mostró diferencias significativas con respecto a AMB sola ($p<0,01$) y la interacción se clasificó como aditiva.

La reducción promedio de células viables en presencia de AMB+CLA fue de 1,92±0,52 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 2,3±0,35 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. AMB+CLA fue significativamente más eficaz que AMB sola tanto en PTFE como en titanio ($p<0,05$) y la interacción se clasificó como aditiva en ambos biomateriales.

La combinación AMB+FAR produjo una reducción de las células viables de 1,3±0,19 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y un incremento de 0,44±0,58 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. En PTFE, AMB+FAR solo fue significativamente más activa que AMB sola a las 72 horas ($p<0,01$); la interacción se clasificó como aditiva. En titanio esta combinación fue menos activa que AMB sola y la interacción se clasificó como indiferente.

4.9.2 Actividad de anidulafungina combinada con rifampicina, EDTA, N-acetilcisteína, claritromicina y farnesol sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10

La actividad de anidulafungina (8 mg/L) se estudió sola y combinada con rifampicina 10 mg/L (RIF), EDTA 30 mg/L (EDTA), N-acetilcisteína 40 mg/L (NAC), claritromicina 5 mg/L (CLA) y farnesol 30 µM (FAR) sobre las biopelículas formadas en PTFE y titanio por el aislado clínico *C. tropicalis* B10.

En la Figura 4.37 se representa la diferencia de células viables con respecto al tiempo 0 en cada uno de los tiempos experimentales. La reducción de células viables (promedio de los tres tiempos experimentales) en el ensayo con AND sola fue de 0,31±0,11 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 0,61±0,25 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio.

La combinación AND+RIF produjo una reducción de células viables con respecto al tiempo 0 de 0,73±0,1 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,8±0,6 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. En PTFE, no se obtuvieron diferencias significativas con respecto a la AND sola ($p>0,05$) y la interacción se clasificó como indiferente. Sin embargo, en titanio, AND+RIF fue significativamente más activa que AND sola en todos los tiempos experimentales ($p<0,01$) y la interacción se clasificó como aditiva.

La reducción promedio de células viables en el ensayo con AND+EDTA fue de 0,93±1,04 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,56±0,6 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. En PTFE, esta combinación fue significativamente más activa que AND solo a las 72 horas de ensayo ($p<0,05$) y la interacción se clasificó como indiferente. En titanio, la actividad de AND+EDTA mostró diferencias significativas con respecto a AND sola en los tres tiempos experimentales y la interacción se clasificó como aditiva ($p<0,05$).

En el ensayo con AND+NAC, se obtuvo un promedio de reducción de las células viables presentes en la biopelícula de 0,47±0,49 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 2,05±0,66 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. En PTFE, esta combinación no mostró diferencias significativas con respecto a la AND sola y la interacción se clasificó como indiferente ($p>0,05$). En titanio, AND+NAC fue significativamente más eficaz que AND en todos los tiempos experimentales ($p<0,01$) y la interacción se clasificó como aditiva.

La combinación AND+CLA redujo el número de células adheridas en 0,44±0,39 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y 1,32±0,18 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio. En PTFE, AND+CLA no mostró diferencias significativas con respecto a la AND sola ($p>0,05$) mientras que en titanio solo fue significativamente más eficaz a las 24 horas ($p<0,01$). La interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales.

Las células viables se redujeron en presencia de AND+FAR un promedio de 0,52±0,26 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 0,22±0,19 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. Esta combinación no mostró diferencias significativas con respecto a la actividad de la AND sola tanto en PTFE como en titanio (p>0,05) y la interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales.

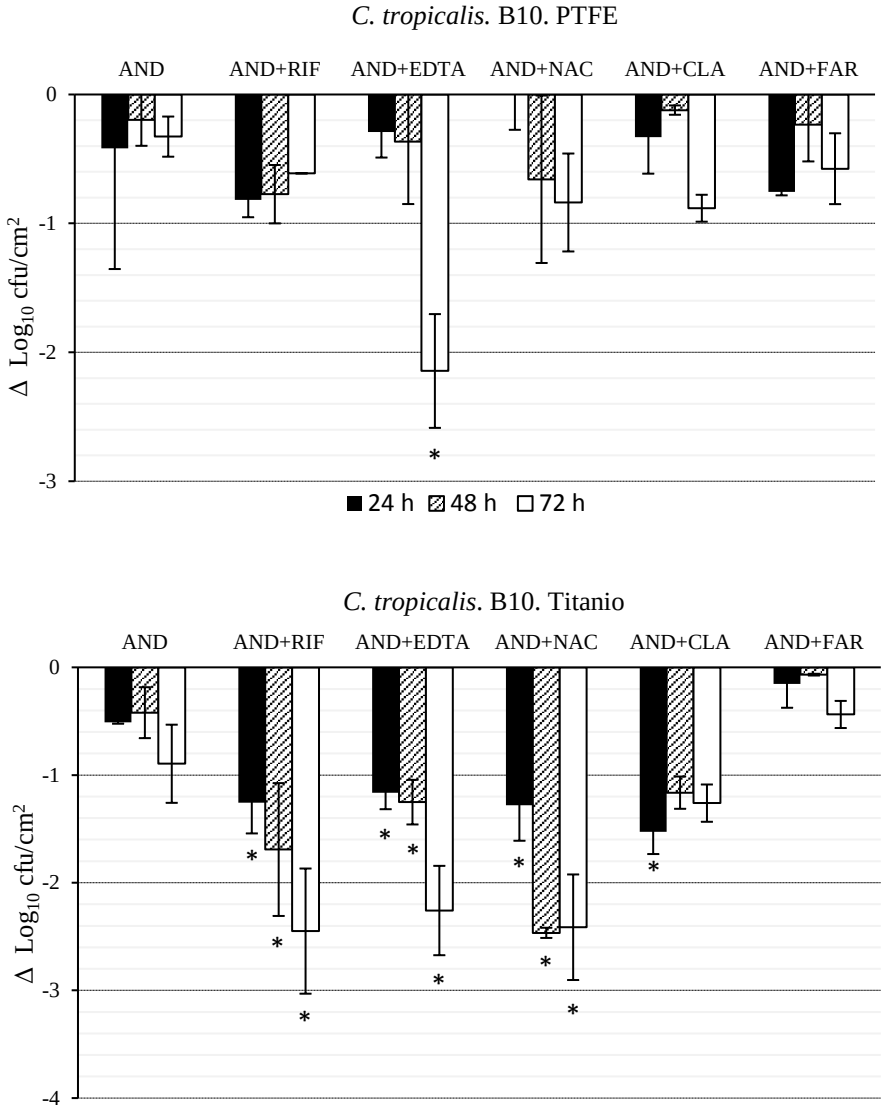


Figura 4.37. Actividad de la anidulafungina (8 mg/L) sola y combinada con rifampicina (10 mg/L), EDTA (30 mg/L), NAC (40 mg/L), claritromicina (5 mg/L) y farnesol (30 µM) sobre la biopelícula de *C. tropicalis*, formada sobre PTFE y Titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. Los asteriscos indican que la diferencia es significativa (p<0,05) con respecto al antifúngico solo en el mismo tiempo experimental.

En la Tabla 4.9 se resumen las interacciones de anfotericina B o anidulafungina con las moléculas ensayadas sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formadas en PTFE y titanio.

Tabla 4.9. Interacciones obtenidas entre los antifúngicos combinados con los compuestos con actividad desestructuradora de la biopelícula, sobre la biopelícula de *C. tropicalis* B10.

Antifúngicos	**Compuestos**	**Biomaterial**	**Interacción**
Anidulafungina 8 mg/L	EDTA 30 mg/L	PTFE	Indiferente
		Titanio	**Aditiva**
	Rifampicina 10 mg/L	PTFE	Indiferente
		Titanio	**Aditiva**
	N-acetilcisteína 40 mg/L	PTFE	Indiferente
		Titanio	**Aditiva**
	Claritromicina 5 mg/L	PTFE	Indiferente
		Titanio	Indiferente
	Farnesol 30 µM	PTFE	Indiferente
		Titanio	Indiferente
Anfotericina B 1.000 mg/L	EDTA 30.000 mg/L	PTFE	**Sinérgica**
		Titanio	Indiferente
	Rifampicina 1.000 mg/L	PTFE	**Sinérgica**
		Titanio	**Aditiva**
	N-acetilcisteína 4.000 mg/L	PTFE	**Sinérgica**
		Titanio	**Aditiva**
	Claritromicina 1.000 mg/L	PTFE	**Aditiva**
		Titanio	**Aditiva**
	Farnesol 300 µM	PTFE	**Aditiva**
		Titanio	Indiferente

Basándonos en los resultados obtenidos en el apartado anterior (Tabla 4.8) se seleccionaron las combinaciones que fueron sinérgicas para valorar su actividad sobre las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata*. De estas especies Se seleccionaron los aislados clínicos que presentaron mayor número de células adheridas a las 24 horas sobre ambos biomateriales en los ensayos de cinética de crecimiento y que además tuvieron menor rango intercuartílico a lo largo de las 96 horas de ensayo

4.10 ACTIVIDAD DE ANFOTERICINA B COMBINADA CON RIFAMPICINA Y EDTA SOBRE LA BIOPELÍCULAS DE OTRAS ESPECIES DE *CANDIDA* SPP.

4.10.1 Actividad de anfotericina B combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. albicans* B2

La actividad de anfotericina B (1.000 mg/L) se estudió sola y combinada con rifampicina (1.000 mg/L) y EDTA (30.000 mg/L) sobre las biopelículas formadas en PTFE y titanio por el aislado clínico *C. albicans* B2 (Figura 4.38). La reducción promedio de células viables en el ensayo con AMB sola fue de 4,44±0,17 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,72±0,17 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. AMB fue significativamente más activa sobre las biopelículas formadas en PTFE ($p<0,01$).

Para la combinación AMB+RIF, la reducción de células viables fue de 4,31 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 2,17 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. No se obtuvieron diferencias significativas entre la actividad de esta combinación y la AMB sola, tanto en PTFE y en titanio ($p>0,05$). La interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales. La combinación AMB+EDTA produjo una reducción de 2,31±1,52 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,13±0,68 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. AMB+EDTA no presentó diferencias significativas con respecto a la AMB sola en PTFE y en titanio ($p>0,05$) y la interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales.

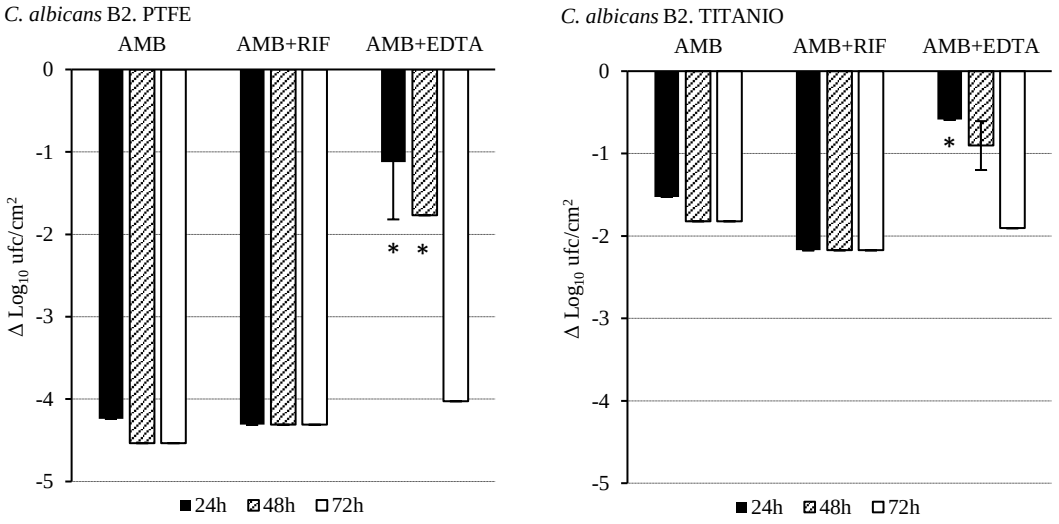


Figura 4.38. Actividad de la anfotericina B (1.000 mg/L) sola y combinada con rifampicina (1.000 mg/L) y EDTA (30.000 mg/L), sobre la biopelícula de *C. albicans*, formada sobre PTFE y Titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. Los asteriscos indican que la diferencia es significativa ($p<0,05$) con respecto al antifúngico solo en el mismo tiempo experimental.

4.10.2 Actividad de anfotericina B combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. parapsilosis* B4

La actividad de anfotericina B (1.000 mg/L) sola y combinada con RIF (1.000 mg/L) y EDTA (30.000 mg/L) sobre las biopelículas formadas en PTFE y titanio por el aislado clínico *C. parapsilosis* B4 se muestra en la Figura 4.39. En el ensayo con AMB sola, se produjo una reducción de las células viables de 4,62±2,17 Log_{10} en PTFE y 4,65±1,75 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. No se obtuvieron diferencias significativas en la actividad de AMB entre biomateriales.

Con la combinación AMB+RIF la reducción el número de células adheridas fue 3,73±2,24 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 3,94±2,44 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. AMB+RIF no tubo diferencias significativas con respecto a la AMB sola tanto en PTFE como en titanio (p>0,05) y la interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales.

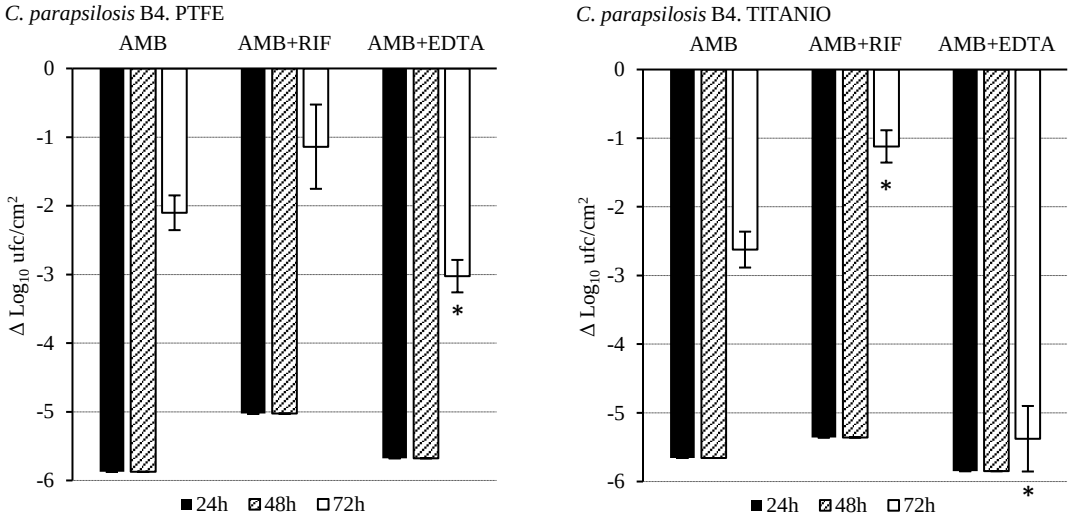


Figura 4.39. Actividad de la anfotericina B (1.000 mg/L) sola y combinada con rifampicina (1.000 mg/L) y EDTA (30.000 mg/L), sobre la biopelícula de *C. parapsilosis*, formada sobre PTFE y Titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. Los asteriscos indican que la diferencia es significativa (p<0,05) con respecto al antifúngico solo en el mismo tiempo experimental.

En el ensayo con AMB+EDTA se obtuvo una reducción de células viables de 4,79±1,53 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 5,69±0,27 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. Esta combinación no presentó diferencias significativas con respecto a la AMB sola tanto en PTFE como en titanio (p>0,05) y la interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales.

4.10.3 Actividad de anfotericina B combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. krusei* B7

La actividad de anfotericina B 1.000 mg/L se estudió sola y combinada con rifampicina 1.000 mg/L y EDTA 30.000 mg/L sobre las biopelículas del aislado clínico *C. krusei* B7 formadas en PTFE y titanio (Figura 4.40). En el ensayo con AMB sola, se obtuvo una reducción de las células viables de 1,8±0,19 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,82±0,25 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio.

La combinación AMB+RIF produjo una reducción de las células viables de 1,64±0,25 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 2,91±0,89 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. En PTFE no se obtuvieron diferencias significativas entre AMB+RIF y AMB sola ($p>0,05$). La interacción en este biomaterial se clasificó como indiferente. En titanio, se encontraron diferencias significativas entre la combinación y el antifúngico solo en las primeras 48 horas de ensayo ($p<0,05$) y la interacción se clasificó como aditiva.

En el ensayo con AMB+EDTA, se obtuvo una reducción del número de células adheridas de 3,53±0,89 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 2,96±0,14 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. Esta combinación fue significativamente más activa que AMB sola tanto en PTFE como en titanio ($p<0,05$) y la interacción se clasificó como aditiva en ambos biomateriales.

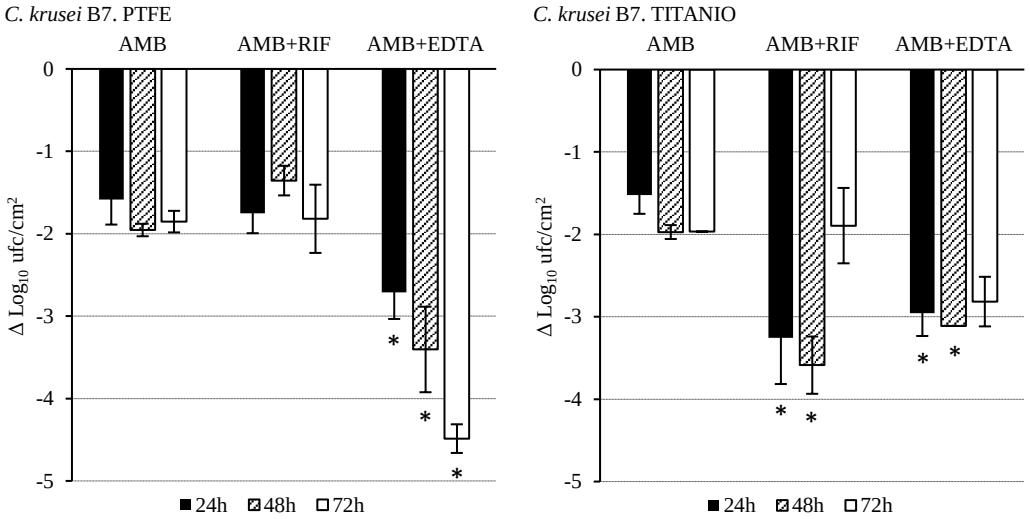


Figura 4.40. Actividad de la anfotericina B (1.000 mg/L) sola y combinada con rifampicina (1.000 mg/L) y EDTA (30.000 mg/L), sobre la biopelícula de *C. krusei*, formada sobre PTFE y Titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. Los asteriscos indican que la diferencia es significativa ($p<0,05$) con respecto al antifúngico solo en el mismo tiempo experimental.

4.10.4 Actividad de anfotericina B combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. glabrata* B13

La actividad de anfotericina B (1.000 mg/L) sola y combinada con RIF (1.000 mg/L) y EDTA (30.000 mg/L) sobre las biopelículas formadas por el aislado clínico *C. glabrata* B13 en PTFE y titanio se muestra en la Figura 4.41. En el ensayo con AMB, se produjo una reducción de las células viables de 0,68±0,12 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 0,19±0,47 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio.

La reducción de células viables en el ensayo con AMB+RIF fue de 1,75±0,31 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,04±0,34 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. Esta combinación fue significativamente más activa que AMB sola en PTFE ($p<0,01$) y la interacción se clasificó como aditiva. En titanio no se obtuvieron diferencias significativas entre la combinación y el antifúngico solo ($p>0,05$) y la interacción se clasificó como indiferente.

En el ensayo con AMB+EDTA la reducción de células viables fue de 0,43±0,29 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 0,44±0,1 Log_{10} ufc/cm^2, en titanio. AMB+EDTA no presentó diferencias significativas con respecto a la AMB sola tanto en PTFE como en titanio ($p>0,05$) y la interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales.

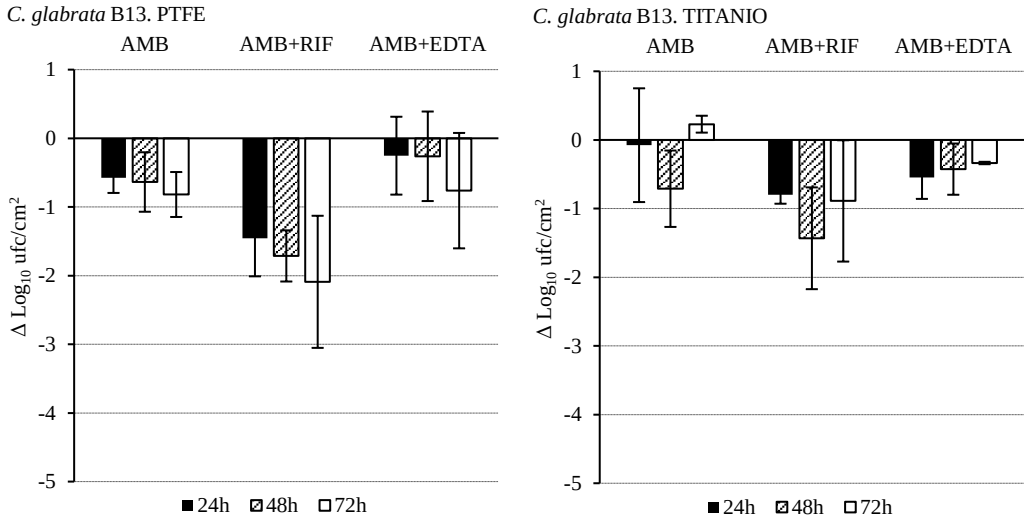


Figura 4.41. Actividad de la anfotericina B (1.000 mg/L) sola y combinada con rifampicina (1.000 mg/L) y EDTA (30.000 mg/L), sobre la biopelícula de *C. glabrata*, formada sobre PTFE y Titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma. Los asteriscos indican que la diferencia es significativa ($p<0,05$) con respecto al antifúngico solo en el mismo tiempo experimental.

4.11 ACTIVIDAD DE ANIDULAFUNGINA COMBINADA CON RIFAMPICINA Y EDTA SOBRE LA BIOPELÍCULAS DE OTRAS ESPECIES DE *CANDIDA* SPP.

4.11.1 Actividad de anidulafungina combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. albicans* B2

La actividad de anidulafungina (8 mg/L) se estudió sola y combinada con rifampicina 10 mg/L (RIF) y EDTA 30 mg/L sobre las biopelículas del aislado clínico *C. albicans* B2 formadas en PTFE y titanio (Figura 4.42). Con AND sola el promedio de reducción de células viables en la biopelícula fue 0,27±0,11 Log_{10} en PTFE y 0,76±0,15 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. Sobre la biopelícula de *C. albicans* B2, AND fue significativamente más activa sobre titanio que sobre PTFE (p= 0,01).

La combinación AND+RIF produjo una reducción promedio del número de células viables de 0,65±0,29 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,03±0,21 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. AND+RIF no mostró diferencias significativas con respecto a la AND sola tanto en PTFE como en titanio (p>0,05) y la interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales.

En el ensayo con AND+EDTA, el promedio de reducción de células viables presentes en la biopelícula fue de 0,51±0,44 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 0,83±0,33 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. AND+EDTA no mostró diferencias significativas con respecto a la AND sola tanto en PTFE como en titanio (p>0,05) y la interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales.

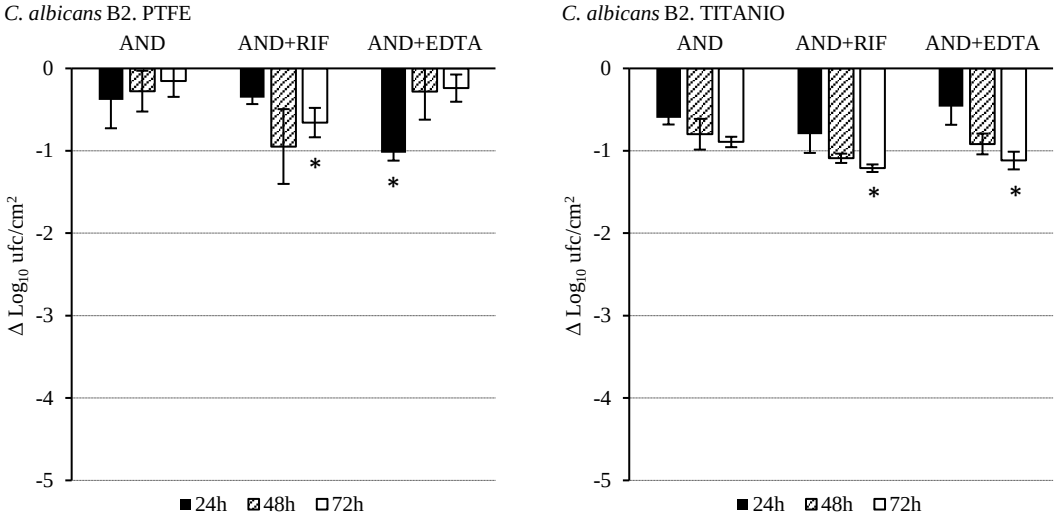


Figura 4.42. Actividad de la anidulafungina (8 mg/L) sola y combinada con rifampicina (10 mg/L), EDTA (30 mg/L) sobre la biopelícula de *C. albicans*, formada sobre PTFE y Titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. Los asteriscos indican que la diferencia es significativa ($p<0,05$) con respecto al antifúngico solo en el mismo tiempo experimental.

4.11.2 Actividad de anidulafungina combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. parapsilosis* B4

La actividad de anidulafungina 8 mg/L sola y combinada con RIF 10 mg/L y EDTA 30 mg/L se estudió sobre las biopelículas del aislado clínico *C. parapsilosis* B4 formadas en PTFE y titanio (Figura 4.43). AND sola produjo una reducción promedio de células viables de 1,23±0,28 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 2,72±0,6 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. La actividad de AMB fue significativamente mayor sobre titanio ($p<0,05$).

La combinación AND+RIF redujo las células viables presentes en la biopelícula un promedio de 1,66±0,69 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,69±1,25 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. Esta combinación no mostró diferencias significativas con respecto a la AND sola tanto en PTFE como en titanio ($p>0,0,5$) y la interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales.

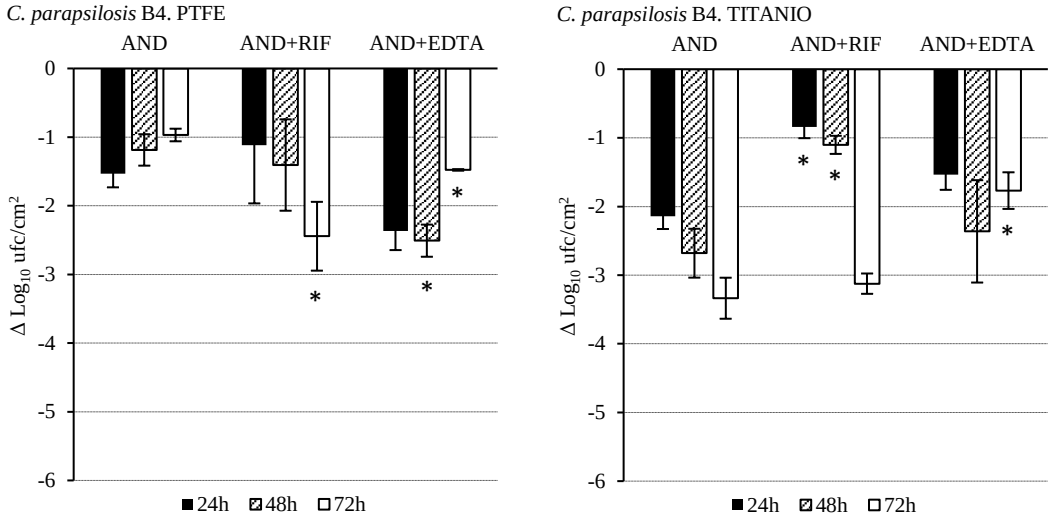


Figura 4.43. Actividad de la anidulafungina (8 mg/L) sola y combinada con rifampicina (10 mg/L) y EDTA (30 mg/L) sobre la biopelícula de *C. parapsilosis*, formada sobre PTFE y Titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. Los asteriscos indican que la diferencia es significativa ($p<0,05$) con respecto al antifúngico solo en el mismo tiempo experimental.

En el ensayo con AND+EDTA redujo las células viables 2,12±0,55 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,89±0,42 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. AND+EDTA no mostró diferencias significativas con respecto a la AND sola tanto en PTFE como en titanio ($p>0,05$) y la interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales.

Tanto AMB sola como las combinaciones AMB+RIF y AMB+EDTA produjeron la erradicación de la biopelícula formada en ambos biomateriales durante las primeras 48 horas. Sin embargo, en el último punto experimental (72 horas) se observó un incremento del número de células viables adheridas en ambos biomateriales de 3,4 Log_{10} ufc/cm^2 en presencia de AMB sola y 4,06 Log_{10} ufc/cm^2 en presencia de AMB+RIF. A destacar que, en titanio, con la combinación AMB+RIF no se obtuvo el recrecimiento de la biopelícula observado con AMB sola y AMB+RIF.

4.11.3 Actividad de anidulafungina combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. krusei* B7

La actividad de anidulafungina (8 mg/L) sola y combinada con RIF (10 mg/L) y EDTA (30 mg/L) sobre las biopelículas formadas en PTFE y titanio por el aislado clínico *C. krusei* B7 se muestra en la Figura 4.44. En el ensayo con AND sola, se obtuvo una reducción de células viables de 0,11±0,16 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,13±0,68 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. La actividad de AND fue significativamente mayor sobre las biopelículas formadas en titanio ($p<0.05$).

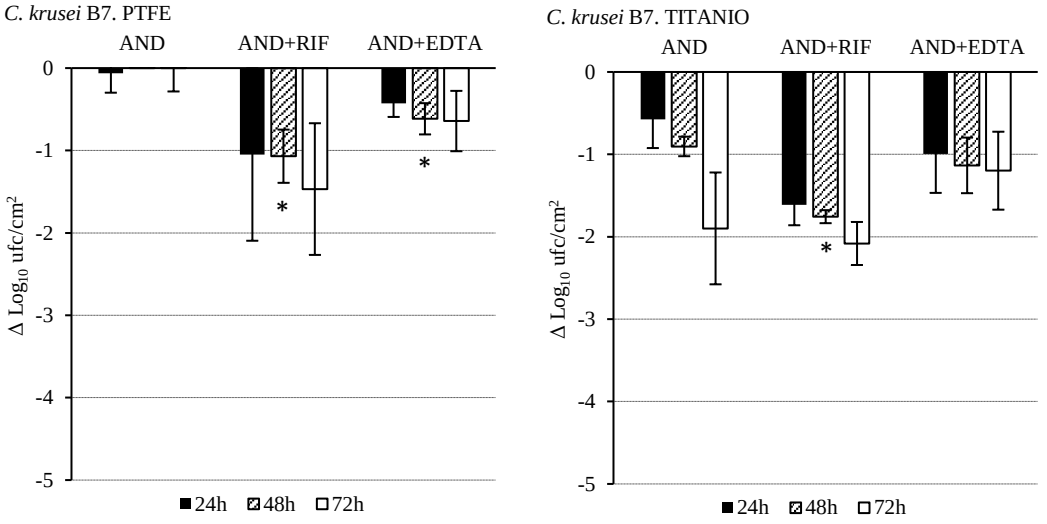


Figura 4.44. Actividad de la anidulafungina (8 mg/L) sola y combinada con rifampicina (10 mg/L) y EDTA (30 mg/L) sobre la biopelícula de *C. krusei*, formada sobre PTFE y Titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. Los asteriscos indican que la diferencia es significativa ($p<0,05$) con respecto al antifúngico solo en el mismo tiempo experimental.

La combinación AND+RIF redujo las células viables en 1,2±0,23 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y 1,82±0,24 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio. En PTFE, AND+RIF fue significativamente más activa que AND ($p<0,01$) y la interacción se clasificó como aditiva. Sin embargo, en titanio, no se obtuvieron diferencias significativas entre la combinación y el antifúngico solo ($p>0,05$). En este biomaterial, la interacción se clasificó como indiferente.

En el ensayo con AND+EDTA, la reducción de células viables de la biopelícula fue de 0,56±0,11 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 1,11±0,1 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. En PTFE, esta combinación fue significativamente más activa que AND sola ($p<0,01$), La interacción se clasificó como indiferente. En titanio, no se obtuvieron diferencias significativas entre la combinación y el antifúngico solo ($p>0,05$) y la interacción también se clasificó como indiferente.

4.11.4 Actividad de anidulafungina combinada con rifampicina y EDTA sobre la biopelícula de *C. glabrata* B13

La actividad de anidulafungina (8 mg/L) se estudió sola y combinada con RIF (10 mg/L) y EDTA (30 mg/L) sobre las biopelículas del aislado clínico *C. glabrata* B13 formadas en PTFE y titanio (Figura 4.45). En el ensayo con AND sola, se observó un incremento en el número de células viables 0,51±0,07 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE. Sin embargo, en titanio, se obtuvo una reducción de 0,07±0,39 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio.

La combinación AND+RIF produjo una reducción de las células viables de 0,38±0,57 Log_{10} ufc/cm^2 en PTFE y 0,59±0,16 Log_{10} ufc/cm^2 en titanio. AND+RIF no mostró diferencias significativas con respecto a la AND sola tanto en PTFE como en titanio ($p>0,05$) y la interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales.

En el ensayo con AND+EDTA se produjo un incremento en el número de células viables adheridas en PTFE y fue de 0,26±0,08 Log_{10} ufc/cm^2 mientras que, en titanio, se obtuvo una reducción de 0,63±0,32 Log_{10} ufc/cm^2. AND+EDTA no presentó diferencias significativas con respecto a la AND sola tanto en PTFE ($p>0,05$) como en titanio ($p<0,05$) y la interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales. Tanto AND como las combinaciones ensayadas fueron significativamente más activas sobre titanio ($p<0,05$).

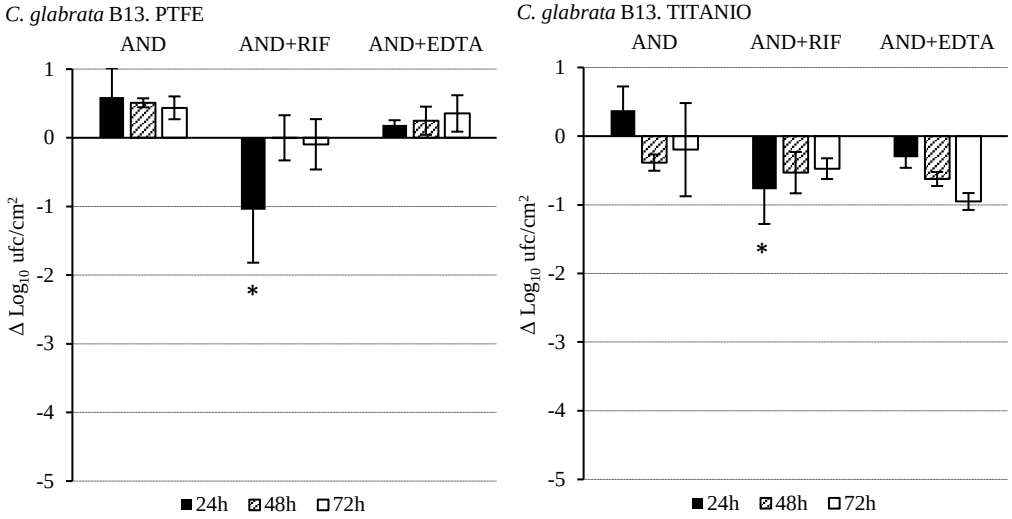


Figura 4.45. Actividad de la anidulafungina (8 mg/L) sola y combinada con rifampicina (10 mg/L) y EDTA (30 mg/L) sobre la biopelícula de *C. glabrata*, formada sobre PTFE y Titanio. Los resultados (Δ Log_{10} ufc/cm^2) reflejan la diferencia en células viables con respecto al tiempo 0. Cada dato experimental representa la media y la desviación estándar de tres réplicas. Valores positivos indican crecimiento de la biopelícula y valores negativos indican muerte de la misma. Los asteriscos indican que la diferencia es significativa ($p<0,05$) con respecto al antifúngico solo en el mismo tiempo experimental.

En la Tabla 4.10 se muestran de manera resumida las interacciones obtenidas para la combinación de anidulafungina y anfotericina B con RIF y EDTA en las especies de *Candida* ensayadas.

Tabla 4.10. Interacciones obtenidas entre los antifúngicos combinados con los compuestos con actividad desestructuradora de la biopelícula, sobre las biopelículas de *C. albicans* B2, *C. parapsilosis* B4, *C. krusei* B7, *C. tropicalis* B10 y *C. glabrata* B13 formadas sobre PTFE y titanio.

Antifúngicos	**Compuestos**	**Biomaterial**	**Especies**				
			C. albicans	***C. parapsilosis***	***C. krusei***	***C. tropicalis***	***C. glabrata***
AND 8 mg/L	EDTA 30 mg/L	PTFE	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Indiferente
		Titanio	Indiferente	Indiferente	Indiferente	**Aditiva**	Indiferente
	Rifampicina 10 mg/L	PTFE	Indiferente	Indiferente	**Aditiva**	Indiferente	Indiferente
		Titanio	Indiferente	Indiferente	Indiferente	**Aditiva**	Indiferente
AMB 1.000 mg/L	EDTA 30.000 mg/L	PTFE	Indiferente	Indiferente	**Aditiva**	**Sinérgica**	Indiferente
		Titanio	Indiferente	Indiferente	**Aditiva**	Indiferente	Indiferente
	Rifampicina 1.000 mg/L	PTFE	Indiferente	Indiferente	Indiferente	**Sinérgica**	**Aditiva**
		Titanio	Indiferente	Indiferente	**Aditiva**	**Aditiva**	Indiferente

5 DISCUSIÓN

Esta tesis tiene como objetivo fundamental estudiar la cinética de formación de biopelículas de *Candida* spp. sobre dos biomateriales utilizados frecuentemente en la fabricación de dispositivos biomédicos (PTFE y titanio) y la cinética de letalidad de los antifúngicos solos o combinados con diversos compuestos sobre las biopelículas formadas en estos biomateriales. Se ha determinado la capacidad de formación de biopelícula, la sensibilidad de las levaduras planctónicas y en biopelículas y la hidrofobicidad celular superficial de aislados clínicos y cepas de referencia de las cinco especies de *Candida* con mayor importancia clínica: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. Los estudios de cinética de crecimiento y letalidad se han realizado utilizando un reactor biológico (*CDC Biofilm Reactor*) como modelo *in vitro*.

Nuestros resultados muestran que la capacidad de formación de biopelícula de *Candida* spp. sobre superficies inertes depende no solo de la especie sino también del aislado y del biomaterial. *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* son las especies con mayor porcentaje de aislados formadores de biopelículas. Los ensayos de cinética de crecimiento en el *CDC Biofilm Reactor* permitieron detectar diferencias significativas en la capacidad de colonización de PTFE y titanio. El número de células viables adheridas al biomaterial más hidrófobo (PTFE) fue significativamente mayor que el número de las adheridas al biomaterial hidrófilo (titanio), un hecho especialmente significativo en *C. albicans*. Además, las cepas más hidrófobas (aislados clínicos de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*) mostraron una mayor capacidad de formación de biopelícula en titanio en comparación con las cepas hidrófilas (*C. albicans*). Nuestros hallazgos sugieren que la hidrofobicidad celular superficial puede tener un papel en la capacidad de formación de biopelícula de *Candida* spp.

Por otro lado, hemos mostrado la resistencia de las biopelículas de *Candida* spp. a los antifúngicos en el rango de concentraciones alcanzadas en el suero cuando se utilizan dosis convencionales. Las biopelículas de *C. tropicalis* muestran una resistencia muy marcada a equinocandinas (con $CMIB_{50}$ de anidulafungina > 16 mg/L). Además, el número de células viables presentes en la biopelícula de esta especie se incrementó en más de 2 Log_{10} ufc/cm^2 en presencia de anfotericina B a concentraciones de 1,5 mg/L.

De igual forma, anfotericina B a 1.000 mg/L erradicó las biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* formadas sobre PTFE y titanio y a 40 mg/L las de *C. tropicalis* formadas en titanio. Sin embargo, tuvo una actividad limitada sobre las biopelículas de *C. krusei* y *C. glabrata*. Algunos antifúngicos como la 5-fluorocitosina, la terbinafina o la caspofungina presentaron diferencias significativas de actividad según el sustrato sobre el cual se había formado la biopelícula.

Nuestros datos evidencian el potencial que poseen algunos compuestos como el EDTA, la rifampicina, la N-acetilcisteína y la claritromicina sobre biopelículas de *Candida* spp. y en especial sobre biopelículas de *C. tropicalis*. La combinación de anfotericina B con EDTA, rifampicina y N-acetilcisteína fue sinérgica sobre biopelículas de *C. tropicalis* formadas sobre PTFE mientras que la combinación de anidulafungina con estas mismas moléculas tuvo un efecto aditivo sobre las biopelículas de esta especie formadas en titanio. También observamos un efecto aditivo cuando utilizamos en combinación anidulafungina con rifampicina o anfotericina B con EDTA o rifampicina sobre la biopelícula de *C. krusei*. Esta última combinación también fue aditiva sobre las biopelículas de *C. glabrata*. Al igual que en los ensayos con antifúngicos, la actividad de estas combinaciones ha sido distinta según el biomaterial sobre el cual se ha formado la biopelícula. Por ejemplo, la combinación de anfotericina B con EDTA fue sinérgica sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en PTFE mientras que, en titanio, la interacción de estas dos moléculas fue indiferente.

Nuestros resultados son difíciles de comparar con los existentes en la literatura ya que la mayor parte de los estudios determinan la CMIB mediante el ensayo de reducción del XTT. En nuestro trabajo, además de utilizar esta metodología para determinar la CMIB de las cepas del conjunto BIOCAN, hemos estudiado tanto la cinética de formación de la biopelícula como la cinética de letalidad de los antifúngicos solos y combinados con compuestos con capacidad desestructuradora de la biopelícula bacteriana, en un reactor biológico como modelo *in vitro*. Por otro lado, la mayoría de los estudios están hecho sobre *C. albicans* mientras que en nuestro trabajo hemos incluido otras especies no *albicans* con importancia clínica.

En conclusión, la mayor parte de los aislados clínicos de las principales especies de *Candida* spp. pueden formar biopelícula en mayor o menor medida según el aislado, la

especie y el biomaterial que actúa como sustrato. Los aislados con mayor hidrofobicidad celular superficial poseen mayor capacidad de formación de biopelícula sobre determinados biomateriales como el titanio. Los antifúngicos poseen una limitada actividad sobre las biopelículas de *Candida* spp. Finalmente, la combinación de antifúngicos con moléculas desestructuradoras de la biopelícula podría ser una estrategia terapéutica eficaz para el tratamiento de las infecciones relacionadas con la biopelícula de *Candida* spp.

5.1 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE LOS AISLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA* SPP.

En nuestro estudio hemos analizado la capacidad de formación de biopelícula de 90 aislados clínicos procedentes de diversas infecciones mediante la tinción con cristal violeta en placas de poliestireno. El 63% de ellos presentaron algún grado de formación de biopelícula, siendo *C. tropicalis*, la especie con mayor capacidad (100% de los aislados), seguidos de *C. parapsilosis* y *C. krusei* (73%), *C. albicans* (53%) y *C. glabrata* (50%). Al clasificar los resultados por localización, observamos que el mayor porcentaje de aislados con capacidad de formación de biopelícula se localizó en el grupo de aquellos procedentes de líquidos biológicos (excepto sangre) (76%), seguidos de sangre (56%) y catéteres (50%).

Los valores de capacidad formación de biopelícula en los aislados del conjunto BIOCAN se confirmaron mediante el ensayo de reducción del XTT realizado también en placas de poliestireno. El análisis de concordancia entre ambas técnicas no mostró una correlación significativa entre ellas. Silva-Dias y cols. tampoco obtuvieron correlación entre ambas técnicas (Silva-Dias et al. 2015). Esta falta de correlación se debe a que la tinción con cristal violeta determina la biomasa total adherida mientras que el ensayo de reducción del XTT detecta las células metabólicamente activas en la biopelícula.

Nuestros resultados coinciden con los publicados por otros autores al indicar que *C. tropicalis* es la especie con mayor capacidad de formación de biopelícula. Tumbarello y cols. estudiaron la capacidad de formación de biopelícula de 294 aislados clínicos de *Candida* spp. donde *C. tropicalis* también fue la especie con mayor porcentaje de aislados formadores de biopelícula (71,4%), mientras que, en el resto de especies estudiadas, *C.*

glabrata, *C. albicans* y *C. parapsilosis*, este porcentaje fue significativamente menor (25%) (Tumbarello et al. 2007). Shin y cols. en su estudio con 360 cepas, *C. albicans* fue la que presentó menor número de aislados formadores de biopelícula. Además, estos autores observaron que los aislamientos de *Candida* no *albicans* recuperados de sangre tienen mayor número de aislados formadores (79%), comparados con los recuperados de otras regiones anatómicas (52%) (Shin et al. 2002).

5.2 INFLUENCIA DEL BIOMATERIAL EN LA CINÉTICA DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP.

La cinética de crecimiento de las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* sobre PTFE y titanio se determinó en el *CDC Biofilm Reactor* durante 96 horas. Se incluyeron dos superficies con características fisicoquímicas y estructurales distintas con el objeto de estudiar la influencia del biomaterial en la capacidad de formación de biopelícula. El PTFE es un polímero plástico, inerte e hidrófobo, con una energía superficial baja (<20 mN/m) mientras que el titanio es un biomaterial metálico, reactivo e hidrófilo, con una energía superficial alta (>70 mN/m).

Hemos observado que el número de células viables adheridas en PTFE fue mayor que en titanio, especialmente en *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, donde la diferencia en células adheridas entre ambos biomateriales estuvo comprendida entre 1 y 2 Log_{10}. En *C. krusei* y *C. glabrata* también se obtuvo un mayor número de células viables adheridas en PTFE, en este caso la diferencia fue menor de 1 Log_{10}. Este hecho también se ha observado en *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*; sin embargo, en otras especies como *S. aureus* o *S. epidermidis*, la formación de biopelícula es mayor sobre superficies hidrófilas (Lüdecke et al. 2014).

Otros estudios han analizado las diferencias en la capacidad de formación de biopelícula de *Candida* spp. en distintas superficies. Chandra y cols. estudiaron la capacidad de formación de biopelícula de *C. albicans* sobre superficies de poliuretano, policarbonato-uretano y polietileno-tereftalato, modificados químicamente para obtener un rango amplio de características superficiales: hidrófobas, hidrófilas, catiónicas y aniónicas. En su estudio, los autores obtuvieron una correlación positiva entre el ángulo

de contacto de la superficie y la capacidad de formación de biopelícula de *C. albicans*, con recuentos significativamente superiores sobre las superficies con mayor ángulo de contacto y por tanto más hidrófobas (Chandra et al. 2005).

5.3 INFLUENCIA DE LA HIDROFOBICIDAD CELULAR SUPERFICIAL EN LA CINÉTICA DE FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

En nuestro trabajo, hemos determinado la hidrofobicidad celular superficial de aislados clínicos y cepas de referencia de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. Los valores más elevados de hidrofobicidad celular superficial, superiores al 70%, se obtuvieron en los aislados clínicos de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Sin embargo, las cepas de referencia ATCC® de estas dos especies han mostrados valores de hidrofobicidad inferiores al 22%. *C. krusei* y *C. glabrata* mostraron valores intermedios de hidrofobicidad, comprendidos entre el 14 y el 75% mientras que *C. albicans* fue la especie con menor hidrofobicidad celular superficial, inferior al 30% en todos los aislados analizados. Otros autores también observaron valores más elevados de hidrofobicidad celular superficial en *C. tropicalis*, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. albicans* (Silva-Dias et al. 2015).

En nuestro trabajo obtuvimos, en las cepas del conjunto BIOCAN, una correlación exponencial positiva (r^2=0,71) entre la hidrofobicidad celular superficial y el número de células viables adheridas a la superficie de titanio (superficie hidrófila) (Figura 4.14). Por ejemplo, en este biomaterial, el número de células viables presentes en las biopelículas de los aislados clínicos de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (hidrófobos) fue significativamente superior al obtenido con las cepas de referencia ATCC® de estas mismas especies (hidrófilas). Sin embargo, en PTFE (superficie hidrófoba), no obtuvimos correlación alguna entre la hidrofobicidad celular superficial y la capacidad de formación de biopelícula.

La influencia de la hidrofobicidad celular superficial en la capacidad de formación de biopelícula de *Candida* spp. ha sido estudiada por algunos autores. Blanco y cols. observaron en *C. albicans* que las cepas con mayor hidrofobicidad presentaron mayor capacidad de formación de biopelícula en placas de poliestierno (Blanco et al. 2010). Nuestro estudio, que ha incluido especies no *albicans* y dos biomateriales con

características superficiales distintas, pone de manifiesto que la hidrofobicidad superficial de la cepa puede condicionar su capacidad para formar biopelícula en biomateriales hidrófilos como el titanio, sin embargo, no influye sobre la capacidad de formación de biopelícula en biomateriales hidrófobos como el PTFE.

5.4 ACTIVIDAD DE LOS ANTIFÚNGICOS SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP.

5.4.1 Eficacia del uso de antifúngicos a concentraciones elevadas como solución de sellado de catéteres venosos centrales.

El sellado antimicrobiano de catéteres venosos centrales es un procedimiento terapéutico que consiste en la instilación de una solución de antimicrobiano en el interior del catéter a una concentración al menos 1.000 veces superior a la CMI del microorganismo con el fin de erradicar la biopelícula microbiana formada en el interior del dispositivo y evitar su retirada. Esta estrategia es especialmente útil en situaciones en las que no es posible someter al paciente a una intervención quirúrgica para retirar el dispositivo o es indispensable disponer de un acceso venoso central para el tratamiento de la enfermedad de base del paciente.

La mayor parte de las guías terapéuticas (IDSA, ECCMID, SEIMC, etc.) (Mermel et al. 2009) recomiendan el sellado antibiótico como estrategia para esterilizar el biomaterial y conservar el catéter cuando el agente etiológico de la colonización y/o infección es un estafilococo coagulasa negativo. Sin embargo, cuando el dispositivo es colonizado por *Candida*, las guías recomiendan la retirada del catéter, una decisión basada principalmente en la ausencia de evidencia y experiencia clínica en el uso de soluciones de sellado eficaces frente a la biopelícula de *Candida* spp. y seguras para el paciente (Walraven y Lee 2013).

En nuestro trabajo hemos evaluado la actividad de anfotericina B y anidulafungina a concentraciones de 1.000 mg/L y 8 mg/L, respectivamente sobre la biopelícula de 24 horas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* formadas en PTFE y titanio. En los ensayos con anfotericina B, se obtuvo la erradicación completa de las biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* en 24 horas. Sobre el resto de especies

estudiadas, la actividad de este antifúngico fue limitada. Anidulafungina, ensayada a 8 mg/L para evitar la aparición de efecto paradójico, fue ligeramente más eficaz sobre las biopelículas formadas en titanio que en PTFE, pero no logró la erradicación de las mismas en ninguno de los dos casos.

En los ensayos con *C. parapsilosis* hemos observado, como hecho destacable, que tras obtener una erradicación de la biopelícula a las 24 y a las 48 horas en ambos biomateriales, se obtuvo un recrecimiento de la misma a las 72 horas. Este fenómeno podría estar relacionado con la pérdida de actividad del antifúngico y con la presencia de células latentes con actividad metabólica reducida o *persisters* adheridas a la superficie del biomaterial. Al-Dhaheri y cols. han descrito la presencia de *persisters* en la biopelícula de *C. parapsilosis* expuesta a concentraciones de anfotericina B de hasta 100 mg/L (Al-Dhaheri y Douglas 2008). El recrecimiento de la biopelícula de *C. parapsilosis* tras 72 horas de exposición debería tenerse en cuenta a la hora de definir los tiempos de recambio de la solución de sellado.

En este estudio, anfotericina B a concentración de 1.000 mg/L no mostró una actividad significativa sobre las biopelículas de *C. glabrata* y *C. krusei*. La incapacidad de estas especies para producir pseudomicelio hace que la citoarquitectura de la biopelícula formada por esta especie sea distinta de la observada en otras levaduras del género como *C. albicans* o *C. parapsilosis*. Desconocemos en qué grado pueden influir las características estructurales de la biopelícula de estas especies en su resistencia a anfotericina B.

La utilización de anfotericina B a concentraciones elevadas sobre la biopelícula de *C. albicans* se ha estudiado tanto *in vitro* como en modelo animales solo sobre las biopelículas de *C. albicans*. Toulet y cols. utilizando anfotericina B a una concentración de 1.000 mg/L, obtuvieron una letalidad superior al 80% sobre la biopelícula de *C. albicans*, sin la erradicación completa de la biopelícula (Toulet et al. 2012). Mukherjee y cols. utilizando 1.500 mg/L de anfotericina B como solución de sellado de en un modelo *in vivo* de ratón, erradicaron la biopelícula de *C. albicans* (Mukherjee et al. 2009). Ensayos clínicos recientes han evaluado la eficacia de una solución de sellado de anfotericina B a 2.000 mg/L obteniendo una erradicación del 100% de la biopelícula de *C. albicans* (McGhee et al. 2016).

Aunque nuestros resultados ponen de manifiesto el potencial uso de anfotericina B a concentraciones elevadas sobre las biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* formadas en distintos biomateriales, la falta de actividad de este antifúngico sobre las biopelículas de especies como *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei* evidencia la necesidad de desarrollar nuevas estrategias frente al resto de especies.

5.4.2 Efecto de la combinación de antifúngicos sobre la biopelícula de *C. tropicalis*.

En este estudio, hemos evaluado la actividad de la anfotericina B, combinada con anidulafungina a concentraciones de 40 y 8 mg/L, respectivamente, sobre las biopelículas de dos aislados clínicos y una cepa de referencia de *C. tropicalis* formadas en PTFE y titanio.

La actividad de esta combinación de antifúngicos dependió de la capacidad de formación de biopelícula del aislado ensayado. La interacción se clasificó como indiferente en ambos biomateriales siguiendo los criterios establecidos para las curvas de letalidad (Lewis et al. 2002) (Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2016). Sin embargo, si se analiza con respecto al antifúngico más activo (anfotericina B) se observa una tendencia al antagonismo ya que la adición de anidulafungina produjo, en los dos aislados clínicos de *C. tropicalis* ensayados, una reducción de la letalidad de anfotericina B tanto en PTFE como en titanio (Figura 4.34). La combinación de estos antifúngicos es menos letal que la anfotericina B sola. La pérdida de letalidad se relacionó con la capacidad de formar biopelícula. Observamos que cuanto mayor capacidad de formación de biopelícula tenía la cepa, menos letal fue la combinación.

La combinación de equinocandinas y anfotericina B ha sido evaluada por otros autores utilizando metodologías como la microdilución bidimensional en tablero de ajedrez. Por este método, la interacción de caspofungina y anfotericina B sobre la biopelícula de *C. albicans* se ha clasificado como indiferente (Bachmann et al. 2003) (Tobudic et al. 2010a). Valentín y cols. observaron un efecto sinérgico de la combinación de anidulafungina y anfotericina B sobre las biopelículas de *C. albicans* y *C. glabrata*, e indiferente en *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Valentín et al. 2016).

Nuestros resultados, sugieren que la combinación de anidulafungina y anfotericina B podría no ser una estrategia adecuada para el tratamiento de las infecciones relacionadas con la biopelícula de *C. tropicalis*.

5.4.3 Efecto del biomaterial sobre la sensibilidad de las biopelículas de *C. tropicalis* a los antifúngicos.

En nuestro estudio hemos observado diferencias significativas de actividad de algunos antifúngicos sobre biopelículas de la misma cepa formada sobre distintos biomateriales. Terbinafina, 5-fluorcitosina y caspofungina son significativamente más eficaces sobre las biopelículas de *C. tropicalis* formadas en PTFE, que sobre las formadas en titanio. Algunos autores han estudiado la posible influencia del biomaterial en la letalidad de la biopelícula bacteriana a los antibióticos.

Las diferencias de letalidad obtenidas según el biomaterial pueden ser explicadas por dos hipótesis. 1) Es posible que existan diferencias significativas en la citoarquitectura de la biopelícula de *Candida* spp. formada sobre distintos biomateriales, que podrían influir en el acceso del antifúngico a las células de la biopelícula. 2) Es posible que existan fuerzas de interacción hidrofóbicas entre los biomateriales más hidrófobos como el PTFE y los antifúngicos con menor coeficiente de solubilidad como la terbinafina, 5-fluorocitosina y caspofungina que podría favorecer en cierta medida el acceso del fármaco a la biopelícula.

5.4.4 Resistencia de la biopelícula de *Candida* spp. a los antifúngicos.

<u>Azoles</u>

En este trabajo, hemos estudiado la cinética de letalidad del posaconazol en un rango de concentraciones comprendidas entre 1 mg/L y 8 mg/L sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en PTFE y titanio. El posaconazol fue el único antifúngico del estudio que no mostró letalidad sobre la biopelícula de *C. tropicalis* de 24 horas de maduración, la cual continuó creciendo en todas las concentraciones ensayadas y en todos los tiempos experimentales. Otros autores tampoco han encontrado actividad del posaconazol sobre

biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* (Katragkou et al. 2008) (Tobudic et al. 2010b) (Cateau et al. 2011).

Se ha descrito que los mecanismos de resistencia a azoles en la biopelícula de *Candida* spp. son específicos de la fase de desarrollo en la que esta se encuentra. Durante las fases tempranas de crecimiento de la biopelícula, la resistencia a azoles está mediada por bombas de expulsión o *efflux* como MDR1, CDR1 y CDR2, mientras que en la biopelícula madura, adquieren más importancia otros mecanismos como la reducción de la permeabilidad de la membrana fruto de una disminución en el contenido de ergosterol (Tobudic et al. 2012).

En general, los estudios publicados hasta la fecha muestran una limitada actividad de los azoles sobre la biopelícula de *Candida* spp. Ramage y cols. observaron que la biopelícula de *C. albicans* tolera concentraciones elevadas de fluconazol (>1.024 mg/L) y las células dispersadas de esta biopelícula mantienen el mismo nivel de resistencia al antifúngico (Ramage et al. 2002a). Valentín y cols. refieren unas $CMIB_{50}$ de voriconazol mayores de 128 mg/L para las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* (Valentín et al. 2016).

Equinocandinas

En nuestro estudio hemos determinado la CMIB de anidulafungina sobre las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* y, además, hemos evaluado la cinética de letalidad de caspofungina, anidulafungina y micafungina en un rango de concentraciones comprendidas entre 4 y 32 mg/L sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en PTFE y titanio. Nuestros resultados de letalidad realizados en el *CDC Biofilm Reactor* y las CMIB obtenidas mediante el ensayo de reducción del XTT coinciden al mostrar que las equinocandinas poseen una actividad limitada sobre la biopelícula de *C. tropicalis* especialmente a las concentraciones alcanzadas en plasma ($CMIB_{50}$ de AND >16 mg/L) mientras que son más activas sobre las biopelículas de *C. krusei* y *C. glabrata* ($CMIB_{50}$ de AND <0,06 mg/L). Otros autores también obtienen CMIBs de las equinocandinas elevadas para *C. tropicalis*. Valentín y cols. obtuvieron valores de $CMIB_{50}$ de anidulafungina mayores de 16 mg/L para *C. tropicalis* y mayores de 8 mg/L para *C. parapsilosis* (Valentín et al. 2016). En el estudio

de Seidler y cols. la CMIB de micafungina para las biopelículas de *C. albicans, C. parapsilosis* y *C. glabrata* fue menor de 1 mg/L, sin embargo, *C. tropicalis* presentó una $CMIB_{50}$ mayor de 16 mg/L (Seidler et al. 2006).

A diferencia de caspofungina, anfotericina B, terbinafina y 5-flurocitosina, en los ensayos con anidulafungina y micafungina no se obtienen diferencias de letalidad entre las biopelículas formadas en PTFE y titanio. Además, hemos observado una pérdida de letalidad de anidulafungina y micafungina a concentraciones elevadas (16 y 32 mg/L) sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en ambos biomateriales, la cual hemos interpretado como el efecto paradójico descrito para las equinocandinas.

La mayor letalidad y el menor efecto paradójico se obtuvo con caspofungina sobre las biopelículas de *C. tropicalis* formadas en PTFE, en cambio, este antifúngico no tuvo actividad sobre la biopelícula formada en titanio. Algunos autores han obtenido resultados alentadores en el uso de equinocandinas a concentraciones muy superiores a la CMI como solución de sellado antifúngico para catéteres venosos centrales. Basas y cols. evaluaron la actividad de anidulafungina a una concentración de 3.300 mg/L sobre la biopelícula de *C. parapsilosis* en un modelo *in vivo* en ratón de infección asociada a catéter. En su estudio, los autores alcanzaron a erradicar la biopelícula hasta en un 73% de los casos (Basas et al. 2016).

En la literatura se han reportado diversas hipótesis para explicar la resistencia de la biopelícula de *C. tropicalis* a equinocandinas. La primera de ellas está relacionada con la composición de la matriz extracelular. En *C. albicans* ($CMIB_{50}$ para AND <0,03 a >16 mg/L), la matriz extracelular está compuesta principalmente por moléculas de glucosa, ensambladas, al igual que en la pared celular, formando β-1,3-glucano mientras que la matriz extracelular de *C. tropicalis* está compuesta principalmente de hexosaminas formando un polisacárido similar a la quitina, el cual podría disminuir la permeabilidad de la matriz e impedir la difusión de la anidulafungina en el interior de la biopelícula (Al-Fattani y Douglas 2006). La segunda hipótesis está relacionada con una respuesta adaptativa frente al antifúngico. Walker y cols. estudiaron la respuesta a caspofungina de las células presentes en las biopelículas de *C. albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis* y *Candida guillermondi* y observaron un incremento significativo en la proporción de quitina presente en la pared celular en presencia de concentraciones cercanas al 50% de

la CMI (Walker et al. 2013). Además, Li y cols. estudiaron las células persistentes o *persisters* presentes en la biopelícula de *C. albicans* expuesta a 128 mg/L de caspofungina e identificaron en ellas la sobreexpresión de determinadas proteínas relacionadas con la integridad de la matriz extracelular como Csh1 (Li et al. 2015).

Anfotericina B

Anfotericina B mostró buena actividad sobre las biopelículas de *C. krusei* y *C. glabrata.* Las $CMIB_{90}$ de estas especies (0,5 a 2 mg/L) estuvieron en rangos cercanos a los valores fisiológicos de este antifúngico. Por el contrario, sobre los aislados clínicos de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* la actividad de anfotericina B fue limitada, con valores de $CMIB_{90}$ (8 a >8 mg/L) claramente superiores a los alcanzados en sangre tras la administración de una dosis estándar. Estos resultados son comparables con los obtenidos por otros autores para estas especies. Maiolo y cols. estudiaron la actividad de anfotericina B sobre las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata* obtuvieron valores de $CMIB_{90}$ iguales o superiores a 8 mg/L en todos los aislados (Maiolo et al. 2014). Marcos-Zambrano y cols. sobre la biopelícula de *C. tropicalis* obtuvieron valores de $CMIB_{90}$ comprendidos entre 2 y más de 16 mg/L (Marcos-Zambrano et al. 2016).

En nuestro trabajo obtuvimos una correlación exponencial positiva (r^2= 0,6) entre la capacidad de formación de biopelícula en placas de poliestierno determinada mediante tinción con cristal violeta (DO_{570}) y la $CMIB_{50}$ a anfotericina B (Figura 4.5). Las cepas más formadoras de biopelícula presentaron las $CMIB_{50}$ más elevada a este antifúngico. Esta correlación pone de manifiesto la importancia que posee la formación de biopelículas como mecanismo de resistencia a anfotericina B en *Candida* spp.

Las biopelículas expuestas a la concentración fisiológica de 1,5 mg/L continuaron creciendo hasta alcanzar recuentos de células viables dos órdenes de magnitud superiores a los obtenidos en la biopelícula de 24 horas. La letalidad comenzó a concentraciones superiores a la $CMIB_{90}$ (>8 mg/L) y se incrementó con la concentración. Anfotericina B a 40 mg/L erradicó la biopelícula de *C. tropicalis* formada sobre titanio, sin embargo, a estas concentraciones el PTFE permaneció colonizado. Este hecho podría ser explicado teniendo en cuenta que el número de células viables presente en la biopelícula era

significativamente mayor en PTFE que en titanio. Por tanto, aunque la constante de reducción de células viables (K) era similar en ambos biomateriales (Figura 4.20), anfotericina B pudo erradicar la biopelícula formada sobre titanio, que era el biomaterial menos colonizado.

Existen pocos estudios relacionados con cinéticas de letalidad de anfotericina B sobre biopelículas de *Candida* no *albicans* formadas en distintos biomateriales, lo cual impide la comparación de resultados. El-Azizi y cols. utilizaron un modelo *in vitro* que simulaba la farmacocinética de la anfotericina B y expusieron la biopelícula de *C. albicans* a concentraciones de hasta 3 mg/L. En este rango de concentraciones, anfotericina B no fue capaz de erradicar la biopelícula y tampoco células dispersadas desde la misma, alcanzando una letalidad máxima del 18% (El-Azizi et al. 2012).

Algunos autores han propuesto diversas hipótesis para explicar la resistencia de la biopelícula de *Candida* spp a anfotericina B. Liu y cols. observaron una pequeña fracción de células en estado latentes o *persisters*, presentes en las biopelículas de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* que sobrevivieron a la exposición a 256 mg/L de anfotericina B durante 96 horas (Li et al. 2014). Otros autores observaron la existencia de mecanismos de compensación que se activan en presencia del anfotericina B. Rodrigues y cols. observaron un incremento significativo de la concentración de polisacáridos presentes en la matriz de *C. glabrata* tras la exposición a concentraciones fisiológicas de anfotericina B (Rodrigues et al. 2016).

5.5 ACTIVIDAD DE COMPUESTOS DESESTRUCTURADORES COMBINADOS CON ANTIFÚNGICOS SOBRE LA BIOPELÍCULA DE *CANDIDA* SPP.

En este trabajo hemos evaluado la actividad de anfotericina B y anidulafungina, combinadas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), rifampicina, N-acetilcisteína, claritromicina y farnesol sobre la biopelícula de *Candida* spp. de 24 horas de maduración y formada sobre superficies de PTFE y titanio. Nuestros resultados ponen de manifiesto que la utilización de algunos de estos compuestos, especialmente EDTA y rifampicina,

mejora la actividad de los antifúngicos sobre las biopelículas de las especies no *albicans*, especialmente en *C. tropicalis*.

5.5.1 Ácido etilendiaminotetraacético

El EDTA es un ácido orgánico tetracarboxílico derivado del etano. La principal característica de esta molécula es su actividad como agente quelante de iones metálicos como el calcio o el magnesio, mediante la formación en su estructura de hasta seis grupos de coordinación, también llamados quelatos (Segura Egea et al. 1997).

El EDTA es capaz de capturar iones metálicos presentes en la estructura de biomoléculas como las metaloenzimas, interfiriendo en su actividad biológica o provocando su inactivación, motivo por el cual es utilizado como anticoagulante y conservante de la sangre extraída para estudio hematológico. Además, el EDTA se administra por vía intravenosa para el tratamiento de la intoxicación por plomo, la hipercalcemia y determinadas arritmias ventriculares inducidas por digitálicos.

La actividad del EDTA sobre la biopelícula bacteriana ha sido descrita previamente. Algunos autores han demostrado que su eficacia sobre la biopelícula no es debida a un efecto de inhibición del crecimiento o muerte celular, sino que es el resultado del secuestro de iones metálicos como el calcio, indispensables para estabilizar la matriz extracelular (Banin et al. 2006). Ramage y cols. estudiaron el efecto del EDTA sobre la biopelícula de *C. albicans* y observaron que inhibe la transición levadura - micelio en *C. albicans*, y la expresión de la adhesina Hwp1, generando una biopelícula desestructurada, consistente en una monocapa de blastosporas adheridas (Ramage et al. 2007). El EDTA, ha demostrado ser eficaz como solución de sellado de catéter venoso central, frente a un gran número de biopelículas bacterianas. Algunos autores han obtenido un incremento significativo de la actividad de gentamicina, vancomicina, minociclina o amikacina en presencia de EDTA, sobre la biopelícula de *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* (Lebeaux et al. 2014) (Raad et al. 2013). Las propiedades antimicrobianas del EDTA, unido a su actividad como anticoagulante, le convierten en un sustituto idóneo de la heparina en la prevención de la oclusión del catéter, aún más cuando estudios previos han demostrado como la heparina estimula la formación de la biopelícula de *S. aureus* (Shanks et al. 2005).

En este trabajo, hemos estudiado la actividad del EDTA en combinación con anidulafungina y anfotericina B sobre las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, y *C. glabrata*, formadas sobre PTFE y titanio. La actividad de la combinación dependió del antifúngico, la especie y el biomaterial que actuó como sustrato. La combinación de anidulafungina y EDTA, ensayada utilizando concentraciones de 8 mg/L y 30 mg/L, respectivamente, fue aditiva sobre la biopelícula de *C. tropicalis* en titanio e indiferente las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata* formadas en ambos biomateriales. La combinación de anfotericina B y EDTA, ensayada utilizando concentraciones de 1.000 mg/L y 30.000 mg/L respectivamente, fue sinérgica sobre la biopelícula de *C. tropicalis* y aditiva sobre *C. krusei*, tanto en PTFE como en titanio, sin embargo, fue indiferente sobre *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* en ambos biomateriales.

La anfotericina B sola mostró una excelente actividad sobre la biopelícula de *C. parapsilosis*, erradicándola las 24 horas en ambos biomateriales. Sin embargo, hay un recrecimiento de la misma a las 72 horas. Aunque la interacción de anfotericina B y EDTA se clasificó como indiferente, la adición de esta molécula evita el recrecimiento observado a las 72 horas en las biopelículas formadas en titanio y expuestas a anfotericina B. La combinación de anfotericina B y EDTA podría tener ciertas ventajas con respecto a la anfotericina B sola, especialmente al evitar el recrecimiento de la biopelícula tras 48 horas de exposición al antifúngico.

Raad y cols. utilizando placas de poliestireno como modelo *in vitro*, obtuvieron una mejora de la actividad de anfotericina B (2.000 mg/L) al combinarla con EDTA (30.000 mg/L) sobre las biopelículas de *C. albicans* y *C, parapsilosis* (Raad et al. 2008), sin embargo, en nuestro modelo experimental la interacción es indiferente. Esta diferencia entre ambos estudios, podría ser explicada por las diferencias metodológicas.

Nuestros resultados ponen de manifiesto el potencial de la combinación de anfotericina B y EDTA como solución de sellado para la erradicación de las biopelículas de *C. tropicalis* y *C. krusei*, la cual ha sido especialmente activa sobre las biopelículas formadas en PTFE, alcanzando una reducción de células viables adheridas superior a los 4 Log_{10} ufc/cm^2 tras 72 horas de exposición. Las propiedades anticoagulantes del EDTA, unido a su capacidad para mejorar la actividad de estos antifúngicos, pueden convertir a

esta molécula en una potencial sustituto de la heparina en el manejo y sellado antimicrobiano de los catéteres venosos centrales.

5.5.2 Rifampicina

La rifampicina es un antimicrobiano macrocíclico y liposoluble, derivado semisintético de la rifamicina B que inhibe específicamente la iniciación de la síntesis del ARN mediante su interacción con la subunidad beta de la ARN polimerasa y bloqueo del conducto donde se debe alojar el híbrido ARN-ADN. Es activa frente a la mayor parte de los cocos y bacilos Gram positivos y en la actualidad es un antibiótico de elección para el tratamiento de la infección protésica osteoarticular, debido a su demostrada actividad sobre la biopelícula estafilocócica (Trampuz y Widmer 2006). Sin embargo, el rápido desarrollo de resistencias a rifampicina hace recomendable su administración en combinación con otros antibióticos antiestafilocócicos como las quinolonas, vancomicina o linezolid (Ariza et al. 2008).

En el presente estudio, hemos evaluado la actividad de la rifampicina, combinada con anidulafungina y anfotericina B sobre las biopelículas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, formadas en PTFE y titanio. La interacción de anidulafungina y rifampicina, ensayadas a una concentración de 8 y 10 mg/L respectivamente, fue indiferente sobre las biopelículas de *C. albicans, C. parapsilosis* y *C. glabrata* formadas tanto en PTFE como en titanio. Sobre las biopelículas de *C. krusei* en PTFE y *C. tropicalis* en titanio fue aditiva. La combinación de anfotericina B y rifampicina, ensayadas ambas a 1.000 mg/L, fue sinérgica sobre la biopelícula de *C. tropicalis* y aditiva sobre la película de *C. glabrata*, tanto en PTFE como en titanio. En el resto de las especies ensayadas (*C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*) la combinación fue indiferente con respecto a la anfotericina B sola.

En los últimos años, algunos estudios han mostrado el potencial que posee la combinación de anfotericina B y rifampicina sobre la biopelícula de *C. albicans, C. parapsilosis* y *C. glabrata*, pero no sobre *C. tropicalis* y *C. krusei*, utilizando concentraciones inferiores a las utilizadas en este estudio (El-Azizi 2007) (Del Pozo et al. 2011). El mecanismo por el cual la actividad de anfotericina B mejora en presencia de rifampicina puede ser debido al aumento de la permeabilidad tanto a nivel de la pared

celular como de la matriz extracelular producida por la anfotericina B, lo cual facilitaría la difusión de la rifampicina al interior celular, alcanzando de esta manera la ARN polimerasa fúngica (El-Azizi 2007).

Los resultados de este trabajo, ponen de manifiesto la eficacia la combinación de rifampicina y anfotericina B sobre las biopelículas de *C. tropicalis* y *C. krusei* a concentraciones elevadas (1.000 mg/L), lo cual puede ser útil como solución de sellado de catéteres venosos centrales. anfotericina B erradicó las biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* y la adición de rifampicina no afectó la actividad del antifúngico solo.

5.5.3 N-acetilcisteína

La N-acetilcisteína es un precursor del aminoácido L-cisteína y se caracteriza por la presencia en su estructura de un grupo sulfhidrilo, cuya oxidación permite la unión de dos moléculas mediante un puente disulfuro. Esta característica le aporta a la N-acetilcisteína una gran capacidad reductora y por tanto antioxidante, la cual es especialmente útil para la reducción de las especies reactivas del oxígeno. Además, la N-acetilcisteína actúa como precursor del glutatión ya que su desacetilación hepática permite disponer de niveles adecuados de cisteína para la síntesis de este último (Dinicola et al. 2014). La N-acetilcisteína es ampliamente conocida por ser un agente mucolítico, debido a su capacidad para reducir los puentes disulfuro presentes en las secreciones mucosas, algo especialmente útil cuando se pretende disminuir la viscosidad de las secreciones bronquiales. Además, la N-acetilcisteína posee efecto antinflamatorio debido a la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión celular ICAM y VCAM lo cual dificulta la migración de monocitos y macrófagos a través del endotelio. La N-acetilcisteína se utiliza además para el tratamiento de la intoxicación por paracetamol, ya que restablece los niveles hepáticos de glutatión y así reduce el riesgo de muerte celular de los hepatocitos por estrés oxidativo. La administración intravenosa de 150 mg/kg de N-acetilcisteína seguidos de 50 mg/kg, permite alcanzar una concentración sérica máxima de 35 mg/L (Prescott et al. 1989).

La eficacia de la N-acetilcisteína sobre la biopelícula bacteriana ha sido evaluada por diversos autores a lo largo de los últimos años. Olofsson y cols. han sugerido que la N-acetilcisteína puede alterar los puentes disulfuro de determinadas enzimas implicadas en

la síntesis de la matriz de la biopelícula. Estos autores observaron que la N-acetilcisteína a una concentración de 0,5 mg/mL produce una reducción significativa de la matriz extracelular de *Stahpylococcus warneri, Bacillus cereus, y Acinetobacter iwofii* (Olofsson et al. 2003) las cuales mostraron una matriz delgada, similar a una fina cápsula alrededor de la célula. También ha mostrado ser eficaz combinada con antibióticos, especialmente en el rango de las concentraciones de sellado de catéter venoso central. Aslam y cols., observaron un efecto sinérgico entre N-acetilcisteína (80.000 mg/L) y tigeciclina (1.000 mg/L) sobre las biopelículas de *S. aureus, K. pneumoniae* y *Acinetobacter baumanii* (Aslam et al. 2007). Además ha mejorado la actividad de ciprofloxacino sobre la biopelícula de *P. aeruginosa* formada en moldes de cemento óseo (Onger et al. 2016).

En el presente trabajo, hemos estudiado la actividad de la N-acetilcisteína combinada con anidulafungina y anfotericina B sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en PTFE y titanio. La combinación de anidulafungina y N-acetilcisteína, ensayada a una concentración de 8 y 40 mg/L, respectivamente, es indiferente sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en PTFE, sin embargo, es aditiva sobre la misma biopelícula formada en titanio. Por otra parte, la combinación de anfotericina B y N-acetilcisteína ensayadas a una concentración de 1.000 mg/L y 4.000 mg/L, respectivamente, es sinérgica sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en PTFE y aditiva sobre la biopelícula formada en titanio.

Los resultados obtenidos evidencian la eficacia de la combinación de N-acetilcisteína con anidulafungina, especialmente sobre superficies de titanio y además con anfotericina B como solución de sellado de catéter venoso central. En la actualidad, pocos estudios han evaluado la eficacia de N-acetilcisteína sobre la biopelícula de *Candida* spp. Venkatesh y cols. obtuvieron una reducción significativa de la biomasa y el grosor de la biopelícula de *C. albicans* tras la exposición a N-acetilcisteína a una concentración de 8.000 mg/L (Venkatesh et al. 2009). Estos autores también observaron un efecto sinérgico en la combinación de N-acetilcisteína con anfotericina B o con fluconazol sobre esta misma especie. Recientemente, Mahmoud y cols. obtuvieron un incremento en la actividad del ketoconazol en presencia de N-acetilcisteína sobre la biopelícula de *C. albicans* (Mahmoud et al. 2014). El hecho de que la N-acetilcisteína sea eficaz en combinación con dos antifúngicos, cuyos mecanismos de acción son muy distintos, fortalece la hipótesis de que la N-acetilcisteína actúa de manera inespecífica, afectando

los puentes disulfuro establecidos entre componentes de la matriz extracelular y los presentes en las enzimas implicadas en la síntesis de esta.

5.5.4 Claritromicina

Los macrólidos son una familia de moléculas lipofílicas que tienen en común un anillo lactónico macrocíclico de 14 átomos de carbono en el caso de la eritromicina o la claritromicina y de 15 átomos en el caso de la azitromicina. Los macrólidos inhiben la síntesis proteica mediante la interacción con la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Además, los macrólidos poseen propiedades antinflamatorias e inmunomoduladoras debido a su interacción con genes y rutas moleculares que regulan estos procesos. Además, algunos autores han observado que los macrólidos estimulan la expresión de enzimas lisosomales como pueden ser las hexosaminidasas (Gerbaux et al. 1996).

La claritromicina es el macrólido más estudiado sobre la biopelícula bacteriana, especialmente las de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Yasuda y cols. observaron una reducción significativa de la concentración de alginato y hexosas en la matriz extracelular de *P. aeruginosa* expuesta a claritromicina (Yasuda et al. 1993). De igual forma, claritromicina mejoró la actividad de vancomicina, daptomicina, moxifloxacino e imipenen, sobre la biopelícula estafilocócica (Parra-Ruiz et al. 2012).

En este trabajo, hemos evaluado la actividad de la claritromicina combinada con anidulafungina y anfotericina B sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en PTFE y titanio. La combinación de anidulafungina y claritromicina, ensayada a una concentración de 8 y 5 mg/L, respectivamente, es indiferente mientras que combinada con anfotericina B, ambas a 1.000 mg/L, es aditiva. Los resultados obtenidos muestran el potencial de la combinación de anfotericina B y claritromicina como solución de sellado de catéteres venosos centrales.

Pocos estudios han evaluado la actividad de los macrólidos y en especial de la claritromicina sobre la biopelícula fúngica. Del Pozo y cols., utilizando un modelo *in vitro* basado en placas de microtitulación de 96 pocillos observaron una interacción sinérgica entre claritromicina y anfotericina B sobre la biopelícula de *C. albicans*, *C. parapsilosis*

y *C. glabrata*, mientras que sobre, *C. krusei* y *C. tropicalis* dicha interacción fue indiferente (Del Pozo et al. 2011). Wu y cols. utilizaron eritromicina como solución de sellado durante un episodio de sepsis asociada a catéter, con aislamientos de *C. parapsilosis* y *S. aureus*, obteniendo una mejoría clínica a los 2 días (Wu y Lee 2007). En nuestro estudio, como se ha mencionado anteriormente, la interacción de anfotericina B y claritromicina es aditiva sobre las biopelículas de *C. tropicalis*. Esta discrepancia con Del Pozo y cols. podría ser debida a las diferencias del modelo *in vitro* y al rango de concentraciones utilizadas.

5.5.5 Farnesol

El farnesol fue la primera molécula de *quorum sensing* descrita en un organismo eucariota y es liberado por la biopelícula de *Candida* spp. cuando la densidad celular en el interior de la misma es elevada. En estas situaciones, donde la sobrepoblación celular pone en riesgo la viabilidad de la comunidad microbiana, debido a la limitada disponibilidad de nutrientes, el farnesol favorece la desestructuración de la biopelícula y la dispersión de nuevas células planctónicas (Ramage et al. 2002b). El farnesol inhibe la transición morfológica levadura–micelio y la expresión de adhesinas como Csh1 (Cao et al. 2005).

En el presente trabajo, hemos estudiado la actividad del farnesol combinado con anidulafungina y anfotericina B sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en PTFE y titanio. La combinación de anidulafungina y farnesol, ensayada a una concentración de 8 mg/L y 30 µM, respectivamente, es indiferente sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en ambos biomateriales. Por su parte, la combinación de anfotericina B y farnesol ensayadas a una concentración de 1.000 mg/L y 300 µM respectivamente, es aditiva sobre la biopelícula de *C. tropicalis* formada en PTFE e indiferente sobre la biopelícula formada en titanio.

Estos resultados evidencian que el farnesol no mejora de manera significativa la actividad de anfotericina B ni la de anidulafungina sobre la biopelícula de *C. tropicalis*. Solamente obtuvimos un efecto aditivo en la combinación de anfotericina B con farnesol a elevadas concentraciones sobre la biopelícula de esta especie formada en PTFE. Es

posible que el papel del farnesol como molécula de *quorum sensing* en *C. tropicalis* sea limitado, teniendo en cuenta que la producción de farnesol en esta especie, según Weber y cols., es muy reducida en comparación con *C. albicans*. Estos autores observaron que la presencia de farnesol en la biopelícula de *Candida* depende de la especie estudiada. *C. albicans* es la que produce farnesol en mayor cantidad (35,6 µM), seguida de *C. tropicalis* (1 µM), *C. parapsilosis* (0,6 µM), *C. krusei* (0,6 µM) y *C. glabrata* (0,4 µM). (Weber et al. 2008). Mosel y cols. reportaron que para inhibir la producción del tubo germinal en *C. albicans* era suficiente una concentración de 1 a 2 µM de farnesol, sin embargo, en presencia de suero se requirió hasta 250 µM (Mosel et al. 2005). Algunos autores han observado que el farnesol produce una reducción de la hidrofobicidad celular superficial en *C. albicans* debido a la inhibición de la expresión de determinadas proteínas de superficie ricas en dominios hidrofóbicos (Cao et al. 2005). En consecuencia, se consideró interesante estudiar la actividad del farnesol sobre un aislado clínico de *C. tropicalis* (B10) con una hidrofobicidad celular superficial elevada (73,47%), sin embargo, obtuvimos una eficacia reducida de esta molécula.

El farnesol ha demostrado sinergismo con anfotericina B, fluconazol y micafungina sobre la biopelícula de *C. albicans* (Katragkou et al. 2015). De igual forma, el farnesol ha reducido de manera significativa la CMI de anfotericina B, fluconazol, itraconazol y caspofungina sobre células planctónicas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Cordeiro et al. 2013). Aunque estos estudios han observado una mejor actividad de los antifúngicos combinados con farnesol sobre biopelículas de *C. albicans*, es posible que el papel esta molécula como *quorum sensing* en *C. tropicalis* sea limitado, teniendo en cuenta que la producción de farnesol en *C. tropicalis* es muy reducida en comparación con *C. albicans*.

5.6 FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La mayor parte de los estudios relacionados con la biopelícula de *Candida* spp. se han realizado sobre *C. albicans* y generalmente han estado enfocados a determinar la capacidad de formación de biopelícula en placas de poliestierno con aislados de distintos orígenes y determinar la sensibilidad de las biopelículas a los antifúngicos calculando la CMIB de los mismos mediante el ensayo de reducción del XTT. En nuestro trabajo,

además de utilizar estas metodologías para conocer la sensibilidad, hemos incorporado un reactor biológico, el *CDC Biofilm Reactor*, con el objetivo de estudiar tanto la cinética de formación la biopelícula como la cinética de letalidad de los antifúngicos en un rango de concentraciones fisiológicas y de sellado de catéter además de otros nuevos compuestos, combinados con antifúngicos, sobre las biopelículas de *C. albicans* y otras especies del género como *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. Además, también hemos estudiado la influencia del biomaterial tanto en la formación de la biopelícula como en la letalidad de los antifúngicos. Esta metodología nos ha permitido conocer el número de células viables presentes en la biopelícula por unidad de superficie de los dos biomateriales ampliamente utilizados en la práctica médica actual.

La laboriosidad y la duración de los ensayos en el *CDC Biofilm Reactor* dificultan ampliar el estudio de un gran número de cepas. Este hecho limita el alcance de nuestros resultados ya que en algunos ensayos solo hemos utilizado un aislado de cada especie. Sin embargo, los aislados ensayados proceden de un cribado de cepas clínicas y seleccionadas por su gran capacidad para formar biopelícula. Esto nos permitió ensayar la cinética de letalidad de los antifúngicos y otros compuestos enfrentándolos a las condiciones más adversas posibles.

5.7 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo sientan las bases para el desarrollo de nuevas líneas de investigación relacionadas con el estudio de la citoarquitectura y la composición de la matriz extracelular de la biopelícula de *Candida* spp.

Los estudios de citoarquitectura estarán encaminados a analizar la conformación estructural de la biopelícula y conocer los mecanismos subyacentes que expliquen las observaciones realizadas en este estudio, especialmente en relación con las diferencias de colonización entre biomateriales y la influencia de la hidrofobicidad celular superficial en el proceso de formación de la biopelícula en titanio.

Los estudios de composición de la matriz extracelular de las diferentes especies de *Candida* son de gran interés para conocer las diferentes moléculas que integran la estructura de la biopelícula, las interacciones que existen entre ellas y poder explicar de esta forma la actividad de los distintos compuestos que han sido evaluados a lo largo del estudio. Además, conocer los metabolitos y otras moléculas liberadas por la biopelícula al medio externo, podría ser útil en la búsqueda de marcadores *in vivo* de formación de biopelícula.

6 CONCLUSIONES

1. La capacidad de formación de la biopelícula de *Candida* spp. sobre superficies inertes depende no solo de la especie sino también del aislado y del biomaterial. *C. tropicalis* es la especie con mayor capacidad de formación de biopelícula, seguida de *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. albicans* y *C. glabrata*.

2. Las propiedades fisicoquímicas del biomaterial que actúa como sustrato y la hidrofobicidad del aislado influyen en la formación de la biopelícula de *Candida* spp. Las cinco especies analizadas forman más biopelícula en PTFE (hidrófobo) que en titanio (hidrófilo).

3. La hidrofobicidad celular se correlaciona con una mayor formación de biopelícula en titanio, pero no en PTFE. Las cepas hidrófobas tienen mayor capacidad de formación de biopelícula en titanio en comparación con las cepas hidrófilas.

4. La sensibilidad de las biopelículas de *Candida* spp. a anfotericina B está relacionada con la capacidad de la cepa para formar biopelícula. Las cepas más formadoras son menos sensibles que las poco formadoras.

5. Anidulafungina es más activa sobre las biopelículas de *C. krusei* y *C. glabrata*, posee actividad limitada sobre las biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* y no es activa sobre las biopelículas de *C. tropicalis*.

6. La letalidad de los antifúngicos sobre la biopelícula de *Candida* spp. depende del biomaterial sobre el que se desarrolla y aumenta con la concentración, excepto en las equinocandinas donde se observa efecto paradójico. Anfotericina B es más letal sobre las biopelículas formadas en titanio; caspofungina, terbinafina y 5-fluorocitosina sobre las desarrolladas en PTFE; la letalidad de anidulafungina y micafungina es similar en ambos biomateriales, y posaconazol no tiene letalidad sobre las biopelículas formadas en ninguna de las dos superficies.

7. Anfotericina B a 40 mg/L erradica las biopelículas de *C. tropicalis* formadas en titanio; a 1.000 mg/L erradica las de *C. albicans* y *C. parapsilosis* formadas en PTFE y titanio y tiene una actividad limitada sobre las biopelículas de *C. krusei* y *C. glabrata* en ambos biomateriales.

8. La cinética de letalidad de la combinación de anfotericina B con anidulafungina está relacionada con la capacidad formadora de biopelícula en *C. tropicalis*. En la cepa altamente formadora de biopelícula la combinación es indiferente con tendencia al antagonismo mientras que en la cepa poco formadora la combinación es ligeramente más activa que los antifúngicos solos.

9. La combinación de anfotericina B con EDTA, rifampicina y N-acetilcisteína es sinérgica sobre las biopelículas de *C. tropicalis* y aditiva sobre las biopelículas de *C. krusei* y *C. glabrata* desarrolladas en ambos biomateriales.

10. La combinación de anidulafungina con EDTA, rifampicina y N-acetilcisteína esa aditiva sobre las biopelículas de *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* desarrolladas en ambos biomateriales.

11. La combinación de antifúngicos con moléculas desestructuradoras de la biopelícula puede ser una estrategia terapéutica eficaz para el tratamiento de las infecciones relacionadas con la biopelícula de *Candida* spp.

7 BIBLIOGRAFÍA

Al-Dhaheri RS, Douglas LJ. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(5):1884-7.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(9):3291-7.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol. 2006;55(8):999-1008.

Alem MAS, Oteef MDY, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. Eukaryot Cell. 2006;5(10):1770-9.

Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol. 2005;43(4):1829-35.

Alvarez-Lerma F, Palomar M, Olaechea P, Otal JJ, Insausti J, Cerda E. National Study of Control of Nosocomial Infection in Intensive Care Units. Evolutive report of the years 2003-2005. Med Intensiva. 2007;31(1):6-17.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Instructions to authors. 2016. p. 23.

Ariza J, Euba G, Murillo O. Orthopedic device-related infections. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26(6):380-90.

Aslam S, Darouiche RO. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections. Int J Artif Organs. 2011;34(9):752-8.

Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V, Darouiche RO. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(4):1556-8.

Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. Curr Opin Pharmacol. 2007;7(4):355-9.

Auriti C, Piersigilli F, Ronchetti MP, Campi F, Amante PG, Falcone M, et al. Shunt lock therapy with micafungin to treat shunt-associated *Candida albicans* meningitis in an infant: Table 1. J Antimicrob Chemother. 2016;71(7):dkw072.

Azzam K, Parvizi J, Jungkind D, Hanssen A, Fehring T, Springer B, et al.

Microbiological, clinical, and surgical features of fungal prosthetic joint infections: a multi-institutional experience. J Bone Joint Surg Am. 2009;91(s6):142-9.

Bachmann SP, Ramage G, Vandewalle K, Patterson TF, Wickes BL, José L, et al. Antifungal Combinations against *Candida albicans* Biofilms In Vitro Antifungal Combinations against *Candida albicans* Biofilms In Vitro. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(11):3657-9.

Baddley JW, Benjamin DK, Patel M, Miró J, Athan E, Barsic B, et al. *Candida* infective endocarditis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008;27(7):519-29.

Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science. 2004;305(5690):1622-5.

Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. Appl Environ Microbiol. 2006;72(3):2064-9.

Barberan J. Management of infections of osteoarticular prosthesis. Clin Microbiol Infect. 2006;12(s3):93-101.

Basas J, Morer A, Ratia C, Martín MT, Del Pozo JL, Gomis X, et al. Efficacy of anidulafungin in the treatment of experimental *Candida parapsilosis* catheter infection using an antifungal-lock technique. J Antimicrob Chemother. 2016;71(10):1-7.

Bernhardt H, Knoke M, Bernhardt J. Efficacy of anidulafungin against biofilms of different *Candida* species in long-term trials of continuous flow cultivation. Mycoses. 2011;54(6):e821-7.

Beyda ND, Alam MJ, Garey KW. Comparison of the T2Dx instrument with T2*Candida* assay and automated blood culture in the detection of *Candida* species using seeded blood samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77(4):324-6.

Beynon RP, Bahl VK, Prendergast BD, Que Y-A, Moreillon P. Infective endocarditis. Nat Rev Cardiol. 2006;333(6):334-9.

Bink A. Anti-Biofilm Strategies: How to Eradicate *Candida* Biofilms? Open Mycol J. 2011;5(1):29-38.

Bizerra FC, Melo ASA, Katchburian E, Freymüller E, Straus AH, Takahashi HK, et al. Changes in cell wall synthesis and ultrastructure during paradoxical growth effect of caspofungin on four different *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(1):302-10.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada

RM, Goldenberg S, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. FEMS Yeast Res. 2008;8(3):442-50.

Blanco MT, Sacristán B, Lucio L, Blanco J, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2010;27(4):195-9.

Bosma JW, Siegert CEH, Peerbooms PGH, Weijmer MC. Reduction of biofilm formation with trisodium citrate in haemodialysis catheters: A randomized controlled trial. Nephrol Dial Transplant. 2010;25(4):1213-7.

Bouza E, Guinea J, Guembe M. The Role of Antifungals against *Candida* Biofilm in Catheter-Related Candidemia. Antibiotics. 2014;4(1):1-17.

Bustos C, Aguinaga A, Carmona-Torre F, Del Pozo JL. Long-term catheterization: Current approaches in the diagnosis and treatment of port-related infections. Infect Drug Resist. 2014;18(7):25-35.

Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Álvarez E, Baquero F, Cisterna R, et al. Sensititre YeastOne caspofungin susceptibility testing of *Candida* clinical isolates: Correlation with results of NCCLS M27-A2 multicenter study. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(4):1604-7.

Cantón E, Pemán J, Iñiguez C, Hervás D, Lopez-Hontangas JL, Pina-Vaz C, et al. Epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole for six *Candida* species as determined by the colorimetric Sensititre YeastOne method. J Clin Microbiol. 2013;51(8):2691-5.

Cao Y-Y, Cao Y-B, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, et al. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. Antimicrob Agents Chemother. febrero de 2005;49(2):584-9.

Carlson RP, Taffs R, Davison WM, Stewart PS. Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. J Biomater Sci Polym Ed. 2008;19(8):1035-46.

Catalán González M, Montejo González JC. Anidulafungin: a new therapeutic approach in antifungal therapy. Pharmacology of anidulafungin. Rev Iberoam Micol. junio de 2008;25(2):92-100.

Cateau E, Berjeaud JM, Imbert C. Possible role of azole and echinocandin lock solutions in the control of *Candida* biofilms associated with silicone. Int J Antimicrob Agents. 2011;37(4):380-4.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development,

architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001a;183(18):5385-94.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of *Candida*l biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res. 2001b;80(3):903-8.

Chandra J, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, McCormick TS, et al. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. Appl Environ Microbiol. 2005;71(12):8795-801.

Chauhan A, Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Full and broad-spectrum in vivo eradication of catheter-associated biofilms using gentamicin-EDTA antibiotic lock therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(12):6310-8.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. J Clin Microbiol. 1985;22(6):996-1006.

Cifani C, Costantino S, Massi M, Berrino L. Commercially available lipid formulations of amphotericin B: are they bioequivalent and therapeutically equivalent? Acta Biomed. 2012;83(2):154-63.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard-Third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA. 2008.

Coenye T, De Prijck K, Nailis H, J. Nelis H. Prevention of *Candida albicans* Biofilm Formation. Open Mycol J. 2011;5(1):9-20.

Cordeiro R a, Teixeira CEC, Brilhante RSN, Castelo-Branco DSCM, Paiva M a N, Giffoni Leite JJ, et al. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. Med Mycol. 2013;51(1):53-9.

Cremer J, Vatou V, Braveny I. 2,4-(Hydroxyphenyl)-ethanol, an antioxidative agent produced by *Candida* spp., impairs neutrophilic yeast killing in vitro. FEMS Microbiol Lett. 1999;170(2):319-25.

Crump JA, Collignon PJ. Intravascular Catheter-Associated Infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19(1):1-8.

Cuéllar-Cruz M, Vega-González A, Mendoza-Novelo B, López-Romero E, Ruiz-Baca E, Quintanar-Escorza MA, et al. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.

2012;31(10):2513-27.

Dalbøge CS, Nielsen XC, Dalhoff K, Alffenaar JW, Duno M, Buchard A, et al. Pharmacokinetic variability of clarithromycin and differences in CYP3A4 activity in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2014;13(2):179-85.

Davis SS. An introduction to tissue–biomaterial interactions. J Control Release. 2003;93(1):85.

Dinicola S, De Grazia S, Carlomagno G, Pintucci JP. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014;18(19):2942-8.

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. 2003;11(1):30-6.

Dupont. Teflon PTFE. Prop Handb. 1996;1-38.

El-Azizi M. Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against the biofilms of non-*albicans Candida* spp. by rifampicin and doxycycline. J Med Microbiol. 2007;56(5):645-9.

El-Azizi M, Farag N, Khardori N. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2012;14(21):1-9.

Ellis ME, Al-Abdely H, Sandridge A, Greer W, Ventura W. Fungal endocarditis: evidence in the world literature, 1965-1995. Clin Infect Dis. 2001;32(1):50-62.

Enjalbert B, Whiteway M. Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during *Candida albicans* resumption of growth. Eukaryot Cell. 2005;4(7):1203-10.

Flora SJS, Pachauri V. Chelation in metal intoxication. Int J Environ Res Public Health. 2010;7(7):2745-88.

Fortún J, Grill F, Martín-Dávila P, Blázquez J, Tato M, Sánchez-Corral J, et al. Treatment of long-term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic-lock therapy. J Antimicrob Chemother. octubre de 2006;58(4):816-21.

Gallardo-Moreno AM, González-Martín ML, Pérez-Giraldo C, Garduño E, Bruque JM, Gómez-García AC. Thermodynamic analysis of growth temperature dependence in the adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene. Appl Environ Microbiol. 2002;68(5):2610-3.

Gelis S, de Groot PWJ, Castillo L, Moragues M-D, Sentandreu R, Gómez M-M, et al.

Pga13 in *Candida albicans* is localized in the cell wall and influences cell surface properties, morphogenesis and virulence. Fungal Genet Biol. 2012;49(4):322-31.

Gerbaux C, Van Bambeke F, Montenez JP, Piret J, Morlighem G, Tulkens PM. Hyperactivity of cathepsin B and other lysosomal enzymes in fibroblasts exposed to azithromycin, a dicationic macrolide antibiotic with exceptional tissue accumulation. FEBS Lett. 1996;394(3):307-10.

Gil ML, Casanova M, Martínez JP. Changes in the cell wall glycoprotein composition of *Candida albicans* associated to the inhibition of germ tube formation by EDTA. Arch Microbiol. 1994;161(6):489-94.

Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton M a, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. Microbiology. 2005;151(3):757-62.

Gomes F, Leite B, Teixeira P, Azeredo J, Oliveira R. Farnesol in combination with N-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm cells. Braz J Microbiol. enero de 2012;43(1):235-42.

Gristina a G, Naylor P, Myrvik Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. Med Prog Technol. 1989;14(3-4):205-24.

Guillaume M, Garraffo R, Bensalem M, Janssen C, Bland S, Gaillat J, et al. Pharmacokinetic and dynamic study of levofloxacin and rifampicin in bone and joint infections. Med Mal Infect. 2012;42(9):414-20.

Habash M, Reid G. Microbial Biofilms: Their Development and Significance for Medical Device-Related Infections. J Clin Pharmacol. 1999;39(9):887-98.

Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta JP, Del Zotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis. Eur Heart J. 2015;36(44):3075-123.

Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(9):2128-31.

Hazen KC, Hazen BW. Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. Infect Immun. 1992;60(4):1499-508.

Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. Science. 2002;295(5557):1014-7.

Hench LL, Thompson I. Twenty-first century challenges for biomaterials. J R Soc Interface. 2010;7(4):379-91.

Hogan DA. Talking to themselves: Autoregulation and quorum sensing in fungi.

Eukaryot Cell. 2006;5(4):613-9.

Hosseini-Yeganeh M, McLachlan AJ. Physiologically based pharmacokinetic model for terbinafine in rats and humans. Antimicrob Agents Chemother. julio de 2002;46(7):2219-28.

International Organization for Standardization. Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. Iso 10993–5. 2009;5:1-52.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Merz WG, Baqui AAMA, Kelley JI, Meiller TF. Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. Rev Iberoam Micol. marzo de 2001;18(1):17-22.

Jacobson MJ, Piper KE, Nguyen G, Steckelberg JM, Patel R. In vitro activity of anidulafungin against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(6):2242-3.

Jans J, Brüggemann RJM, Christdmann V, Verweij PE, Warris A. Favorable outcome of neonatal cerebrospinal fluid shunt-associated *Candida* meningitis with caspofungin. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(5):2391-3.

Jiménez-Mejías ME, García-Cabrera E. Infecciones relacionadas con los sistemas de drenaje de líquido cefalorraquídeo. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26(4):240-51.

Justo JA, Bookstaver PB. Antibiotic lock therapy: Review of technique and logistical challenges. Infect Drug Resist. 2014;7:343-63.

Kaneko Y, Ohno H, Kohno S, Miyazaki Y. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. Jpn J Infect Dis. 2010;63(5):355-7.

Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Diza-Mataftsi E, Tsantali C, et al. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(1):357-60.

Katragkou A, McCarthy M, Alexander EL, Antachopoulos C, Meletiadis J, Jabra-Rizk MA, et al. In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother. 2015;70(2):470-8.

Kim TI, Han JH, Lee IS, Lee KH, Shin MC, Choi BB. New titanium alloys for biomaterials: a study of mechanical and corrosion properties and cytotoxicity. Biomed Mater Eng. 1997;7(4):253-63.

Ko KS, Lee J-Y, Song J-H, Peck KR. In vitro evaluation of antibiotic lock technique for the treatment of *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis* biofilms. J Korean Med Sci. 2010;25(12):1722-6.

Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. Clin Microbiol Rev. 2004;17(2):255–267.

Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. J Med Microbiol. 2010;59(8):873-80.

Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. Infect Immun. 2002a;70(2):878-88.

Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. Antimicrob Agents Chemother. 2002b;46(6):1773-80.

Kuiper JWP, van den Bekerom MPJ, van der Stappen J, Nolte P a, Colen S. 2-Stage Revision Recommended for Treatment of Fungal Hip and Knee Prosthetic Joint Infections. Acta Orthop. 2013;84(6):517-23.

Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. J Arthroplasty. 2012;27(8):61-5.

LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(11):3839-46.

Lebeaux D, Leflon-Guibout V, Ghigo JM, Beloin C. In vitro activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. J Antimicrob Chemother. 2014;70(6):1704-12.

Lee JY, Peck KR, Oh WS, Song JH. In vitro evaluation of the antibiotic lock technique (ALT) for the treatment of catheter-related infections caused by staphylococci. J Antimicrob Chemother. junio de 2006;57(6):1110-5.

Lefort A, Chartier L, Sendid B, Wolff M, Mainardi JL, Podglajen I, et al. Diagnosis, management and outcome of *Candida* endocarditis. Clin Microbiol Infect. 2012;18(4).

Leroy O, Gangneux J-P, Montravers P, Mira J-P, Gouin F, Sollet J-P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida*

infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). Crit Care Med. 2009;37(5):1612-8.

Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol. 2007;5(1):48-56.

Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. J Antimicrob Chemother. 2002;49(2):345-51.

Leyens C, Peters M. Titanium an Titanium Alloys. Titanium and Titanium Alloys. 2003.

Li P, Seneviratne C, Jin L. Consecutive Amphotericin B Treatments Fail to Eradicate *Candida* Biofilm Persisters. 2014;

Li P, Seneviratne C, Vizcaino J, Jin L. The survival mechanisms underlying caspofungin-induced *Candida albicans* biofilm persisters. 2015;

Liu P, Ruhnke M, Meersseman W, Paiva JA, Kantecki M, Damle B. Pharmacokinetics of anidulafungin in critically ill patients with candidemia/invasive candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(4):1672-6.

Liu Y, Filler SG. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. Eukaryot Cell. 2011;10(2):168-73.

Lüdecke C, Jandt KD, Siegismund D, Kujau MJ, Zang E, Rettenmayr M, et al. Reproducible biofilm cultivation of chemostat-grown *Escherichia coli* and investigation of bacterial adhesion on biomaterials using a non-constant-depth film fermenter. PLoS One. 2014;9(1):e84837.

Maertens J, Cornely OA, Ullmann AJ, Heinz WJ, Krishna G, Patino H, et al. Phase 1B study of the pharmacokinetics and safety of posaconazole intravenous solution in patients at risk for invasive fungal disease. Antimicrob Agents Chemother. julio de 2014;58(7):3610-7.

Mahmoud R, El-Baky A, Mohamed D, Abo M, Ela E, Fadl G, et al. N-acetylcysteine Inhibits and Eradicates *Candida albicans* Biofilms. Am J Infect Dis Microbiol. 2014;2(5):122-30.

Maiolo EM, Tafin UF, Borens O, Trampuz A. Activities of fluconazole, caspofungin, anidulafungin, and amphotericin b on planktonic and biofilm *Candida* species determined by microcalorimetry. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(5):2709-17.

Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Comparison of the antifungal activity of micafungin and amphotericin B against *Candida tropicalis* biofilms. J Antimicrob Chemother. septiembre de 2016;71(9):dkw162.

Martin SW, Douglas LM, Konopka JB. Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamydospores are distinct from budding and hyphal growth. Eukaryot Cell. 2005;4(7):1191-202.

Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. Mycoses. 2012;55(1):80-5.

Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. Mycopathologia. 2010;169(5):323-31.

Masuoka J, Hazen KC. Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains. Infect Immun. 2004;72(11):6230-6.

McGhee W, Michaels MG, Martin JM, Mazariegos G V, Green M. Antifungal Lock Therapy with Liposomal Amphotericin B: A Prospective Trial. J Pediatric Infect Dis Soc. marzo de 2016;5(1):80-4.

Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 1 de julio de 2009;49(1):1-45.

Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. Infect Immun. 1985;47(1):11-4.

Modrzewska B, Kurnatowski P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. Ann Parasitol. 2015;61(1):3-9.

Mosel DD, Dumitru R, Hornby JM, Atkin AL, Nickerson KW. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. Appl Environ Microbiol. 2005;71(8):4938-40.

Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. Infect Immun. agosto de 2003;71(8):4333-40.

Mukherjee PK, Long L, Kim HG, Ghannoum MA. Amphotericin B lipid complex is efficacious in the treatment of *Candida albicans* biofilms using a model of

catheter-associated *Candida* biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2009;33(2):149-53.

Neely L a, Audeh M, Phung NA, Min M, Suchocki A, Plourde D, et al. T2 magnetic resonance enables nanoparticle-mediated rapid detection of candidemia in whole blood. Sci Transl Med. 2013;5(182):182ra54.

Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Andes DR. Genetic basis of *Candida* biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. J Infect Dis. 2010;202(1):171-5.

Niinomi M, Nakai M. Titanium-based biomaterials for preventing stress shielding between implant devices and bone. International Journal of Biomaterials. 2011.

Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. Annu Rev Microbiol. 2015;69:71-92.

Nunes CZ, Marra AR, Edmond MB, da Silva Victor E, Pereira CA. Time to blood culture positivity as a predictor of clinical outcome in patients with *Candida albicans* bloodstream infection. BMC Infect Dis. 2013;13(1):486.

Olofsson A-C, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. Appl Environ Microbiol. agosto de 2003;69(8):4814-22.

Onger ME, Gocer H, Emir D, Kaplan S. N-acetylcysteine eradicates *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in bone cement. Scanning. 2016;doi: 10.1002/sca.21326.

Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: Clinical practice guidelines by the infectious diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2013;56(1).

Otoo HN, Kyeng GL, Qiu W, Lipke PN. *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences. Eukaryot Cell. 2008;7(5):776-82.

Park J, Lakes RS. Biomaterials: An introduction: Third edition. Biomaterials: An introduction: Third edition. 2007.

Parra-Ruiz J, Vidaillac C, Rose WE, Rybak MJ. Activities of high-dose daptomycin, vancomycin, and moxifloxacin alone or in combination with clarithromycin or rifampin in a novel in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(10):4329-34.

Parra-Ruiz J, Vidaillac C, Rybak MJ. Macrolides and staphylococcal biofilms. Rev Española Quimioter. 2012;25(1):10-6.

Paul Dimondi V, Townsend ML, Johnson M, Durkin M. Antifungal catheter lock therapy for the management of a persistent *Candida albicans* bloodstream

infection in an adult receiving hemodialysis. Pharmacotherapy. 2014;34(7):120-7.

Pemán J, Cantón E, Valentín A. Activity of anidulafungin against *Candida* biofilms. Rev Iberoam Micol. 2008;25(2):124-8.

Pemán J, Salavert M. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(2):90-8.

Pemán J, Zaragoza R, Salavert M. Prevention and control of nosocomial and health-care facilities associated infections caused by species of *Candida* and other yeasts. Rev Esp Quimioter. 2013;26(4):298-311.

Percival SL, Kite P, Eastwood K, Murga R, Carr J, Arduino MJ, et al. Tetrasodium EDTA as a novel central venous catheter lock solution against biofilm. Infect Control Hosp Epidemiol. junio de 2005;26(6):515-9.

Perumal P, Mekala S, Chaffin WL. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(7):2454-63.

Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. Nat Protoc. 2008;3(9):1494-500.

Portillo ME, Salvadó M, Sorli L, Alier A, Martínez S, Trampuz A, et al. Multiplex PCR of sonication fluid accurately differentiates between prosthetic joint infection and aseptic failure. J Infect. 2012;65(6):541-8.

Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Siverio A, Alier A, Sorli L, et al. Improved diagnosis of orthopedic implant-associated infection by inoculation of sonication fluid into blood culture bottles. J Clin Microbiol. 2015;53(5):1622-7.

Del Pozo JL, Francés ML, Hernáez S, Serrera A, Alonso M, Rubio MF. Effect of amphotericin B alone or in combination with rifampicin or clarithromycin against *Candida* species biofilms. Int J Artif Organs. septiembre de 2011;34(9):766-70.

Del Pozo JL. Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic. N Engl J Med. agosto de 2009;361(8):787-94.

Prescott LF, Donovan JW, Jarvie DR, Proudfoot AT. The disposition and kinetics of intravenous N-acetylcysteine in patients with paracetamol overdosage. Eur J Clin Pharmacol. 1989;37(5):501-6.

Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: A population-based surveillance in Spain. Clin Microbiol

Infect. 2014;20(4):O245-54.

Raad I, Hanna H, Dvorak T, Chaiban G, Hachem R. Optimal antimicrobial catheter lock solution, using different combinations of minocycline, EDTA, and 25-percent ethanol, rapidly eradicates organisms embedded in biofilm. Antimicrob Agents Chemother. enero de 2007;51(1):78-83.

Raad I, Rosenblatt J, Reitzel R, Jiang Y, Dvorak T, Hachem R. Chelator-based catheter lock solutions in eradicating organisms in biofilm. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):586-8.

Raad II, Hachem RY, Hanna HA, Fang X, Jiang Y, Dvorak T, et al. Role of ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) in catheter lock solutions: EDTA enhances the antifungal activity of amphotericin B lipid complex against *Candida* embedded in biofilm. Int J Antimicrob Agents. 2008;32(6):515-8.

Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother. 2002a;49(6):973-80.

Ramage G, López-Ribot JL. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Methods Mol Med. 2005;118:71-9.

Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res. 2006;6(7):979-86.

Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. Int J Microbiol. 2012;528521.

Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule. Appl Environ Microbiol. 1 de noviembre de 2002b;68(11):5459-63.

Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol organo la Asoc Esp Espec en Micol. 2001a;18:163-70.

Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2001b;45(9):2475-9.

Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition on *Candida albicans* biofilm formation using divalent cation chelators (EDTA). Mycopathologia. diciembre de 2007;164(6):301-6.

Rodrigues CF, Silva S, Azeredo J, Henriques M. *Candida glabrata*'s recurrent

infections: biofilm formation during Amphotericin B treatment. Lett Appl Microbiol. 2016;63(2):77-81.

Rodriguez-Baño J, del Toro MD, Lupion C, Suarez AI, Silva L, Nieto I, et al. Arthroplasty-related infection: incidence, risk factors, clinical features, and outcome. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26(10):614-20.

Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. FEMS Microbiol Lett. septiembre de 2006;262(2):129-34.

Ruiz Gaitán AC, Moret A, López-Hontangas JL, Molina JM, Aleixandre López AI, Cabezas AH, et al. Nosocomial fungemia by *Candida auris*: First four reported cases in continental Europe. Rev Iberoam Micol. enero de 2017;

Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. APMIS. 1995;103(10):707-13.

Samaranayake YH, Ye J, Yau JYY, Cheung BPK, Samaranayake LP. In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* Biofilms. J Clin Microbiol. 2005;43(2):818-25.

Schenk R. Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses, and Medical Applications. En: Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses, and Medical Applications. 2001. p. 145-68.

Schinabeck MK, Long LA, Hossain MA, Chandra J, Mukherjee PK, Mohamed S, et al. Rabbit Model of *Candida albicans* Biofilm Infection: Liposomal Amphotericin B Antifungal Lock Therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(5):1727-32.

Segura Egea JJ, Jiménez Rubio-Manzanares A, Llamas Cadaval R, Jiménez Planas A. El ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) y su uso en endodoncia. Endodoncia (Mex). 1997;15(2):90-7.

Seidler M, Salvenmoser S, Müller F-MC. In vitro effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. Int J Antimicrob Agents. 2006;28(6):568-73.

Shanks RMQ, Donegan NP, Graber ML, Buckingham SE, Zegans ME, Cheung AL, et al. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. Infect Immun. 2005;73(8):4596-606.

Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: Comparison

of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol. 2002;40(4):1244-8.

Shirtliff ME, Krom BP, Meijering RAM, Peters BM, Zhu J, Scheper MA, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(6):2392-401.

Shuford JA, Rouse MS, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. Evaluation of Caspofungin and Amphotericin B Deoxycholate against *Candida albicans* Biofilms in an Experimental Intravascular Catheter Infection Model. J Infect Dis. 2006;194:710-3.

Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: Relationship among *Candida* spp. Front Microbiol. 2015;6.

Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans Candida* species: quantification, structure and matrix composition. Med Mycol. 2009;47(7):681-9.

Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans Candida* species. Curr Microbiol. 2010;61(6):534-40.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata, Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(2):288-305.

Soldini D, Zwahlen H, Gabutti L, Marzo A, Marone C. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine following repeated intravenous infusion in haemodialysed patients. Eur J Clin Pharmacol. 2005;60(12):859-64.

Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, et al. Direct maldi-tof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 2012;50(1):176-9.

Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. J Microbiol Methods. 2000;40(2):175-9.

Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. Clin Microbiol Rev. 2014;27(2):302-45.

Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Graninger W, Presterl E. In vitro activity of

antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother. 2010a;65(2):271-4.

Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. Mycoses. 2012;55(3):199-204.

Tobudic S, Lassnigg A, Kratzer C, Graninger W, Presterl E. Antifungal activity of amphotericin B, caspofungin and posaconazole on *Candida albicans* biofilms in intermediate and mature development phases: Original article. Mycoses. 2010b;53(3):208-14.

Tornos P, Iung B, Permanyer-Miralda G, Baron G, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, et al. Infective endocarditis in Europe: lessons from the Euro heart survey. Heart. 2005;91(5):571-5.

Toulet D, Debarre C, Imbert C. Could liposomal amphotericin B (L-AMB) lock solutions be useful to inhibit *Candida* spp. biofilms on silicone biomaterials? J Antimicrob Chemother. 2012;67(2):430-2.

Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. N Engl J Med. 2007;357(7):654-63.

Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. Curr Opin Infect Dis. agosto de 2006;19(4):349-56.

Trinel PA, Borg-von-Zepelin M, Lepage G, Jouault T, MacKenzie D, Poulain D. Isolation and preliminary characterization of the 14-to 18-kilodalton *Candida albicans* antigen as a phospholipomannan containing beta-1, 2-linked oligomannosides. Infect Immun. 1993;61(10):4398-405.

Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. J Clin Microbiol. 2007;45(6):1843-50.

Tuson HH, Weibel DB. Bacteria-surface interactions. Soft Matter. 2013;9(18):4368-80.

Valentín A, Cantón E, Pemán J, Fernandez-Rivero ME, Tormo-Mas MA, Martínez JP. In vitro activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five *Candida* species. J Antimicrob Chemother. 2016;71(12):3449-52.

Valentin A, Canton E, Peman J, Martinez JP. Voriconazole inhibits biofilm formation in different species of the genus *Candida*. J Antimicrob Chemother. 2012;67(10):2418-23.

Valentín A, Cantón E, Pemán J, Quindós G. In vitro activity of amphotericin B and anidulafungin against *Candida* spp. biofilms. Rev Iberoam Micol. 2007;24(4):272-7.

Venkatesh M, Rong L, Raad I, Versalovic J. Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. J Med Microbiol. 2009;58(7):936-44.

Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. J Antimicrob Chemother. agosto de 2000;46(2):171-9.

Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. JAMA. 2009;302(21):2323-9.

Viudes A, Pemán J, Cantón E, Úbeda P, López-Ribot JL, Gobernado M. Candidemia at a tertiary-care hospital: Epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21(11):767-74.

Walker LA, Gow NAR, Munro CA. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):146-54.

Walraven CJ, Lee SA. Antifungal lock therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):1-8.

Wang Q-J, Shen H, Zhang X-L, Jiang Y, Wang Q, Chen YS, et al. Staged reimplantation for the treatment of fungal peri-prosthetic joint infection following primary total knee arthroplasty. Orthop Traumatol Surg Res. 2015;

Weber K, Sohr R, Schulz B, Fleischhacker M, Ruhnke M. Secretion of E,E-farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother. mayo de 2008;52(5):1859-61.

Williams D. Revisiting the Definition of Biocompatibility. Med Device Technol. 2003;14(8):10.

Williams DF. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. 1987.

Wu C-Y, Lee P-I. Antibiotic-lock therapy and erythromycin for treatment of catheter-related *Candida parapsilosis* and Staphylococcus *aureus* infections. J Antimicrob Chemother. 1 de septiembre de 2007;60(3):706-7.

Yasuda H, Ajiki Y, Koga T, Kawada H, Yokota T. Interaction between biofilms formed

by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(9):1749-55.

8 PUBLICACIONES

8.1 COMUNICACIONES EN CONGRESOS

8.1.1 Efficacy of anidulafungin plus clarithromycin against *C. tropicalis* biofilms growing on PTFE and titanium

Autores: Marcelo Ernesto Fernández Rivero; José Luis Del Pozo León; José Luis López Hontangas; Javier Pemán García; Emilia Cantón Lacasa.

Congreso: 7th Trends in Medical Mycology

Organizador: European Confederation of Medical Mycology

Lugar y fecha de celebración: Lisboa, Portugal. 9 al 12 de octubre de 2015

Formato de presentación: Póster

Referencia: *Mycoses*, 2015;58 (s4), 84-85.

Objectives

Up to 60% of all human infections are caused by biofilms, a significant clinical problem. *Candida* biofilm-associated infections are difficult to eradicate with antifungal treatment. Biofilms cells are more resistant than are planktonic cells because the exopolysaccharide matrix can slow the diffusion of antifungals inside the biofilm. Previous studies have found that *C. tropicalis* biofilm is resistant to echinocandins. Here we studied the kinetics of biofilm formation on PTFE and titanium. In addition, we have evaluated the efficacy of anidulafungin plus clarithromycin to eradicate biofilm formed on these biomaterials.

Methods

The selected strain of *C. tropicalis* was isolated in blood culture and was strongly adherent according to the methodology described by Stepanovic (Stepanović et al. 2000). The initial inoculum was adjusted to 10^7 cfu/mL in YNB 100 mM glucose. The kinetics of biofilm formation on PTFE and titanium was performed using 1.27 cm discs in the *CDC Biofilm Reactor*. The number of attached cells was determined after 24, 48, 72 and 96 hours by vortexing, sonication and quantified culture. The results were expressed as Log_{10} cfu/cm^2.

The study biofilm eradication was also performed using the *CDC Biofilm Reactor*. The biofilm was formed on titanium and PTFE for 24h. Later, AND AND+CLA combination was added to the *CDC Biofilm Reactor* according to the experiment. Eradication kinetics for 72 hours was studied using the same experimental protocol as in kinetic studies of growth.

Results

A significant difference ($p = 0.03$) was observed in the amount of *C. tropicalis* biofilm formed on PTFE and titanium. The average count of PTFE was 4.60 Log_{10} cfu/cm^2 and 2.17 Log_{10} cfu/cm^2 on titanium. The biofilm exposed to AND had an initial adhesion of 4.79 Log cfu/cm^2 on PTFE and 4.23 Log_{10} cfu/cm^2 on titanium. At 72 hours adhered cells were reduced 48,49% (2.47 Log_{10} cfu/cm^2) on PTFE and 41.06% (2.50 Log_{10} cfu/cm^2) on titanium. The biofilm exposed to AND+CLA had an initial adhesion of 4.86 Log_{10} cfu/cm^2 on PTFE and 4.13 Log_{10} cfu/cm^2 on titanium. At 72 hours adhered cells were reduced 61.92% (1.85 Log_{10} cfu/cm^2) on PTFE and 54.14% (1.89 Log_{10} cfu/cm^2) on titanium.

Conclusion

C. tropicalis forms a stable biofilm after 24 hours of contact with the biomaterial and persisted adhered to the surface during the 96 hours of experiment. PTFE was the biomaterial on which more amount of biofilm formed. Anidulafungin alone was capable of eradicate 48% of biofilm formed in PTFE and 41% of the biofilm formed in titanium. The combination with clarithromycin was capable of eradicate 62% of biofilm formed in PTFE and 54% of the biofilm formed in titanium. Anidulafungin-clarithromycin combination could be effective strategy for the eradication of biofilm of *Candida* spp.

8.1.2 Eficacia de la anidulafungina en combinación con N-acetilcisteína, claritromicina y rifampicina frente a biofilms de *C. tropicalis*

Autores: Marcelo Ernesto Fernández Rivero; Iván Beltrán Hortelano; Carmen Losa Maroto; Javier Pemán García; Emilia Cantón Lacasa; José Luis Del Pozo León

Congreso: XIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Organizador: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Lugar y fecha de celebración: Sevilla, España. 28 al 30 de mayo de 2015.

Formato de presentación: Comunicación oral

Referencia: *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33 (Espec Cong 1):38

Introducción

Las equinocandinas presentan una difusión limitada al interior de los biofilms fúngicos, provocando fracasos terapéuticos. Evaluamos la actividad in vitro de la anidulafungina sola y en combinación con N-acetilcisteína, claritromicina y rifampicina frente a biofilms de *C. tropicalis* sobre dos biomateriales (titanio y PTFE).

Material y métodos

Se seleccionó una cepa clínica de *C. tropicalis* (aislada en hemocultivo), fuertemente adherente según la metodología descrita por Stepanovic (Stepanović et al. 2000). Partiendo de un inóculo de 10^7 ufc/mL, se desarrolló la biopelícula sobre discos de PTFE y titanio en un *CDC Biofilm Reactor* utilizando YNB-Glucosa 100mM. Se cuantificó el número de ufc/cm^2 tras 24 horas de incubación. Posteriormente la biopelícula se expuso a 16 mg/L de anidulafungina sola y en combinación con 5 mg/L de N-acetilcisteína, 20 mg/L de claritromicina y 10 mg/L de rifampicina durante 72 horas. Se cuantificó el número de ufc/cm^2 a las 24, 48 y 72 horas de exposición a AND y a las combinaciones AND+NAC, AND+CLA y AND+RIF en cada una de las superficies.

Tras la exposición al antifúngico, se lavó cada disco con PBS a 4ºC y se sometió a un proceso de agitación vorticial (1 min) y sonicación (5 min a 50 Hz). Se realizó un cultivo cuantitativo del caldo obtenido tras la sonicación sobre agar BHA y los recuentos

obtenidos se expresaron como Log_{10} ufc/cm^2. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados

La biopelícula expuesta a AND presentó una adherencia inicial de 4.79 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y 4.23 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio. A las 72 horas las ufc adheridas se redujeron un 48,49% (2.47 Log_{10} ufc/cm^2) sobre PTFE y un 41.06% (2.50 Log_{10} ufc/cm^2) sobre titanio. La biopelícula expuesta a AND+NAC presentó una adherencia inicial de 4.72 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y 4,43 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio. A las 72 horas las ufc adheridas se redujeron un 11,32% (4,19 Log_{10} ufc/cm^2) sobre PTFE y un 40,03% (2,66 Log_{10} ufc/cm^2) sobre titanio.

La biopelícula expuesta a AND+CLA presentó una adherencia inicial de 4,86 Log_{10} ufc/cm^2 sobre PTFE y 4,13 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio. A las 72 horas las ufc adheridas se redujeron un 61.92% (1,85 Log_{10} ufc/cm^2) sobre PTFE y un 54,14% (1,89 Log_{10} ufc/cm^2) sobre titanio. La biopelícula expuesta a AND+RIF presentó una adherencia inicial de 5.32 Log_{10} ufc/cm^2sobre PTFE y 3,93 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio. A las 72 horas las ufc adheridas se redujeron un 39,68% (3,21 Log_{10} ufc/cm^2) sobre PTFE y un 41,68% (2,29 Log_{10} ufc/cm^2) sobre titanio.

Conclusiones

La combinación AND+CLA fue la más eficaz sobre PTFE y titanio, reduciendo en más de un 50% la ufc adheridas a los biomateriales. La actividad hexosaminidasa de CLA podría favorecer la penetración del antifúngico. Las combinaciones AND+NAC y AND+RIF fueron menos eficaces que AND sola.

8.1.3 Efficacy of anidulafungin plus ethylenediaminetetraacetic acid against *C. tropicalis* biofilms

Autores: Marcelo Ernesto Fernández Rivero; Emilia Cantón Lacasa; Carmen Losa Maroto; José Luis López Hontangas; Javier Pemán; José Luis Del Pozo León

Congreso: 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Organizador: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
Lugar y fecha de celebración: Copenhague, Dinamarca. 25 al 28 de abril de 2015
Formato de presentación: Póster
Referencia: Poster Nº EV0977. ESCMID eLibrary. https://www.escmid.org

Objectives

Fungal biofilms are involved in infections with both high mortality and health care-associated costs. These biofilms are highly resistant to conventional antifungal agents. It is necessary to explore novel therapeutical approaches to fight against these recalcitrant infections. Previous studies have shown that *C. tropicalis* biofilms are resistant to echinocandins. The aim of this study was to evaluate the combined activity of anidulafungin plus EDTA against *C. tropicalis* biofilms.

Methods

Three strains of *C. tropicalis* were selected; two from invasive clinical isolates and the reference strain (ATCC 750). Susceptibility to anidulafungin for planktonic yeasts was determined following the M27-A3 document and biofilm susceptibility by the XTT reduction assay. *C. tropicalis* biofilms in 96-well plates were exposed to double serial dilutions of EDTA (4.000 - 8 mg/L), alone and combined with 128, 32 and 8 mg/L of anidulafungin. The combination was considered to be synergistic if the reduction of the metabolism was higher than 50% compared with that obtained with each drug alone, and indifferent if lower than 50%. All experiments were performed in triplicate.

Results

Biofilm forming ability was strain dependent. Two strains were classified as high biofilm forming (B10 and B11) and the other as low biofilm forming (B12). Anidulafungin MICs for planktonic yeasts were lower than 0.25 mg/L and for biofilms equal to or greater than 16 mg/L. Biofilm EDTA MICs were greater than 4.000 mg/L. When biofilms were exposed to EDTA, no metabolism reductions were observed at any of the assayed concentrations except for B12, where a reduction between 10-33% was obtained with a concentration lower than 1.000 mg/L.

When exposed to concentrations lower than 1.000 mg/L in combination with 32 or 8 mg/L of anidulafungin, a synergistic activity was observed for B11 and B12. However, for B10 these combinations resulted indifferent. Interestingly, combinations with 128 mg/L of anidulafungin were indifferent for B10 and B11, and for B12 reductions between 10-30% were observed with an EDTA concentration lower than 1.000 mg/L.

Conclusions

C. tropicalis susceptibility to anidulafungin plus EDTA depended primarily on the ability of the strain to form biofilm. Those strains which form more stable and thicker biofilms were more resistant to individual or combined action of the assayed drugs. Paradoxically, the efficacy of the combination anidulafungin plus EDTA is greater at lower concentration of both drugs.

8.1.4 Cinética de formación de biofilms de levaduras sobre superficies de titanio en un *CDC Biofilm Reactor*

Autores: Marcelo Ernesto Fernández Rivero; Carmen Losa Maroto; Aitziber Aguinaga Pérez; Ana Ramos Cabodevilla; Manuel Rubio Vallejo; Emilia Cantón Lacasa; Javier Pemán García; José Luis del Pozo León.

Congreso: XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Organizador: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Lugar y fecha de celebración: Valencia, España. 9 al 11 de abril de 2014

Formato de presentación: Comunicación oral

Referencia: *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32 (Espec Cong 1): 233-234

Introducción

El titanio es un metal idóneo como material protésico por sus excelente biocompatibilidad, su gran tolerancia al estrés mecánico y su alta resistencia a la corrosión. Sin embargo, puede sufrir la colonización por microorganismos que

sobreviven gracias a su desarrollo formando biofilms. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la cinética de formación de la biopelícula de *C. albicans* y *C. tropicalis* sobre superficies de titanio, utilizando un *CDC Biofilm Reactor*, y comparar los resultados con los obtenidos en estudios previos sobre superficies de PTFE.

Material y métodos

Se seleccionaron 4 cepas clínicas y 2 cepas ATCC de *C. albicans* y *C. tropicalis* que presentaron *in vitro* una adherencia clasificada como moderada o fuerte según la metodología descrita por Stepanovic (Stepanović et al. 2000). Partiendo de un inóculo de 10^6 ufc/ml en fase de crecimiento exponencial, se formó la biopelícula sobre discos de titanio de 1.27 cm de diámetro en un *CDC Biofilm Reactor*. Se utilizó Yeast Nitrogen Base suplementado con 100mM de Glucosa como medio de cultivo. Se estudió la cinética de formación de la biopelícula durante 96 horas. Se cuantificó el número de ufc adheridas por unidad de superficie de titanio a las 4, 8, 12, 24, 48. 72 y 96 horas.

Cada disco fue lavado con PBS a 4ºC y sometido a un proceso de agitación vorticial y sonicación (5 minutos a 50 Hz) para liberar la biopelícula. Se realizó un cultivo cuantitativo sobre agar BHA del caldo obtenido tras la sonicación y los recuentos obtenidos se expresaron como Log10 ufc/cm^2. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados

El número de levaduras adheridas sobre PTFE fue siempre mayor que sobre titanio, tanto en *C. albicans* como en *C. tropicalis* y en todos los puntos del ensayo. Se encontraron diferencias para la cantidad de biopelícula formada a partir de las 24 horas de ensayo. Se observó una diferencia significativa (p=0.03) en la cantidad de biopelícula formada de *C. albicans* en PTFE y en titanio. El recuento medio sobre PTFE fue de 4.45 Log_{10} ufc/cm^2, y de 2.54 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio. Se observó una diferencia significativa (p=0.03) en la cantidad de biopelícula formada de *C. tropicalis* en PTFE y en titanio.

El recuento medio sobre PTFE fue de 4.60 Log_{10} ufc/cm^2, y de 2.17 Log_{10} ufc/cm^2 sobre titanio. No se encontraron diferencias significativas (p=1) en la cantidad de biopelícula formada por *C. tropicalis* y *C. albicans* en ambas superficies, aunque tanto en PTFE como en titanio el recuento medio de *C. tropicalis* fue siempre mayor que la de *C. albicans.*

Conclusiones

Las especies de levaduras estudiadas fueron capaces de formar biopelículas estables tanto sobre titanio como sobre PTFE. Sin embargo, los recuentos sobre PTFE fueron mayores que sobre titanio en ambos casos y durante las primeras 96 horas. *C. tropicalis* mostró una mayor capacidad de formación de biofilm que *C. albicans* tanto en superficies de PTFE como de titanio. Sería necesario estudiar tanto la citoarquitectura de las biopelículas, así como la posible influencia de las superficies estudiadas sobre la resistencia a antifúngicos.

8.1.5 Actividad de Anfotericina B y Anidulafungina frente a biofilms de *Candida* no *albicans*

Autores: Marcelo Ernesto Fernández Rivero; Aitziber Aguinaga Pérez; María Luisa Francés; Carmen Losa Maroto; Manuel Rubio Vallejo; Melania Iñigo Pestaña; Emilia Cantón Lacasa; Javier Pemán García; José Luis del Pozo León.
Congreso: XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
Organizador: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
Lugar y fecha de celebración: Zaragoza, España. 29 al 31 de mayo de 2013
Formato de presentación: Comunicación oral
Referencia: *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31 (Espec Cong 1): 267-268

Introducción

El desarrollo de biofilms de *Candida* se asocia con un aumento de la resistencia a los antifúngicos, en comparación con los mismos microorganismos en crecimiento planctónico, y facilita la persistencia de las infecciones asociadas. En trabajos previos de

nuestro grupo hemos demostrado que los azoles presentan una escasa actividad frente a biopelículas de *Candida*. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad *in vitro* de Anfotericina B y Anidulafungina frente a biopelículas de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*.

Material y Métodos

Se determinó la actividad de los antifúngicos frente a las cepas seleccionadas tanto en crecimiento planctónico como en biopelícula. Los ensayos de sensibilidad se realizaron sobre biopelículas formadas durante 48 horas sobre placas microtitulación. La biopelícula se expuso a concentraciones dobles seriadas de los antifúngicos estudiados durante 24 horas.

Se determinó el porcentaje de reducción de las lecturas de absorbancia, obtenidas mediante el ensayo de XTT respecto a la absorbancia del control de crecimiento. Se determinó la concentración mínima capaz de inhibir el 50 y el 90% de la actividad metabólica de la biopelícula ($CMIB_{50}$ y $CMIB_{90}$ respectivamente). Todos los experimentos se realizaron por triplicado, en días separados.

Resultados

Todas las cepas planctónicas fueron sensibles *in vitro* tanto a AMB como a AND. Todas las cepas de *Candida* formaron biopelículas estables a las 24 horas sobre las placas de microtitulación: *C. tropicalis*: media: 2.17, Desviación standard: 0,27; *C. glabrata*: media: 1.83, DE: 0,36; *C. krusei*: media: 1.41, DE: 0.1827) y *Ca. parapsilosis*: media: 0.78, DE: 0.08. Las CMI_{50} y $CMIB_{90}$ de AMB y AND frente a las distintas cepas de las especies estudiadas se muestran en la Tabla 7.1.

Conclusiones

A pesar de que todas las cepas fueron sensibles en su estado planctónico a AMB y AND, la actividad de los antifúngicos frente a las biopelículas fúngicas fue tanto especie- como cepa-dependiente. AND fue más activa que AMB frente a biopelículas de *C glabrata* y *C krusei*. AMB fue más eficaz que AND frente a biofilms de *C. tropicalis*. Las

biopelículas de *C. parapsilosis* fueron los más resistentes tanto a AMB como a AND. Destacar que la valoración de la actividad antifúngica frente a biopelículas de *C. parapsilosis* pudo estar determinada por la escasa capacidad de formación de la biopelícula que presentó esta especie en el presente trabajo.

Tabla 7.1. Sensibilidad de las biopelículas de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* a anfotericina B y anidulafungina.

Especie	anfotericina B		anidulafungina	
	$CMIB_{50}$	**$CMIB_{90}$**	**$CMIB_{50}$**	**$CMIB_{90}$**
C. tropicalis 3105/09	0,156	2,5	0,218	>56
C. tropicalis ATCC® 750	0,312	1,75	<0,109	<0,109
C. tropicalis 988/11	<0,156	1,7	0,437	>56
C. glabrata 309/08	0,312	5	<0,109	0,218
C. glabrata 1016/08	<0,156	1,75	<0,109	0,437
C. glabrata 2818/10	0,312	5	0,109	0,437
C. krusei 510/08	0,625	20	<0,109	0,218
C. krusei ATCC® 6258	0,625	>80	0,218	1,75
C. krusei 2207/09	0,625	40	0,109	0,437
C. parapsilosis 278/08	>80	>80	0,875	>56
C. parapsilosis 2247/08	10	>80	3,5	>56
C. parapsilosis 368/10	1,75	>80	3,5	>56

8.1.6 Cinética de formación de biofilms de *Candida* spp. sobre discos de PTFE en un *CDC Biofilm Reactor*

Autores: Marcelo Ernesto Fernández Rivero; Aitziber Aguinaga Pérez; María Luisa Francés; Carmen Losa Maroto; Manuel Rubio Vallejo; Melania Iñigo Pestaña; Emilia Cantón Lacasa; Javier Pemán García; José Luis del Pozo León.

Congreso: XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Organizador: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Lugar y fecha de celebración: Zaragoza, España. 29 al 31 de mayo de 2013

Formato de presentación: Comunicación oral

Referencia: *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31 (Espec Cong 1): 263-264

Introducción

El conocimiento del proceso de formación de biofilms de *Candida* spp, así como su composición y citoarquitectura, es fundamental para poder desarrollar nuevas estrategias preventivas o terapéuticas. El objetivo de este trabajo fue determinar la cinética de adherencia y formación de biofilms de diferentes especies de *Candida* sobre discos de PTFE, en condiciones dinámicas utilizando un *CDC Biofilm Reactor*.

Material y Métodos

En el estudio se emplearon las siguientes especies de *Candida*: *Candida albicans, Candida famata, Candida parapsilosis, Candida glabrata, Candida tropicalis* y *Candida krusei*. Se desarrollaron los biofilms sobre discos de PTFE de 1,27 cm de diámetro en un *CDC Biofilm Reactor* sometido a agitación (150 rpm). Se utilizó un inóculo de 106 ufc/mL de *Candida* spp. en fase de crecimiento exponencial. El medio de cultivo para la generación de los biofilms fue Yeast Nitrogen Base suplementado con 100 mM de dextrosa. Se estudió la cinética de adherencia durante 96 horas. Para ello se procedió a extraer tres discos a distintos intervalos de tiempo (24, 48, 72 y 96 h). Los discos extraídos fueron lavados con 15 mL de PBS a 4 ºC.

A continuación, se sometieron a un proceso de agitación vorticial (1 minuto) + sonicación (5 minutos a 50 Hz) + agitación vorticial (1 minuto). El caldo obtenido tras la sonicación, se cultivó de forma cuantitativa y los recuentos se expresaron en términos de Log_{10} ufc/cm^2. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados

A las 96 horas de incubación se obtuvo un recuento máximo en los biofilms de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, observándose un incremento mantenido del recuento desde las primeras horas de incubación. Sin embargo, en las cepas de *C. famata* y *C. glabrata*, el recuento máximo se obtuvo hacia las 48 horas, apreciándose una tendencia a la disminución de la adherencia a medida que transcurría el tiempo. En la Tabla 7.2 se muestran los resultados.

Tabla 7.2. Recuentos de células viables adheridas a PTFE

	Recuentos (Log_{10} ufc/cm^2)			
Especie	**24 horas**	**48 horas**	**72 horas**	**96 horas**
C. albicans	3,43 ± 0,16	3,64 ± 0,23	3,67 ± 0,19	4,15 ± 0,18
C. famata	5,06 ± 0,04	6,37 ± 0,38	5,74 ± 0,34	6,14 ± 0,55
C. glabrata	3,7 ± 0,25	4,17 ± 0,12	4,21 ± 0,28	3,92 ± 0,03
C. parapsilosis	4,9 ± 0,13	5,53 ± 0,54	5,91 ± 0,67	5,93 ± 0,18
C. krusei	3,35 ± 0,37	3,44 ± 0,30	3,35 ± 0,29	3,57 ± 0,13
C. tropicalis	6,03 ± 0,37	7,16 ± 0,75	7,41 ± 0,98	7,93 ± 0,97

Conclusiones

Hemos encontrado diferencias tanto en la cantidad de biopelícula formada como en la cinética de formación observada. *C. famata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* son las especies que forman una mayor cantidad de biofilm. *C. famata* y *C. glabrata* muestran un modelo de cinética diferente con una disminución de la cantidad de biopelícula formada a partir de las 48-72 horas. Este hecho podría estar relacionado con la incapacidad de formar.

8.2 PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

8.2.1 Actividad de anfotericina B, anidulafungina, solas y combinadas, frente a biopelículas de *Candida tropicalis* formadas sobre teflón® y titanio

Autores: Marcelo Ernesto Fernández-Rivero, José Luis del Pozo, Amparo Valentín, Araceli Molina de Diego, Javier Pemán, Emilia Cantón.
Revista: Revista Iberoamericana de Micología
Estado de la publicación: Aceptado para publicación.

Resumen

Antecedentes: Las estrategias terapéuticas actuales poseen una limitada eficacia para erradicar biopelículas de *Candida* spp. formadas en la superficie de los dispositivos

biomédicos. Pocos estudios han evaluado la eficacia de los antifúngicos sobre biopelículas de *Candida tropicalis.*

Objetivos: Evaluar la actividad de anfotericina B (AMB) y de anidulafungina (AND), solas y combinadas, sobre biopelículas de *C. tropicalis* desarrolladas en superficies de politetrafluoroetileno (PTFE) y titanio mediante ensayos de letalidad-tiempo.

Métodos: Los ensayos se realizaron en un CDC Biofilm Reactor (CBR) sobre biopelículas de 24 horas de maduración formadas en discos de PTFE y titanio. Las concentraciones ensayadas fueron AMB 40 mg/L, AND 8 mg/L y la combinación de ambas. Tras 24, 48 y 72 horas de exposición a los antifúngicos se determinaron las ufc/cm^2 mediante agitación vorticial y cultivo cuantificado previa sonicación.

Resultados: AMB redujo las células viables adheridas a PTFE y titanio en más de un 99% y AND en un 89.3% en PTFE y 96,8% en titanio. La combinación AMB+AND fue menos activa que la AMB sola tanto en PTFE (descenso en ufc/cm^2 de 3,09 Log_{10} *vs.* 1,08 en la combinación) como en titanio (4,51 *vs.* 1,53 en la combinación) siendo la interacción indiferente en ambas superficies.

Conclusiones: AMB es más activa que AND sobre biopelículas de *C. tropicalis*. La mortalidad es mayor en titanio. La combinación AMB+AND es menos eficaz que AMB sola en ambas superficies.

Introducción

Las infecciones relacionadas con biopelículas de *Candida* spp. se han convertido en un importante problema sanitario en los últimos años (Ramage et al. 2006), no solo porque las células en el interior de la biopelícula muestran una mayor resistencia a los antimicrobianos, sino que además están protegidas del sistema inmune (Chandra et al. 2001a). Las estrategias terapéuticas actuales poseen una limitada eficacia para erradicar biopelículas formadas en la superficie de los dispositivos biomédicos colonizados, lo cual obliga en muchas ocasiones a intervenciones quirúrgicas para su retirada y así controlar la infección. *Candida* spp. es capaz de formar biopelículas sobre una gran variedad de biomateriales, desde polímeros plásticos utilizados en catéteres vasculares como el

politetrafluoroetileno (PTFE) hasta materiales metálicos como el titanio, utilizados habitualmente para la fabricación de prótesis osteoarticulares (Nobile y Johnson 2015).

Aunque *Candida albicans* es la especie más comúnmente relacionada con estas infecciones, *Candida tropicalis* ha emergido como un importante patógeno asociado a pacientes inmunodeprimidos, ingresados en unidades de críticos y en pacientes neutropénicos (Douglas 2003) (Kothavade et al. 2010). En la actualidad, la anfotericina B (AMB) y las equinocandinas han demostrado ser eficaces frente a biopelículas de *C. albicans* (Kuhn et al. 2002b) (Pemán et al. 2008) (Valentín et al. 2007) y se ha propuesto su utilización para el sellado de catéteres venosos centrales (Toulet et al. 2012). Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con *C. albicans*, hay pocos estudios que evalúen la eficacia de estos antifúngicos sobre las biopelículas de *C. tropicalis* (Pemán et al. 2008) (Valentín et al. 2007).

La mayor parte de los trabajos relacionados con biopelículas de *Candida* spp. se han realizado analizando la actividad metabólica de las células en la biopelícula, mediante el ensayo de reducción del XTT en placas de poliestireno de 96 pocillos (Pierce et al. 2008) (Ramage et al. 2001b). En la actualidad se dispone de varios modelos *in vitro* para el estudio de biopelículas microbianas, como pueden ser los dispositivos de Calgary, el de Robbins o el CDC Biofilm Reactor (CBR). El CBR ha sido estandarizado por la American Society for Testing Materials (Método E2562 - 12) (Goeres et al. 2005) y destaca por ser una herramienta eficaz para estudiar la interacción entre el microorganismo y distintos biomateriales con la ventaja de que el fluido está en movimiento. Además, permite evaluar la influencia del biomaterial tanto en la adherencia como en la sensibilidad a los antimicrobianos (Coenye et al. 2011) (Parra-Ruiz et al. 2010).

El presente estudio posee un doble propósito: 1) Estudiar la cinética de formación de biopelículas de *C. tropicalis* en dos biomateriales con propiedades fisicoquímicas muy distintas, como el PTFE (hidrófobo) y el titanio (hidrófilo) y 2) evaluar la actividad de AMB y anidulafungina (AND), solas y combinadas, sobre la biopelícula formada en estos materiales.

Materiales y Métodos

CBR y Biomateriales: El CBR (modelo CBR 90-1) y los biomateriales fueron suministrados por BioSurface Technologies Corporation (Bozeman, MT, EE.UU.). El CBR está equipado con ocho portadiscos, incluidos en un recipiente de 1 litro de capacidad. Cada portadisco aloja tres discos de 1,27 cm de diámetro y 0,4 cm de grosor, permitiendo un total de 24 oportunidades de muestreo. Los biomateriales utilizados fueron PTFE (Modelo RD 128-PTFE) y titanio comercialmente puro (Modelo RD128-Ti).

Antifúngicos: AMB soluble (Ref. A9528) fue suministrada por Sigma-Aldrich (Madrid, España) y disuelta en agua estéril. AND fue suministrada por Pfizer (Madrid, España) en forma de polvo valorado y se disolvió en dimetil sulfóxido. Las concentraciones ensayadas fueron 40 mg/L de AMB y 8 mg/L de AND, las cuales podrían ser potencialmente útiles en una terapia de sellado antifúngico de catéter venoso central.

Caracterización fenotípica del aislado: El aislado de *C. tropicalis* utilizado fue recuperado de un paciente durante un episodio de candidemia asociada a catéter. La capacidad para formar biopelícula se determinó por el método de tinción con cristal violeta y el ensayo de reducción del XTT (Valentín et al. 2007) (Pierce et al. 2008) (Stepanović et al. 2000). La sensibilidad de las células planctónicas a AMB y AND se determinó según el método de microdilución en caldo del CLSI (documento M27-A3) (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008). La CMI de AMB se definió como la concentración más baja capaz de inhibir el 100% del crecimiento. La CMI de AND se definió como la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento ≥50%. La sensibilidad de la biopelícula a AMB y AND se determinó en placas de 96 pocillos mediante el ensayo de reducción del XTT previamente descrito (Valentín et al. 2007). La CMI de las células en biopelícula (CMIB) se definió como la concentración más baja de antifúngico capaz de reducir la actividad metabólica de la biopelícula ≥ 50% ($CMIB_{50}$) o ≥90% ($CMIB_{90}$).

Curvas de letalidad: El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 horas en agar de Sabouraud glucosa, suspendiendo 1-3 colonias en solución salina estéril y ajustando a una densidad óptica 2 de la escala de 2 McFarland (10^7ufc/mL). El CBR, equipado con

los discos de PTFE, titanio y con 400 mL de Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.) suplementado con glucosa 100 mM (YNBG) se inoculó con 1 mL de la suspensión. Posteriormente, se colocó el CBR en un agitador magnético ajustado a 250 rpm. La temperatura se mantuvo durante todo el experimento a 30°C ± 1°C. Después de 24 horas de incubación se retiraron asépticamente tres discos de PTFE y tres discos de titanio para cuantificar el número de células viables en sus superficies previa agitación vorticial y cultivo tras sonicación. Posteriormente, se añadió a cada unidad CBR 40 mg/L de AMB y 8 mg/L de AND, solas y combinadas. A las 24, 48 y 72 horas de haber añadido el antifúngico se retiraron discos de PTFE y titanio para determinar el número de células viables en la biopelícula. Como control, se utilizó un CBR en las mismas condiciones de ensayo, pero sin antifúngico.

Recuento de células viables adheridas a los discos de PTFE y titanio: Una vez extraído el disco del CBR se lavó con 14 mL de PBS estéril con el fin de eliminar las células no adheridas, se depositó en un tubo con 1 mL YNBG y se sometió a agitación vorticial durante 1 min a 2500 rpm, sonicación (Modelo Ultrasons-H; JP Selecta, Barcelona, España) durante 5 min a 50 KHz y nueva agitación vorticial durante 1 min a 2500 rpm. Posteriormente, 0,1 mL del caldo tras sonicación obtenido se diluyó (1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000) en solución salina estéril y 0,1 mL de cada dilución se cultivó en *Brain Heart Infusion Agar* (Becton Dickinson, EE. UU). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37ºC. Los resultados del cultivo tras sonicación (ufc/mL) se transformaron en Log_{10} ufc/cm^2 según la ecuación descrita por Goeres et al. (Goeres et al. 2005) teniendo en cuenta que el área de cada superficie del disco es 1,267 cm^2. Con el fin de minimizar el sesgo, los dos biomateriales se ensayaron en el mismo CBR. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis de los datos: Siguiendo los criterios establecidos para las curvas de letalidad, la interacción entre AMB y AND se clasifica como sinérgica si la disminución en células viables (ufc/cm^2) a las 72 horas es $\geq$ 2 Log_{10} en comparación con el antifúngico más activo, indiferente si la diferencia en células viables es <2 Log_{10} y $\geq$1 Log_{10}, y antagónico cuando hay un incremento en células viables $\geq$ 2 Log_{10} en comparación con el antifúngico menos activo (Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2016) (Lewis et al. 2002). Se realizó un modelo de regresión lineal con triple interacción (tiempo, biomaterial y antifúngico) para detectar diferencias significativas ($p < 0,05$) en los recuentos de células

viables y en las cinéticas de letalidad. Los análisis se realizaron con el programa estadístico R (versión 3.3.2).

Resultados

C. tropicalis fue capaz de formar biopelícula en placas de poliestireno y se clasificó como muy adherente, utilizando tanto el procedimiento de tinción con violeta cristal como el ensayo de reducción del XTT. La CMI de AMB y AND fue de 0,25 mg/L y 0,03 mg/L respectivamente. La $CMIB_{50}$ y $CMIB_{90}$ de AMB fue 4 mg/L y >8 mg/L, respectivamente y las de AND fueron en ambos casos > 16 mg/L.

En la Tabla 1 se muestra el número de células viables (Log_{10} ufc/cm^2) presentes en el biopelícula de *C. tropicalis* formada en las superficies de PTFE y de titanio en presencia y ausencia de los antifúngicos. En el control a partir de las 24 horas no se observó un aumento significativo ($p>0.05$) de células viables adheridas a la superficie de ambos biomateriales, aunque el número de células adheridas fue ligeramente mayor en PTFE. A las 24 horas de la adición de AMB, se observó una reducción en el número de ufc/cm^2 en la biopelícula de 3,09 Log_{10} (99,6% de mortalidad) en PTFE y de 2,84 Log_{10} (99,5% de mortalidad) en titanio. La letalidad en PTFE no aumentó significativamente después de 48 y 72 horas de exposición al antifúngico ($p>0,05$). Por el contrario, en titanio, la mortalidad fue del 100% a las 48 horas y se mantuvo hasta el final del experimento.

La exposición a AND sola durante 24 horas produjo una la disminución de células viables de 0,42 Log_{10} ufc/cm^2 (36,4% de mortalidad) en PTFE y de 0,51 (55,4% de mortalidad) en titanio; la mortalidad no aumento significativamente con el tiempo de incubación (Figura 1). La actividad de AMB fue significativamente mayor ($p<0,05$) sobre las biopelículas formadas en titanio. AMB fue más activa que AND sobre las biopelículas formada en ambas superficies ($p <0,05$).

La combinación de AMB y AND alcanzó una reducción de células viables a las 24 horas de 1,08 Log_{10} ufc/cm^2 (89,3% de mortalidad) en PTFE y 1,53 (96,8% de mortalidad) en titanio. En las superficies de titanio se mantuvo constante el número de células viables, mientras que en PTFE se observó un aumento de las mismas a las 24 y 72 horas. (Tabla 1 y Figura 1). La actividad de la AMB se redujo significativamente en presencia de AND ($p <0,05$) tanto en PTFE (3,09 Log_{10} ufc/cm^2 *vs.* 1,08 combinadas) como en titanio (4,51

vs. 1,53 combinadas). No se obtuvieron diferencias significativas entre la actividad de la combinación y la AND sola en ninguno de los dos biomateriales ensayados ($p>0,05$).

Discusión

Nuestros resultados muestran que la AMB es significativamente más eficaz que AND sobre las biopelículas de *C. tropicalis* formadas en la superficie de titanio y PTFE ($p <0,05$). En la actualidad, no hemos encontrado estudios que hayan analizado la actividad de estos antifúngicos sobre las biopelículas de *C. tropicalis* formadas en distintos biomateriales, ni usando el CBR como modelo *in vitro* ni realizando curvas de letalidad. Nuestro estudio muestra la escasa actividad de AND sobre las biopelículas desarrolladas en ambos biomateriales, los cuales permanecen colonizados después de 72 horas de exposición al fármaco; la resistencia de las biopelículas de *C. tropicalis* a AND ya había sido descrita utilizando otras metodologías (Pemán et al. 2008) (Valentín et al. 2007) (Bernhardt et al. 2011). Por el contrario, AMB es capaz eliminar más del 99% de las células adheridas a los dos biomateriales, e incluso esterilizar la superficie del titanio después de 48 horas de exposición, aunque no consigue erradicar todas las células adheridas al PTFE.

Sin embargo, la actividad de la combinación AMB+AND es inferior que la de AMB sola. Al final del experimento (72 horas) la interacción, siguiendo los criterios establecidos para las curvas de letalidad, se clasificó como indiferente en ambos biomateriales. En cambio, analizado gráficamente las curvas obtenidas con respecto al antifúngico más activo (AMB) es posible visualizar una cierta tendencia al antagonismo puesto que la adición de AND conlleva una disminución de la actividad de AMB de 2,01 Log_{10} en PTFE y de 2,98 Log_{10} en titanio.

La mayoría de los estudios de sensibilidad de las biopelículas a los antifúngicos, se han realizado principalmente con *C. albicans* utilizando el ensayo de reducción del XTT y se dispone de pocos datos sobre la actividad de estos en otras especies de *Candida* (Pemán et al. 2008) (Valentín et al. 2007) (Silva et al. 2010). Aunque AND ha demostrado ser eficaz frente a la biopelícula de *C. albicans* (Pemán et al. 2008) (Jacobson et al. 2008) no ocurre lo mismo con las biopelículas de *C. tropicalis*, ya sea mediante la medida de la actividad metabólica (XTT) o determinando las ufc adheridas al biomaterial

(CBR). Estas diferencias entre las dos especies podrían estar relacionadas con la composición de la matriz extracelular, glucosa en *C. albicans* y hexosaminas en *C. tropicalis*, lo cual podría influir en la tasa de difusión del antifúngico al interior de la biopelícula (Bizerra et al. 2008). Por otra parte, las diferencias en la eficacia de los antifúngicos entre ambos biomateriales podrían ser explicadas por las distintas características de la superficie de los biomateriales ensayados. Liu et al. (Liu y Filler 2011) observaron que la adherencia de *Candida* spp. a superficies inertes está mediada por proteínas con dominios hidrofóbicos que podrían facilitar la adherencia a las superficies hidrófobas (PTFE) y así explicar las diferencias encontradas entre ambos biomateriales.

Varios autores han estudiado la influencia de la hidrofobicidad del biomaterial en la tasa de crecimiento de la biopelícula (Samaranayake et al. 1995) (Minagi et al. 1985) y nuestro estudio sugiere que esta propiedad superficial también influye sobre la tasa de mortalidad. Las diferencias en las características superficiales del PTFE (hidrófobo) y del titanio (hidrófilo) podrían explicar las diferencias de mortalidad encontradas entre los dos biomateriales.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que las características fisicoquímicas de las superficies son un factor importante en la evolución de las infecciones relacionadas con las biopelículas de *Candida* spp. y deben tenerse en cuenta en la elección del biomaterial de los dispositivos biomédicos.

Una de las limitaciones de este estudio es la utilización de un solo aislado de *C. tropicalis*. Sin embargo, es una cepa que ha sido seleccionada previamente por su gran capacidad para formar biopelícula a las 24 horas en el CBR. Otra limitación son las concentraciones ensayadas, aunque cercanas a las concentraciones séricas máximas tras la administración de una dosis estándar (Liu et al. 2013) (Cifani et al. 2012), no son fisiológicas ya que se mantienen durante un corto periodo de tiempo; no obstante, al ser tan elevadas (>100 veces la CMI), nos dan información para su posible utilización en una terapia de sellado antifúngico de catéter venoso central.

En resumen, nuestros resultados ponen de manifiesto la influencia de los biomateriales en el desarrollo de la biopelícula. AMB es más activa que AND en ambos

biomateriales y la mortalidad de ambos antifúngicos es mayor sobre superficies de titanio. Además, también muestran la pérdida de actividad de la AMB cuando se combina con AND, lo que sugiere que podría no ser apropiada para el tratamiento de las infecciones relacionadas con el biopelícula de *C. tropicalis*.

Tablas y figuras

Tabla 1. Cuantificación de células viables en la biopelícula de *C. tropicalis* desarrollada en PTFE y titanio, después de la exposición a anfotericina B (AMB), anidulafungina (AND) y la combinación de ambas.

		Log_{10} ufc/cm^2			
Antifúngicos	**Biomaterial**	**0 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**
Control	PTFE	4.85± 0.20	4.91± 0.60	4.59± 0.19	4.57± 0.11
	Titanio	4.24± 0.04	4.23± 0.26	4.22± 0.49	4.48± 0.38
AMB 40 mg/L	PTFE	4.71 ± 0.36	1.62 ± 1.08	2.56 ± 0.25	2.27 ± 0.98
	Titanio	4.51 ± 0.36	1.67 ± 0.92	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
AND 8 mg/L	PTFE	4.08 ± 0.54	3.66 ± 0.93	4.08 ± 0.33	3.75 ± 0.16
	Titanio	3.91 ± 0.09	3.40 ± 0.01	3.49 ± 0.24	3.02 ± 0.36
AMB 40 mg/L + AND 8 mg/L	PTFE	3.97 ± 0.22	2.90 ± 0.48	3.54 ±0.12	3.74 ± 0.00
	Titanio	4.26 ± 0.10	2.73 ± 0.07	2.60 ±0.18	2.89 ± 0.16

Los datos representan la media ± desviación estándar de tres discos

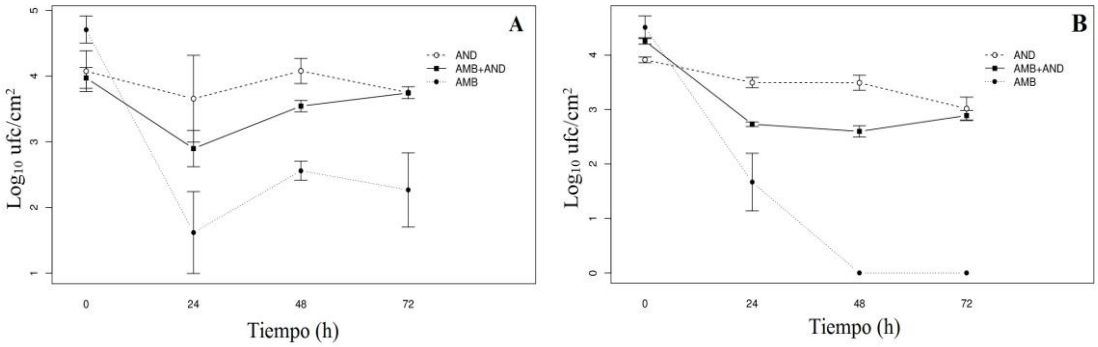


Figura 1. Cinética de letalidad de anidulafungina 8 mg/L (AND), anfotericina B 40 mg/L (AMB), y AMB 40 mg/L más AND 8 mg/L frente a la biopelícula de *C. tropicalis* formada sobre PTFE (A) y titanio (B). Cada punto representa la media ± desviación estándar de tres discos.

8.2.2 Activity of Amphotericin B and Anidulafungin Combined with Rifampicin, Clarithromycin, Ethylenediaminetetraacetic Acid, N-Acetylcysteine and Farnesol Against *Candida tropicalis* Biofilms

Autores: Marcelo Ernesto Fernández-Rivero, José Luis del Pozo, Amparo Valentín, Araceli Molina de Diego, Javier Pemán, Emilia Cantón.

Revista: *Journal of Fungi*

Estado de la publicación: Publicado. *Journal of Fungi*, 3(1), 16.

Abstract

We evaluated the activity of 1) amphotericin-B (AMB) combined with rifampicin (RIF), clarithromycin (CLA), N-acetylcysteine (NAC), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and farnesol (FAR) (1000, 1000, 1000, 4000, 30,000 mg/L and 300 µM, respectively) against *Candida tropicalis* biofilms formed on polytetrafluoroethylene (PTFE) and 2) anidulafungin (ANF) combined with the same compounds at 8, 10, 5, 40, 30 mg/L and 30 µM, respectively against biofilms formed on titanium. Biofilm growth kinetics were performed in a CDC Biofilm Reactor (CBR). PTFE or titanium disks were removed from the CBR at 24, 48, 72 and 96 hours to determine the $Log_{10}CFU/cm^2$. Killing kinetics were performed by adding the drugs to 24-hour-mature biofilms (time 0). Disks were removed after 24, 48 and 72 hours of drug exposure to determine $Log_{10}CFU/cm^2$. Viable cells in biofilms were 4.73 and 4.29 $Log_{10}CFU/cm^2$ on PTFE and titanium, respectively. Maximum Log_{10} decreases in CFU/cm^2 depends on the combination and were: 3.53 (AMB+EDTA), 2.65 (AMB+RIF), 3.07 (AMB+NAC), 2.52 (AMB+CLA), 1.49 (AMB+FAR), 2.26 (ANF+EDTA), 2.45 (ANF+RIF), 2.47 (ANF+NAC), 1.52 (ANF+CLA) and 0.44 (ANF+FAR). In conclusion, EDTA, NAC, RIF and CLA improve the activity of AMB and ANF against biofilms developed on both surfaces, which could be an effective strategy against *C. tropicalis* biofilm-related infections.

Introduction

Biomedical devices are essential for treatment of a number of diseases, substantially improving the quality of life and survival of patients. Several materials are commonly used in the manufacture of these devices. Plastic polymers such as

polytetrafluoroethylene (PTFE, commercially known as Teflon®) are hydrophobic materials commonly used for the manufacture of catheters. On the other hand, about 80% of hip and knee prostheses are manufactured using metallic biomaterials such as titanium (a hydrophilic surface), which, due to its excellent biocompatibility, has gained importance in the last few years. However, *Candida* spp. are able to attach to biomaterials and tissues, and once an organism colonizes the surface of a device, it forms a complex microbial community named biofilm that grows embedded in a polymeric extracellular matrix that is regulated by quorum sensing molecules (Habash y Reid 1999). These biofilms are exposed to a wide range of drug concentrations during the treatment. For example, biofilms formed on catheters are exposed to high concentrations during the antimicrobial-lock therapy (ALT) (Fortún et al. 2006), while biofilms formed on prosthesis are exposed to drug concentrations usually reached in serum after administration of standard doses (Del Pozo JL. Patel 2009). *Candida* spp. biofilm cells have proved to be more resistant to conventional antifungal agents than planktonic cells, and several authors have observed that this resistance especially affects azoles (Mukherjee et al. 2003). Furthermore, some species such as *Candida tropicalis* have also a reduced susceptibility to echinocandins when grown in a biofilm (Pemán et al. 2008).

Various strategies have been proposed for the prevention and treatment of *Candida* infections related to biomedical devices; for example, the use of antimicrobial agents combined with anti-biofilm compounds such as chelating agents, matrix disrupters, quorum sensing molecules and antibiotics. Among these substances, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), a calcium chelating agent, inhibits the transport and assemblage of cell wall components and also affects the morphogenesis of *Candida albicans* by altering the calcium-dependent calmodulin modulations (Gil et al. 1994).

N-acetylcysteine (NAC), is a mucolytic and antioxidant agent that reduces cellular adherence and extracellular matrix production in bacterial biofilms (Olofsson et al. 2003). Rifampicin (RIF) and clarithromycin (CLA) are two antibiotics which inhibit the bacterial RNA polymerase and ribosome, respectively. It has been reported that RIF also displays activity against the fungal RNA polymerase, and CLA induces the activity of enzymes such as hexosaminidases, that could affect hexosamines, an important component of *C. tropicalis* biofilm matrix (Del Pozo et al. 2011). Farnesol (FAR) is a quorum sensing molecule that is self-produced by *C. albicans* biofilms as a response to high cell densities.

It inhibits yeast-hyphae transition and disrupts the biofilms to prevent nutrient depletion by overpopulation (Ramage et al. 2002b). The use of these compounds in combination with antifungal agents could be an effective strategy to prevent and/or eradicate *C. tropicalis* biofilm formed on the surface of biomedical devices.

The aim of our study was to evaluate the activity of amphotericin B (AMB) and anidulafungin (ANF) alone and combined with RIF, CLA, NAC, EDTA and FAR, against *C. tropicalis* biofilms formed on PTFE and titanium, using the CDC Biofilm Reactor (CBR) as an *in vitro* model.

Materials and methods

Drugs and concentrations assayed: AMB, EDTA, NAC and FAR were provided by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and dissolved in dimethyl sulfoxide (AMB, FAR) and water (EDTA, NAC). ANF (Pfizer, Madrid, Spain), RIF (Sanofi-Aventis, Barcelona, Spain) and CLA (Abbott, Madrid, Spain) were provided as pure powder by manufacturers and dissolved in dimethyl sulfoxide (ANF) and water (RIF, CLA). Stock solutions were stored at -80 ºC until use within one year. The maximum DMSO concentration in the CBR was always ≤ 1%.

Concentrations assayed against biofilms formed on PTFE were those potentially used in ALT: AMB 1000 mg/L, RIF 1000 mg/L, CLA 1000 mg/L, EDTA 30,000 mg/L, NAC 4000 mg/L and FAR 300 µM (Ko et al. 2010),(Chauhan et al. 2012),(Lee et al. 2006), (Dalbøge et al. 2014). Against biofilms formed on titanium, the concentrations assayed were chosen taking into account the peak serum concentration reached after the administration of standard doses: ANF 8 mg/L, RIF 10 mg/L, CLA 5, EDTA 30 mg/L, NAC 40 mg/L and FAR 30 µM (Liu et al. 2013),(Guillaume et al. 2012),(Soldini et al. 2005). Concentrations of EDTA and FAR were chosen since they have been used by other authors (Ramage et al. 2007),(Ramage et al. 2002b).

CBR and Biomaterials: The CBR has been described elsewhere (Goeres et al. 2005). Briefly, a CBR (model CBR 90, BioSurface Technologies, Bozeman, MT, USA) consists of eight rods inserted in a ported lid and mounted in a 1-liter glass vessel (Figure 1). Each rod houses three removable disks, which allow a total of 24 sampling opportunities. Disks

act as biofilm growth surfaces and have a diameter of 1.27 cm and a height of 0.4 cm. In our case, the CBR was set up with 12 PTFE disks (Model RD128-PTFE) or 12 commercially pure titanium disks (Model RD128-Ti).

Isolate selection and characterization: *C. tropicalis* B10, identified by its biochemical properties (Vitek 2, bioMérieux, Marcy-l′Étoile, France), was selected in a previous screening of eight strains isolated from patients with catheter-related *C. tropicalis* bloodstream infection for its highly biofilm-forming capacity at 24 hours, determined by crystal violet staining and XTT reduction assay (Stepanović et al. 2000),(Pierce et al. 2008). Planktonic MIC of AMB and ANF was determined by the reference CLSI broth microdilution method (M27-A3 document) (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008). ANF and AMB MICs were defined as the lowest drug concentration that caused a reduction of growth ≥50% and 100%, respectively, compared with the control (without antifungal agents). Biofilm MICs (BMIC) were determined by XTT reduction assay as we describe elsewhere (Pemán et al. 2008),(Valentin et al. 2012). The influence of anti-biofilm compounds on the biofilm metabolic activity were assayed by the XTT reduction assay. Cell surface hydrophobicity (CSH) was performed using the water-cyclohexane biphasic assay, previously described, that takes into account the number of cells removed from the aqueous phase (Gelis et al. 2012).

Biofilm Growth kinetics: Growth kinetics curves were performed in the CBR filled with 400 ml Yeast Nitrogen Base with glucose 100 mM (YNBG). Before the test was performed, the isolate was subcultured at least twice and grown for 24 hours on Sabouraud dextrose agar. The inoculum was prepared by suspending 1 to 3 colonies in phosphate buffered saline pH 7.3 (PBS) and adjusting cell density to 2 McFarland standard. The CBR was charged with 1 ml of this cell suspension (final concentration in the CBR ranged from 8×10^4 to 2.7×10^5 CFU/mL) and placed on a stir plate with a rotational speed of 125 rpm. CBR was operated for 96 hours and was maintained at 30 ºC during the experiment. A CBR with 1% of DMSO but without antifungal agent was used as control for antifungals dissolved in DMSO.

At predetermined time points (24, 48, 72 and 96 hours), three disks were removed to ascertain the number of viable cells attached to the surfaces. Disks were rinsed with 14 mL PBS to remove non-adherent cells. Then, each one was placed in 1 mL YNBG, vortexed for 1 min, sonicated at 50 kHz for 1 min and vortexed again (1 min) to recover

the viable cells attached. Samples were then serially diluted and 0.1 mL of each dilution was plated onto brain heart infusion agar and incubated overnight at 37 ºC to determine the CFU. The lower limit of accurate and reproducible detectable colony counts in this model was 10 CFU/mL. Results, expressed in CFU/mL, were transformed into Log_{10} CFU/cm^2 taking into account that the area of each disk is 1.27 cm with two surfaces where biofilms can grow. All time-kill studies were evaluated in triplicate and on at least two different days to ensure reproducibility.

Killing kinetics of antifungals plus anti-biofilm compounds: AMB, ANF, RIF, CLA, EDTA, NAC and FAR alone or combined were added to the CBR containing 24-hour biofilms formed on PTFE or titanium. Before adding the drugs, one rod of PTFE or titanium was extracted from the CBR to determine the number of viable cells attached to its surface at 24 hours (time 0). After 24, 48 and 72 hours of drug exposure, disks were removed from the holders to establish the number of viable cells attached by using the same protocol as described above. Reductions in colony counts (Δ Log_{10} CFU/cm^2) at each time point were determined with respect to biofilm control at the same time point.

Data analysis: The effect of AMB and ANF combined with anti-biofilm compounds was defined following the established criteria for synergism by time kill curves (Lewis et al. 2002),(Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2016): synergistic when the decrease in CFU/cm^2 at 72 hours was $\geq$ 2 Log_{10} compared with that obtained with the antifungal agent alone; improved when the decrease was < 2 Log_{10} and $\geq$1 Log_{10}; no interaction when the difference was <1 Log_{10}; and antagonistic when there was an increase in CFU/cm^2 $\geq$ 2 Log_{10} compared with that obtained with the antifungal agent alone. Differences among groups were assessed with the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. A p value $\leq$0.05 was considered statistically significant.

Results

Table 1 shows the susceptibility of *C. tropicalis* to antifungal agents and anti-biofilms compounds. CV staining (OD_{550}: 3.42, Cut-off: 0.178) and XTT reduction assay (OD_{492}: 1.024) classified this isolate as highly adherent (OD_{550}>4xCut-off, OD_{492}>1) following the classification reported by Stepanovic *et al*. for crystal violet assay and Valentin *et al*

for XTT reduction assay (Stepanović et al. 2000) (Valentín et al. 2007). The CSH was 73.47% (OD_{600} of the control: 0.49; OD_{600} after cyclohexane overlay: 0.13). Biofilm growth kinetics curves showed that *C. tropicalis* was able to colonize both PTFE and titanium surfaces. The number of viable cells in the biofilm control at 0, 24, 48 and 72 hours were on PTFE: 4.85±0.2, 4.91±0.6, 4.59±0.19 and 4.57±0.11 Log_{10} CFU/cm^2 and on titanium: 4.24±0.04, 4.23±0.26, 4.22±0.49, 4.48±0.38 Log_{10} CFU/cm^2, respectively. There was no difference between the number of viable cells present in the biofilms exposed to RIF, EDTA, NAC, CLA and FAR alone and those present in the biofilm control (data not shown).

Figure 2 shows the activity of AMB alone and combined with RIF, CLA, EDTA, NAC and FAR against *C. tropicalis* biofilms formed on PTFE disks. AMB alone reduced the viable cells in the biofilm by 0.82 Log_{10} (84.8 % killing) at 24 hours. From this point, a slow recovery was observed and, at the end of the experiment, the number of viable cells was 0.35 Log_{10} (5.31±0.24 Log_{10} CFU/cm^2), superior to that of time 0. Cell reduction after AMB+EDTA and AMB+RIF exposure increased with time, reaching a maximum Log_{10} reduction of 3.53 Log_{10} (99.9 % killing) and 2.65 Log_{10} (99.8 % killing), respectively, at the end of the experiment (72 hours) this reduction being significant ($p<0.05$). With AMB+NAC, AMB+CLA and AMB+FAR, the maximum Log_{10} reduction was 3.07, 2.52, and 1.49 Log_{10}, respectively (99.9, 99.7 and 96.7 % killing) after 24 hours, it being significant ($p<0.05$) for the first two combinations. It must be noted that while kinetics of the combinations AMB+EDTA and AMB+RIF was linear ($r^2 = 0.91$ and 0.88, respectively) for the other combinations (AMB+NAC, AMB+CLA and AMB+FAR) a regrowth in CFU/cm^2 was observed after 24 hours. The interaction of AMB plus RIF or EDTA was synergistic, while CLA or NAC improved the activity of AMB with a tendency to synergism. On the contrary, the interaction of AMB plus FAR was indifferent.

Figure 3 shows the activity of ANF alone and combined with FAR, EDTA, RIF, CLA and NAC against *C. tropicalis* biofilm developed on titanium disks. ANF alone reached the maximum effect at 72 hours (0.9 Log_{10} decrease, 87.3 % killing). The combination of ANF+FAR was less active than ANF alone (0.44 Log_{10} decrease, 63.48 % killing). The effect ANF +EDTA and ANF +RIF combinations increased linearly with time (r^2= 0.92 and 0.96, respectively), producing Log_{10} decreases in biofilm viable cells of 2.26 and 2.45

Log_{10} (99.64 % and 99.45 % killing), respectively, at the end of the experiment. For the combination of ANF +NAC the maximum Log_{10} reduction was obtained after 48 hours (2.47 Log_{10}, 99.66 % killing) and with the combination of ANF +CLA it was reached at 24 hours (1.26 Log_{10}, 97.03 % killing). The reductions in viable cells with respect to those obtained with ANF alone were significant at the three time points ($p<0.05$), except for the combinations of ANF+CLA and ANF+FAR.

Discussion

In this work, we have determined the activity of AMB and ANF combined with EDTA, NAC, RIF, CLA and FAR, which have shown to be effective against bacterial biofilms and, in some cases, against *C. albicans* biofilms (Del Pozo et al. 2011),(Ramage et al. 2002b),(Walraven y Lee 2013),(Ramage et al. 2007). To our knowledge, this is the first study that uses AMB and ANF combined with these compounds against *C. tropicalis* biofilms developed on PTFE and titanium, under continuous stirring conditions. *C. tropicalis* biofilms formed on PTFE were exposed to concentrations usually used in ALT, and those formed on titanium to concentrations reached in serum after the administration of standard doses. The highlights of the present study are that EDTA, NAC, RIF and CLA enhanced the activity of AMB or ANF against *C. tropicalis* biofilm formed both on PTFE or titanium. Our results strengthen the hypothesis that these anti-biofilm compounds, combined with antifungal agents could be an effective strategy for the treatment of *C. tropicalis* biofilm-related infections.

Some authors have proposed the use of calcium chelating agents, such as EDTA, in combination with antimicrobial agents to eradicate microbial biofilms (Raad et al. 2008). This study shows that EDTA, independently of the concentration used, increased the activity of ANF and AMB against *C. tropicalis* biofilm formed both on PTFE or titanium. At the concentration assayed on PTFE (30,000 mg/L) the effect was synergistic, while at the concentration assayed on titanium (30 mg/L) it was improved. Our results allow us to suggest, in accordance with other authors,(Percival et al. 2005),(Raad et al. 2007) that EDTA, in addition to its anticoagulant properties that can prevent thrombotic occlusions in the lumen of the CVC, also increases the activity of antifungal agents, which could be a novel strategy for the conservative management of CVC-related infections.

According to other authors, the increased activity of AMB and ANF in the presence of EDTA could be explained by its ability to sequester the divalent ions essential for the extracellular polymeric matrix structure of biofilms, which enables the penetration of antifungals to the lower layers of biofilm (Percival et al. 2005). Also, Ramage *et al*.(Ramage et al. 2007) have reported that EDTA inhibits the filamentation of *C. albicans* and reduces the expression of HWP1 (adhesin implicated in biofilm formation), producing an unstructured biofilm which consists of a monolayer of adherent cells.

NAC is a small molecule derived from the amino acid cysteine, known for its mucolytic (disruption of disulphide-bonds), antioxidant properties (increases production of glutathione) and as a competitive inhibitor of cysteine (Olofsson et al. 2003),(Aslam y Darouiche 2011). Furthermore, its ability to reduce bacterial biofilms when combined with tigecycline or ciprofloxacin has been reported (Aslam et al. 2007). It also reduces monomicrobial and polymicrobial biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* and *C. albicans* (Venkatesh et al. 2009). Our results show that the combinations of NAC with ANF or AMB are more effective than ANF or AMB alone against *C. tropicalis* biofilm, producing more than a 2-fold Log_{10} reduction in viable cells attached to PTFE and titanium compared with the antifungal alone.

RIF, is an antibiotic that inhibits the RNA polymerase, has activity against bacterial biofilms and is used for the treatment of device-related infections (Trampuz y Widmer 2006). On the other hand, AMB increases cell permeability which could enable RIF to reach the fungal RNA polymerase and thus explain the synergistic interaction found between AMB and RIF. This mechanism has been suggested by El-Azizi *et al*. to explain the enhanced activity of this combination against *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *C. glabrata* biofilms (El-Azizi 2007). Furthermore, Del Pozo *et al*., using a different methodology, reported synergistic activity of this combination against biofilms of *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* developed on microtiter plates, but not against *C. tropicalis* (Del Pozo et al. 2011). In our study, we have assayed this combination in a bioreactor under continuous stirring conditions and have found that RIF maintained the biofilm reduction rate along time, without biofilm regrowth, independently of the biomaterial and drug concentration assayed.

The discrepancy with Del Pozo *et al*. could be due to the methodology used. With respect to the combination of ANF +RIF an increase in killing compared to the antifungal alone was observed. The underlying mechanism that might explain this phenomenon is unknown and further studies are needed to clarify this fact.

The role of CLA as an anti-biofilm compound against *Candida* spp. biofilms is not clear. Previous studies have demonstrated that certain enzymatic activities, such as hexosaminidases may be increased in the presence of macrolides and this fact could affect the synthesis of the extracellular matrix (Gerbaux et al. 1996). Some authors have found that AMB+CLA shows a synergistic activity against *C. albicans, C. parapsilosis* and *C. glabrata* and indifference against *C. tropicalis* (Del Pozo et al. 2011). Wu *et al*. used erythromycin as ALT for the treatment of a CVC-related infection caused by *Staphylococcus aureus* and *C. parapsilosis*, obtaining a clinical improvement at 2 days (Wu y Lee 2007). Our *in vitro* results show that CLA improves the activity of AMB and ANF against *C. tropicalis* biofilm, increasing the killing in more than one Log_{10} both on PTFE and titanium.

FAR is released when there is cell overpopulation, mainly in *C. albicans* biofilms and it acts by inhibiting mycelial development (Weber et al. 2008),(Katragkou et al. 2015). Some authors have reported that FAR reduces the expression of certain surface proteins with hydrophobic domains implicated in the cellular adherence and thus decreasing the CSH of *C. albicans* (Cao et al. 2005). Consequently, we considered that FAR, at the concentrations assayed, could improve the AMB and ANF killing, since the CSH of the selected *C. tropicalis* B10 isolate was high (73.47 %). Our results show that FAR only improves the activity of AMB, but not that of ANF against *C. tropicalis* biofilms. However, Katragkou *et al*. reported a synergistic effect of FAR when combined with micafungin and fluconazole, and indifference when combined with AMB against *C. albicans* biofilms by XTT reduction assay (Katragkou et al. 2015).

The limitation of this study is that we have assayed only one clinical isolate. However, this isolate has a high biofilm-forming capacity and its $BMICs_{90}$ of AMB and ANF are > 8 and >16 mg/L, respectively. Furthermore, we have compared the activity of multiple drug combinations at different concentrations (ALT and serum levels) against biofilms formed on two biomaterials commonly used in medical devices. Moreover, we use an *in*

vitro model (CBR) with continuous stirring that mimics *in vivo* conditions better than with biofilms formed on 96-well microtitter plates.

Conclusion

In summary, we show for the first time an enhanced activity of AMB and ANF in the presence of EDTA, NAC, RIF and CLA and a reduced efficacy of FAR against *C. tropicalis* biofilm formed on PTFE or titanium, using a bioreactor as an *in vitro* model where the material surfaces are under continuous stirring conditions. Although further studies are required to confirm these observations, our findings suggest that anti-biofilm compounds could be a new, effective strategy for the treatment of *C. tropicalis* biofilm-related infections.

Figures and tables

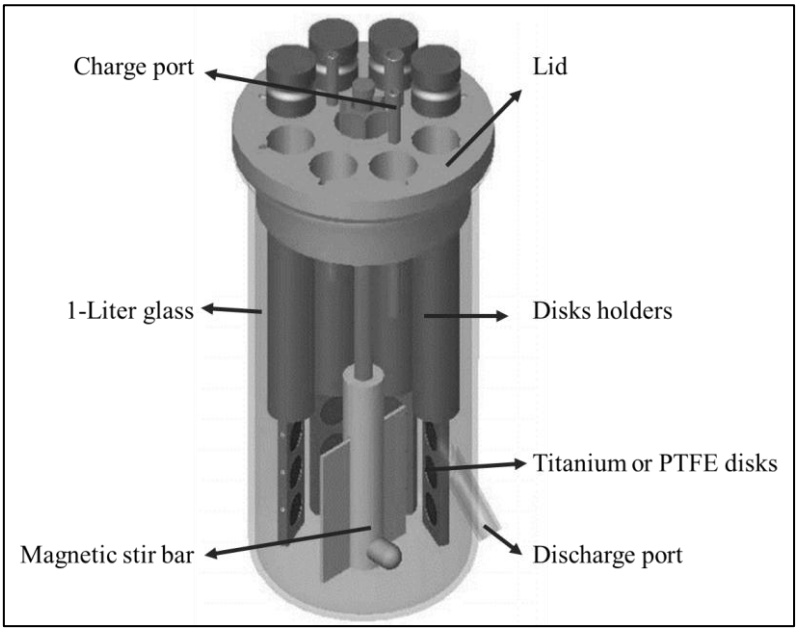


Figure 1. Schematic representation of the CDC Biofilm Reactor. Obtained from BioSurface Technologies Corporation (http://biofilms.biz/).

Table 1. Susceptibility of *C. tropicalis* B10 to drug assayed

Planktonic MIC	mg/L
Amphotericin B	0.25
Anidulafungin	0.03
Biofilm MIC 50/90	
Amphotericin B	0.25 / 8
Anidulafungin	>16 / >16
Ethylenediaminetetraacetic acid	>1000 />1000
Rifampicin	>20 / >20
N-acetylcysteine	>80 / >80
Clarithromycin	>128 / >128
Farnesol (μM)	>200 / >200

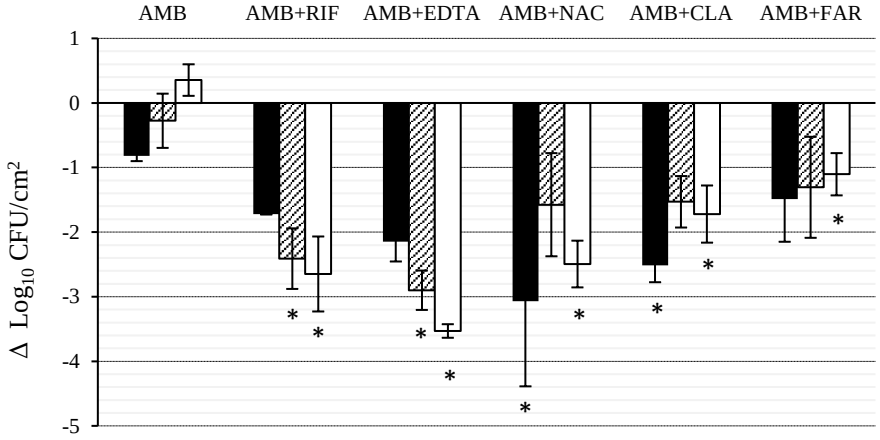


Figure 2. Effect of AMB (1000 mg/L) combined with RIF (1000 mg/L), CLA (1000 mg/L), EDTA (30,000 mg/L), NAC (4000 mg/L) and FAR (300 μM) against *C. tropicalis* biofilm formed on PTFE. Results (Δ Log_{10} CFU/cm^2) indicate the difference in viable cells at 24 hours (black column), 48 hours (striped column) and 72 hours (white column) of drug exposure with respect to biofilm control at the same time point. Each data point represents the mean and standard deviation for two independent experiments carried out with three replicates. The asterisks indicate that the difference is significant at $p \leq 0.05$ compared to AMB alone at the same time point. RIF, CLA, EDTA, NAC and FAR alone at the concentrations assayed have no anti-biofilm activity (data not shown).

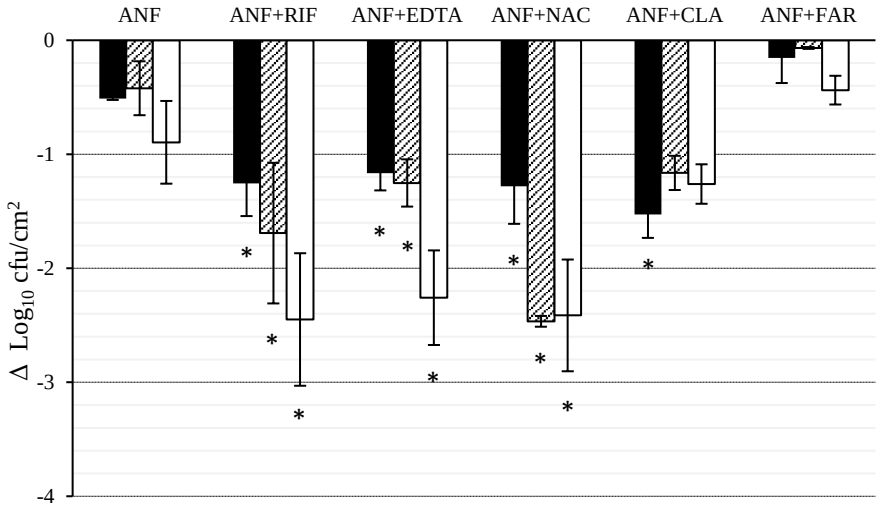


Figure 3. Effect of ANF (8 mg/L) combined with RIF (10 mg/L), CLA (5 mg/L), EDTA (30 mg/L), NAC (40 mg/L) and FAR (3 µM) against *C. tropicalis* biofilm developed on titanium. Results (Δ Log_{10} CFU/cm^2) indicate the difference in viable cells at 24 hours (black column), 48 hours (striped column) and 72 hours (white column) of drug exposure with respect to biofilm control at the same time point. Each data point represents the mean and standard deviation for two independent experiments carried out with three replicates. The asterisks indicate that the difference is significant at $p \leq 0.05$ compared to AND alone at the same time point. RIF, CLA, EDTA, NAC and FAR at the concentrations assayed have no anti-biofilm activity (data not shown).

8.2.3 Time kill assays of amphotericin B plus anidulafungin against *Candida tropicalis* biofilms formed on two different biomaterials

Autores: Marcelo Ernesto Fernández-Rivero, José Luis del Pozo, Amparo Valentín, Eulogio Valentín, Araceli Molina de Diego, Javier Pemán, Emilia Cantón

Revista: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

Estado de la publicación: En revisión

Abstract

Time kill assays of amphotericin B (AMB) combined with anidulafungin (ANF) have been determined against biofilms of two clinical isolates of *Candida tropicalis* and the reference strain ATCC® 750, developed on polytetrafluoroethylene (PTFE) and titanium, using the CDC Biofilm Reactor (CBR) as an *in vitro* model. Biofilms were developed for 24 hours on the disk surfaces and then exposed to AMB (40 mg/L), ANF (8 mg/L), alone and combined. At predetermined time points after drug exposure, biofilms were removed

from the disk surface by vortexing-sonication to quantify viable biofilm cells. Drug activity was strain and time dependent. After exposure to AMB, the mean decrease in viable cells attached to PTFE was 2.23±0.89 Log_{10} cfu/cm^2 (range 0.69–3.56 Log_{10}), and on titanium 2.91±1.04 (range 1.49–4.51 Log_{10}). The reduction with ANF was 0.78±0.5 (0.03–1.58 Log_{10}) on PTFE and 0.8±2.26 (0.42–1.16 Log_{10}) on titanium. The reduction obtained with the combination of AMB+ANF was 1.8±1.07 (0.22–3.54 Log_{10}) on PTFE and 1.97±0.49 (1.36–2.84 Log_{10}) on titanium. The interaction was classified as indifferent with a tendency to antagonism.

We conclude that the activity of antifungal agents depends on the biomaterial surfaces the biofilm forming capacity of the isolate. AMB+ANF is less effective than AMB alone on both surfaces. Thus, the combination of these antifungals does not seem to add additional benefits to the treatment of *C. tropicalis* biofilm-related infections.

Introduction

Fungal biofilm-associated infections have emerged as an important health problem (Ramage et al. 2006). Biofilm yeast cells exhibit an increased antifungal resistance, besides they are also protected from the immune system by the matrix, and may persist on the biomaterial surface causing recalcitrant infections (Chandra et al. 2001a). Limited effectiveness of current therapeutic strategies to eradicate fungal biofilm leads, in many cases, to device removal to cure the infection. *Candida* species are the most relevant fungal pathogens associated with device-related infections, they being able to colonize and form biofilms on many surfaces used in current medical practice, such as polytetrafluoroethylene (PTFE) and titanium (Nobile y Johnson 2015). PTFE, commercially know as Teflon®, is commonly used in the manufacture of vascular grafts and titanium is one of the metallic biomaterials used for joint arthroplasties.

Although *Candida albicans* is the most commonly involved yeast, *Candida tropicalis* has also emerged as an important pathogen associated with immunocompromised patients (Douglas 2003) (Kothavade et al. 2010) (Viudes et al. 2002), intensive care units and patients with neutropenia. Two classes of antifungal agents, polyenes and echinocandins have proven to be effective against *Candida* species biofilms (Kuhn et al. 2002b) (Pemán et al. 2008) (Valentín et al. 2007) and several authors have proposed these agents for the

systemic and local treatment (i.e. lock therapy) of long-term catheter-related *Candida* spp. infections (Toulet et al. 2012).

Most of the studies related to antifungal activity against *Candida* biofilm have been performed by measuring the metabolic activity of biofilms formed on polystyrene 96-well microtiter plates by the XTT reduction assay (Valentín et al. 2007) (Ramage et al. 2001b). Other biofilm growth systems have been developed for testing microbial biofilms [i.e., Calgary Biofilm Device, Robbins device and the CDC Biofilm Reactor (CBR)]. The CBR, which has been standardized by the American Society for Testing Materials (Method E2562 – 12) (Goeres et al. 2005), is an effective tool to study the interaction between biomaterial surfaces and microbial biofilms and also the activity of antimicrobial agents against mature biofilms (Coenye et al. 2011) (Parra-Ruiz et al. 2010).

The purpose of the present study was 1) to determine the time growth curves of *C. tropicalis* biofilms on two biomaterials with different physicochemical properties such as PTFE (hydrophobic) and titanium (hydrophilic) using the CBR as an *in vitro* model; 2) to determine the susceptibility of planktonic and biofilm cells of *C. tropicalis* to amphotericin B (AMB) and anidulafungin (ANF); and 3) to analyze the time kill assays of AMB plus ANF against *C. tropicalis* biofilms formed on PTFE and titanium in the CBR.

Materials and methods: CDC Biofilm Reactor and biomaterials: BioSurface Technologies Corporation (Bozeman, MT, USA) provided the CBR (model CBR 90-1) and the biomaterials. The CBR was equipped with eight rods housing each three removable disks of PTFE (Model RD 128-PTFE) or commercially pure titanium disks (Model RD128-Ti). Each disk was 12.7 mm in diameter and 4 mm in thickness.

Antifungal drugs: AMB (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and ANF (Pfizer Pharmaceuticals Group, Madrid, Spain) were dissolved in DMSO. The maximum DMSO concentration in the CBR was always $\leq 0.5\%$. Antifungal concentrations assayed were: AMB 40 mg/L and ANF 8 mg/L, concentrations that could be used for lock therapy in central venous catheters.

Isolates, biofilm formation, susceptibility and hydrophobicity test: A total of three isolates of *C. tropicalis* were assayed, two of them recovered from catheters of patients with bloodstream infection (B11 and B12) and the reference strain *C. tropicalis* ATCC® 750. The ability to form biofilm was determined by crystal violet staining and XTT reduction assays in 96-well plates as previously described (Valentin et al. 2012) (Pierce et al. 2008) (Stepanović et al. 2000).

Susceptibility of planktonic cells to AMB and ANF was determined according to the CLSI broth microdilution method (M27-A3 document) (Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008). ANF and AMB MICs were defined as the lowest drug concentration that caused a reduction of growth ≥50% and 100%, respectively, compared with the control (without antifungal agents). Biofilm MICs (BMIC) were determined by the XTT reduction assay according to the protocol described by Pierce *et al*. (Pierce et al. 2008) Antifungal agents were added to preformed 24-hour biofilms and incubated for 48 hours at 37 ºC. BMIC was defined as the lowest drug concentration of antifungal able to reduce biofilm metabolic activity by ≥50% ($BMIC_{50}$) or by ≥90% ($BMIC_{90}$). Cell surface hydrophobicity (CSH) was determined using the water-cyclohexane biphasic assay previously described that takes into account the number of cells removed from the aqueous phase (Gelis et al. 2012).

Biofilm formation and time kill assays in the CBR: Prior to analysis, each isolate was subcultured twice on Sabouraud dextrose agar plates to ensure viability. Inoculum was prepared suspending 1 to 3 colonies from a 24-hour culture in phosphate buffered saline pH 7.3 (PBS) and adjusting cell density to 2 McFarland standard providing 10^8 cfu/mL. The CBRs, equipped with PTFE and titanium disks, were filled with 400 mL of Yeast Nitrogen Base medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with 100 mM glucose (YNBG) and inoculated with 1 mL of the inoculum suspension (final inoculum size ranged from 8×10^4 to 2.7×10^5 cfu/mL). The CBR was then placed in a stir plate set at 250 rpm. Temperature inside the CBR was maintained uniform at 30 °C ± 1 ºC during all the experiment.

After 24 hours of incubation, three PTFE and three titanium disks were aseptically removed from the CBR and the number of viable cells on their surfaces quantified after a vortexing-sonication procedure. After that, AMB and ANF alone and combined, were

added to the CBR at a concentration of 40 mg/L (AMB), 8 mg/L (ANF), and 40 + 8 mg/L (AMB+ANF) (time 0). The number of viable biofilm cells on PTFE and titanium disks was determined at 24, 48 and 72 hours after adding the antifungal agents. A CBR without antifungal agents and with 0.5 % of DMSO was used as a control. At each time point, three disks were removed and rinsed with 14 mL PBS to remove planktonic and placed in a tube containing 1 mL YNBG.

Each tube, with the disk inside, was vortexed for 1 min at 2500 rpm, sonicated (Model Ultrasons-H; J.P Selecta, Barcelona, Spain) for 5 min at 50 kHz and vortexed again for 1 min at 2500 rpm to disaggregate cells attached to the disk surfaces. Afterward, 0.1 mL of the fluid obtained was diluted (1:10, 1:100, 1:1000 and 1:10000) in saline solution and 0.1 mL of each dilution was plated on Brain Heart Infusion Agar (Becton Dickinson, USA). The plates were incubated for 24 h at 37 °C. Results, expressed as cfu/mL, were transformed into Log_{10} cfu/cm^2. In order to minimize bias, both biomaterials were assayed in the same CBR. All experiments were performed in triplicate.

Data analysis: The interaction AMB+ANF, following the established criteria for synergism by time kill curves (Lewis et al. 2002) (Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2016), was classified as synergistic when the decrease in cfu/cm^2 at 72 hours was $\geq$2 Log_{10} in the combination compared with the most active single agent; indifferent when the difference in viable cells was <2 Log_{10} and $\geq$1 Log_{10}; and antagonistic when there was an increase in viable cells $\geq$2 Log_{10} compared with the least active single agent.

Differences among groups were assessed with the analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test for multiple comparisons. A $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The selected strains formed biofilms on microtiter plates and were classified as high (B11), moderate (B12) and weak (ATCC® 750) biofilm formers by both tests (crystal violet staining and XTT reduction assay) (Table 1). No differences in viable cells attached to PTFE or titanium were observed at 24, 48, 72 and 96 hours in the control. CSH was

similar for both clinical isolates (B11 and B12) while the ATCC® strain was less hydrophobic. Planktonic cells of the three strains were susceptible to both antifungal agents (AMB MIC ≤0.5 mg/L and ANF MIC ≤0.03 mg/L). AMB $BMIC_{90}$ were >8 mg/L for the two clinical isolates and 4 mg/L for the ATCC® strain. ANF $BMIC_{50}$ were >16 mg/L (Table 1).

Figure 1 shows the reduction in biofilm viable cells formed on PTFE and titanium after exposure to AMB and ANF alone, and combined. Against the three isolates, AMB was the most active drug both on PTFE and titanium. On PTFE, AMB produced a reduction in viable cell ranging from 0.69 Log_{10} cfu/cm^2 to 3.56 Log_{10} cfu/cm^2 depending on the strain (mean of three strains: 2.23±0.89 Log_{10}) and on titanium it was from 1.49 Log_{10} cfu/cm^2 to 4.51 Log_{10} cfu/cm^2 (mean: 2.91±1.04 Log_{10}). At 24 hours, the difference in viable cells with respect to their control was significant in the two clinical isolates, but at 48 and 72 hours the difference was significant for the three strains ($p<0.05$).

ANF did not show activity against the clinical isolate B11. On PTFE the mean reduction was 0.78 ± 0.5 Log_{10} cfu/cm^2 (range 0.03 to 1.58 Log_{10}) and on titanium 0.8 ± 2.26 Log_{10} cfu/cm^2 (range 0.42 to 1.16 Log_{10}). For the AMB+ANF combination, the reduction in viable cells was isolate dependent. AMB lost activity when combined with ANF mainly on the B11 isolate. The mean reduction in viable cells attached to PTFE was 1.8 ± 1.07 Log_{10} cfu/cm^2 (range 0.22 to 3.54 Log_{10}) and on titanium 1.97 ± 0.49 Log_{10} cfu/cm^2 (range 1.36 to 2.84 Log_{10}). The interaction was classified as indifferent on both biomaterials, but we observed a tendency to antagonism in the isolate with a high biofilm forming capacity (B11).

In general, AMB was more active against biofilms formed on titanium than those formed on PTFE and among isolates it was greater against B11. The same as occurs on PTFE, ANF was not active against B11 except at 72 hours, when the reduction in viable cells with respect to biofilm control at the same time point was significant, moreover, the combination of AMB+ANF was less active than AMB alone. The difference in cfu/cm^2 between antifungals alone and in combination were significant ($p<0.05$) both on PTFE and titanium.

Discussion

Our results show the influence of biomaterials in the killing rates of AMB and ANF against *C. tropicalis* biofilms. To the best of our knowledge, there are no previous studies that analyze the effect of biomaterials and antifungal agents against *C. tropicalis* biofilms by either time kill assays or using CBR, which precludes comparisons.

We have analyzed the antifungal activity using the CBR, and show the poor response of *C. tropicalis* biofilm to ANF on both biomaterials, which remained colonized after 72 hours. This resistance of *C. tropicalis* biofilms to ANF has also been reported by other authors using different methodologies (Pemán et al. 2008) (Valentín et al. 2007) (Bernhardt et al. 2011). Time kill studies show that AMB is able to eliminate more than 99% of cells attached to both biomaterials, and even eradicate the biofilm formed on titanium by the two clinical isolates. On the contrary, AMB did not eradicate the biofilms formed on PTFE. Interestingly, these isolates have more biofilm forming capacity (high and moderate) and hydrophobity (>73 %) than the ATCC® reference strain (weak and CSH 21.7 %).

The activity of the combination of AMB+ANF against *C. tropicalis* biofilms at the concentration assayed is inferior to that of AMB alone on both surfaces. At the end of the experiment (72 hours), the interaction is indifferent on both PTFE and titanium (Figure 1). The results suggest that combination of ANF and AMB does not add benefits to the treatment of *C. tropicalis* biofilm-related infections (e.g., antimicrobial lock therapy), although further studies are required.

Most of biofilm antifungal susceptibility studies, using the XTT reduction assay, have been performed mainly against *C. albicans* and few data have been reported for other *Candida* species (Pemán et al. 2008) (Valentín et al. 2007) (Silva et al. 2010). Although ANF has proven to be effective against *C. albicans* biofilms (Pemán et al. 2008) (Jacobson et al. 2008), our results show no effectiveness against *C. tropicalis* biofilms either by XTT reduction assay ($BMIC_{50}$ > 16 mg/L) or CBR.

These differences between species could be related to the cytoarchitecture and matrix composition reported (glucose in *C. albicans* and hexosamines in *C. tropicalis*) that could affect the antifungal penetration rate (Bizerra et al. 2008) (Al-Fattani y Douglas 2004)

(Al-Fattani y Douglas 2006). With respect to the different activity of antifungals on biomaterials, it could be associated with the difference in the hydrophobic properties of the PTFE surface and the hydrophilic characteristics of titanium. Several authors have studied the effect of the hydrophobicity of biomaterials on yeast biofilm growth rates (Samaranayake et al. 1995) (Minagi et al. 1985) (Cuéllar-Cruz et al. 2012) and our study suggests that it also affects killing rates.

One of the limitations of this study is the reduced number of isolates assayed but they were selected with different degrees of biofilm forming capacity. Although only one concentration of each antifungal has been assayed, it was selected as a possible *Candida*te for lock therapy in central venous catheters.

In conclusion, the present work reinforces the importance of taking into account the biomaterial in biofilm formation and strengthens the hypothesis that the physicochemical properties of the biomaterials could be an important factor for the treatment of *Candida* biofilm-associated infections. Drug activity is strain and time dependent, AMB being more active than ANF on both biomaterials. The killing rates are higher on titanium surfaces than on PTFE. Results also underline the loss of activity of AMB when combined with ANF, suggesting that no benefits are added to the treatment of *C. tropicalis* biofilm-related infections.

Figures and tables

Table 1. Characteristics of biofilm formation and antifungal activity (mg/L) of amphotericin B (AMB) and anidulafungin (ANF) against planktonic and biofilm cells of *C. tropicalis*.

	Isolate		
	B11	B12	ATCC® 750
Biofilm forming capacity	High	Moderate	Weak
CSH (%)	73.5	76.8	21.7
Planktonic MIC			
AMB	0.25	0.25	0.5
ANF	0.03	0.016	0.016
Biofilm MIC			
AMB $BMIC_{90}$	>8	>8	4
ANF $BMIC_{50}$	>16	>16	>16

CSH, cell surface hydrophobicity.

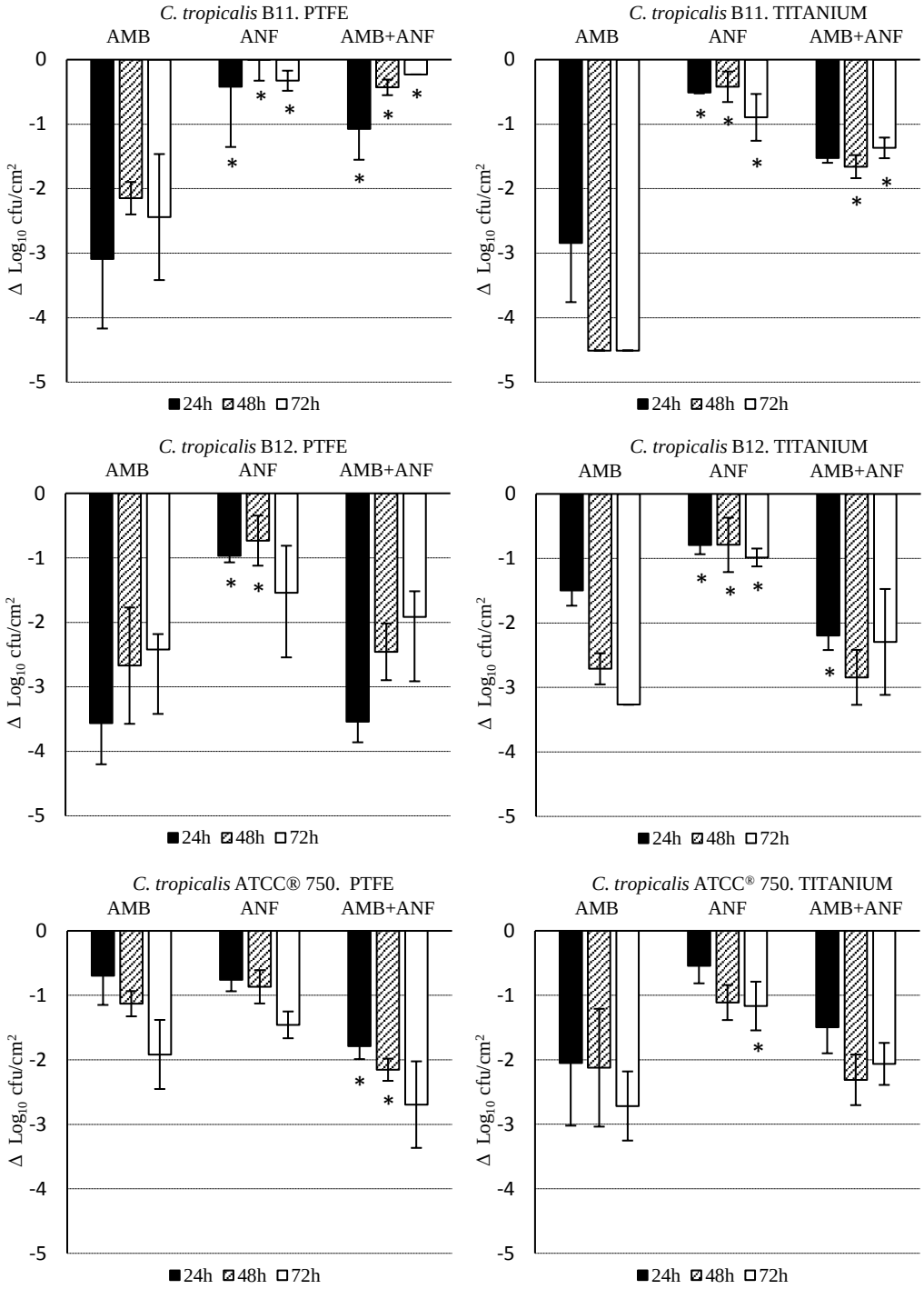


Figure 1. Activity of AMB 40 mg/L, ANF 8 mg/L and AMB 40 mg/L plus ANF 8 mg/L against biofilms formed by two clinical isolates (B11, B12) and a reference strain of *C. tropicalis*. on PTFE and titanium. Results (Δ Log10 CFU/cm^2) indicate the difference in viable cells with respect to biofilm control at the same time point. Each data point represents the mean ± standard deviation of three disks. *Significant difference with respect to AMB alone at the same time point ($p<0.05$).

9 ANEXO

9.1 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

9.1.1 Agar Infusión Cerebro Corazón

Composición y propiedades

El Agar Infusión Cerebro Corazón o *Brain Heart Infusion Agar* (BHA) es un medio de cultivo general, rico en nutrientes, que permite el crecimiento de una gran variedad de bacterias y hongos tanto levaduriformes como filamentosos. Se utilizó para realizar los cultivos cuantificados tras sonicación y el recuento de células viables adheridas a los biomateriales.

En la Tabla 8.1 se muestra su composición. El corazón vacuno, el cerebro de ternera, la glucosa y el suplemento de peptona aportan la fuente de carbono, nitrógeno y micronutrientes. El fosfato disódico actúa como tampón químico para ajustar el pH a 7,4 ± 0,2, el cloruro sódico mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante.

Tabla 8.1. Composición del medio Agar Infusión Cerebro Corazón

Infusión de cerebro de ternera	7,7 g
Infusión de corazón de res	9,8 g
Peptona	10,0 g
Dextrosa	2,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agar	20 g

Preparación, inoculación e incubación

Se disolvieron 37 gramos de polvo BHA (Becton Dickinson, Madrid, España) y 20 gramos de Agar (Becton Dickinson, Madrid, España) en 1 litro de agua destilada. Se calentó hasta ebullición con agitación frecuente para conseguir la completa disolución de los componentes. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 121 ºC durante 20 minutos y se distribuyó en placas Petri estériles (Francisco Soria Melguizo SA, Madrid, España), las cuales se conservaron a 4 ºC hasta su uso, en un plazo máximo de 5 días.

9.1.2 Agar glucosado de Sabouraud

El agar glucosado de Sabouraud es un medio de cultivo ampliamente utilizado para el aislamiento e identificación de hongos levaduriformes y filamentosos. La concentración elevada de glucosa y el pH ácido favorece el crecimiento de los hongos sobre el de las bacterias (Tabla 8.2). Esta capacidad selectiva puede ser mejorada con la adición de antibióticos como el cloranfenicol. El agar glucosado de Sabouraud se utilizó para subcultivar y verificar la viabilidad y pureza de los aislados de *Candida* spp. extraídos de los crioviales conservados a -80 ºC.

Tabla 8.2. Composición del medio agar glucosado de Sabouraud

Hidrolizado enzimático de caseína	10 g
Dextrosa	20 g
Agar	20 g

Se suspendieron 50 gramos de polvo de agar glucosado de Sabouraud (Becton Dickinson, Madrid, España) en 1 litro de agua destilada y se calentó con agitación frecuente hasta alcanzar la ebullición. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 121ºC durante 20 minutos y se distribuyó en placas de Petri estériles que se conservaron a 4ºC hasta su uso en un plazo máximo de 5 días.

9.1.3 CHROMagar® *Candida*

El CHROMagar® *Candida* (CHROMagar, Paris, Francia) es un medio selectivo y cromogénico que permite la identificación presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* (Tabla 8.3). La mezcla cromogénica está formada por sustratos artificiales que son degradados por enzimas específicas de las distintas especies de *Candida*, liberando compuestos que portan un determinado color al medio según la especie (Tabla 8.4). El CHROMagar® *Candida* se utilizó para verificar la viabilidad y pureza de los aislados de *Candida* spp.

Tabla 8.3. Composición del medio CHROMagar® *Candida*

Agar	15 g
Peptona	10,2 g
Mezcla cromogénica	22 g
Cloranfenicol	0,5 g

Se disolvieron 40 gramos de polvo CHROMagar® *Candida* en 1 litro de agua destilada y se calentó hasta una temperatura comprendida entre 90 ºC y 100 ºC con agitación frecuente para conseguir la completa disolución de los componentes. Se distribuyó en placas de Petri estériles, las cuales se conservaron a 4 ºC hasta su uso en un plazo máximo inferior a 15 días.

Tabla 8.4. Color desarrollado en CHROMagar® *Candida*

C. albicans	Colonias verdes
C. krusei	Colonias grandes, planas, rosado pálido, halo blanco
C. tropicalis	Colonias azul verdoso a violeta
C. glabrata	Colonias rosado intenso
Otras especies	Blancas
Bacterias	Crecimiento inhibido

9.1.4 Base Nitrogenada de Levadura suplementada con glucosa

La base nitrogenada de levadura o *Yeast Nitrogen Base* (YNB) es un medio complejo que contiene una mezcla bien definida de aminoácidos, vitaminas, micronutrientes y sales, que portan todo lo necesario para el crecimiento de la levadura, con la excepción de la fuente de carbono (Tabla 8.5). El YNB se utilizó como medio de cultivo para el crecimiento de *Candida* spp. en las placas de poliestireno para la tinción con cristal violeta, en el *CDC Biofilm Reactor* y como caldo para recoger la biopelícula desprendida, durante el proceso de sonicación y agitación vorticial.

Tabla 8.5. Composición del medio Base Nitrogenada de Levadura

Fuente de nitrógeno	
Sulfato amónico	5 g
Aminoácidos	
Histidina	10 mg
Metionina	20 mg
Triptófano	20 mg
Vitaminas	
Biotina (Vitamina B8)	2 µg
Pantotenato de calcio (Vitamina B5)	400 µg
Ácido fólico (Vitamina B9)	2 µg
Inositol	2000 µg
Niacina (Vitamina B3)	400 µg
Ácido paraaminobenzoico (PABA)	200 µg
Hidrocloruro de piridoxina (Vitamina B6)	400 µg
Riboflavina (Vitamina B2)	200 µg
Tiamina (Vitamina B1)	400 µg
Micronutrientes	
Ácido Bórico	500 µg
Sulfato de cobre	40 µg
Yoduro de potasio	100 µg
Cloruro férrico	200 µg
Sulfato de manganeso	400 µg
Molibdato de sodio	200 µg
Sulfato de Zinc	400 µg
Sales	
Fosfato monopotásico	1,0 g
Sulfato de magnesio	0,5 g
Cloruro sódico	0,1 g
Cloruro cálcico	0,1 g

Se disolvieron 6,7 gramos de polvo YNB (Becton Dickinson, Madrid, España) en 0,8 litros de agua purificada y se esterilizó en autoclave a 121 ºC durante 20 minutos. Posteriormente, el YNB se suplementó con glucosa a una concentración de 100 mM (18 g/L), disolviendo 18 gramos de glucosa (Becton Dickinson, Madrid, España) en 200 mL de agua destilada y añadiéndolos al YNB mediante filtración.

9.1.5 Medio RPMI 1640

El medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) es un medio de cultivo inicialmente diseñado para el crecimiento de líneas celulares y que es utilizado en el ensayo de microdilución en caldo M27-A3 para la estudiar la sensibilidad de *Candida* spp. a los antifúngicos debido a su elevada concordancia entre los distintos ensayos (Tabla 8.6). En nuestro estudio, se utilizó el RPMI para determinar la sensibilidad de *Candida* spp. a anfotericina B y a anidulafungina, tanto en fase planctónica como en biopelícula, utilizando el método M27-A3 y el ensayo de reducción del XTT.

El RPMI 1640, suplementado con glutamina y sin bicarbonato sódico, se preparó disolviendo 10,4 gramos de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 34,53 gramos de ácido morfolino propano sulfónico (MOPS, Sigma-Aldrich, Madrid, España) en 900 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 6,9 - 7,1 utilizando NaOH 1 N y se añadió agua hasta completar 1 litro. Se esterilizó mediante filtración utilizando un filtro de 0,22 μm y se conservó a 4 - 8 ºC durante un máximo seis meses.

9.2 SOLUCIONES Y REACTIVOS

9.2.1 Tampón fosfato salino estéril

El tampón fosfato salino o PBS pH 7,2, 150 mM (Química Clínica Aplicada SA, Amposta, España) se presenta en alícuotas que contienen cloruro de sodio (7,65 g), fosfato monopotásico (0,21 g) y fosfato de sodio (0,724 g), las cuales se disuelven en 1 litro de agua destilada para alcanzar un pH 7,2 y una concentración de 150 mM. El PBS se esterilizó en el autoclave a 121 ºC durante 20 minutos y se almacenó a 4 ºC hasta su uso. El PBS se utilizó para lavar los discos extraídos del *CDC Biofilm Reactor* y los pocillos de las placas de poliestierno, para retirar las células planctónicas no adheridas. También se utilizó como fase acuosa durante el test de adhesión microbiana a hidrocarburos para estudiar la hidrofobicidad celular superficial de las cepas.

Tabla 8.6. Composición del medio RPMI 1640 (mg/L).

L-arginina	200
L-asparragina (anhidra)	50
Ácido L-aspártico	20
Dihidrocloruro de L-cistina	65,2
Ácido L-glutámico	20
L-glutamina	300
Glicina	10
L-histidina	15
L-hidroxiprolina	20
L-isoleucina	50
L-leucina	50
Hidrocloruro de L-lisina	40
L-metionina	15
L-fenilalanina	15
L-prolina	20
L-serina	30
L-treonina	20
L-triptófano	5
L-tirosina	28,8
L-valina	20
Biotina	0,2
Cloruro de colina	3
Ácido fólico	1
Mioinositol	35
Nicotinamida	1
Pantotenato D-calcio	0,25
Ácido p-aminobenzoico	1
Hidrocloruro de piridoxina	1
Riboflavina	0,2
Hidrocloruro de tiamina	1
Vitamina B12	0,005
Nitrato cálcico tetrahidratado	100
Sulfato magnésico (anhidro)	48,8
Cloruro potásico	400
Cloruro sódico	6000
Fosfato sódico dibásico (anhidro)	800
D-glucosa	2000
Glutation (reducido)	1
Rojo fenol	5,3

9.2.2 Solución de 2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolio-5-Carboxanilida (XTT)

La sal de tetrazolio 2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolio-5-Carboxanilida, abreviada como XTT se reduce por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas dando lugar a un cristal de formazán soluble de color rojo. El XTT fue utilizado en el ensayo de reducción en placas de poliestierno de 96 pocillos para determinar las $CMIB_{50}$, $CMIB_{80}$ y $CMIB_{90}$ a anidulafungina y anfotericina B. Para ello, se disolvió XTT (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en PBS hasta alcanzar una concentración de 1 mg/mL. La solución se esterilizó mediante filtración utilizando filtros de 0,22 µm (Sarstedt, Granollers, España) y se almacenó en alícuotas a -80 ºC hasta su uso.

9.2.3 2-metil-1,4-maftoquinona (menadiona)

Con el objetivo de facilitar y acelerar la reducción del XTT, se incorporó en la reacción un dador de electrones, la 2-metil-1,4-maftoquinona, también denominada menadiona. Se disolvieron 0,017 gramos de menadiona (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en 10 mL de acetona para obtener una concentración final de 10 mM, la cual se conservó a 4 ºC hasta su utilización.

9.2.4 Solución XTT-Menadiona

Se preparó una solución de XTT-menadiona 1 µM, disolviendo 1,2 µL de menadiona en 12 mL de XTT (1 mg/mL). La solución de XTT y menadiona se utilizó para medir la actividad metabólica de las células adheridas en una superficie de la placa de microtitulación durante los ensayos de reducción del XTT.

9.3 DISOLUCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS FÁRMACOS EMPLEADOS

En la Tabla 8.7 se resume la lista de antifúngicos, antibióticos y otras moléculas utilizadas en el estudio. Los fármacos utilizados se disolvieron en agua o DMSO según el coeficiente de solubilidad de cada molécula y se conservaron a -80 ºC hasta su uso, en un periodo no superior a 3 meses, excepto el Farnesol, el cual se conservó a temperatura ambiente y protegido de la luz. En el caso de los fármacos conservados en DMSO, la concentración final de este disolvente en el *CDC Biofilm Reactor* no superó el 1% en ningún caso.

Tabla 8.7. Adquisición, disolución y conservación de los fármacos utilizados en el estudio

Fármaco	**Proveedor**	**Disolvente**	**Concentración de almacenaje (mg/L)**
Anfotericina B Desoxicolato	Sigma-Aldrich	Agua	10.000
Anidulafungina	Pfizer	Agua	5.000
Caspofungina	Merck Sharp & Dohme	DMSO	5.000
Claritromicina	Abbot	Agua	5.000
EDTA	Sigma-Aldrich	Agua	20.000
Farnesol	Sigma-Aldrich	DMSO	886.000
Micafungina	Astellas Pharma	Agua	5.000
N-acetilcisteína	Sigma-Aldrich	Agua	20.000
Posaconazol	Merck Sharp & Dohme	DMSO	1.600
Rifampicina	Sanofi-Aventis	Agua	6.000
Terbinafina	Sigma-Aldrich	Agua	2.000
5-fluorocitosina	Sigma-Aldrich	Agua	10.000