



UADY
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA Y PROTEINASA EN CEPAS DE
Candida albicans AISLADAS DE PACIENTES CON PRÓTESIS

Tesis presentada por:
MARÍA ANTONIETA NAVARRETE MARTÍNEZ

En opción al Diploma de Especialización en:
ODONTOLOGÍA RESTAURADORA

Directores de Tesis:
DR. FLORENCIO RUEDA GORDILLO
M. EN O. PEDRO ERNESTO LUGO ANCONA

Mérida, Yucatán, Julio de 2018



UADY
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA

ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA Y PROTEINASA EN CEPAS DE
Candida albicans AISLADAS DE PACIENTES CON PRÓTESIS

Tesis presentada por:
MARÍA ANTONIETA NAVARRETE MARTÍNEZ

En opción al Diploma de Especialización en:
ODONTOLOGÍA RESTAURADORA

Directores de Tesis:
DR. FLORENCIO RUEDA GORDILLO
M. EN O. PEDRO ERNESTO LUGO ANCONA

Mérida, Yucatán, Julio de 2018



UADY
CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE
ODONTOLÓGIA

UNIDAD DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Mérida, Yucatán, 1 de Julio de 2018

C. MARÍA ANTONIETA NAVARRETE MARTÍNEZ

Con base en el dictamen emitido por sus Directores y revisoras, le informo que la Tesis titulada "**ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA Y PROTEINASA EN CEPAS DE *Candida albicans* AISLADAS DE PACIENTES CON PRÓTESIS**", presentada como cumplimiento a uno de los requisitos establecidos para optar al Diploma de la Especialización en Odontología Restauradora, 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. Pedro Ernesto Lugo Ancona
Director de Tesis

Dr. Florencio Rueda Gordillo
Director de Tesis

C. D. Carolina Valeria Abeytia Gómez
Revisora

Dra. Sandra Elena Hernández Solís
Revisora

Artículo 78 del Reglamento Interior
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 llevó a cabo en la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, en el Departamento de Microbiología Oral y Biología Molecular, haciendo uso de sus instalaciones material y equipos. Bajo la dirección del Dr. Florencio Rueda Gordillo. Los resultados presentados son parte del proyecto de investigación Actividad de la Fosfolipasa y Proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con prótesis.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser infinitamente bondadoso conmigo, por darme a los padres más buenos y por demostrarme una y otra vez que esta siempre ahí, en todas las cosas, en todos los momentos.

A mi papá y mi mamá, gracias por TANTO, no puedo expresar de ninguna forma lo agradecida que estoy con ustedes, por ser mi soporte, mi ayuda, el motor que me impulsó todas las veces que lo necesité, gracias por hacer de mí lo que soy hoy, profesional y personalmente.

A mis asesores y profesores, por guiarme en estos dos años en la realización de esta tesis y por formarme profesionalmente con ética y responsabilidad.

ÍNDICE

| | |
|----------------------------|----|
| DEFINICIÓN DEL PROBLEMA | 1 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 2 |
| JUSTIFICACIÓN | 15 |
| OBJETIVOS | 16 |
| MATERIAL Y MÉTODO | 17 |
| DISEÑO DEL ESTUDIO | 17 |
| POBLACIÓN DE ESTUDIO | 17 |
| METODOLOGÍA | 17 |
| RESULTADOS | 21 |
| DISCUSIÓN | 27 |
| CONCLUSIONES | 29 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 30 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA 1. FACTORES PREDISPONENTES EN CANDIDIASIS | 9 |
| TABLA 2. COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR PERTENECIENTES AL BIOFILM DE <i>C.ALBICANS</i> | 12 |
| TABLA 3. GRADOS DE ACTIVIDAD DE INDICE PZ DE FOSFOLIPASA | 22 |
| TABLA 4. GRADOS DE ACTIVIDAD DE INDICE PZ DE PROTEINASA | 24 |
| TABLA 5. PRINCIPALES ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS EN ÍNDICE PZ DE FOSFOLIPASA Y PROTEINASA | 25 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. CANDIDIASIS PSEUDOMEMBRANOSA | 6 |
| FIGURA 2. ESTOMATITIS ERITEMATOSA | 6 |
| FIGURA 3. CANDIDIASIS HIPERPLÁSICA | 7 |
| FIGURA 4. ESTOMATITIS PROTÉSICA | 7 |
| FIGURA 5. QUEILITIS ANGULAR | 8 |
| FIGURA 6. GLOSITIS ROMBOIDE | 8 |
| FIGURA 7. FRECUENCIAS DE ÍNDICE DE PZ FOSFOLIPASA | 21 |
| FIGURA 8. FRECUENCIA DE GRADOS DE ACTIVIDAD DE ÍNDICE PZ DE FOSFOLIPASA | 22 |
| FIGURA 9. FRECUENCIAS DE ÍNDICE DE PZ PROTEINASA | 23 |
| FIGURA 10. FRECUENCIA DE GRADOS DE ACTIVIDAD DE ÍNDICE PZ DE PROTEINASA | 24 |
| FIGURA 11. DIAGRAMA DE DISPERSIÓN DEL ÍNDICE PZ DE FOSFOLIPASA E ÍNDICE PZ DE PROTEINASA | 26 |

RESUMEN

La secreción de las enzimas hidrológicas fosfolipasa y aspartil proteinasa secretoria constituyen importantes mecanismos de patogenicidad de *Candida*, teniendo un rol en el daño que causan a las membranas celulares al degradar los lípidos y proteínas que las constituyen.

Estas enzimas favorecen a la adherencia e invasión de los tejidos del hospedero así como la evasión de los mecanismos de defensa, por lo que resulta importante conocer la presencia de estos factores de virulencia en las cepas y la manera en que afectan para establecer métodos de prevención y agentes terapéuticos.

En total se estudiaron 50 cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con prótesis, de las cuales se obtuvieron los resultados siguientes: El porcentaje total de cepas que presentó actividad enzimática de fosfolipasa fue del 80%. El 94% de las cepas mostró actividad a la proteinasa. Las cepas presentaron mayor actividad enzimática a la proteinasa que a la fosfolipasa.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Dentro de la cavidad bucal están presentes diversos microorganismos de manera natural debido a la humedad que lo caracteriza, entre ellos se encuentran los hongos del género *Candida* de manera comensal siempre que exista un equilibrio entre los mecanismos de defensa del hospedero y el potencial invasivo de la levadura; sin embargo, al haber una predisposición local o general pueden transformarse en patógeno, causando la enfermedad conocida como candidiasis oral.

La candidiasis oral está asociada a la colonización por *Candida albicans*, aunque también existen otras especies que se han identificado en este tipo de infecciones y cada vez en aumento, entre ellas: *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida dubliniensis*.

Los microorganismos del género *Candida* deben su patogenicidad a la presencia de moléculas en su superficie y a la secreción de enzimas hidrolíticas como las lipasas, proteinasas y fosfolipasas, que le permiten dañar las membranas celulares del huésped al degradar lípidos y proteínas, favoreciendo su adherencia e invasión a los tejidos así como la evasión de los mecanismos de defensa.

El crecimiento en superficies es parte natural del modo de vivir de *Candida* y es común que colonice las prótesis dentales, dando como resultado estomatitis por uso de dentadura. Por este motivo, resulta importante conocer la presencia de estos factores de virulencia en las cepas y la manera en que afectan para establecer métodos de prevención y agentes terapéuticos. Esto conlleva a realizar la siguiente pregunta: ¿Cuál es la actividad de las enzimas fosfolipasa y proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con prótesis?

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La cavidad bucal es un medio complejo que presenta diversas condiciones para que microorganismos puedan habitar en ella como parte de su microbiota natural, entre ellas, temperatura entre 34°C y 36°C y pH neutro (1-3).

Además de virus, bacterias y hongos, las levaduras *Candida* también están presentes de manera comensal, formando parte de la flora oral compleja y como resultado de la interacción entre el medio exterior y el bucal, pero se pueden encontrar también en piel, mucosas, vías aéreas, tracto genitourinario y tracto digestivo (1-3).

Dentro de la cavidad bucal, *Candida* está presente en un 7 a 65%, siendo de manera comensal muy común y poco frecuente en su transformación patógena. Para que *Candida* se replique y se considere patógeno, deben ocurrir ciertos factores en el huésped, el microorganismo y el ambiente (1-3).

El microorganismo del género *Candida*, se considera un agente oportunista debido a que se beneficia cuando el huésped presenta defensas bajas e inmunoincompetencia y se multiplica para colonizar la cavidad oral y producir candidiasis. No obstante, también se requiere de su capacidad de adhesión a las membranas del huésped, crecimiento y mediación de sus factores de virulencia en respuesta a cambios ambientales para que la enfermedad se produzca (1-3).

La Candidiasis se considera la “enfermedad del enfermo” debido a su naturaleza oportunista, es la infección micótica más común en la cavidad bucal de los seres humanos y se produce al romperse el equilibrio donde el sistema inmune del huésped regula la prevención de adherencia de *Candida*, su crecimiento e invasión con mecanismos de defensa epitelial, péptidos antimicrobianos de la mucosa y flujo salival. Por lo tanto, al alterarse las barreras defensivas, el microorganismo se replica, crece e invade los tejidos bucales, produciendo la infección. Es importante mencionar que los más afectados son las personas debilitadas, es por eso que se presenta con mayor prevalencia en bebés, an-

cianos, personas con sistema inmune deprimido, con padecimientos como VIH, anemia, diabetes mellitus, neutropenia, etc. Existen entre otras causas, factores que afectan al portador y lo hacen propenso a la infección, como por ejemplo, alteraciones salivales, uso de prótesis mucosoportadas, tabaco, alteraciones endocrinas y tratamientos farmacológicos prolongados (1-5).

Existen muchas especies diferentes de *Candida*, se han identificado entre 150 y 200 especies, sin embargo, se conocen más de 17 tipos que pueden ser patógenas para los humanos, las más comunes son: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y la aislada con más frecuencia de la cavidad bucal, *Candida albicans*, a la cual se le atribuyen más del 90% de las infecciones (4,5).

Se ha considerado que las especies no *albicans* causan infecciones de menor virulencia a causa de la carencia de factores que *C. albicans* si presenta, entre otros, menor capacidad de adherencia a tejidos endoteliales, vasculares y epiteliales; así como menor secreción de enzimas proteinasas; mismos que vuelven a esta última la más patógena (6).

Candida glabrata: Esta especie es la segunda aislada con mayor frecuencia, se le atribuyen las infecciones orofaríngeas y está asociada a infecciones sistémicas. Debido a su resistencia innata a los antifúngicos azoles como el fluconazol e itraconazol, es la causante de infecciones en mucosa, intrahospitalarias y colonizaciones en torrente sanguíneo, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (VIH). Su capacidad de adherencia es menor a la que presenta la especie *albicans* (6,7).

Candida tropicalis: Es considerada la más prevalente y virulenta dentro de las especies no *albicans*, es comúnmente aislada de la cavidad bucal y piel, pero puede ocasionar lesiones en el esófago. Las infecciones causadas por este patógeno han ido en aumento siendo ahora la causa más común de candidiasis invasiva y colonización en el tracto gastrointestinal (6,8).

Candida parapsilosis: La incidencia de *C. parapsilosis* ha aumentado progresivamente, es una de las principales causas de candidemia a nivel mundial, situándose entre 20-30%. Esta asociada a infecciones en recién nacidos (prematuros o de bajo peso) e individuos jóvenes que presentan dispositivos venosos centrales, dispositivos protésicos o alimentación parenteral, además de infecciones óseas y articulares. Dentro de sus manifestaciones clínicas pueden incluirse: endoftalmitis, endocarditis, artritis séptica y peritonitis. Es susceptible a azoles pero resistente a anfotericina B (9,10).

Candida krusei: Se puede encontrar en diferentes medios naturales, como en la atmósfera, alimentos, aguas residuales y suelo; por esto se considera un microorganismo comensal transitorio en el hombre. Afecta principalmente a personas en estado crítico y a pesar de que es menos virulenta que *C. albicans* esta relacionada con fungemia, endoftalmitis, artritis y endocarditis. Las cepas presentan resistencia alta al fluconazol, itraconazol y, en ocasiones, anfotericina B (6,11).

Candida albicans: De las especies aisladas de la cavidad oral, el 80% corresponden a *C. albicans*, normalmente forma parte de la microbiota sana, pero puede colonizar diferentes áreas del cuerpo humano, como el tracto gastrointestinal, piel, uñas, y cavidad bucal. Es una de las especies encontradas con mayor frecuencia en dispositivos médicos como como catéteres, prótesis de articulación, lentes de contacto, marcapasos, y dentaduras postizas, lo que significa un alto riesgo, pues al ser la especie más virulenta, tiene potencial para diseminarse por tejidos y órganos (12-15).

En respuesta a modificaciones que se presentan en el huésped, por ejemplo, estrés, antibioticoterapia o desnutrición, puede crecer, duplicarse y generar una infección limitada a ciertas zonas del cuerpo o diseminada, pudiendo resultar fatal. Esto, debido a que ha desarrollado diversos factores de patogenicidad, destacando la secreción de enzimas hidrolíticas como aspartil-proteinasa, fosfolipasa y hemolisinas; que le permiten invadir con mayor facilidad los tejidos, evadiendo las defensas del huésped. Entre otros

factores de virulencia, destacan también su capacidad para formar hifas y realizar cambios fenotípicos (14-16).

CLASIFICACIÓN DE CANDIDIASIS ORAL

La candidiasis puede presentarse de forma localizada o generalizada, puede estar en la piel y mucosas o bien, puede abarcar zonas más profundas y diseminarse por el organismo incluyendo el torrente sanguíneo y órganos como riñones, ojos, hígado, bazo, y corazón (2,5).

En cuanto a su duración se pueden dividir en aguda o crónica, cuando seden ante el tratamiento rápidamente o bien, cuando persisten a pesar de tomar medidas, quizás por no eliminar los factores predisponentes, respectivamente. Actualmente, la clasificación más utilizada contempla las siguientes presentaciones: candidiasis pseudomembranosa, candidiasis eritematosa, candidiasis hiperplásica, estomatitis protésica, queilitis anular y glositis romboidal (2,17).

1. CANDIDIASIS PRIMARIAS

1.1 Pseudomembranosa: Se le conoce como algodoncillo o muguet debido a sus características clínicas que consisten en placas blanco-amarillentas blandas y cremosas que se desprenden fácilmente al raspado localizadas sobre una superficie eritematosa en la mucosa bucal. Los sitios de afinidad son la orofaringe, carrillos y ambos lados de la lengua. Los individuos más vulnerables a esta clasificación son aquellos que se encuentran debilitados a causa de la edad (recién nacidos o ancianos), enfermedades, alteraciones inmunitarias, o aquellos sometidos a antibioticoterapias de larga duración. Los síntomas y signos incluyen pérdida del gusto, mal sabor de boca, ardor y dolor (2,17,18).



Figura 1. Candidiasis pseudomembranosa

1.2 Estomatitis atrófica eritematosa o hipertrófica: Es la presentación más común en individuos inmunodeprimidos y tiende a manifestarse como una complicación del tratamiento antibiótico. Se caracteriza por regiones de epitelio eritematosas, delgadas, brillantes y atróficas localizadas dentro de la cavidad oral, particularmente en el paladar y la lengua. Puede presentarse de forma aguda o crónica (2,17,18).



Figura 2. Estomatitis eritematosa

1.2.1 Candidiasis eritematosa aguda: También llamada lengua dolorosa antibiótica, se caracteriza por lesiones eritematosas que se presentan la mucosa bucal, especialmente en el dorso de la lengua, sitio donde causa daño a las papilas linguales e imposibilita la ingesta de alimentos ácidos, picantes o calientes. El síntoma característico es el dolor (2,17,18).

1.2.2 Candidiasis eritematosa crónica: Se relaciona con ancianos e individuos inmunosuprimidos, con xerostomía, EPOC o asma. Se caracteriza por la presencia de áreas enrojecidas y lisas en la mucosa del paladar o dorso lingual, donde pueden incluso desaparecer las papilas filiformes. Normalmente, es asintomático pero puede generar alteraciones del gusto o mal sabor de boca (2,17,18).

1.3 Hiperplásica o leucoplaquia: La forma menos frecuente de candidiasis, consiste en placas bilaterales, blancas, persistentes y rígidas que no se retiran al raspado, afectando la zona retrocomisural, lengua, labios y paladar. Puede ser asintomática (forma homogénea) o dolorosa (forma nodular). Esta indicada la biopsia para descartar malignización (2,17,18).



Figura 3. Candidiasis Hiperplásica

2. CANDIDIASIS ASOCIADAS

2.1 Estomatitis protésica, subprótesis o subplaca: Aparece con mayor frecuencia en individuos que utilizan prótesis completas mucosoportadas, aunque también puede afectar en presencia de prótesis parciales. Su origen inicia con traumatismo de la mucosa ocasionado por la prótesis desajustada aunado a una mala higiene y el uso sin descanso del dispositivo protésico. Se caracteriza por un eritema y edema de la mucosa afectada, sin presencia de síntomas (2,17,18).



Figura 4. Estomatitis protésica

2.2 Queilitis angular: Son lesiones dolorosas, bilaterales situadas en las comisuras de la boca, pueden observarse como pequeñas erosiones, fisuras o grietas con costras. Están

originadas por disminución de la dimensión vertical y deficiencias de vitaminas (2,17,18).



Figura 5. Queilitis angular

2.3 Glositis romboide: Afecta la línea media posterior del dorso de la lengua, es un área rojiza en forma romboidal plana o sobresaliente donde no se pueden apreciar las papilas filiformes (2,17,18).



Figura 6. Glositis romboide

PATOGENICIDAD DE *Candida*

Candida posee recursos genómicos que le asisten para adaptarse a cualquier tipo de ambiente, desde uno sencillo como un medio de cultivo que le brinde carbono y nitrógeno a temperatura ambiente, hasta un ambiente tan complejo y variable como la cavidad bucal (2-4).

La patogenia de la candidiasis se ocasiona por la combinación de tres factores: mecanismos de defensa del huésped, factores de virulencia del microorganismo y factores que modifican el microambiente de la cavidad bucal. El balance entre colonización y candidiasis está regulado por la capacidad de *Candida* para modular la expresión de sus factores virulentos cuando existen cambios en el ambiente oral y el sistema inmune del huésped (2,3).

Las manifestaciones clínicas de la infección están en relación con las defensas del huésped, sin embargo existen factores que lo vuelven susceptible a que se desarrolle un comportamiento patógeno del hongo; los cuales se pueden agrupar en locales, sistémicos e iatrogénicos (Tabla 1) (1,2,17).

Tabla1. Factores predisponentes en Candidiasis

| Factores predisponentes en la infección de Candidiasis | | |
|--|---------------------------------|---------------------------------------|
| Factores Locales | Factores Sistémicos | Factores iatrogénicos |
| Actúan sobre la mucosa | Edad | Tratamiento con antibióticos |
| Alteraciones en la saliva | Alteraciones endócrinas | Tratamiento con corticoides |
| Flora comensal | Alteraciones nutricionales | Anticonceptivos y terapia sustitutiva |
| Dieta rica en carbohidratos | Alteraciones del sistema inmune | Radioterapia o Quimioterapia |
| Tabaco | Enfermedades sistémicas | |
| | Grupos sanguíneos | |

Dentro de los factores locales se incluyen aquellos que se ocasionan daño directamente a la mucosa, como por ejemplo traumatismos ocasionados por prótesis mal adaptadas o maceraciones que dañan su integridad tisular, se ha identificado que en individuos portadores de prótesis, el 11-77% de los cultivos dan positivo a estomatitis protésica. Aunado a esto, la mucosa presenta un envejecimiento natural en los adultos mayores al disminuir su espesor, volviéndose un blanco fácil para que levaduras como *Candida* penetren sin dificultad. Otro factor, son alteraciones salivales cuantitativas (disminución en la secreción) y cualitativas (pH y acidificación), además de la dificultad del paso del flujo salival y anticuerpos salivales a causa de aparatología intraoral (1,2,13,16,18).

En factores sistémicos, se pueden incluir los extremos de la edad (neonatos y ancianos), embarazo, alteraciones metabólicas como hipotiroidismo, hipoparatiroidismo, alteración de la flora normal por uso de antibióticos, hospitalización, VIH, SIDA, cáncer, anemias, neutropenia, diabetes mellitus, insuficiencia renal, depresión inmune en pacientes trasplantados, inanición, quemaduras graves, drogadicción (1,2,13,18).

Dentro de los factores iatrogénicos, el uso de antibióticos por tiempo prolongado reduce la microbiota bacteriana que regula e inhibe la adhesión de hongos a superficies orales, lo que favorece el crecimiento de *Candida* en la cavidad oral (2,13,18).

Los factores que pueden alterar el microambiente bucal abarcan disminución de la dimensión vertical, uso antiséptico crónico, mala higiene bucal, tabaquismo y alcoholismo (2,13,18).

PATOGENICIDAD

C. albicans se encuentra habitualmente en la microbiota local bucal, sin embargo forma un ecosistema complejo que reacciona cuando su equilibrio se modifica con la presencia de cambios en el sistema inmune causados por una dieta inadecuada, estrés, enfermedad, antecedentes genéticos, terapias antibióticas, variaciones locales en el pH y

viscosidad de la mucosa y la saliva; activando su crecimiento, invaginación y diseminación, provocando una infección (14,19-21).

La transición de microorganismo comensal a patógeno está sujeta a una serie de factores entre los que destacan la adherencia los tejidos del huésped o biomateriales, la formación de biofilm y la secreción de moléculas de carbohidratos, fibrinógeno, fibronectina, laminina y enzimas hidrolíticas extracelulares como proteasas, fosfolipasas y hemolisinas, que participan de forma importante en la invasión del hongo al epitelio bucal (14,20,21).

Candida albicans posee factores de virulencia que le permiten desarrollar infecciones con mayor frecuencia que otras especies y se pueden clasificar en tres categorías, el reconocimiento del hospedero por adhesinas de la célula fúngica, la conversión morfológica del organismo de una forma unicelular a una forma multicelular y filamentosa, es decir, de su forma de levadura a hifal y pseudohifal en condiciones ambientales completamente diferentes; ligado a su capacidad para desarrollar tubos germinales y portar glucoproteínas tales como manosa y glucosa en la pared, para adherirse a las membranas y receptores del huésped; y la secreción de enzimas que intervienen en la penetración e invasión. Incluso puede portar polisacáridos que le permiten inhibir la defensa inmune (10,21).

Al tornarse en patógeno, produce biofilms estructurados con células diferentes, pseudohifales ovoides y cilíndricas hifales alargadas envueltas en una matriz extracelular. La formación del biofilm consiste en cuatro etapas temporales: adherencia a una superficie, proliferación para formar una capa de anclaje, crecimiento de pseudohifas, hifas y producción de matriz extracelular; y dispersión lenta de las células en forma de levadura (14,21,22).

Este microorganismo tiene la capacidad para adherirse a otras células y a superficies duras o blandas, como un dispositivo protésico o la mucosa. Este principio de adhe-

rencia es sumamente importante para que se desarrollen adecuadamente el resto de las etapas y se rige por proteínas superficiales especializadas denominadas adhesinas, que se unen a aminoácidos y azúcares en la superficie de otras células o promueven la adherencia a superficies abióticas (14,21,22).

El biofilm formado por *C. albicans* tiene cierta resistencia a agentes antimicrobianos clave para que pueda crecer; regulada por la presencia de la matriz extracelular y de células recalcitrantes (14,21,22).

La matriz extracelular del biofilm se compone por más de 500 proteínas y glucoproteínas, enzimas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, por lo que se relaciona con roles importantes en la descomposición de los biopolímeros. Se piensa que el biofilm aumenta la resistencia a la terapia antifúngica, debido a que la matriz restringe el contacto con los fármacos mediante la formación de una barrera, donde únicamente las capas más superficiales están en contacto con dosis letales de antibióticos. Las concentraciones de cada uno se pueden ver en la tabla 2 (14,21,22).

Tabla 2. Componentes de la matriz extracelular pertenecientes al biofilm de *C. albicans*

| Componente | Concentración |
|--------------------------|---------------|
| Proteínas-glicoproteínas | 55% |
| Carbohidratos | 25% |
| Lípidos | 15% |
| Ácidos nucleicos | 5% |

En el huésped, las células epiteliales, localizadas en las capas más externas del cuerpo son las que entran en contacto directo con los hongos y por lo tanto, son las encargadas de prevenir la invasión fúngica con la segregación de citoquinas (quimioquinas y citocinas) además de péptidos antimicrobianos (21,22).

Una vez que la célula del hongo se adhiere a la célula epitelial del huésped comienzan ciertas interacciones que involucran fuerzas pasivas, de atracción y repulsivas, Van der Waals, hidrofóbicas, y electrorepulsivas mutuas, respectivamente. Ya adheridas las células, comienza el proceso de reconocimiento e invasión en el que se desencadena la producción de prostaglandinas y donde el huésped reorganiza el citoesqueleto, favoreciendo la endocitosis de las hifas. Se necesita también, un método llamado penetración activa en el cual las hifas invadan a las células epiteliales, detalles sobre procesos y proteínas relacionadas con esto, aun son poco conocidos. Los procesos de endocitosis y penetración activa conllevan al daño celular mediante necrosis o apoptosis, es por eso que la mucosa presenta pérdida de epitelio ante una infección candidiásica (21,22).

Adicional a la formación de hifas, *C. albicans* secreta enzimas hidrolíticas que participan activamente en la adherencia, penetración de tejidos, invasión y destrucción epitelial, las más importantes son proteinasas y fosfolipasas (15,21,22).

Las enzimas aspartil proteinasas secretorias (SAP) son capaces de la degradación de diferentes sustratos fisiológicos, por ejemplo, los componentes celulares de las mucosas y elementos del sistema defensivo del humano, así pues, la producción de estas enzimas mejoran la capacidad de *C. albicans* para colonizar, facilitan la penetración de tejidos en mayor profundidad y evadir el sistema inmune del huésped. Su secreción esta ligada a la patogenicidad debido a que cepas aisladas de pacientes con candidiasis bucal han mostrado mayor actividad proteolítica que las aisladas de la cavidad oral de portadores sanos. Las SAP responsables de la actividad proteinasa de *C. albicans* están codificadas por los genes SAP1-10; en donde SAP1-6 son relacionados con el daño epitelial y cambios a las respuestas defensivas del huésped mientras que SAP9 y SAP10 son utilizadas por el microorganismo para la preservación de su integridad superficial. Se han realizado estudios donde, en presencia del inhibidor de proteasa, pepstatina A, *C. albicans* reduce su capacidad de daño epitelial bucal (21,22-24).

En cuanto a la fosfolipasa, se han identificado siete genes diferentes, como son, PLA, PLB1, PLB2, PLC1, PLC2, PLC3 y PLD1; a pesar de ello, solo se conoce que PLB1 tiene un papel virulento al estar situada en la punta de las hifas durante la invasión celular y poseer actividad hidrolasa y lisofosfolipasa. Samaranayake y colaboradores en 1984 demostraron que en *C. albicans* cultivado en agar, la secreción de fosfolipasa sucede dentro de un pH limitado, que va de 3.6 a 4.7 (22-25).

Además, la producción de hemolisina es esencial para la supervivencia y está relacionada con la adquisición de hierro. Son proteínas producidas por microorganismos para destruir los glóbulos rojos. El hierro, es un elemento necesario para el desarrollo de los microorganismos y para el establecimiento de un proceso infeccioso (22-25).

JUSTIFICACIÓN

La candidiasis oral se ha encontrado cada vez con mayor frecuencia en pacientes que utilizan prótesis y aunque se han aislado diferentes especies de los cultivos, *C. albicans* es la encontrada con mayor frecuencia.

A pesar de que muchos estudios mencionan que esta especie es adaptable a diferentes medios y capaz de modificar su comportamiento y morfología para lograr la invasión de los tejidos del huésped, en México, son pocos los estudios donde analizan cepas aisladas de pacientes portadores de prótesis, y por tanto, faltan datos sobre las posibles modificaciones y adecuaciones en su adhesión y secreción de enzimas invasivas en estos individuos.

Conocer sus mecanismos de patogenicidad, como la adhesión atribuida a la secreción de enzimas hidrolíticas como fosfolipasa y proteinasa brindará la oportunidad de conocer el grado de virulencia y adaptación que poseen estos microorganismos así como parámetros para desarrollar diferentes métodos de prevención para la colonización de estas levaduras en pacientes con prótesis.

La importancia radica en el incremento de pacientes portadores de prótesis que resultan positivos ante cultivos para evaluar la infección o presencia de *Candida albicans* en la cavidad bucal. Desde un punto de vista clínico, este estudio puede aportar datos para establecer estrategias terapéuticas novedosas para las infecciones causadas por estos hongos así como cuidados y hábitos de una correcta higiene y desinfección.

Este estudio se pudo realizar en el Laboratorio de Microbiología Oral y Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, ya que cuenta con las instalaciones, equipo, instrumentos y materiales adecuados para el análisis y trabajo experimental, que hicieron factible su realización.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad enzimática de la proteinasa y fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con prótesis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la actividad de la proteinasa de las cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con prótesis.

2. Cuantificar la actividad de la fosfolipasa de las cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con prótesis.

MATERIAL Y MÉTODO

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de tipo retrospectivo, observacional y descriptivo.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se estudiaron 50 cepas que fueron aisladas de pacientes con prótesis en el posgrado de Odontología Restauradora de la Facultad de Odontología UADY.

Todas las cepas se encontraban conservadas en Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) con glicerol al 20%, a una temperatura de -80°C, en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la UADY.

METODOLOGÍA

1. RECUPERACIÓN Y CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIE DE *Candida*

Para la recuperación de la cepas congeladas y confirmación de la especie, se tomó una porción de la cepa congelada, se inoculó en Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y se incubó a 37°C por 48 hrs. Posteriormente una colonia del cultivo se inoculó en el medio CHROMagar *Candida* (medio cromógeno específico para la identificación de especies de *Candida*) y se incubó a 37°C por 48 hrs. La interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante el cual menciona que cultivos de color rosa intenso corresponden a *C. glabrata*, los de color azul a *C. tropicalis*, los de color rosa claro a *C. krusei* y color verde claro para *C. albicans*.

2. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PROTEINASA

Para determinar la actividad de la proteínasa, se cultivó una colonia de la cepa en 5ml de medio líquido Sabouraud (SLM) a 36°C, durante 24 horas, en agitación a 200rpm en una incubadora orbital.

Posteriormente las células se recolectaron por centrifugación a 2,500rpm durante 10 minutos y se realizaron dos lavados con buffer de fosfatos (PBS,pH 7.2). Las células se suspendieron de nuevo hasta alcanzar una densidad de 1×10^8 UFC/ml de Mc Farland.

Se tomaron 10 μ l de la suspensión y se colocaron en el medio Agar Albúmina Sérica Bovina (1% de bacto-agar, 0.1% KH₂PO₄, 0.5% MgSO₄, 1% de glucosa, 0.16% Albúmina sérica bovina) pH3.5.

Los inóculos se realizaron por triplicado, utilizando la cepa *C. albicans* ATC-C10231 como control positivo.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se observó la presencia de halos alrededor de las colonias (zona de acción enzimática), se midieron, y se calculó el índice de actividad enzimática (Pz), siguiendo la metodología de Price, descrita por Oksuz y cols. Para esto se dividió el diámetro de la colonia levaduriforme entre la sumatoria del diámetro de la colonia y zona de producción enzimática.

El índice de Pz puede arrojar valores que van desde cero a uno, índices Pz comprendidos entre 0.64 y 0.99 se consideran como actividad positiva, siendo:

- a) Valores menores de 0.69, actividad mayor
- b) Valores entre 0.70 y 0.79, actividad moderada
- c) Valores entre 0.80 y 0.89, actividad débil
- d) Valores entre 0.90 y 0.99, actividad muy débil

3. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA

Para medir la actividad de la fosfolipasa, se cultivó una colonia de la cepa en el medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) a 36° por 24 horas.

Se tomó el equivalente a tres colonias de cada inóculo, se colocó en 5ml de solución salina y se igualaron a una lectura de 0.075 de absorbancia.

Posterior a eso, se depositaron 10µl de la suspensión en el medio Agar yema de huevo (13,0g SGA (Oxoid), 11.7g de NaCl, 0.11g de CaCl₂ y 10% de yema de huevo estéril (Oxoid), 184ml de agua destilada). El cultivo se incubó a 37°C durante 7 días y los ensayos se realizaron por triplicado, al cabo de ese tiempo, se midió el diámetro de la zona de precipitación alrededor de la colonia (un indicador de la actividad de la fosfolipasa) y se calculó el índice de actividad enzimática (Pz), siguiendo la metodología de Price (1982), descrita por Oksuz y cols. Para esto se dividió el diámetro de la colonia levaduriforme entre el diámetro de la colonia + zona de producción enzimática.

El índice de Pz puede arrojar valores que van desde cero a uno, índices Pz comprendidos entre 0.64 y 0.99 se consideran como actividad positiva, siendo:

- e) Valores menores de 0.69, actividad mayor
- f) Valores entre 0.70 y 0.79, actividad moderada
- g) Valores entre 0.80 y 0.89, actividad débil
- h) Valores entre 0.90 y 0.99, actividad muy débil

Se utilizó solución salina 9% como control negativo y *C. albicans* ATCC 10231 como control positivo.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Una vez que se obtuvieron los índices de Pz de cada cepa se realizó la descripción de los resultados con porcentajes, medidas de tendencia central y para valorar una posible relación entre fosfolipasa y proteinasa, se realizó regresión lineal simple.

RESULTADOS

En total se estudiaron 50 cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con prótesis, de las cuales se obtuvieron los resultados descritos en las tablas siguientes.

ANALISIS DESCRIPTIVO DE FOSFOLIPASA

Acorde a los resultados del análisis, la media de Pz de Fosfolipasa en las cepas estudiadas fue de $.7207303391 \pm .17809815468$, con una mediana de $.6979548230$ y un rango de $.57894737$, siendo las puntuaciones de Pz mínima y máxima de $.42105263$ y 1.00000000 respectivamente.

En la Figura 7 se observan las frecuencias de Pz de Fosfolipasa en las cepas observadas.

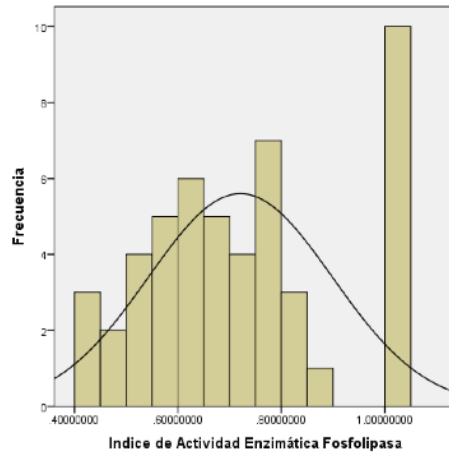


Figura 7. Frecuencias de Índice de Pz Fosfolipasa

Tomando como criterio referencial el índice Pz, se procedió a realizar un análisis categórico de dichas puntuaciones para ubicar cada caso según el nivel de actividad registrado.

Según los resultados obtenidos, el 50% (25) de las cepas observadas registró una actividad mayor (<.69), 22% (22) actividad moderada (0.70 y 0.79), 20% (10) actividad nula (1) y un 8% (4) actividad débil (0.80 y 0.89).

En la Figura 8 se exponen de modo gráfico la distribución de categorías de actividad en tanto que en la Tabla 3 se presenta un breve resumen de la distribución de frecuencias de las mismas.

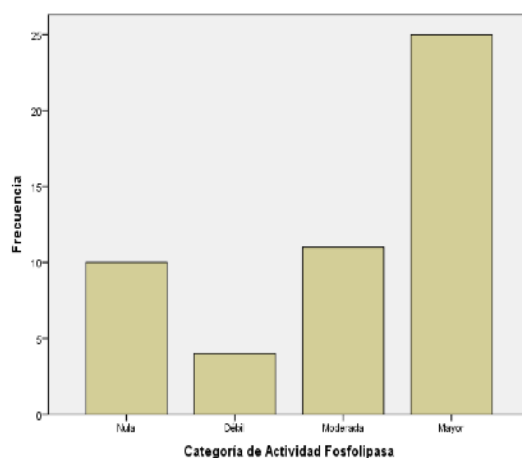


Figura 8. Frecuencia de grados de actividad de Índice Pz de Fosfolipasa

Tabla 3. Grados de actividad de índice Pz de Fosfolipasa

| Índice Pz | Frecuencia | Porcentaje |
|-----------|------------|------------|
| Nula | 10 | 20.0 |
| Débil | 4 | 8.0 |
| Moderada | 11 | 22.0 |
| Mayor | 25 | 50.0 |
| Total | 50 | 100.0 |

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA PROTEINASA

El análisis estadístico reveló puntuaciones medias de Pz de proteinasa de $.6569428174 \pm .21195127925$. Complementariamente, se registraron puntuaciones correspondientes a mediana de $.6527777780$, con un rango de $.79523810$ y puntuaciones mínima y máxima de $.20476191$ y 1.00000000 .

En la Figura 9 se expone a modo gráfico la distribución de frecuencias del índice Pz de proteinasa en las cepas observadas.

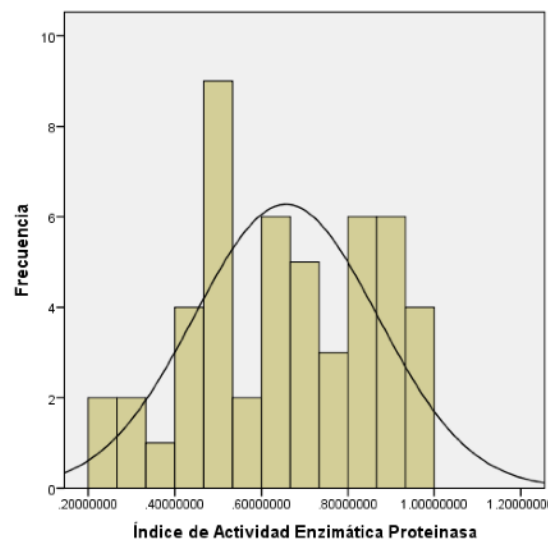


Figura 9. Frecuencias de Índice de Pz Proteinasa

Tomando como criterio referencial el índice Pz, se procedió a realizar un análisis categórico de dichas puntuaciones para ubicar cada caso según el nivel de actividad registrado.

Según los resultados obtenidos, el 54% (27) de las cepas observadas registró una actividad mayor ($<.69$), 16% (8) actividad débil (0.80 y 0.89), 14% (7) actividad moderada (0.70 y 0.79), 10% (5) actividad muy débil ($.90$ y $.99$) y 6% (3) actividad nula (1).

En la Figura 10 y en la Tabla 4 se exponen los resultados de este análisis.

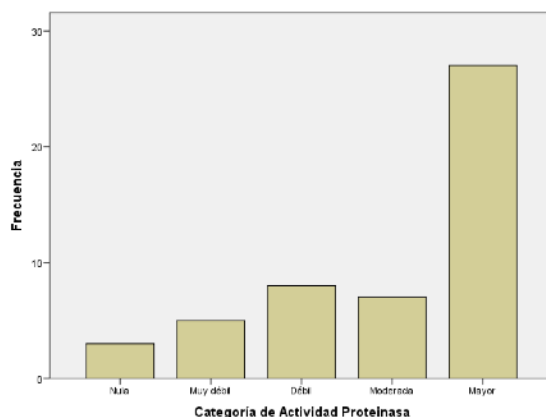


Figura 10. Frecuencia de grados de actividad de Índice Pz de Proteinasa

Tabla 4. Grados de actividad de índice Pz de Proteinasa

| Índice Pz | Frecuencia | Porcentaje |
|-----------|------------|------------|
| Nula | 3 | 6.0 |
| Muy débil | 5 | 10.0 |
| Débil | 8 | 16.0 |
| Moderada | 7 | 14.0 |
| Mayor | 27 | 54.0 |
| Total | 50 | 100.0 |

En la Tabla 5 se expone un resumen conjunto de los principales estadísticos descriptivos del Índice de Pz de Fosfolipasa y Proteinasa en las cepas estudiadas.

Tabla 5. Principales estadísticos descriptivos en Índice Pz de fosfolipasa y proteinasa

| Índice Pz | Media | D.E. | Mediana | Rango | Punt. Mínima | Punt. Máxima |
|-------------|------------|-------------|------------|----------|--------------|--------------|
| Fosfolipasa | 7207303391 | 17809815468 | 6979548230 | 57894737 | .42105263 | 1 |
| Proteinasa | 6569428174 | 21195127925 | 6527777780 | 79523810 | .20476191 | 1 |

ANÁLISIS CORRELACIONAL Y REGRESIÓN LINEAL SIMPLE

Con la finalidad de hallar una posible relación entre el índice Pz de fosfolipasa y el índice Pz de proteinasa, se realizó un análisis exploratorio mediante el gráfico de dispersión (Figura 11).

Como se puede observar en la gráfica, existe una tendencia de incremento de Pz de Proteinasa en la medida en la que incrementa el índice Pz de fosfolipasa, sin embargo no se observa una delimitación lineal precisa.

Para constatar estadísticamente esta relación y posterior al hallazgo de evidencia a favor de la distribución normal de las puntuaciones de ambas variables, se generó un análisis correlacional mediante la prueba paramétrica r de Pearson.

Los resultados de este análisis demostraron la ausencia de correlación estadísticamente significativa al 95% o 99% entre las variables de estudio. Según los estadísticos

hallados, la correlación entre las variables es positiva y moderada ($r=.061$), pero no es estadísticamente significativa, pues se obtuvo un valor $p>.05$ o $>.01$ ($p=.673$).

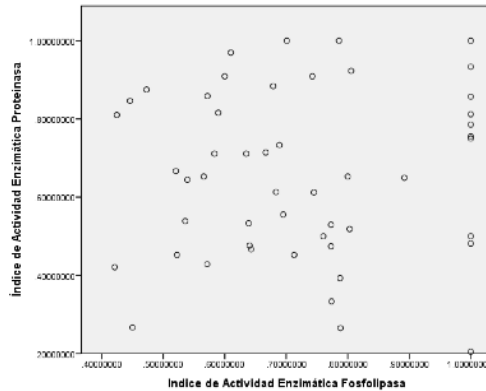


Figura 11. Diagrama de dispersión del índice Pz de fosfolipasa e índice Pz de proteinasa.

Con la finalidad de generar un análisis más preciso de esta posible relación, se generó un modelo de regresión lineal simple $Y = B_0 + B_1X$ con las dos variables.

Según los resultados del análisis ANOVA, el modelo de regresión lineal no resultó significativo, pues se halló un valor $p = .673$, es decir, $p > .05$.

En cuanto al valor de los coeficientes, para la variable constante se obtuvo un valor de $B_0 = .605$ y un valor $p < .05$ ($p = .0001$), lo que lo determina como significativo. Por otra parte, se obtiene un valor $B_1 = .073$ y $p > .05$ ($p = .673$), lo que lo determina como no significativo.

Al analizar la bondad de ajuste del modelo, se identificó un coeficiente de determinación, $R^2 = .004$, lo que refiere que el modelo no se ajusta bien a los datos, es decir, carece de una buena bondad de ajuste para explicar los valores de las variables. El modelo de regresión lineal simple, explica menos del 1% de la variabilidad del índice de Pz de proteinasa, mientras que el 99% de la variabilidad queda explicada por otros factores.

DISCUSIÓN

Candida es un colonizador común de la mucosa, que modula la expresión de sus factores de virulencia en respuesta a los cambios ambientales y la competencia del sistema inmune del huésped. La producción de enzimas como proteinasa y fosfolipasa resulta esencial para colonizar e invadir los tejidos debido a su capacidad para lisar membranas biológicas (23).

Barret-Bee K y cols. estudiaron la actividad de la fosfolipasa en cepas de *C. albicans* y lo relacionaron con su patogenicidad, descubriendo que los aislamientos que mostraban baja actividad enzimática también presentaban baja patogenicidad y adherencia, a diferencia de aquellos que mostraron actividad enzimática mayor que mostraron patogenicidad moderada y adherencia alta (23).

En un estudio realizado por Marcos C. y cols. *C. albicans* fue la especie predominante en personas que utilizaban prótesis y padecían estomatitis protésica. Analizaron 101 aislamientos y 98 resultaron positivos a secreción de fosfolipasa, es decir, el 97.02%. En cuanto al índice de Pz, los valores que encontraron fueron de 78.21% alta, 16.83% moderada, 2.97% baja y 2.97% nula. Lo anterior coincide con los resultados de este estudio donde la actividad enzimática fue observada en la mayoría de los aislamientos. En cuanto a la nula actividad, aquí se encontró en el 20% de las cepas a diferencia del 2.97% del estudio antes mencionado, pudiéndose deber a las condiciones sistémicas que portaban los individuos (24).

Oksuz S y cols. realizaron un estudio con individuos sanos donde el 50% de las cepas presenta actividad proteolítica lo cual coincide con este estudio donde el 53.8% mostró actividad de fosfolipasa y 56.7% de proteinasa (25).

Según Hernández S. y cols. en su estudio, el 42% de las cepas de *C. albicans* mostraron actividad proteolítica, a diferencia de este, donde 80-94% fue positivo a actividad. Las diferencias pueden deberse a las técnicas empleadas para valorar la actividad o bien, a las características presentadas por los individuos que portaban las cepas (15).

En diversos estudios se ha encontrado que la actividad proteolítica de SAP es similar en individuos con mucosas sanas y con candidiasis. Otros estudios mencionan que no hay diferencia considerable entre individuos que presentan o no estomatitis protésica, donde los valores son similares. Todos estos resultados pudieron variar los factores de virulencia de acuerdo a las condiciones del individuo, características del microorganismo y el ambiente, es decir, la patogenicidad de *Candida* y la expresión de sus factores de virulencia como la producción de enzimas fosfolipasa y proteinasa dependen en alto nivel de las defensas que presenta el huésped, en tanto que, si este presenta alguna complicación sistémica hay mayor posibilidad de que se exprese su virulencia a diferencia de un individuo sano (26-29).

CONCLUSIONES

1. El 80% de las cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con prótesis mostró actividad a la fosfolipasa.
2. El 94% de las cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con prótesis mostró actividad a la proteinasa.
3. Las cepas de *Candida albicans* presentaron mayor actividad enzimática a la proteinasa que a la fosfolipasa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ugalde C. Prevalencia de especies de *Candida* en la cavidad oral en pacientes diabéticos tipo 2 [tesis]. Universidad de Granada. Granada, España. 2008.
2. Otero R, Peñamaría M, Rodríguez M, Martín B, Blanco A. Candidiasis oral en el paciente mayor. *Avances en odontoest.* 2015; 31(3):1-14.
3. Pei Z, Hong H, Xiao L. Quantity of *Candida* Colonies in Saliva: A Diagnostic Evaluation for Oral Candidiasis. *Chin J Dent Res.* 2017; 20(1):27–32.
4. Sardi J, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida A, Mendes M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology.* 2013; 62(1):10–24.
5. Estrada G, Márquez M, González E, Díaz J Agüero L. Manifestaciones bucales de la candidiasis en pacientes con trasplante renal. *MEDISAN.* 2015; 19(6):718-25.
6. Meurman J, Siikala E, Richardson M, Rautemaa R. Non-*Candida albicans* *Candida* yeasts of the oral cavity. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.* A. Méndez-Vilas (Ed.); 2012. págs. 719-31.
7. Muñoz del Valle G. *Candida glabrata*: un patógeno emergente. *Biociencias.* 2015; 10(1):89 - 102.
8. Kothavade R, Kura M, Arvind G, Panthaki M. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology.* 2010; 59(1):873–80.

9. Villalobos J, Castro J, Avilés A, Peláez C, Somogyi T, Sandoval L. Candida parapsilosis: principal causa de candidemia en un hospital de referencia para adultos de Costa Rica. *Rev Chilena Infectol.* 2016; 33(2):159-65.
10. Tapia C, Correa N. Candida parapsilosis complex. *Rev Chilena Infectol.* 2015; 32(5): 569-70.
11. Samaranayake Y, Samaranayake P. Candida krusei: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J. Med. Microbiol.* 1994; 41(1):295-310.
12. Coronado L, Jiménez Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent.* 2013; 5(5):279-86.
13. Jaimes A, Hernández F, Martínez E, Rodríguez A, Arenas R. Portadores de Candida en la mucosa oral: tipificación de 35 cepas con CHROMagar Candida. *Med Int Mex.* 2008; 24(4):262-6.
14. Nobile C, Johnson A. Candida albicans Biofilms and Human Disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 2015; 69(1):71-92.
15. Hernández S, Rueda F, Rojas R. Actividad de la proteinasa en cepas de Candida albicans aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. *Rev Iberoam Micol.* 2014; 31(2):137-40.
16. Pardi G, Cardozo E. Algunas consideraciones sobre Candida albicans como agente etimológico de candidiasis bucal. *Acta odon Ven.* 2002; 40(1):1-10.
17. Castañón L. Candidiasis o candidosis. Unidad de Micología, Universidad Nacional Autónoma de México. 2013.
18. Rodríguez J, Miranda J, Morejón H, Santana J. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. *Rev Cubana Estomatol.* 2002; 39(2): 1-15.

19. Torrealba B, Vielma E, Salas E, Carrero S, Martínez S, Moreno J, Varela Y, Jiménez J. Especies de *Candida* asociadas a lesiones bucales en pacientes con diabetes tipo 2. *Rev Soc Ven de Microbiología*. 2016; 36:58-62.
20. Deorukhkar S, Saini S, Hindawi S. Non-albicans *Candida* Infection: An Emerging Threat. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2014; 1-8.
21. Moyes D, Richardson J, Naglik J. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence*. 2015; 6(4):338-46.
22. Mayer F, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013; 4(2):119-28.
23. Barrett K, Hayers Y, Wilson R, Riley J. A Comparison of Phospholipase Activity, Cellular Adherence and Pathogenicity of Yeasts. *Journal of General Microbiology*. 1985; 131(1): 1217-221.
24. Marcos C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre J, Quindo G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. 2009; 54(1):10-6.
25. 21. Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D, et al. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn J Infect Dis*.2007; 60:280–3.
26. Volpato P, Zago C, Pavarina A, Habib J, Machado A, Vergani C. Enzymatic activity profile of a Brazilian culture collection of *Candida albicans* isolated from diabetics and non-diabetics with oral candidiasis. *Mycoses*. 2014; 57: 351-57.
27. Antonella Souza A, Hartz S, Bittencourt C, Silva L, Mattos F, Severo L. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop*. 2013; 46(3):1-6.

28. Riceto E, Menezes R, Penatti M, Pedroso R. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. *Rev Iberoam Micol.* 2014; 1(1): 1-4.
29. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindos G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses.* 2011;54:e10–6.