



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA

FACTORES DE VIRULENCIA DE *Candida albicans*  
AISLADA DE NIÑOS CON Y SIN CARIES DENTAL

Tesis presentada por:

LILI MARISOL CANUL VELA

En opción al Grado de:

MAESTRA EN ODONTOLOGÍA INFANTIL

Directores:

M. EN O. FERNANDO JAVIER AGUILAR AYALA

DR. FLORENCIO RUEDA GORDILLO

Mérida, Yucatán, Octubre 2018





**UADY**

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA

FACTORES DE VIRULENCIA DE *Candida albicans*  
AISLADA DE NIÑOS CON Y SIN CARIES DENTAL

Tesis presentada por:

LILI MARISOL CANUL VELA

En opción al Grado de:

MAESTRA EN ODONTOLOGÍA INFANTIL

Directores:

M. EN O. FERNANDO JAVIER AGUILAR AYALA

DR. FLORENCIO RUEDA GORDILLO

Mérida, Yucatán, Octubre 2018



**UADY**  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA

UNIDAD DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Mérida, Yucatán, 22 de octubre de 2018

**C. LILI MARISOL CANUL VELA**

Con base en el dictamen emitido por sus Directores y revisores, le informo que la Tesis titulada "**FACTORES DE VIRULENCIA DE *Candida albicans* AISLADA DE NIÑOS CON Y SIN CARIES DENTAL**", presentada como cumplimiento a uno de los requisitos establecidos para optar al Título de la Maestría en Odontología Infantil, ha sido aprobada en su contenido científico, por lo tanto, se le otorga la autorización para que una vez concluidos los trámites administrativos necesarios, se le asigne la fecha y hora en la que deberá realizar su presentación y defensa.

**M. C. O. José Rubén Herrera Atoche**  
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación

M. en O. Fernando Javier Aguilar Ayala  
Director de Tesis

Dr. Florencio Rueda Gordillo  
Director

M.O.I. Marina Eduvigés Rejón Peraza  
Revisora

Dra. Sandra Elena Hernández Solís  
Revisora

Artículo 78 del reglamento interno de la  
Facultad de Odontología de la  
Universidad Autónoma de Yucatán.

Aunque una tesis hubiera servido para  
el examen profesional y hubiera sido  
aprobada por el sínodo, solo su autor o  
autores son responsables de las  
doctrinas en ella emitidas.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Florencio Rueda Gordillo. Los resultados presentados, son parte del proyecto de investigación “Genotipificación y factores de virulencia de *Candida albicans* aisladas de pacientes con y sin caries dental” con número de registro FODO-2016-0009, financiado por el PAIIFO 2016.

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, me gustaría agradecer a ti Dios, por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A mis padres y su amor recibido, la dedicación y la paciencia con la que cada día se preocupaban por mi avance y desarrollo de esta tesis, es simplemente único y se refleja en la vida de un hijo.

También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional, porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación, y en especial a mis profesores: Dr. Florencio Rueda Gordillo, M. en O. Fernando Javier Aguilar Ayala, Dra. Sandra Elena Hernández Solís y M.O.I Marina Eduviges Rejón Peraza, por sus consejos y enseñanzas, los cuales me han motivado durante mi formación profesional.

A todas las personas que me apoyaron y creyeron en la realización de esta tesis, para ellos, muchas gracias y que Dios los bendiga.

## ÍNDICE

RESUMEN	
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>Candida albicans</i>	2
<i>Candida albicans</i> Y SU RELACIÓN CON LA CARIES DENTAL	4
FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>C. albicans</i>	5
PLANTEAMIENTO DE LAS HIPÓTESIS	10
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la formación de biopelícula de <i>C. albicans</i> y distribución porcentual según el grupo de estudio	19
Tabla 2. Valores promedio del índice Pz de cepas de <i>C. albicans</i> de los distintos grupos de pacientes	20
Tabla 3. Valores promedio de IH de la actividad hemolítica de las cepas de <i>C. albicans</i> de los distintos grupos de pacientes	20

## RESUMEN

En los últimos años, *Candida albicans* está siendo asociada al desarrollo de la caries dental, entre otros, por tener una prevalencia mayor en niños con caries. Asimismo, por los factores de virulencia asociados al microorganismo, como son la actividad de la fosfolipasa, proteinasa, actividad hemolítica y formación de biopelícula, entre otros. Debido a ello, existe un gran interés en el estudio de los factores de virulencia de *C. albicans* que permitan establecer el papel del hongo con la presencia de caries dental.

Se estudiaron un total de 40 cepas de *C. albicans* previamente aisladas e identificadas y que forman parte del cepario del Departamento de Microbiología Oral y Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la UADY. 31 cepas (77.5%) fueron aisladas de niños con caries y 9 (22.5%) de niños libres de caries. Para la actividad de la fosfolipasa se encontró un valor promedio de Pz de 0.49 y 0.75 para los niños con y sin caries, respectivamente, con un valor de  $p < 0.05$ . Con relación a la actividad hemolítica, el promedio IH fue de 0.59 y 0.66 para los niños con y sin caries, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Referente a la formación de biopelícula, se encontró que la mayor cantidad de cepas aisladas en los niños con caries presentó una formación fuerte de biopelícula (61%), en comparación con el grupo de niños sin caries donde el mayor porcentaje fue en la formación débil de biopelícula (77%), encontrándose un valor de  $\chi^2 = 23.23$  y un valor de  $p < 0.05$  por lo que se acepta que, en este estudio, el nivel de formación de biopelícula es dependiente del grupo origen de las cepas.

Hasta el momento, son pocos los estudios sobre los factores de virulencia de *Candida albicans* asociados a la caries dental. Se pudo encontrar que la actividad de la fosfolipasa, hemolítica y formación de biopelícula es mayor en niños con caries dental. Por lo que el presente estudio es el primer trabajo en México que permite establecer esas diferencias.

## DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En los últimos años, se ha reportado que *Candida albicans* está siendo asociada al desarrollo de la caries dental, ya que presenta una prevalencia mayor en niños con caries dental en comparación con los niños sin caries. La colonización del microorganismo y la edad, son factores predisponentes que inclinan la balanza a favor del desarrollo de caries dental, debido, entre otros, a que tanto el sistema inmunitario como la microbiota bucal se encuentran inmaduros. La caries dental en niños es una de las principales problemáticas de salud oral y, por lo tanto, se deben emplear procedimientos de estabilización del ambiente oral y así, reducir el número de microorganismos patógenos en la boca, evitando la instalación o progresión de enfermedades.

*Candida albicans* posee factores de virulencia que se han relacionado con la cariogenicidad, como son: la actividad de la fosfolipasa, proteinasa, actividad hemolítica y formación de biopelícula, todos, encargados de colonizar el huésped y ocasionar daño de forma directa, al activar, resistir o evadir los mecanismos de defensa de este.

La inhibición de estos factores de virulencia es considerada una estrategia importante que contribuirá en la prevención de la caries dental, por lo que la caracterización de las cepas de *Candida albicans* que colonizan la cavidad bucal, es importante para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan disminuir la colonización de este microorganismo, sobre todo, en la población infantil, que es el grupo de la población con mayor riesgo para el desarrollo de caries dental.

Debido a la presencia de los factores de virulencia de *C. albicans* y la posible asociación de este microorganismo con la caries dental, existe un gran interés en su estudio a nivel mundial, con el objetivo de conocer el papel del hongo y con ello, diseñar estrategias de control y prevención, con agentes terapéuticos que tengan como blanco de acción los factores de virulencia asociados.

Por lo anteriormente planteado, se propone la siguiente pregunta de investigación:

¿Existen diferencias en los factores de virulencia de cepas de *Candida albicans* aisladas de niños escolares con y sin caries dental?

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

De manera natural, en la cavidad oral existe un equilibrio de la microbiota controlado entre otros, por el sistema inmunitario, el cual, desempeña un papel de defensa para prevenir la colonización e invasión por microorganismos oportunistas como los hongos del género *Candida* (1).

*Candida* spp. se puede presentar en forma levaduriforme o también como hongo filamentosos, capaz de formar hifas verdaderas, por lo cual, es conocido como un hongo polimórfico que posee la capacidad de sobrevivir como comensal o un patógeno oportunista bajo condiciones de desequilibrio del microambiente local. Puede ocasionar un desbalance del equilibrio de la microbiota del área mucocutánea, gastrointestinal y genitourinaria en el cuerpo del ser humano llamado disbiosis, colonizando del 30 al 60% de las membranas mucosas. En un hospedero susceptible, *Candida* spp. puede transformarse a patógeno, y bajo ciertas condiciones causa infecciones superficiales como la candidiasis oral o vaginal e infecciones sistémicas mortales (2,3).

### CARACTERÍSTICAS DE *Candida albicans*

*Candida albicans* pertenece al reino de los hongos. Se encuentra clasificada taxonómicamente como: clase: *Blastomycetes*, división: *Deuteromycota*, familia: *Cryptococcaceae*, y género *Candida* (4).

Es un hongo unicelular, levaduriforme, que mide de 2 a 4 micras, su pared es delgada, ovoide (blastospora), se reproduce por gemación y dependiendo del ambiente en el que crezca puede encontrarse como células levaduriformes, pseudohifas, hifas o una combinación de estas morfologías (4).

Químicamente, *C. albicans*, está constituida de proteínas (20-40%), polisacáridos (30-50%), variando su proporción de lípidos, de acuerdo con factores como la antigüedad del cultivo, condiciones del ambiente y el origen de la fuente de carbono (4).

*C. albicans* posee una estructura subcelular similar al de las células animales y vegetales, sin embargo su pared celular difiere al de las células animales, la cual es responsable del contacto y la adhesión al huésped y juega un papel importante en la

patogénesis durante la infección fúngica, protegiendo frente a cualquier agravio físico, químico y biológico (4).

Las especies de *Candida*, pueden cultivarse sobre medios de cultivo que contengan agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa, con un pH entre 2.5 y 7.5 y temperatura entre 20°C y 38°C y en condiciones de aerobiosis crecimiento *in vitro* de las colonias de *C. albicans*. En Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) u otros medios de cultivo semejantes se observan colonias lisas, suaves, húmedas y de color y aspecto cremoso. En el medio CHROMagar *Candida* el crecimiento de las colonias se observan de color verde (4).

*C. albicans*, representa el hongo con mayor patogenicidad del ser humano, con la habilidad de subsistir y proliferar en diferentes ambientes, adaptándose a condiciones fisiológicas extremas de pH, osmolaridad, disponibilidad de nutrientes y temperatura. Esta variabilidad le permite colonizar diferentes zonas en individuos sanos y, ocasionar infecciones en numerosos sitios del cuerpo (4).

En individuos sanos *C. albicans* es la especie con mayor prevalencia. La colonización se ve favorecida por numerosos factores, que comprometen el estado inmunológico del paciente, como la diabetes *mellitus*, infección por VIH, SIDA, periodos prolongados de hospitalización, neoplasias y la edad del individuo. Los aparatos de ortopedia u ortodoncia contribuyen al incremento de la colonización por *C. albicans* por la acumulación de biopelícula dental modificando el entorno ecológico de la cavidad oral (5-7).

Hernández-Solís *et al.* Estudiaron muestras de la cavidad bucal de 67 niños del estado de Yucatán, en pacientes cuyas edades estuvieron entre los 3 y 13 años de edad, reportando que 39 (58.2%) tuvieron cultivos positivos a *Candida*, de los cuales 21 (53.8%) correspondieron a *C. albicans*. Concluyendo que esta especie pudiera ser considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de la candidiasis bucal en la población pediátrica (5).

## *Candida albicans* Y SU RELACIÓN CON LA CARIES DENTAL

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece la caries dental como un problema de salud pública, debido a las altas prevalencias reportadas a nivel mundial. Es una enfermedad infecciosa, crónica y multifactorial principalmente en la población pediátrica. México es considerado uno de los países con mayor problema de salud bucal, en el que 60-90% de los niños se encuentran afectados; por lo que se debe tratar oportunamente para conservar el bienestar y calidad de vida de las personas. De acuerdo con los resultados del SIVEPAB 2015 (Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucles), de los niños y adolescentes de 2 a 19 años de edad, el 75% presentan caries dental y el otro el 25% se encuentra libre de caries. Con relación a la edad, aproximadamente la mitad de los niños de 2 años están libres de caries dental, posterior a esta edad, disminuye la población libre de caries, con un crecimiento significativo hasta los 8 años. (8).

Esta enfermedad se encuentra relacionada con diversos factores de riesgo como la higiene oral deficiente, uso prolongado del biberón, alto consumo de azúcares, colonización bacteriana y bajo nivel socioeconómico, ocasionando disminución en la calidad de vida del niño, afectando sus actividades cotidianas con alteraciones del sueño, ausentismo escolar, problemas de fonación, dificultades en la alimentación; provocando un retraso en el desarrollo físico del niño como talla y bajo peso (9,10).

La caries provoca la destrucción del tejido como resultado de un proceso bioquímico de las bacterias adheridas a los dientes, principalmente *Streptococcus mutans* (EM), que metabolizan los azúcares y producen ácido, que, con el tiempo desmineralizan el esmalte dental. Los *Streptococcus mutans*, generalmente se consideran el grupo principal de organismos bacterianos responsables del inicio de la caries dental. La colonización de *Streptococcus mutans* en un bebé puede ocurrir desde el nacimiento, lo que condiciona la colonización significativa de las superficies dentales después erupcionar ya que estas proporcionan espacios que permiten su adherencia de *Streptococcus mutans*. (11-14).

Se han llevado a cabo diversos estudios, como el de Thomas *et al.* (2016), quien reporta una prevalencia de *Candida* entre el 23.7% - 89% en niños con caries dental y 7% - 21% en niños libres de caries. de caries. Estos hallazgos proporcionan evidencia en la asociación de *C. albicans* con la caries dental particularmente en niños, adolescentes y adultos jóvenes (15).

Guangyun Lai y Mingyu Li encontraron que entre las características de *C. albicans* se encuentran la facilidad de adherirse a los tejidos duros del diente formando biopelículas, de igual manera una capacidad altamente acidogénica, disolviendo 20 veces más los cristales de hidroxapatita del esmalte que el *Streptococcus mutans* y una capacidad acidofílica produciendo ácido a un valor de pH inferior a 4.0 y mostrando una fuerte tolerancia a los ácidos. M. Sonesson *et al.* sugirieron que los niños se encuentran bajo el estado de desarrollar inmunidad; y *Candida* spp. tiene potencial para aumentar en número durante los estados inmunes bajos. Por lo tanto, estos factores determinan un papel importante de *C. albicans* en el desarrollo de la caries dental en niños (15-17).

#### FACTORES DE VIRULENCIA DE *C. albicans*

La presencia de factores de virulencia determina el potencial patogénico de cualquier microorganismo. *C. albicans* posee diversos factores de virulencia que aportan a su patogenicidad; que podrían intervenir en el desarrollo de la caries debido a la capacidad de adherirse a las superficies dentales y degradar las proteínas y la matriz extracelular, colonizar la mucosa bucal, fermentar los carbohidratos contribuyendo a la acidez oral y producir enzimas extracelulares (18-20).

Durante la infección de *C. albicans*, los factores de virulencia participan en la primera fase de la colonización, en la cual se logra a través de las adhesinas y posteriormente, se da adhesión epitelial y adquisición de nutrientes mediante la producción de enzimas hidrolíticas, formación de hifas y cambio genotípico. Seguido de la infección superficial, mediante la degradación y penetración tisular, invasión vascular y evasión del sistema inmune, pasando a la fase de infección profunda y terminando con la fase de infección diseminada al adherirse al endotelio, provocando infección de tejidos del hospedero, activación del sistema de coagulación por adhesinas, enzimas hidrolíticas y cambio de fenotipo (3).

## 1.1 FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

Una biopelícula es una agrupación de microorganismos, unidos a una superficie con matriz exopolimérica y muestra propiedades distintivas. La mayoría de los microorganismos son capaces de formar una biopelícula, por ello en el mundo microbiano la formación de comunidades celulares asociadas a una superficie es demasiado común (21-23).

En la formación de la biopelícula, los microorganismos pueden desarrollar características fenotípicas que son diferentes a las que poseen en la forma de vida libre, en los cuales incrementa la resistencia de agentes microbianos, adhesión a dispositivos médicos y protección al sistema inmune del hospedador (21,24-25).

La colonización de los tejidos del huésped se facilita por la asociación de microorganismos a una superficie viva o inerte aumentando sus factores de virulencia, cooperación metabólica, captura eficiente de nutrientes, comunicación célula-célula, aumentando la supervivencia de la comunidad microbiana a condiciones críticas y tolerando a agentes químicos, físicos y biológicos (26).

La biopelícula durante su formación presenta un procedimiento complejo empezando por la adhesión a una superficie abiótica, tejido o en la interfase aire-líquido de acuerdo con sus fases de desarrollo.

1.1.1 Acondicionamiento: La cavidad oral contiene glicoproteínas que provienen de la saliva y de diferentes tipos de bacterias, estas biopelículas están conformadas por microcolonias incluidas dentro una matriz polimérica y representa una forma de crecimiento microbiano (24-27).

1.1.2 Adhesión: Las adhesinas son moléculas que se encargan de mediar la ligación entre células, polímeros inertes o proteínas; en este proceso los receptores son las estructuras a las cuales estas se ligan (24-27).

1.1.3 Coadhesión: Las especies de *Candida* se unen a receptores en las superficies de bacterias u otro microorganismo. *Candida* spp. puede interactuar con otros microorganismos que participan durante la colonización primaria, secundaria o tardía como los *S. mutans* y *S. mitis*, entre otros (24-27).

1.1.4 Síntesis de matriz extracelular: La matriz celular esta formada por una malla de proteínas y azúcares alrededor de las células microbianas y se encarga de proteger a la célula contra factores hostiles como la inmunidad del huésped y los antimicrobianos.

1.1.5 Maduración: La matriz extracelular favorece la maduración de la biopelícula, a las 8 horas forma una biopelícula temprana, de 12 a 30 horas intermedia y de 38 a 72 horas madura. La biopelícula madura está formada de una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas recubiertas por una matriz extracelular y asociada a bacterias, las cuales, son favorecidas por factores como: el flujo del medio que las rodea, el pH, la temperatura y la osmolaridad (28).

1.1.6 Dispersión: Son los microorganismos desalojados de las microcolonias por diferentes medios, que si encuentran áreas propicias para su supervivencia podrán reiniciar el ciclo de formación de la biopelícula (24-27).

## 1.2 ADHERENCIA

La capacidad de adherencia de *Candida* spp. a las superficies mucosas es el primer paso para la colonización y posterior infección del huésped impidiendo el retiro del microorganismo por la limpieza de las secreciones de la mucosa, logrando facilitar el proceso de la infección (5,29).

La interacción de *Candida* spp. con las células epiteliales del huésped se presenta por los componentes de la pared celular que se unen en la superficie de la célula huésped, incluyendo proteínas y carbohidratos (5,30,31).

Las biomoléculas que promueven la unión de proteínas y carbohidratos se llaman adhesinas (Ala1p, Als1p y Hwp1p, Csh1, Ywp1, Pra1 y Saps) son esenciales para la colonización y desarrollo de la enfermedad (32).

La invasión de superficies epiteliales penetrando en el espacio intersticial y degradando las uniones intraepiteliales, la invasión entre células epiteliales está mediada tanto por endocitosis inducida como por penetración activa. Ambos, son mecanismos de adhesión a células epiteliales por las especies de *Candida*, la E-cadherina se produce por vía proteólisis por enzimas degradativas como Saps y su función es degradar proteínas de unión celular que provocan un daño significativo a las células epiteliales (33-35).

La familia de genes *Agglutinin-Like Sequence (ALS)* es un grupo de adhesinas que transcriben ocho proteínas de la superficie celular a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y cuyos miembros median la unión a diversos sustratos del hospedero. Cada gen se expresa de forma diferente, dependiendo de la especie y la presencia de proteínas dianas. Las ALS forman agregados similares a la aglutinina a lo largo de la superficie celular, facilitando la aglutinación de las células fúngicas (32).

### 1.3 ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA

Las fosfolipasas es un factor de virulencia propio de *Candida* asociada a la adhesión, penetración e invasión de las células epiteliales, estas son un grupo de enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar uno o más enlaces éster en glicerofosfolípidos (32,36,37).

Las fosfolipasas representan un importante daño causado a las membranas celulares, poseen la capacidad de degradar lípidos y proteínas que las forman. (32,38,39).

La producción de esta enzima se considera como un elemento fundamental para la patogénesis de esta levadura, ya que determinan en la capacidad de un microorganismo para provocar infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos. Se han determinado siete genotipos (PLA, PLB1, PLB2, PLC1, PLC2, PLC3 y PLD1), y cuatro de estos (PLB1, PLB2, PLC1 y PLD1) han sido bien caracterizados, para la invasión PLB1 es importante por la función de hidrolizar las uniones de éster de glicerofosfolípidos de la membrana celular del hospedero (32,39,40).

A la fosfolipasa se le atribuye la hidrólisis de cadenas de fosfoglicéridos, el control del crecimiento de la levadura y el remodelado de la membrana celular, aparentemente la expresión de genes PLB1 estaría regulada por los mismos factores que regulan la morfología del hongo (41-42).

Por otra parte, estas enzimas se relacionan con el mecanismo de invasión tisular del huésped, se le ha dado mayor importancia a la aportación de estas enzimas a la patogenicidad del hongo que al control del crecimiento y dependiendo de la especie de *Candida* la actividad enzimática cambia (3,38,39,41-43).

#### 1.4 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

El hierro es un elemento esencial para casi todos los organismos, tanto unicelulares como multicelulares, en los seres humanos, el hierro se encuentra en algunas proteínas presentes en la sangre como transferrina, lactoferrina y ferritina incluida la hemoglobina la cual forma parte de los eritrocitos. La actividad hemolítica es un importante factor de virulencia, que permite que los hongos del género *Candida* adquieran hierro de los tejidos del huésped, que luego es utilizado en el metabolismo del microorganismo promoviendo el crecimiento y la invasión durante la infección del hospedador (44-46).

El primer paso de la infección de *C. albicans* es la unión a los eritrocitos a través de los receptores del “sistema complemento”, produciendo un factor de hemólisis que induce la lisis del eritrocito, este factor corresponde a una manoproteína unida a la superficie celular del hongo (44).

En la cavidad oral, el hierro extracelular se une principalmente a la lactoferrina, una proteína presente en la saliva, mientras que el hierro intracelular se almacena como ferritina. Aunque este elemento está ligado a las proteínas y/o está presente en el citoplasma de las células, las infecciones orales con *C. albicans* son frecuentes, lo que sugiere que esta levadura puede tomar diferentes formas de hierro de la cavidad oral causando mayor daño a las células epiteliales que contienen concentraciones de ferritina en comparación con niveles más bajos (44-47).

## HIPÓTESIS

Con base en la revisión de la literatura, en el presente estudio, se establece la siguiente hipótesis de investigación:

Hi: Existen diferencias en los factores de virulencia (formación de biopelícula, fosfolipasa y capacidad hemolítica) producidos por las cepas de *C. albicans* aisladas de niños con y sin caries dental.

Y como hipótesis nula

Ho: No existen diferencias en los factores de virulencia (formación de biopelícula, fosfolipasa y capacidad hemolítica) producidos por las cepas de *C. albicans* aisladas de niños con y sin caries dental.

## JUSTIFICACIÓN

*Candida albicans* se encuentra con mayor frecuencia en la cavidad oral de niños, aumentando las infecciones producidas por este microorganismo en los últimos años. La caracterización de los factores de virulencia contribuye a la comprensión de las infecciones por *Candida albicans*. Lo anterior mencionado ha despertado interés en la investigación de sus factores de virulencia, así como su patogenicidad para poder diseñar estrategias y medidas futuras para el tratamiento y seguimiento de *Candida albicans* en pacientes con y sin caries dental.

En el presente estudio determina la producción de adhesión, fosfolipasa y actividad hemolítica en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de niños con y sin caries dental que pertenecen al Departamento de Investigación de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán lo que lo hace viable y pertinente, ya que hasta el momento son pocos los estudios sobre los factores de virulencia de *Candida albicans* asociados a la caries dental, por lo que el presente estudio es el primer trabajo en México que permite establecer estas diferencias.

Con base en lo anterior, se justifica la realización del presente trabajo con el fin de contribuir al conocimiento de este microorganismo y su asociación de sus factores de virulencia con el desarrollo de la caries dental en la región, además de su aportación académica relevante en la Universidad Autónoma de Yucatán.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar los factores de virulencia en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de niños con y sin caries dental.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la capacidad de formación de biopelícula de *Candida albicans* aisladas de escolares con y sin caries dental.
2. Determinar la actividad de fosfolipasa de cepas de *Candida albicans* aisladas de escolares con y sin caries dental.
3. Determinar la actividad hemolítica de cepas de *Candida albicans* aisladas de escolares con y sin caries dental.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO DEL ESTUDIO

El tipo de estudio realizado fue descriptivo, observacional, transversal y prospectivo.

### VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

VARIABLES	Tipo de variable	Indicador	Escala de medición	Objetivo a cumplir	Análisis estadístico
Caries dental	Independiente	Índice CPO D, ceo-d	Cualitativa nominal: -Presencia -Ausencia	1-3	T de Student y Chi Cuadrada
Formación de biopelícula	Dependiente	Detección visual de la capacidad de adherencia a través del tubo (33).	Cualitativa ordinal: -Negativa, transparente sin biopelícula -Débil (+), capa muy delgada apenas visible en la parte inferior -Moderada (+++), capa delgada en la parte inferior y los lados del tubo -Fuerte (+++), capa gruesa en todas partes el fondo y los lados del tubo)	1	Chi Cuadrada

Actividad hemolítica	Dependiente	Índice del tamaño del halo producido por la actividad de la enzima hemolisina del hongo (48).	Cuantitativa. Pz: Actividad enzimática  -Negativo: 1 -Positivo: 0.64-0.99 -Fuertemente positivo: < 0.64	2	T student
Actividad de la Fosfolipasa	Dependiente	La actividad de la fosfolipasa se midió dividiendo el diámetro de la colonia por el diámetro de la zona de precipitación (pz) alrededor de la colonia formada en la placa (33).	Cuantitativa Índice pz <0.69 Mayor actividad (++++) -0.70-0.79 Actividad moderada (+++) -0.80 -0.89 Actividad débil (++) -0.90 - 0.99 Actividad muy débil (+) -1 Negativo (-)	3	T student

## POBLACIÓN DE ESTUDIO

Cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de niños con caries y sin caries dental que pertenecen al cepario del Departamento de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán.

## MUESTRA

Se estudiaron a la totalidad de cepas aisladas en estudio previo con un total de 31 cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con caries dental y 9 cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes sin caries dental, las cuales se encontraban conservadas a -82°C en Caldo Dextrosa Sabourad (CDS) con glicerol al 20% en el Departamento de Microbiología y Biología Molecular de la FOUADY.

## METODOLOGÍA

### Recuperación de las cepas de *C. albicans*

Una porción de la cepa congelada se inoculó en Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) por 24 horas para posteriormente ser cultivada en una placa de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) por 24 h a 37°C.

Posteriormente, una colonia del cultivo en ADS se cultivó en el medio CHROMagar *Candida*® por 24 h a 37°C. Los cultivos de color verde claro fueron considerados como cepas de *C. albicans*, acorde a los registros de los resultados previos.

### Determinación de la formación de biopelícula de *C. albicans*

La determinación de la producción de biopelícula se realizó mediante el método visual según Furlaneto-Maia *et al* (20). Las cepas fueron aisladas y cultivadas a 37°C durante 24 h en placas de ADS. Posteriormente, se lavaron con solución salina a 4000 rpm por 4 minutos. Se realizó una suspensión de las levaduras hasta una turbidez equivalente a  $3 \times 10^7$  UFC/ml en Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) suplementada con glucosa al 8%. Un ml de la suspensión se inoculó en tubos de poliestireno (tubo cónico Falcon con tapa roscada) con 9 ml de Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS). Se incubaron a 35°C durante 48 horas. Posteriormente se retiró cuidadosamente el caldo del cultivo y los tubos se lavaron una vez con agua destilada estéril y luego se tiñeron las paredes de los tubos con safranina al 2% (20).

La producción de biopelícula se calificó como negativa (transparente sin producción de biopelícula), débil (+; capa muy delgada, apenas visible en la parte inferior), moderada (++; capa delgada en la parte inferior y los lados del tubo) o fuerte (+++; una capa gruesa en todas partes el fondo y los lados del tubo). Para todos los ensayos se utilizó la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 como control positivo y un inóculo de CDS como control negativo (20).

#### Determinación *in vitro* de la actividad hemolítica

La determinación de la actividad hemolítica se realizó según lo descrito por Furlaneto-Maia *et. al* (20). y Price *et al* (48). Se preparó ADS de sangre de oveja añadiendo 7 ml de sangre de oveja fresca a 100 ml de ADS suplementado con glucosa al 3%. Las cepas aisladas fueron cultivadas e incubadas en placas de ADS a 37°C durante 18 h. Posteriormente, se prepararon suspensiones de levadura a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml a partir del cultivo puro de las colonias de levadura en las placas de ADS. 10µl de esta suspensión fue inoculada en el ADS de sangre de oveja al 7% suplementada con glucosa al 3%. Las placas inoculadas se incubaron a 37°C durante 48 horas. La presencia de un anillo transparente y/o un halo verde oscuro alrededor del inóculo, es indicativo de actividad hemolítica (20,48).

El índice hemolítico (IH) se obtuvo dividiendo el diámetro de la colonia entre la suma del diámetro de la colonia y el halo transparente. Valores de  $IH < 0.64$  indicaron alta actividad hemolítica y cercana a 1.0 menos o nula actividad. Los ensayos se realizaron por triplicado, por lo que se obtuvo un promedio del valor de IH de cada una de las cepas estudiadas. Una vez obtenidos los valores de IH de cada cepa, se procedió un análisis estadístico utilizando medidas de tendencia central como promedio y desviación estándar. Se utilizó la prueba de estadística de t de Student para establecer diferencias estadísticamente significativas de la actividad hemolítica (20,48).

Para todos los ensayos se utilizó como control positivo la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 y como control negativo el inóculo de 10 µl de agua destilada (20,48).

#### Determinación de la producción y actividad de la fosfolipasa

Siguiendo la metodología de Price (1982), descrita por Oksuz *et al* (42), para medir la actividad de la fosfolipasa, se cultivó una colonia de la cepa aislada en el medio de

cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) a 37°C por 24 h. Se tomó el equivalente de 3 colonias de cada inóculo, se colocaron en 5 ml de solución salina y se igualó a una lectura de 0.075 de absorbancia. Posteriormente, 10 µl de la suspensión se depositó sobre el medio de Agar Yema de Huevo (13,0 g SGA (Oxoid), 11,7 g de NaCl, 0,11 g de CaCl<sub>2</sub> y 10% de yema de huevo estéril (Oxoid), 184 ml de agua destilada). El cultivo se incubó a 37°C durante 7 días y los ensayos se realizaron por triplicado. Los valores de Pz se obtuvieron dividiendo el diámetro de la colonia levaduriforme entre el diámetro de la colonia más la zona de producción enzimática. El índice de Pz arrojó valores que van de cero a uno, índices de Pz comprendidos entre 0.64 y 0.99 se consideraron como actividad positiva. La escala de Pz se dividió de la siguiente manera: los valores menores de 0.69 se consideraron como de mayor actividad, los valores comprendidos entre 0.70 y 0.79 de actividad moderada, los que se encontraron entre 0.80 y 0.89 de actividad débil, 0.9 y 0.99 como de actividad muy débil y 1 como actividad negativa (48).

## MÉTODOS DE MEDICIÓN Y ESTANDARIZACIÓN

### 1. Medición y estandarización de la formación de biopelícula

Según los criterios por Udayalaxmi y Gokce (33), para detectar la presencia de una capa adherente de biopelícula de *C. albicans* en el objetivo 4x del microscopio se examinaron los tubos y se determinaron las frecuencias según las categorías de débil, moderado y fuerte de acuerdo con la densidad e intensidad de la tinción. Los ensayos se realizaron por triplicado y con dos observadores, se obtuvo la moda de los resultados y se determinó si existía una asociación entre los niveles y los grupos de procedencia, por lo cual, se realizó la prueba estadística de Chi cuadrada (33).

### 2. Medición y estandarización de la actividad hemolítica

La presencia de un anillo transparente y/o un halo verde oscuro alrededor del inóculo, es indicativo de actividad hemolítica. El índice hemolítico (IH) se obtuvo dividiendo el diámetro de la colonia entre la suma del diámetro de la colonia y el halo transparente. Valores de  $IH \leq 0.64$  indican alta actividad hemolítica y cercana a 1.0 menos o nula actividad hemolítica. Los ensayos se realizaron por triplicado, por lo que se obtuvo un promedio del valor de IH de cada una de las cepas estudiadas. Una vez obtenidos los

valores de IH de cada cepa, se procedió un análisis estadístico utilizando medidas de tendencia central como promedio y desviación estándar. Se utilizó la prueba de estadística de t de Student para establecer diferencias estadísticamente significativas de la actividad hemolítica (20,48).

### 3. Medición y estandarización de la actividad de la fosfolipasa

Se midió el diámetro de la zona de precipitación alrededor de la colonia (un indicador de la actividad de la fosfolipasa). Siguiendo la metodología de Price (1982), descrita por Oksuz *et al* (42) se calculó el índice de actividad enzimática (Pz), para esto, se dividió el diámetro de la colonia levaduriforme entre el diámetro de la colonia + zona de producción enzimática. El índice de Pz arrojó valores que van de cero a uno, índices de Pz comprendidos entre 0.64 y 0.99 se consideraron como actividad positiva. La escala de Pz se dividió de la siguiente manera: los valores menores de 0.69 se consideraron como de mayor actividad, los valores comprendidos entre 0.70 y 0.79 de actividad moderada, los que se encontraron entre 0.80 y 0.89 de actividad débil y los que se encontraron entre 0.9 y 0.99 como de actividad muy débil y 1 como actividad negativa (42).

### 4. Recopilación y manejo de resultados

Los resultados obtenidos de las cepas estudiadas fueron organizados y clasificados en un a base de datos utilizando el programa Microsoft Excel 2013 y los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1.

## RESULTADOS

Todas las cepas de *C. albicans* estudiadas dieron positivas a la formación de biopelícula. El 61% de las cepas provenientes de pacientes con caries dental presentaron mayor capacidad de biopelícula en comparación con las provenientes de pacientes sin caries dental con el 77% de actividad baja.

Los resultados de la formación de biopelícula se obtuvieron de acuerdo con la clasificación cualitativa de: débil, moderado y fuerte que presentaron las cepas de *C. albicans* de cada grupo (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la formación de biopelícula de *C. albicans* y distribución porcentual según el grupo de estudio.

Grupo de estudio	Nivel de formación de biopelícula						X <sup>2</sup>	p
	Fuerte		Moderado		Débil			
	No	%	No	%	No	%		
Cepas con caries dental	19	61	11	36	1	3	23.23	<0.05*
Cepas sin caries dental	0	0	2	22	7	77		

\*=Diferencia estadísticamente significativa

Se llevó a cabo la prueba estadística Chi cuadrada para determinar si el nivel de formación de biopelícula de las cepas es independiente del grupo origen, encontrándose un valor de X<sup>2</sup>=23.23 y un valor de p<0.05, por lo que se acepta que, en este estudio, el nivel de formación de biopelícula es dependiente del grupo origen de las cepas.

Con respecto a la actividad de las fosfolipasas, el 100% de las cepas de *C. albicans* estudiadas mostraron actividad, siendo mayor en las provenientes de pacientes con caries dental con un promedio de 0.49 en comparación con las provenientes de pacientes sin caries dental con un promedio de 0.75 (Tabla 2).

Tabla 2. Valor promedio del índice Pz de la actividad de la fosfolipasa en cepas de *C. albicans* de los distintos grupos de pacientes

Grupo de estudio	Muestra	Índice Pz	t	p
Cepas con caries dental	31	0.49	0.97	<0.05
Cepas sin caries dental	9	0.75		

\*=Diferencia estadísticamente significativa

Para comparar la actividad de fosfolipasas de las cepas de *C. albicans* entre los grupos de pacientes con y sin caries dental, se llevó a cabo la prueba de estadística de t de Student, encontrándose un valor de  $t=0.97$  y un valor de  $p<0.05$ , presentando una diferencia estadística significativa de la actividad de fosfolipasa entre los grupos de estudio.

Referente a la actividad hemolítica, el 100% de las cepas de *C. albicans* estudiadas mostraron actividad, siendo mayor en las provenientes de pacientes con caries dental con un promedio de IH de 0.59 en comparación con las provenientes de pacientes sin caries dental con un IH de 0.66 (Tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio de IH de la actividad hemolítica de las cepas de *C. albicans* de los distintos grupos de pacientes.

Grupo de estudio	Muestra	Índice IH	t	p
Cepas con caries dental	31	0.59	0.24	<0.05
Cepas sin caries dental	9	0.66		

Para comparar la actividad hemolítica de las cepas de *C. albicans* entre los grupos de pacientes con y sin caries dental, se llevó a cabo la prueba de estadística de t de Student, encontrándose un valor de  $t=0.24$  y un valor de  $p<0.05$ , encontrándose una diferencia estadística significativa de la actividad hemolítica entre los grupos de estudio.

## DISCUSIÓN

Diversos investigadores han encontrado que entre las características de *C. albicans* se encuentran la facilidad de adherirse a los tejidos duros del diente formando biopelículas, al igual que poseer la capacidad de ser altamente acidogénica, disolviendo 20 veces más los cristales de hidroxiapatita del esmalte que el *Streptococcus mutans*, produciendo un ácido a un valor de pH inferior a 4.0 mostrando una fuerte tolerancia a los ácidos. M.Sonesson *et al.* consideran el sistema inmunitario de los niños se encuentra en desarrollo; por lo tanto, *Candida spp.* tiene la capacidad de crecer durante los estados deprimidos del sistema inmune. Estos factores juegan un papel importante de *C. albicans* y su relación con el desarrollo de la caries dental, así mismo, los factores de virulencia (formación de biopelícula, actividad de fosfolipasa y hemolítica) presentes en la patogenicidad de *C. albicans* (15-17).

La formación de biopelícula y su capacidad de adherencia es el paso principal para la colonización y posteriormente la infección del huésped, por lo tanto la actividad de fosfolipasa causa a las membranas celulares ya que posee la capacidad de degradar lípidos y proteínas que las constituyen. En cuanto a la actividad hemolítica, es sustancial la obtención de hierro para aportar nutrientes de procesos químicos fundamentales (18).

En el presente estudio, todas las cepas dieron positivas a la formación de biopelícula, de las cuales el 61% de las cepas provenientes de pacientes con caries dental presentaron mayor capacidad de biopelícula en comparación con las provenientes de pacientes sin caries dental con el 77% de actividad baja. Durante los análisis de los resultados obtenidos con la prueba estadística Chi cuadrada, encontrándose un valor de  $X^2=23.23$  y un valor de  $p<0.05$ . Como conclusión en este estudio la capacidad de formación de la biopelícula depende de la presencia o ausencia de caries dental. De igual manera con lo reportado por Udayalaxmi y Shenoy quienes reportaron que las cepas de *C. albicans* con caries dental producen un aumento de la biopelícula que predispone la formación de caries dental (33). Briguenti *et al* demostraron que los mecanismos de adhesión influyen de manera directa y significativa en la caries dental debido a las altas concentraciones de ácido, polisacárido extracelulares y proteínas (49).

Con respecto a la actividad de fosfolipasa Cassia Mardegan *et al*, demostraron que el 92.3% de las cepas totales de individuos con caries y el 98% libres de caries resultaron positivo a la producción de fosfolipasa. La prueba t de Student reveló estadísticamente diferencia significativa ( $p = 0.034$ ) en relación con cepas negativas para la actividad de la enzima, siendo más común en el grupo con caries dental (50), Beena *et al*, mostraron en cepas aisladas de *C. albicans* de un grupo con caries dental mayor producción de fosfolipasa, mientras que en el grupo libre de caries dental estaba ausente (51), concordando con el presente estudio reportando el 100% de las cepas de *C. albicans* estudiadas mostraron actividad, siendo mayor en las provenientes de pacientes con caries dental con un promedio de 0.49 en comparación con las provenientes de pacientes sin caries dental promedio de 0.75. En el análisis de los resultados con la prueba de estadística de t de Student se encontró un valor de  $t=0.97$  y un valor de  $p<0.05$ , presentando una diferencia estadística significativa de la actividad de fosfolipasa entre los grupos de estudio concluyendo la presencia de caries dental se encuentra relacionada y aumenta de manera significativa la actividad fosfolipasa de *C. albicans* y su virulencia.

Asimismo, en la actividad hemolítica se encuentran escasos estudios sobre cepas aisladas de *C. albicans* en pacientes con y sin caries dental. Beena *et al*, reportan que la actividad hemolítica de cepas aisladas de *C. albicans* de pacientes con caries dental fue significativamente mayor en comparación en las aisladas de pacientes sin caries dental (51). Udayalaxmi y Shenoy reportan mayor presencia de actividad hemolítica en cepas aisladas con caries dental en comparación a libres de caries, sin embargo, se requieren más estudios para determinar que desempeña un papel en la formación de caries dental (33). En este estudio, se encontró que el 100% de las cepas de *C. albicans* estudiadas mostraron actividad, siendo esta mayor en cepas de pacientes con caries dental con un promedio de IH de 0.59 en comparación con las cepas de pacientes sin caries dental con un IH de 0.66. En los resultados se observó con la prueba de estadística de t de Student, encontrándose un valor de  $t=0.24$  y un valor de  $p<0.05$ , presentando una diferencia estadística significativa de la actividad hemolítica entre los grupos de estudio.

Por lo tanto, la presencia de caries dental en el paciente se encuentra directamente relacionada y aumenta significativamente la actividad hemolítica de *C. albicans* aumentando su patogenicidad.

La presencia de factores de virulencia determina el potencial patogénico de cualquier microorganismo. *Candida albicans* posee diversos factores de virulencia como la actividad de la fosfolipasa, proteinasa, hemolítica y capacidad de adherencia entre otros que podrían intervenir en el desarrollo de la caries, como la capacidad de adherirse a las superficies dentales y degradar las proteínas y la matriz extracelular, colonizar la mucosa bucal, fermentar los carbohidratos (contribuyendo a la acidez oral) y producir enzimas extracelulares, todas ellas de los cuales contribuyen a su patogenicidad. En este estudio todos los factores de virulencia se encontraron aumentados en las cepas provenientes de pacientes con caries dental (18-20).

## CONCLUSIONES

1. La capacidad de formación de biopelícula es dependiente del grupo de origen de las cepas, siendo mayor en los pacientes con caries dental.
2. La actividad de la fosfolipasa fue estadísticamente mayor en las cepas provenientes de los niños con caries.
3. Las cepas de los niños con caries tuvieron una actividad hemolítica estadísticamente mayor que las de niños sin caries.
4. Se encontró una asociación entre los factores de virulencia (formación de biopelícula, fosfolipasa y actividad hemolítica) de las cepas de *C. albicans* y la presencia de caries dental.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Flota-Alcocer AD, Aguilar-Ayala FJ, Rodríguez Fernández MS, Lama-González E. Influencia de la aparatología ortodóntica sobre la ocurrencia de *Candida* spp. en la cavidad oral. Rev Chilena Infectol. 2016;33(3):293-7.
2. Lozano Moraga CP, Rodríguez Martínez GA, Lefimil Puente CA, Morales Bozo IC, Urzúa Orellana BR. Prevalence of *Candida albicans* and carriage of *Candida non-albicans* in the saliva of preschool children, according to their caries status. Acta Odontol Scand. 2016;75(1):1-6.
3. Calle Rodríguez N, Santa Vélez C, Cardona Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. Revista CES. 2012;26(1):43-55.
4. Pardi G, Cardozo I. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta Odontol Venez. 2002;40(1):9-17.
5. Hernández-Solis SE, Rueda-Gordillo F, Pereira-Góngora JR, Villamil-Urzais JL. Frecuencia de portadores de *C. albicans* en un grupo de niños de una comunidad rural del estado de Yucatán. Rev Odontol Latinoam. 2008;0(1):1-4.
6. Rozkiewickz D, Daniluk T, Zaremba ML, Cylwik-Rokicka D, Stokowska W, Pawinska M, Dabrowska E, Marczuk-Kolada G, Waskiel D. Oral *Candida albicans* carriage in healthy preschool and school children. Adv Med Sci. 2006;51(1):187-90.
7. Hernández-Solis SE, Rueda-Gordillo F, Rojas-Herrera RA. Proteinase activity in *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of immunocompromised patients, with oral candidiasis and in healthy subjects. Rev Iberoam Micol. 2014; 31(2):137-40.
8. Secretaria de Salud. Resultados de la vigilancia epidemiológica de patologías bucales SIVEPAB 2015. México: Secretaria de Salud; 2015. Acceso 21 de Agosto de 2017. Disponible en: [www.gob.mx/salud/documentos/informes-sivepab-2015](http://www.gob.mx/salud/documentos/informes-sivepab-2015) .
9. Aguilar Ayala FJ, Duarte Escobedo CG, Rejón Peraza ME, Serrano Piña R, Pinzón Té AL. Prevalencia de caries de la infancia temprana y factores de riesgo asociados. Acta Pediatr Mex. 2014;35(4):259-66.

10. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3(17030):1-16.
11. Klinker T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res*. 2011;45(2):100-6.
12. Koo H, Bowen W. *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*: a potential synergistic alliance to cause virulent tooth decay in children. *Future Microbiol*. 2014; 9(12):1295-97.
13. Kim D, Sengupta A, Niepa T, Lee BH, Wljie A, Freitas-Blanco V, Murata R, Stebe Kathleen, Lee D, Koo H. *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Sci Rep*. 2017;7(41332):1-14.
14. Xiao J, Huang X, Alkhers N, Alzamil H, Alzoubi S, Wu TT, Castillo CA, Campbell F, Davis J, Herzog K, Billings R, Kopycka-Kedzierawski DT, Hajishengallis E, Koo H. *Candida albicans* and Early Childhood Caries: A systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Res*. 2008;52(1-2):102-12.
15. Thomas A, Mhambrey S, Chokshi K, Chokshi A, Jana S, Thakur S, Jose D, Bajpai G. Association of oral *Candida albicans* with severe early childhood caries-A pilot study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016;10(8):ZC109-2.
16. Guangyun L, Mingyu L. The possible role of *Candida albicans* in the progression of dental caries. *Int. Res. J. Microbio*. 2011;2(12):504-6.
17. Carvalho FG, Manzano Parisotto TM, Hebling J, Spolidorio LC, Palomari Spolidorio DM. Presence of *Candida* spp. in infants oral cavity and its association with early childhood caries. *Braz J Oral Sci*. 2007;6(19):1249-53.
18. Castrillón Rivera LE, Palma Ramos A, Padilla Desgarenes C. Factores de virulencia en *Candida* spp. *Dermatología Rev Mex*. 2005;49(1):12-27.
19. García C, Viasus D, Carratala J. Pathogenesis of invasive fungal infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(3):270-6.
20. Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, Oliveira MT, Furlaneto MC. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathol*. 2008;166(8):209-17.

21. Zarnowski R, Sanchez H, Andes DR. Large-scale production and isolation of *Candida* biofilm extracellular matrix. *Nat Protoc.* 2016;11(12):2320-7.
22. Ardesia M, Mondello P, Fries W. Biofilm-producing fungi as emergent cause of bloodstream infections in patients with inflammatory bowel disease. *Med Clin.* 2017; 149(6):272-3.
23. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(9):3291-7.
24. Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 2001;18(4):163-70.
25. Vidotto V, Mantoan B, Pugliese A, Ponton J, Quindos G, Aoki S. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. *Rev Iberoam Micol.* 2003;20(2):52-4.
26. Vipulanandan G, Herrera M, Wiederhold NP, Li X, Mintz J, Wickes BL. Dynamics of Mixed-*Candida Species* Biofilms in Response to Antifungals. *J Dent Res.* 2017;97(1):91-8.
27. Lima-Neto RG, Beltrao EI, Oliveira PC, Neves RP. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses.* 2011;54(1):23-9.
28. Castrillón Rivera LE, Palma Ramos A, Padilla Desgarenes MC. Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev Mex.* 2013;57(5):350-61.
29. Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, Yang R, Liu Y, Zou J. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2012;57(8):1048-3.
30. Ghasempour M, Ashgar Sefidgar SE, Samaneh Gharakhani HE. Prevalence of *Candida albicans* in dental plaque and caries lesion of early childhood caries (ECC) according to sampling site. *Caspian J Intern Med.* 2011;2(4):305-8.
31. Willems HM, Kos K, Jabra-Rizk MA, Krom B. *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. *Pathog Dis.* 2016;74(5):1-6.
32. Rodríguez J, Santa C, Cardona N. Virulence factors of *Candida albicans* and dermatophytes in keratinized tissues infection. *Rev CES.* 2012;26(1):43-5.

33. Udayalaxmi J, Shenoy N. Comparison between biofilm production, phospholipase and hemolytic activity of different species of *Candida* isolated from dental caries lesions in children. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(4):21-3.
34. Cavalho FG, Silva Souza D, Hebling J, Spolidorio LC, Palomari Spolidorio DM. Presence of *mutans streptococci* and *Candida* spp. In dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2006;51(11):1024-8.
35. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Gianini MJ. *Candida species*: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013;62(1):10-24.
36. Mohandas V, Ballal M. Distribution of *Candida species* in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. *J Glob Infect Dis.* 2011;3(1):4-8.
37. Mohandas V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida species* isolated from blood. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25(4):208-10.
38. Tsang CS, Chu FC, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and hemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol.* 2008;57(19):1393-8.
39. Panizo M, Reviakina V, Flores Y, Montes W, González G. Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida* spp. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.* 2005;25(2):217-28.
40. Ramos L, Barbedo-Silva-LA, Dos Santos AI, Pinto MR, Sgarbi DB. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol.* 2015;32(2):122-5.
41. Ombrella AM, Racca L, Ramos L. Protease and phospholipase activities of *Candida albicans* isolated from vaginal secretions with different pH values. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25(1):12-6.
42. Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida species* isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn Infect Dis.* 2007;60(5):280-3.

43. Kumar CP, Kumar SS, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia*. 2006; 161(4):213-8.
44. Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SF, Junqueira JC. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and *non albicans Candida species*. *Braz Oral Res*. 2013; 27(6):484-9.
45. Yigit N, Aktas E, Dagistan S, Ayvildiz A. Investigating biofilm production, coagulase and hemolytic activity in *Candida species* isolated from denture stomatitis patients. *Eurasian J Med*. 2011;43(1):27-32.
46. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida species* exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol*. 2001;39(8):2971-4.
47. De Melo Riceto EB, De Paula Menezes R, Amante Penatti MP, Dos Santos Pedroso R. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida species*. *Rev Iberoam Micol*. 2015;32(2):79-2.
48. Price MF, Wilkinson ID, Hentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982; 20(1):7-14.
49. Briguenti Lourencao F, Medeiros Coelho A, Mello Matos B, Ribeiro Abreu ZE, Kogaito CY. Evaluation of caries-associated virulence of biofilms from *Candida albicans* isolated from saliva of pediatric patients with sickle-cell anemia. *J Appl Oral Sci*. 2014;22(6):484-9.
50. Cássia Mardegan R, Klein MI, Baglione Golvea M, Oliveira Rodrigues JA, Goncalves RB, Hotfling JF. Biotyping and genotypic diversity among oral *Candida albicans* strains from caries-free and caries-active healthy children. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006;37(1):26-32.
51. Beena MS, Faizal P, Gufran Afmed MB, Chandru TP, Soni K, Dhanesh N. Comparison of *Candida species* isolated from children with and without early childhood caries: A descriptive cross-sectional study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2017;35(4):296-300.