

Estudio de la variabilidad genética entre aislamientos clínicos de *Candida albicans* formadores de biopelículas

Estela Liliana Durán, María Teresa Mujica, Virginia Marta Jewtuchowicz, Jorge Luis Finquelievich, María Victoria Pinoni y Cristina Adela Iovannitti

Centro de Micología. Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires, Argentina

Resumen

Las biopelículas están constituidas por microcolonias incluidas dentro de una matriz polimérica y representan una forma de crecimiento microbiano. *Candida albicans* puede colonizar las superficies de catéteres, prótesis y epitelios formando biopelículas que son resistentes a las drogas antifúngicas. El objetivo de este trabajo fue la caracterización genotípica de aislamientos clínicos de *C. albicans* formadores de biopelículas usando la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Fueron estudiados 25 aislamientos clínicos de *C. albicans* de fauces, sangre, piel, uñas, materia fecal, biopsia de esófago, y flujo vaginal de pacientes con candidiasis. Cada cepa fue previamente analizada en su capacidad de crecer y adherirse a la superficie de poliestireno, y la cuantificación de la biopelícula formada fue realizada mediante el ensayo de reducción de XTT [2,3-bis (2-metoxi-4 nitro-5 sulfofenil) -2 H tetrazolio-5 carboxanilida]. Los coeficientes de similitud generados por RAPD variaron entre el 49 y el 91% con los cuatro iniciadores usados, revelando un alto nivel de variabilidad genética. El dendrograma agrupó los aislamientos en cuatro grupos, incluyendo todos ellos cepas con muy diferente capacidad para formar biopelículas. Aislamientos con genotipos similares mostraron diferente capacidad de formación de biopelículas. Las cepas fueron agrupadas independientemente del origen de la muestra. Nuestros resultados sugieren que en poblaciones naturales de *C. albicans* no existe correlación entre la capacidad de formar biopelículas y el genotipo determinado por PCR-RAPD.

Palabras clave

Candida albicans, Candidiasis, Biopelículas, RAPD, Variabilidad genética, Polimorfismo

Examination of the genetic variability among biofilm-forming *Candida albicans* clinical isolates

Summary

Biofilms are microbial communities encased in a self-produced polymeric matrix and represent a common mode of microbial growth. *Candida albicans* is able to colonize the surface of catheters, prostheses, and epithelia, forming biofilms that are highly resistant to antimicrobial drugs. The objective of this study was the genotypic characterization of biofilm-forming *C. albicans* clinical isolates using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). We have studied 25 clinical isolates of *C. albicans* from oral cavities, blood, skin, nail, stool, oesophagus biopsy and vaginal fluids from patients suffering from candidiasis. For each strain biofilm formation was analysed by measuring the ability to adhere to and grow on polystyrene plastic surfaces using XTT [2,3-bis (2-methoxy-4nitro-5sulfophenil) -2H tetrazolium-5carboxanilide] reduction assay. The similarity coefficients generated by RAPD using four different primers varied from 49 to 91%, indicating a high degree of genetic variability between the clinical isolates. The dendrogram clustered the isolates in four related groups, all groups included strains with very different abilities to form biofilms. The isolates with similar genotypes often showed very different biofilm formation abilities. Strains were grouped into clusters independently of their clinical sources. Our results suggested that a direct correlation does not exist between the biofilm-forming ability of natural populations of *C. albicans* and the genotype as determined by RAPD.

Key words

Candida albicans, Candidiasis, Biofilms, RAPD, Genetic variability, Polymorphism

Dirección para correspondencia:

Dra. Estela L. Durán
Paraguay 2155, 1121
Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina
E-mail: esteladuran2003@yahoo.com.ar

Aceptado para publicación el 23 de mayo de 2007

Introducción

Las biopelículas son comunidades microbianas estructuradas que están adheridas a una superficie y embebidas en una matriz de exopolisacáridos [2-4,19]. En las candidiasis sistémicas se puede producir la formación de biopelículas sobre material biomédico, como catéteres, válvulas cardíacas protésicas, o prótesis dentales [9,16]. *Candida albicans* y otras especies estrechamente relacionadas del género *Candida*, son la cuarta causa más común de infecciones del torrente circulatorio [17]. En las biopelículas, las levaduras de *Candida* adquieren cierta resistencia a la acción terapéutica de los antifúngicos, como la anfotericina B y el fluconazol, lo que explicaría la persistencia de muchas infecciones a pesar del tratamiento [1,2,6,11,12]. Se han desarrollado diversos métodos para estudiar la generación de biopelículas de *Candida* in vitro; los métodos directos consisten principalmente en técnicas microscópicas, que permiten la visualización [5]. Los métodos indirectos estiman el número de microorganismos adheridos in situ, o requieren la separación del sustrato y cuantificación.

Recientemente, Ramage et al. [19] han descrito los modelos experimentales de formación de biopelículas de *C. albicans* desarrollados por diferentes grupos de investigadores. En modelos animales de infección de *Candida* asociados a catéter, las biopelículas formadas in vivo resultaron estructuralmente similares a las producidas in vitro al ser observadas en el microscopio.

La relación entre el genotipo y la plasticidad fenotípica que muestra *C. albicans* en el laboratorio no ha sido ampliamente estudiada. Es relativamente poco conocida la variación genética que existe entre cepas de poblaciones naturales de levaduras formadoras de biopelículas médicamente importantes. Las técnicas RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), cariotipificación electroforética (EK), PCR *fingerprinting*, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y el análisis de secuencias son las más comúnmente usadas en la genotipificación de especies de *Candida* [7,14,21,23,24]. La técnica RAPD implica la amplificación simultánea de varios *loci* anónimos en el genoma utilizando un único iniciador de secuencia arbitraria, complementaria a una región blanco desconocida [25]. El objetivo de esta investigación fue determinar mediante marcadores de RAPD la diferente capacidad de generar biopelículas, y si existe relación entre el patrón genético y los valores de cuantificación de las biopelículas formadas por *C. albicans*.

Materiales y métodos

Cepas. Se estudió la capacidad de formación de biopelículas de 63 aislamientos de *C. albicans* provenientes de pacientes con candidiasis, 32 de fuentes no invasoras (sitios no estériles), y 31 de fuentes invasoras (sitios estériles).

Formación de las biopelículas. Se inocularon matrices tipo Erlenmeyer conteniendo 20 ml de caldo YPD (extracto de levadura 1%, bacto-peptona 2% y glucosa 2%) con las diferentes cepas de *C. albicans*, y se incubaron en agitación (100 rpm/min) durante 24 h a 37 °C. Las levaduras obtenidas se lavaron 3 veces con PBS (0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 8,5 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7) y se preparó a continuación una suspensión de 10⁶ cel/ml de los cultivos en RPMI con 2% de glucosa. La formación de biopelículas se realizó en microplacas estériles de poliestireno (Becton Dickinson, EE.UU.), de fondo

plano y con 96 pocillos, que se inocularon con 200 µl de la suspensión de las levaduras, incubándose durante 48 h a 37 °C. A continuación, las células no adheridas se desecharon mediante lavados con tampón PBS. La cuantificación se realizó mediante la reducción metabólica por las deshidrogenasas mitocondriales de las levaduras sobre el XTT (Sigma Chemical Co., EE.UU.) [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida] a formazán XTT en un lector de placas de ELISA a 490 nm. (Mod 550 BioRad, California, EE.UU.) [13,18]. Cada cepa se estudió por triplicado y los pocillos conteniendo solo RPMI con 2% de glucosa se usaron como blanco.

El análisis estadístico de la producción de biopelículas según el origen de las cepas de *C. albicans* se realizó mediante la prueba t-Student para varianzas iguales.

Para la técnica RAPD se seleccionaron al azar 25 cepas de *C. albicans* (Tabla 1) provenientes de hemocultivos (n = 11), coprocultivos (n = 3), exudado de fauces (n = 1), flujo vaginal (n = 4), escamas de piel (n = 1), uñas (n = 4) y biopsia esofágica, (n = 1).

Amplificación por RAPD. Las levaduras fueron cultivadas en caldo YPD durante toda la noche a 37 °C. El ADN fue extraído usando la técnica de Scherer y Stevens [21]. Las concentraciones de ADN se estimaron realizando una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, juntamente con el marcador de peso molecular DNA lambda (Pharmacia Biotech, Suecia) [20] y coloreado con bromuro de etidio (0,5 µg/µl). Las concentraciones de ADN fueron cuantificadas mediante un espectrofotómetro (Spectronic spectrophotometres Genesys 5- Milton Roy U-3300, EE.UU.) a 260 nm y 280 nm.

Las regiones de ADN fueron amplificadas a través de la técnica RAPD [25]. Se utilizaron cuatro iniciadores de Invitrogen: OPA 02 (TGCCGAGCTG), OPA 09 (GGGTAACGCC), M13F (CGACGTTGTAACGACGCCAGT) y M13R

Tabla 1. Aislamientos de *Candida albicans*, su origen, y valores de formación de biopelículas por el método de reducción de XTT.

N.º cepa	Origen	*Biopelículas (media± DE)
1	Hemocultivo	0,705 ±0,084
3	Coprocultivo	1,463 ±0,097
4	Exudado de fauces	1,656 ±0,176
5	Hemocultivo	2,451 ±0,094
6	Coprocultivo	1,560 ±0,080
7	Hemocultivo	2,585 ±0,144
8	Hemocultivo	2,586 ±0,093
9	Hemocultivo	2,164 ±0,093
10	Hemocultivo	1,156 ±0,087
11	Hemocultivo	1,414 ±0,117
13	Flujo vaginal	0,332 ±0,145
14	Escamas de piel	0,305 ±0,074
15	Escamas de uñas	1,577 ±0,138
17	Hemocultivo	1,517 ± 0,134
18	Escamas de uñas	0,618 ± 0,005
19	Hemocultivo	0,971 ±0,074
20	Hemocultivo	0,578 ±0,156
21	Hemocultivo	0,358 ±0,100
22	Coprocultivo	2,412 ±0,038
24	Flujo vaginal	3,073 ±0,069
25	Flujo vaginal	2,320 ±0,228
26	Escamas de uñas	2,604 ±0,192
27	Flujo vaginal	1,719 ±0,114
29	Biopsia de esófago	1,580 ±0,104
30	Escamas de uñas	0,785 ±0,029

*Las actividades de XTT fueron medidas colorimétricamente a 490 nm. Los resultados representan la media ± desvío estándar de tres experimentos independientes.

(CAGGAAACAGCTATGAC). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl, conteniendo tampón 1x (Invitrogen, Argentina), 0,2 mM de cada dNTP, MgCl₂ 3 mM, iniciador 0,4 µM, y *Taq* DNA Polimerasa 1,5 U, y aproximadamente 5 ng de ADN. La amplificación fue realizada en un termociclador Minicycler TM MJ Research Inc. (EE.UU.) programado como sigue: un ciclo de 4 min a 92 °C; 40 ciclos de 1 min a 92 °C, 1,5 min a 37 °C, y 2 min a 72 °C; y un ciclo final de 3 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,4%. Fue usado el marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb (Invitrogen). El gel fue coloreado con bromuro de etidio (0,5 µg/µl), observado en un transiluminador UV (EPI-Chemi Darkroom. UVP Laboratory Products, EE.UU.) y digitalizado en una computadora personal. La imagen fue generada usando el programa VisionWorks 3.1 Imaging Software y almacenada en el disco rígido de la computadora. El análisis de variabilidad genética fue realizado con el Bionumerics Program (Applied Mathematics, Belgica). El dendrograma fue generado usando el coeficiente de similitud de Jaccard y el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) [22].

Resultados

La cuantificación de la formación de biopelículas a través de la reducción de XTT para las cepas de *C. albicans* estudiadas mostró variaciones intraespecíficas, si bien estas diferencias no resultaron significativas al analizar el origen invasor o no de las cepas y la capacidad de formar biopelículas (t-Student para varianzas iguales 1,29 p = 0,8009).

En la tabla 1 se observa la formación de la biopelícula medida a través de la actividad de XXT a 490 nm para las cepas de *C. albicans* caracterizadas por RAPD.

La figura 1 muestra el patrón electroforético de los productos de amplificación por RAPD de 25 cepas de *C. albicans* con el iniciador OPA 02.

Con los cuatro iniciadores usados se obtuvieron un total de 49 bandas, de las cuales el 91,8% de las bandas fueron polimórficas. El dendrograma del análisis de los RAPD con los cuatro iniciadores mostró que los coeficientes de similitud variaron entre el 49% y el 91%, y agrupó los aislamientos en cuatro grupos principales con el 50% de similitud (Figura 2). Todos los grupos incluyeron aislamientos con diferente capacidad para formar biopelículas.

Discusión

Las placas de poliestireno resultaron útiles en la producción de biopelículas por diferentes aislamientos de *C. albicans*, pues es conocido que este material promueve la adherencia de las levaduras, una etapa inicial y de importancia en la formación de las biopelículas [19], siendo un método sencillo para ser aplicado a un número importante de cepas [8]. Este método ha sido establecido y propuesto como una técnica estandarizada para la formación de biopelículas y para sus respectivos estudios de sensibilidad frente a antifúngicos [18]. Nuestros resultados muestran una falta de relación entre la formación de biopelículas y el origen del aislamiento. Aunque existen trabajos que mencionan una mayor formación de las biopelículas entre aislamientos de *C. albicans* recuperadas de fuentes invasoras, éstos fueron analizados con otra metodología con un número pequeño de aislamientos estudia-

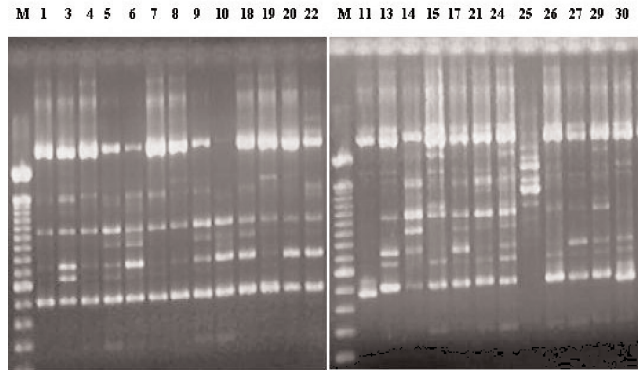


Figura 1. Patrón electroforético de los productos de amplificación por RAPD de 25 aislamientos de *Candida albicans* con el iniciador OPA 02. (M, marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb).

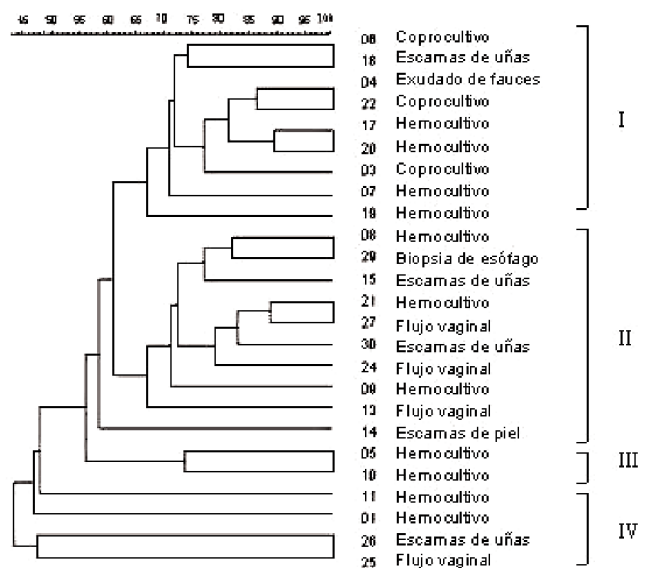


Figura 2. Dendrograma generado por el método de agrupamiento UPGMA, usando el coeficiente de Jaccard. Los valores indicados arriba representan los coeficientes de similitud. A la derecha están representados los códigos y orígenes de los 25 aislamientos de *Candida albicans*, así como los grupos de similitud.

dos [10,13]. Nuestros hallazgos concuerdan con los de otros autores que no pudieron establecer diferencias en la formación de biopelículas entre aislamientos de *C. albicans* provenientes de diferentes muestras clínicas [8,13,15] o en relación con la patogenicidad de las cepas [5].

Este es el primer estudio realizado en Argentina para la caracterización molecular por RAPD de aislamientos clínicos de *C. albicans* con diferente capacidad de producir biopelículas.

Los 25 aislamientos de *C. albicans* mostraron una alta variabilidad genética intraespecífica, detectándose un alto nivel de polimorfismo entre la población de *C. albicans* con diferente capacidad para formar biopelículas. Los aislamientos con genotipos similares mostraron con frecuencia muy diferente capacidad de formación de biopelículas. Nuestros análisis de los patrones de bandas de RAPD no permitieron predecir la capacidad de formación de biopelículas. Igualmente, Li et al. [13] observaron por PCR-RFLP una alta variación en la capacidad de formación de biopelículas entre cepas del mismo clon o linaje clonal en poblaciones naturales de *C. albicans*.

Nuestros resultados mostraron que existe una alta diversidad genotípica entre las cepas en relación a su capacidad de formación de biopelículas, y sugieren que esas variaciones estarían condicionadas por la expresión fenotípica y no solo por la base genética [19]. La relación entre fenotipo y genotipo ha sido estudiada en otros aspectos como la sensibilidad a antifúngicos, y la morfología de las colonias. Deberían realizarse nuevas investigaciones para estudiar los mecanismos de regulación genética implicados en la formación de biopelículas empleando ensayos *in vitro* y modelos animales experimentales.

Expresamos nuestra gratitud al Dr. Ricardo Negroni por la lectura del manuscrito.
Agradecemos al Dr. Fernando Gomes Barcellos y al becario Alan Alves Pereira de EMBRAPA, Londrina, Brasil su colaboración en el análisis computarizado de los patrones de bandas de RAPD.
Este trabajo fue financiado por los proyectos M-087 y M-039 de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires y por la Beca Leonardo Satz (ACADEMIC) otorgada a la Dra. Estela L. Durán.

Bibliografía

1. Baillie GS, Douglas LJ. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods Enzymol* 1999; 310: 644-656.
2. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*-development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001; 183: 5385-5394.
3. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 2003; 11: 30-36.
4. Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 139-143.
5. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilms formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect Immun* 1994; 62: 915-921.
6. Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2128-2131.
7. Holmberg K, Feroze F. Evaluation of an optimized system for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for genotypic mapping of *Candida albicans* strains. *J Clin Lab Anal* 1996; 10: 59-69.
8. Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in case of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2961-2967.
9. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 255-267.
10. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilm formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 2002; 70: 878-888.
11. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1773-1780.
12. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 999-1007.
13. Li, X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* 2003; 149: 353- 362.
14. López-Ribot JL, McAtee RK, Kirkpatrick WR, Perea S, Patterson TF. Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 49-54.
15. Mujica MT, Jewtuchowicz VM, Pinoni MV, Finquelievich JL, Tiraboschi CA, Iovannitti CA. Formación de biofilm en *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*. En: X Congreso Argentino de Micología, 2005, libro de resúmenes: 143.
16. Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol* 2005; 43: 191-208.
17. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National Surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diag Microbiol Infect Dis* 1998; 30: 121-129.
18. Ramage G, Walle KV, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2475-2479.
19. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell* 2005; 4: 633-638.
20. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
21. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 675-679.
22. Sneath PH, Sokal RR. *Numerical Taxonomy*. San Francisco, Freeman WH & Co., 1973.
23. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *J Clin Microbiol* 2000; 13: 332-370.
24. Song JW, Shin JH, Shin DH, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med Mycol* 2005; 43: 657-661.
25. Williams JGK, Kubelik AR, Libak KJ, Rafalski JA, Tingey, SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 1990; 18: 6531-6135.