



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

Biofilmes de *Candida albicans*:

**Regulación molecular, implicaciones clínicas y potenciales
dianas terapéuticas**

Autor: Álvaro Ruiz Moreno

Tutor: Carmina Rodríguez Fernández

Convocatoria: Junio 2018

RESUMEN

El hongo dimórfico *Candida albicans* es uno de los patógenos oportunistas de mayor prevalencia e incidencia en pacientes inmunocomprometidos, en los que produce tanto infecciones superficiales como sistémicas, especialmente intrahospitalarias. Infecta piel, uñas y mucosas orofaríngea y gastrointestinal, además de ser la principal causa de la vaginitis. Este microorganismo comensal coloniza las mucosas gastrointestinal y vaginal del 30-70% de los individuos sanos, en los que su crecimiento está controlado por el sistema inmunitario innato (no produciendo enfermedad). Sin embargo, en pacientes con factores predisponentes, infecta tejidos y mucosas, siendo el responsable de infecciones graves (400 000 casos por año), con una tasa de mortalidad superior al 30%. Además, debido a sus múltiples factores de virulencia, forma biofilmes, lo que facilita su adhesión y favorece la infección.

La mayor resistencia de los biofilmes a los antimicrobianos implica distintos mecanismos entre los que se incluyen la disminución de la permeabilidad a los agentes antimicrobianos, una menor tasa de crecimiento celular y la adquisición de genes de resistencia dentro del biofilme.

En los últimos años se han desarrollado múltiples estrategias dirigidas a destruir o evitar la formación de los biofilmes fúngicos como la combinación de antimicrobianos o la modificación del material protésico para prevenir su formación. Otras novedosas estrategias incluyen el uso de inhibidores del *quorum sensing* y la inactivación fotodinámica mediante la producción de especies reactivas de oxígeno.

Palabras clave: *Candida albicans*, biofilme, *quorum sensing*, infección, antifúngicos, resistencia.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Aunque los microorganismos se han estudiado tradicionalmente en cultivos puros, ya sea en medio líquido (células planctónicas) o en medio sólido (como colonias), en las últimas décadas se ha puesto de manifiesto que los biofilmes son el estado de crecimiento preferido y probablemente el "natural" de la mayoría de los microorganismos. Una **biopelícula** o **biofilme** es una comunidad de células microbianas que se adhieren a una superficie (o interfaz aire-líquido), están rodeadas por una matriz extracelular y tienen propiedades distintas de sus contrapartidas de flotación libre⁽¹⁾.

Candida albicans es la especie fúngica principalmente aislada en infecciones producidas por biofilmes en dispositivos médicos, tales como catéteres venosos centrales, válvulas cardíacas, dispositivos de asistencia ventricular, endoprótesis coronarias, derivaciones ventrículo-peritoneales utilizadas en neurocirugía, implantes de estimulación neurológica,

prótesis articulares, dispositivos de fijación de fracturas, prótesis inflables de pene, implantes de seno, implantes cocleares y dentales y las lentes intraoculares⁽²⁾. Una vez que se forma una biopelícula de *C. albicans* en un dispositivo médico implantado, actúa como un reservorio para las células patógenas, es altamente resistente a los fármacos y al sistema inmunitario del huésped, y tiene el potencial de comenzar infecciones sanguíneas diseminadas (candidemia) que pueden derivar a infecciones sistémicas invasivas de tejidos y órganos.

Estimaciones recientes de los Institutos Nacionales de Salud indican que los biofilmes son responsables, directa o indirectamente, de más del 80% de todas las infecciones microbianas⁽³⁾. Además, la naturaleza de los biofilmes es variable, ya que en el interior de un biofilme podemos encontrar distintas especies de microorganismos asociadas como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.* o *Actinomyces spp.*

2. OBJETIVOS

Los **objetivos** que se persiguen en este trabajo de Fin de Grado son:

- Profundizar en el conocimiento de los biofilmes de *Candida albicans* y su regulación molecular.
- Determinar su importancia clínica y su resistencia a los antifúngicos.
- Describir las potenciales dianas terapéuticas sobre las que se puede actuar, consiguiendo así tratamientos eficaces para erradicar dichas infecciones.

3. METODOLOGÍA

Este trabajo de Fin de Grado se trata de una Revisión Bibliográfica en el que se ha analizado la información de revistas de divulgación científica, artículos científicos, consultados a partir de distintas fuentes:

- PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>)
- Med Line (<https://www.nlm.nih.gov/bsd/pmresources.html>)
- Web of Science (<https://login.webofknowledge.com>)
- Bucea (<http://biblioteca.ucm.es>)
- Google Scholar (<https://scholar.google.co.in/schhp?hl=en>)
- Elsevier (www.elsevier.com).
- Science Direct (<http://www.sciencedirect.com>)

Las palabras clave de búsqueda fueron: *biofilms*, *Candida albicans*, *quorum sensing*, *patogénesis*, *infecciones*, *resistencias*, *antifúngicos*. En PubMed: ("candida"[MeSH Terms] OR "candida"[All Fields]) AND ("biofilms"[MeSH Terms] OR "biofilms"[All Fields]) AND ("quorum sensing"[MeSH Terms] OR ("quorum"[All Fields] AND "sensing"[All Fields])).

Otros documentos consultados publicados por organismos oficiales: la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) y los fondos de la biblioteca de la Facultad de Farmacia, libros de texto de Microbiología General y Clínica, y Guías Especializadas.

La nomenclatura de siglas y abreviaturas científicas (DNA, ECM) se hizo según los criterios del Vocabulario Científico y Técnico (VCTRAC) de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (RACEFN)⁽⁴⁾ y las recomendaciones de la International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature⁽⁵⁾.

Para la escritura técnica de números, magnitudes y unidades se han seguido las normas ISO del Sistema Internacional de Unidades, publicadas en el Boletín Oficial del Estado⁽⁶⁾ y de uso obligatorio en cualquier documentación oficial.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Concepto de biofilme

Un biofilme consiste en una comunidad de microorganismos adheridos irreversiblemente a una superficie determinada, material inerte o tejido vivo, produciendo polímeros extracelulares que proporcionan una matriz estructural⁽⁷⁾. Esto les confiere unas propiedades diferentes de las que tienen las células aisladas⁽⁸⁾, ya que poseen tasas de crecimiento más bajas y una mayor resistencia al tratamiento antimicrobiano, comportándose de manera muy distinta a las células planctónicas.

Los biofilmes son sistemas biológicos que interaccionan y evolucionan de manera conjunta. Es por ello que necesitan una amplia red de regulación genética para poder llevar a cabo la comunicación y especialización intra e intercelular, pudiendo originar biofilmes constituidos por una misma especie o multiespecies⁽⁸⁾.

Cada especie de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilopsis*, *C. tropicalis*...) muestra particularidades significativas en cuanto a la formación de biofilmes, lo que se traduce en distintas morfologías, composición de la matriz extracelular y resiliencia a los antifúngicos⁽⁹⁾. Concretamente, los biofilmes de *C. albicans* poseen una gran heterogeneidad en cuanto a su estructura, en función de diferentes condiciones ambientales, factores nutricionales y otros microorganismos. Por ello es la principal especie fúngica que produce infecciones en mucosas e instrumental médico⁽⁸⁾.

4.2. Formación del biofilme

Durante el proceso de formación de un biofilme se han identificado cuatro fases que transcurren en un período de 24-48h según las especies, de manera sistemática: adherencia (reversible y, posteriormente, irreversible), proliferación, maduración y dispersión⁽¹⁰⁾.

En el genoma de *C. albicans* se han identificado numerosos genes implicados en la formación del biofilme: 50 genes reguladores de la transcripción y 101 genes no reguladores de la transcripción⁽⁸⁾.

Los 6 genes principales reguladores de la transcripción son Efg1 (enhanced filamentous growth), Tec1 (transposon enhancement control), Bcr1 (biofilm and cell wall regulator), Ntd80 (meiosis-specific transcription factor), Brg1 (biofilm regulator) y Rob1 (regulator of biofilm), todos ellos intrínsecamente necesarios en diferentes etapas del proceso de formación del biofilme, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos 6 genes reguladores controlan la expresión de hasta 1000 genes diferentes de *C. albicans*, lo que además afecta a las diferentes rutas de señalización celular, siendo los procesos más importantes el crecimiento y diferenciación de pseudohifas y la respuesta a la presión osmótica en la fase levadura⁽¹¹⁾. Aparte de estos 6 genes, se han identificado otros 44 genes reguladores transcripcionales, cuya delección supone una errónea formación del biofilme.

C. albicans tiene la capacidad de unirse tanto a superficies abióticas como bióticas, lo que supone una mayor virulencia⁽⁷⁾. La **adherencia** es el primer paso, es fundamental y comienza con la unión tanto a una superficie como a otras células, permitiendo que el biofilme sea una biomasa diferenciada y estratificada. Este proceso implica varias proteínas de la pared celular denominadas adhesinas, entre las que destacan dos familias: Als (agglutinin-like sequence) y Hwp (hyphal wall protein). La primera de ellas, Als, con secuencia tipo aglutinina, comprende un dominio de tipo glucosilfosfatidilinositol (GPI), un dominio serina/treonina y un dominio de unión a carbohidrato o péptido. Dentro de los 8 miembros que componen Als destaca la proteína Als3, que se encuentra en la pared hifal, por su papel en la formación de biopelículas, ya que su delección conlleva importantes alteraciones de la pared respecto de la cepa salvaje, como demostró Nobile *et al*⁽¹⁾.

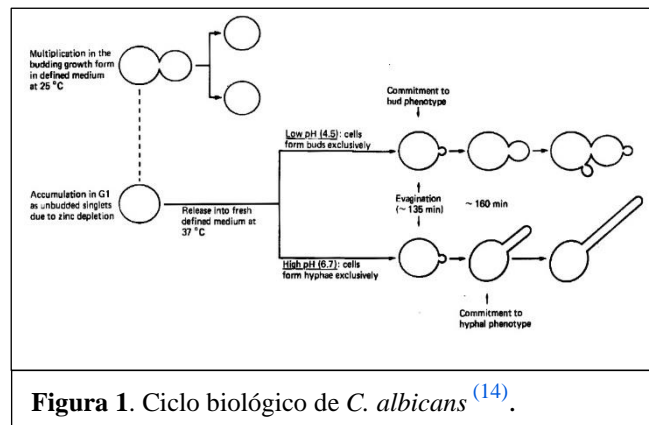
Otra familia importante es la formada por las proteínas de la pared de la hifa (Hwp), destacando Hwp1, de tipo manoproteína de los tubos germinales y de las células hifales, con una función importante en la formación del biofilm tanto *in vivo* como *in vitro*⁽⁷⁾.

La expresión de estas proteínas de la pared está regulada básicamente por dos genes principales: BCR1 y TEC1. TEC1 regula a su vez a BCR1, que mediante cascadas de señalización celular, está implicado en la diferenciación de levadura a hifa⁽¹²⁾. Por tanto, ambos

genes, junto con los factores de transcripción necesarios para su expresión tales como Efg1 y Ace2, están implicados en la filamentación; la carencia de uno de ellos no se ve compensada por la sobreexpresión del otro, lo que tendría como consecuencia una formación errónea del biofilme⁽¹³⁾. Por último, es necesaria la participación de otras proteínas (Hwp2, Rbt1, Eap1 e Ywp1) para el desarrollo de biofilmes y otros genes reguladores (Suv3, Nup85, Mds3 y Kem1).

Durante la fase de **proliferación**, el hongo polimórfico *C. albicans* sigue desarrollándose (Figura 1), con una activa multiplicación de las células que lo componen, formando una monocapa que recubre toda la superficie donde se ha adherido. Ahí se produce principalmente la filamentación, siendo las hifas las que contribuyen a la estabilidad general, actuando como soporte para las distintas morfologías celulares: levadura, pseudohifa, hifa y otras células de microorganismos que pueden formar parte del biofilme⁽¹³⁾.

En la fase de **maduración**, el desarrollo del biofilme continúa a través de modificaciones morfológicas, aumento en el número de células y producción de matriz extracelular polisacáridica, siendo *C. albicans* la principal especie productora de biofilmes dentro el género *Candida*.



Cuando se observa la formación de biofilmes en la superficie de objetos, los biofilmes de *C. albicans* exhiben una densa red de levaduras y células filamentosas embebidas en una matriz de material exopolimérico. Los análisis bioquímicos tras la introducción de potentes técnicas de proteómica, glicómica y lipidómica, han manifestado que la composición general de la matriz de los biofilmes de *C. albicans* representa cada una de las cuatro clases macromoleculares principales: polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos⁽¹⁵⁾.

Las **proteínas** (55% del peso seco del biofilme) son principalmente glicoproteínas, enzimas glucolíticas y proteínas de choque térmico. Se han identificado hasta 565 proteínas diferentes, lo que representa un total de 458 actividades distintas⁽¹⁶⁾. Muchas de ellas son señales de secreción, pero la mayoría no presentan dicha señal, lo que indica una vía de secreción no canónica y/o la acumulación de proteínas después de la muerte celular. Además, en modelos de estudio *in vivo*⁽¹⁷⁾ se han hallado proteínas del huésped, que incluyen proteínas relacionadas con el grupo hemo y proteínas inflamatorias y asociadas a leucocitos, como hemoglobina, mieloperoxidasa, proteína C reactiva y alarmin S100-A9.

La arabinosa, la manosa, la glucosa y la xilosa constituyen los monosacáridos más abundantes del conjunto total de **hidratos de carbono**⁽¹⁸⁾. Por otra parte, mediante RMN se revelaron los exopolisacáridos principales, los mananos, específicamente, α -1,2 ramificados y α -1,6 mananos. Estos polisacáridos de manano están asociados con glucanos β -1,6 lineales, que constituyen aproximadamente el 13% de todos los carbohidratos en un complejo de manano-glucano aparente (MGCx)⁽⁸⁾.

La mayoría de los **lípidos** (15% del peso seco) identificados fueron glicerolípidos neutros, glicerolípidos polares y, en un menor porcentaje, esfingolípidos⁽⁷⁾. No es sorprendente que el ergosterol, principal esteroide en las membranas de las células fúngicas, es el único esteroide detectado en la matriz, aunque en concentraciones muy modestas. Además, pequeñas cantidades de prostaglandina E2 (un precursor de eicosanoides) también se encuentran en la matriz extracelular de biofilme de *C. albicans*⁽¹⁸⁾.

La matriz extracelular de *Candida albicans* también está formada por **DNA extracelular** (eDNA) en una proporción del 5%⁽¹⁹⁾. Se han propuesto diferentes mecanismos por los que éste puede estar presente, tanto procedente del interior del biofilme o por captación del exterior, como transmisión horizontal o lisis celular⁽¹⁸⁾. Este eDNA está compuesto en su mayoría por secuencias aleatorias no codificantes, aunque su función podría ser importante en la resistencia a antifúngicos⁽²⁰⁾.

Además, esta composición puede verse afectada por diversos factores externos, como la saliva, pH, fuente de carbono o presencia de otros microorganismos, por lo que dependerá de las condiciones ambientales, la evolución y la naturaleza de los biofilmes⁽⁷⁾.

Aparte de la composición de la matriz, varios estudios recientes se centran en la **regulación genética** de la misma (Figura 2). El manano y el β -1,6-glucano son componentes esenciales para la formación de la matriz ya que la delección única de genes que codifican proteínas implicadas en su producción (ALG11, MNN9, MNN11, VAN1, MNN4-4, PMR1 y VRG4 para la producción de manano y BIG1 y KRE5 para la producción de β -1,6-glucano) produjeron la eliminación casi completa de la biopelícula⁽⁷⁾. Por otro lado, hay dos reguladores de la producción de la matriz extracelular: Rml1 y Zap1. La ausencia del primero (Rml1) conduce a la reducción de los niveles de matriz⁽¹⁷⁾; mientras que la del segundo (Zap1) supone un aumento de la misma, debido a la sobreexpresión de las glucoamilasas Gca1 y Gca2^(17,21) que, junto con otras enzimas hidrolizantes, son importantes para la degradación de biopolímeros⁽⁸⁾.

La matriz de biofilme es crítica en la formación de las biopelículas de *C. albicans*. Sus **funciones** son: media las interacciones adhesivas y cohesivas, otorga estabilidad mecánica e

integridad, permite la dispersión celular, limita la difusión de sustancias tóxicas y nutrientes, e incluso actúa como un sistema enzimático. Sin embargo, la función principal de esta matriz extracelular es la de protección del biofilme debido a las importantes repercusiones clínicas, actuando como barrera física para proteger las células que hay en su interior frente a los factores ambientales^(12,18).

En la última fase (**dispersión**), las células levaduriformes de *Candida* no adheridas se liberan del biofilme allí donde pueden colonizar otras superficies. Esta etapa tiene gran importancia clínica ya que las células liberadas pueden iniciar la formación de nuevas biopelículas o bien diseminarse en los tejidos del huésped y, por tanto, desarrollar candidemias y enfermedades invasivas diseminadas⁽¹⁰⁾. A pesar de que las células dispersadas son muy

similares a la planctónicas, presentan ciertas diferencias respecto a estas últimas. Entre sus características destacan una mayor adherencia, mayor capacidad para formar nuevos biofilmes y mayor virulencia, lo que se ha puesto de manifiesto mediante estudios de infección

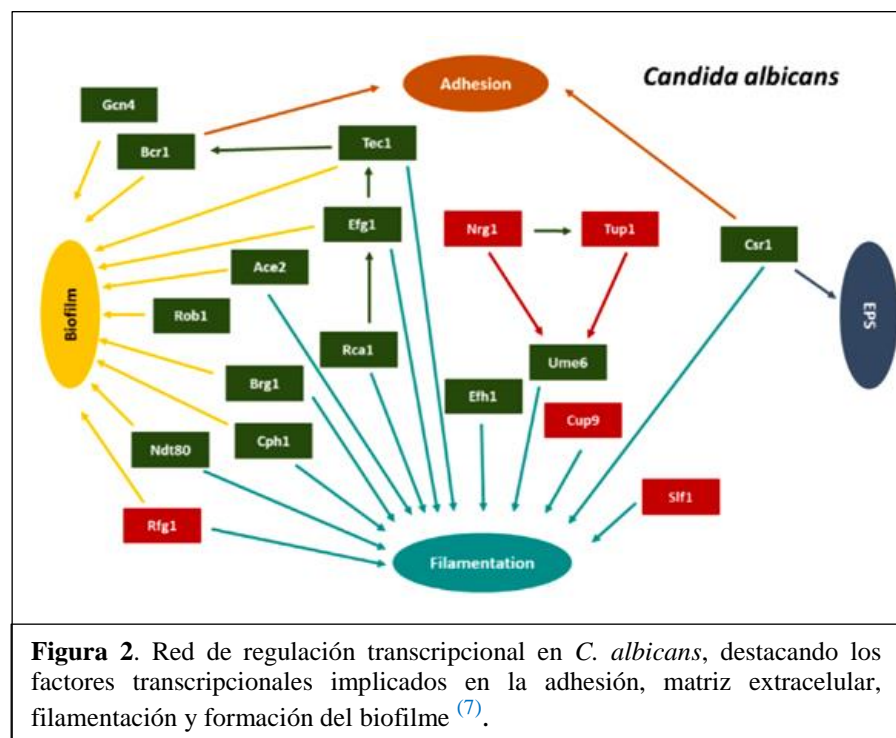


Figura 2. Red de regulación transcripcional en *C. albicans*, destacando los factores transcripcionales implicados en la adhesión, matriz extracelular, filamentación y formación del biofilme⁽⁷⁾.

in vivo en ratones⁽²²⁾. Este proceso depende de tres reguladores transcripcionales identificados: Pes1, Nrg1 y Ume6, siendo estos dos últimos de gran importancia ya que su sobreexpresión aumenta el número de células dispersadas liberadas activamente de la película⁽²³⁾.

Por otro lado, la chaperona molecular Hsp90 también está implicada en el proceso de dispersión. La expresión de la misma supone una disminución del número de células dispersadas que son liberadas y la inducción de la filamentación⁽⁸⁾. Por último, la sobreexpresión de la proteína Ywp1 de la pared celular hace que el biofilme tenga mayor adherencia, regulando de manera negativa el proceso de dispersión⁽²⁴⁾.

4.3. Sistemas de comunicación de los biofilmes

El término *quorum sensing* (QS) o “percepción de quórum” designa un sistema de comunicación intercelular complejo, por el que los microorganismos coordinan una respuesta uniforme para su supervivencia, y aseguran la colonización de hábitats. Es el llamado “lenguaje de los microorganismos”.

Los biofilmes de *Candida* se han estudiado habitualmente como biofilmes de una sola especie, aunque *in vivo* se observa una realidad muy diferente. En general, los biofilmes están compuestas por múltiples microorganismos diferentes que interactúan como una comunidad donde hay relaciones sinérgicas y/o antagónicas. Debido al ambiente, las vías metabólicas de *C. albicans* implicadas en la transición de levadura-hifa así como su virulencia, dependen de un gran número de moléculas que proceden de *quorum sensing*⁽²⁰⁾. Este proceso comprende la producción y liberación de una molécula señal (autoinductor) que, según la densidad celular, aumentará su concentración y favorecerá la expresión colectiva y coordinada de genes específicos, en todas las especies involucradas para el desarrollo de la biopelícula⁽⁷⁾. Esta secreción de señales influye en el comportamiento de unas especies hacia otras, de manera física (ej: las hifas fúngicas actúan como soporte para el crecimiento bacteriano); o bien química mediante alteraciones del ambiente que les rodea: pH, concentración de oxígeno...⁽⁸⁾

Entre este tipo de moléculas sintetizadas por *C. albicans* destacan el farnesol, el ácido farnesoico, el triptofol y el alcohol feniletílico⁽²⁵⁾. El farnesol se produce como un producto secundario de la ruta sintética de los esteroides, mediante la desfosforilación del farnesol pirofosfato (FPP) y su principal función es influir en la morfología de *C. albicans* sin afectar la tasa de crecimiento. Su capacidad para inducir la transición de hifas a levaduras y la acumulación de farnesol en biofilmes en crecimiento, lo convierten en un candidato atractivo para promover la dispersión de células de levadura de la superficie de las biopelículas. Sin embargo, no se ha demostrado que la adición de farnesol exógeno, a concentraciones fisiológicas, aumente la dispersión de la levadura desde las superficies de las biopelículas⁽²²⁾. Además, el farnesol afecta la expresión de genes implicados en fenotipos tan diversos como la resistencia a fármacos, el mantenimiento de la pared celular, la respuesta fagocítica, la hidrofobicidad superficial, el metabolismo del hierro y el choque térmico. Teniendo en cuenta sus diversos efectos sobre la biología celular de *C. albicans*, no es sorprendente que el farnesol afecte a varias vías centrales de señalización en *C. albicans*, lo que conlleva a la expresión de ciertos productos de síntesis que van a permitir la inhibición del crecimiento de otras especies de microorganismos que se encuentren en su entorno⁽²⁶⁾.

Los biofilmes suelen estar formados por más de una especie de microorganismos, que pueden tener relaciones sinérgicas o antagónicas. Dentro del primer grupo encontramos a *C. albicans* asociada con *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus* y *Actinomyces odontolyticus*. Se ha observado un aumento del desarrollo de hifas, acompañado de la sobreexpresión de HWP1, ALS3 y EPA1, en el biofilme de especies mixtas, tanto en superficies acrílicas como en el epitelio oral humano reconstituido (RHOE). Además, el daño tisular y la invasividad son mayores cuando estas cinco especies están coinfectando y formando biopelícula en RHOEs⁽²⁷⁾. Así mismo, los estudios de estomatitis realizados con la asociación de *C. albicans* y *S. mutans* reflejan una relación sinérgica, ya que su coexistencia conduce a una mayor formación de biopelículas, en comparación con biofilmes individuales, a pesar del efecto negativo que *S. mutans* tiene sobre la formación de hifas. Estos biofilmes con dos especies muestran dos capas: células *S. mutans* unidas a la superficie seguidas por células de *C. albicans* como una segunda capa⁽²⁸⁾. Por último, la observación del biofilme formado por *C. albicans* junto con *Staphylococcus aureus*, mostró una primera capa de biofilme de *C. albicans* unida a la superficie cubierta por una monocapa de *S. aureus* que se incluye en la matriz extracelular formada por células de *Candida*. Se ha demostrado que esta matriz extracelular protege a *S. aureus* de la muerte por vancomicina⁽²⁹⁾.

Respecto a las relaciones antagónicas, las más importantes son la de *C. albicans* con *Lactobacillus* y con *Pseudomonas aeruginosa*. La primera de ellas se encuentra en la vagina, en la que *Lactobacillus* sintetiza ácido láctico que se libera al medio, disminuye el pH de la mucosa vaginal y dificulta así el crecimiento de *C. albicans*. Por su parte, la relación de *P. aeruginosa* con *C. albicans* es importante ya que ambas especies coexisten en los biofilmes que se forman en catéteres, quemaduras y en pacientes con fibrosis quística (FQ) en el pulmón⁽³⁰⁾. La infección pulmonar por *P. aeruginosa* genera condiciones anaeróbicas que, en pacientes con FQ promueve la transición de bacterias anaeróbicas, como las periodontales de la microbiota oral, al moco de las vías respiratorias. Además, la microbiota presente en las vías respiratorias superiores de los pacientes con FQ es más diversa de lo que se pensaba, habiéndose aislado *P. aeruginosa* y *C. albicans* en el esputo de pacientes con FQ. *P. aeruginosa* inhibe el crecimiento de *C. albicans* mediante la secreción de moléculas, como la piocianina y 3-oxo-C12-homoserina lactona, que son moléculas de señalización célula-célula, y mata selectivamente los filamentos de *C. albicans* formando biopelículas en sus superficies⁽³¹⁾.

4.4. Importancia clínica

Las infecciones de etiología fúngica son actualmente un problema cada vez más frecuente en nuestro ambiente debido a los tratamientos antimicrobianos de amplio espectro, a los antineoplásicos y a un mayor número de maniobras invasivas en el ámbito clínico. *Candida albicans* es un microorganismo comensal que coloniza las mucosas gastrointestinal y vaginal del 30-70% de los individuos sanos, en los que su crecimiento está controlado por el sistema inmunitario innato (no produciendo enfermedad). Sin embargo, en pacientes con factores predisponentes infecta tejidos y mucosas, siendo el responsable de infecciones graves (400 000 casos por año), con una tasa de mortalidad superior al 30%⁽³²⁾.

Afecta en su mayoría a pacientes críticos, como los infectados por VIH, pacientes oncológicos, pacientes trasplantados, pacientes quirúrgicos y neonatos, siendo el cuarto patógeno más frecuente que se aísla en hospitales. Las infecciones más graves son las candidiasis invasivas, destacando la candidemia como la más importante. Éstas se producen debido a la presencia de dispositivos biomédicos, que actúan como soporte para el desarrollo de biofilmes, que se desarrollan con mayor frecuencia cuanto más larga sea la estancia hospitalaria, suponiendo un coste económico de hasta 6 500 millones de dólares en asistencia médica⁽³⁾.

En las infecciones producidas por biofilmes, los catéteres intravasculares son los dispositivos biomédicos más frecuentes. La infección puede darse en cualquier momento desde la colocación del catéter, dado que los microorganismos pueden contaminar los líquidos de infusión o las conexiones del catéter. En aquellos que se dejan poco tiempo, *Candida* puede migrar desde la piel del paciente a través de la superficie externa del catéter hasta el torrente circulatorio. En aquellos pacientes oncológicos neutropénicos, se pueden translocar al torrente sanguíneo y alcanzar el segmento intravascular del catéter. Del mismo modo, las especies de *Candida* son las responsables de otras infecciones asociadas a la presencia de dispositivos biomédicos como prótesis articulares, marcapasos, sondas urinarias, drenajes biliares, etc⁽³³⁾.

4.5. Mecanismos y factores de resistencia a antifúngicos del biofilme

Los principales sistemas de resistencias se resumen en la Figura 3 y son los siguientes:

a) Matriz extracelular: la matriz es el contribuyente principal a los elevados niveles de resistencia exhibidos por las biopelículas de *C. albicans*. Aparte de ser la estabilizadora de la arquitectura general del biofilme, ejerce una función física de barrera frente a los antifúngicos y demás compuestos en general, siendo mayor la resistencia cuanto mayor sea la abundancia de la misma⁽³⁴⁾. El componente principal de dicha matriz es el polisacárido β -1,3-glucano ya que

el tratamiento de biofilmes con β -1,3-glucanasa aumenta la susceptibilidad de las biopelículas al fluconazol⁽³⁵⁾. Este polisacárido se une a anfotericina B, lo que se ha demostrado en otro estudio donde el fármaco radiomarcado (^3H -fluconazol) sólo se secuestra en presencia de manano de la matriz y β -1,6-glucano⁽³⁶⁾, lo que resalta la importancia de estas moléculas en la resistencia. No obstante, *C. albicans*, es capaz de resistir altas concentraciones de antifúngicos en las primeras etapas de formación del biofilme, así como la capacidad de dichos antifúngicos de difundir fácilmente a través de biofilms maduros⁽³⁷⁾, por lo que el mecanismo de resistencia se debe a otras razones.

Por otro lado, el DNA extracelular presente en la matriz supone un aditivo en la resistencia de la matriz a los antifúngicos. Martins *et al.* demostraron que la adición de DNAasa mejora la susceptibilidad de las biopelículas⁽³⁸⁾ ante ciertos antifúngicos como la capsosungina, aunque el fluconazol no se veía afectado.

Así mismo, también encontraron que la coexistencia de células de levadura con la bacteria *Staphylococcus epidermidis*, comúnmente presente en biofilmes mixtos *in vivo*, ralentiza la penetración del fármaco⁽³⁴⁾, sugiriendo que la resistencia a los antifúngicos en la clínica podría ser más compleja de lo que sugiere en las investigaciones *in vitro*⁽¹²⁾.

Por último, cabe destacar que, en función de la configuración del locus del tipo de apareamiento, *C. albicans* puede formar dos tipos de biofilmes: una biopelícula α/α "patógena" y una biopelícula "sexual" α/a o α/α ⁽¹⁸⁾. Las biopelículas patógenas se consideran impermeables, impenetrables y resistentes a los medicamentos, mientras que las biopelículas sexuales carecen de estas características. Curiosamente, estas propiedades diferentes están principalmente relacionadas con las diferencias en la matriz⁽³⁹⁾.

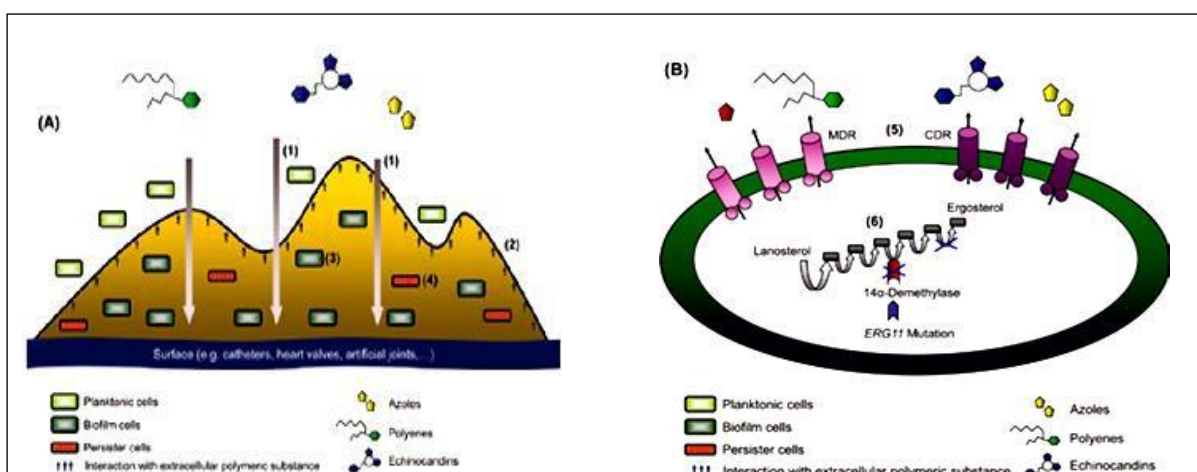


Figura 3. (A) Mecanismos de Resistencia a antifúngicos de los biofilmes de *C. albicans*. (1) Penetración lenta del antimicrobiano en el interior del biofilme; (2) zonas de no crecimiento o crecimiento lento del biofilme; (3) Respuesta adaptativa al estrés ambiental; (4) Células persistentes. (B) (5) Sobreexpresión de las bombas de eflujo (MDR y CDR); (6) Inhibición de la síntesis del ergosterol⁽³⁷⁾.

b) Microambiente químico: en el interior del biofilme el microambiente químico está alterado, lo que supondrá una reducción o supresión en la tasa del crecimiento celular. Debido a la elevada densidad de células y a la escasa disponibilidad de nutrientes - sobre todo en la zona basal - la actividad de fármaco en la superficie es diferente a la que ejerce en las células planctónicas. Esto supone un mecanismo de resistencia del patógeno, ya que serán necesarias mayores concentraciones de antifúngico para que el tratamiento sea eficaz⁽⁴⁰⁾. Además, otros factores como el pH, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, etc, alterarán la arquitectura de la biopelícula y posiblemente la susceptibilidad antifúngica⁽³³⁾. Estos aspectos se han comprobado mediante el estudio de la sensibilidad de los biofilmes de *C. albicans* a anfotericina B frente a las células planctónicas de la misma. Chandra *et al.* observaron que la anfotericina B reduce el número de células levaduriformes, lo que es independiente de la tasa de crecimiento de las levaduras en el interior del biofilme. Este hecho indica que la resistencia no sólo depende de la velocidad de crecimiento sino del grado de maduración del biofilme⁽⁴¹⁾, obteniendo valores menores de concentración mínima inhibitoria (CMI) en estadios tempranos del desarrollo del biofilme.

c) Densidad celular: se acepta comúnmente que la densidad celular puede afectar la eficacia de los agentes antimicrobianos. Esto es especialmente cierto en biofilmes, donde elevadas cantidades de células se concentran en un ambiente pequeño, debido a la baja disponibilidad de nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo, sobre todo en la zona basal⁽³⁷⁾. En estas condiciones se requiere una mayor concentración de antifúngico para erradicar al patógeno, lo que constituye un mecanismo de resistencia del mismo.

d) Modificación de la expresión de genes: la exposición de los biofilmes maduros a los agentes antimicrobianos habitualmente induce genes de resistencia. Se ha formulado la hipótesis de que un cambio en la composición de los esteroides de membrana plasmática durante la formación de las biopelículas (concretamente del ergosterol) y del glucano de la pared celular, podría explicar la resistencia de los biofilmes a los azoles y las equinocandinas, respectivamente⁽⁴²⁾.

El ergosterol es esencial para el crecimiento de *C. albicans*, por lo que constituye una diana ideal para los antifúngicos. La biosíntesis de ergosterol en *C. albicans* es un proceso complejo que incluye numerosas enzimas, donde están implicados los genes ERG (ergosterol resistance gene)⁽¹⁰⁾. Debido a que los azoles inhiben la síntesis de dicho compuesto, los biofilmes de *C. albicans* aumentan la expresión de los genes relacionados con la producción del mismo, tales como ERG1, ERG3, ERG11 y ERG25. En cambio, las células planctónicas sólo sobreexpresan ERG9 y ERG11⁽⁴³⁾, lo que indica una mayor capacidad de las biopelículas

de responder al estrés antifúngico. Además, se ha descubierto que la eliminación de los genes MNN9, MNN11, VAN1, MNN4-4, VRG4, PMR1, BIG1, KRE5 y FKS1 conduce a una mayor susceptibilidad al fluconazol en las células del biofilme, pero no en las células planctónicas⁽⁴⁴⁾.

e) Modificación del sustrato diana del fármaco: otro método usado para evitar la acción de los agentes antimicrobianos es la fosforilación de los sustratos, concretamente a través de mutaciones en ERG3 y ERG5, cuyo resultado es la resistencia cruzada a anfotericina B y azoles⁽⁴⁵⁾.

f) Bombas de eflujo: las bombas de eflujo facilitan el transporte extracelular de antifúngicos, evitando así su acumulación intracelular⁽⁴⁶⁾. Se ha comprobado que las dos familias principales de bombas de eflujo están reguladas positivamente durante la etapa de formación y crecimiento del biofilme⁽³⁷⁾; y contribuyen a la resistencia a los fármacos en *C. albicans*. Por un lado, los transportadores ABC (casete de unión a ATP) codificados por los genes CDR (*Candida* drugs resistance), que engloban a CDR1 y CDR2, lo que se pudo demostrar mediante el marcaje con GFP (proteína verde fluorescente) de las bombas de eflujo⁽⁴⁷⁾. La segunda superfamilia principal está codificada por los genes MDR (multidrug resistance), comprendiendo MDR1 y FLU1⁽⁴⁸⁾. Si existe una doble mutación de los mismos junto con los CDR, la pérdida de la resistencia del biofilme a los antifúngicos está asegurada⁽⁴⁷⁾.

Aunque estos genes pueden expresarse en cepas planctónicas resistentes, se ha visto que se expresan particularmente en los biofilmes⁽¹⁰⁾, siendo resistentes a azoles. Curiosamente, las equinocandinas no se ven afectadas por las bombas de eflujo⁽⁴⁹⁾.

Una característica de las bombas de eflujo es su capacidad para unirse a una variedad de medicamentos estructuralmente no relacionados⁽³³⁾. Por lo tanto, es concebible que, en el entorno de las biopelículas de *C. albicans*, las bombas de eflujo se empleen principalmente como un medio de desintoxicación celular. De este modo, las biopelículas mantienen un entorno físico-químico local apropiado para el crecimiento y la supervivencia del microbioma.

g) Células persistentes y respuesta al estrés: constituyen un pequeño subconjunto de células levaduriformes en estado metabólicamente latente, que surgen como variantes fenotípicas del tipo salvaje dentro de los biofilmes (no se encuentran en poblaciones de células planctónicas)⁽³⁷⁾ y que son extremadamente resistentes a los fármacos antimicóticos⁽⁸⁾. Se ha demostrado que la anfotericina B induce el estrés oxidativo en células fúngicas, ocasionando la muerte por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)⁽⁵⁰⁾. Sin embargo, en estos biofilmes previamente tratados se observó la expresión de superóxido dismutasa (SOD), enzima que detoxifica los ROS, provocando una mayor supervivencia de *C. albicans*⁽⁵¹⁾.

4.6. Potenciales dianas terapéuticas

Actualmente, no existen fármacos específicos de biofilmes para el tratamiento de ninguna infección producida por éstos, por lo que la erradicación de dichas infecciones es particularmente problemática.

4.6.1. Inhibición de la formación del biofilme: esta estrategia tiene como objetivo evitar que el biofilme llegue a formarse, gracias a la difusión de una alta concentración de antifúngico en la luz del catéter durante horas o días, lo que evita la toxicidad sistémica en el paciente. Se han obtenido resultados prometedores con micafungina (5 y 15 mg/L), capsosfungina (5 y 25 mg/L) y posaconazol (10 mg/L), siendo la micafungina la más efectiva⁽⁵²⁾. Además, si la micafungina se combina con etanol al 70%, los resultados son mucho más efectivos, como en el estudio realizado por Piersegilli *et al*⁽⁵³⁾.

4.6.2. Recubrimiento del catéter: el revestimiento del material médico con nanopartículas o moléculas con actividad farmacológica que eviten la aparición de estas infecciones se considera uno de los principales objetos de estudio. Se ha observado un número menor de infecciones sistémicas con recubrimientos de clorhexidina, sulfadiazina y minociclina-rifampicina en el catéter, lo que también es aplicable a prótesis de zirconio y titanio para implantes⁽⁵⁴⁾.

4.6.3 Polímeros: Además de recubrir las superficies con moléculas específicas, otra estrategia se basa en la **modificación de polímeros** incorporados en dispositivos médicos. Los derivados de polietilamina insolubles en agua y organolubrificables son capaces de inhibir el crecimiento de *C. albicans*, residiendo su actividad en la alteración de la integridad de la membrana. Además, el quitosano (polímero natural), también es eficaz contra los biofilmes de *C. albicans*⁽⁵⁵⁾.

4.6.4. Nuevos productos naturales o péptidos sintéticos: recientemente se han descrito nuevas moléculas con actividad antifúngica. Entre ellas, destacan los fenilpropanoides y terpenoides de origen vegetal, y las fenazinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa*. Dentro de los compuestos sintéticos, destaca el péptido KSL-W y el SM21. Todos ellos inhiben la transición de levadura a hifa, así como la formación del biofilme⁽⁷⁾.

4.6.5. Antifúngicos en combinación:

- **Combinación de antifúngicos:** las combinaciones de anfotericina B y posaconazol, y anfotericina B con flucitosina son sinérgicas contra las biopelículas de *Candida*⁽³⁷⁾.
- **Antifúngicos y moléculas de quorum sensing:** en *C. albicans*, el farnesol (molécula del QS) inhibe la formación de hifas y de los biofilmes por lo que es un excelente candidato como antifúngico.

- **Antifúngicos y péptidos catiónicos:** los antibióticos peptídicos catiónicos han mostrado un efecto sinérgico cuando se usan en combinación con agentes antifúngicos, como la polimixina B con azoles⁽⁵⁶⁾.
- **Antifúngicos y agentes antibacterianos:** la asociación de antibióticos como rifampicina y tetraciclina con anfotericina B mejora la actividad del agente antifúngico. Esto se debe a que la anfotericina B se une a los esteroides de la membrana fúngica aumentando su permeabilidad, lo que permite la entrada y posterior interferencia del resto de antibióticos⁽⁵⁷⁾. Lo mismo sucede con las fluoroquinolonas, que inhiben la replicación del DNA fúngico una vez el antifúngico ha alterado la membrana celular⁽⁵⁸⁾.

4.6.6. Nuevas formulaciones: a pesar de las resistencias y gracias a las nuevas formulaciones, hay ciertos antifúngicos que siguen siendo efectivos. Es el caso de las formulaciones lipídicas de polienos, como la anfotericina B liposomal y el complejo lipídico de anfotericina B. Cuando se usan en modelos bioprostéticos, se observa una CMI similar a la de las células planctónicas. Además, en el mismo modelo, que las equinocandinas, la capsosungina y la micafungina vuelven a ser eficaces contra el biofilm^(59,60).

4.6.7. Otras terapias:

- **Aspirina:** el ácido acetilsalicílico es eficaz a concentraciones de entre 0,43-1,736 mM, además de tener efectos sinérgicos en combinación con la anfotericina B⁽⁶¹⁾. La aspirina ha demostrado actividad antifúngica, antibacteriana y antiviral debido a su capacidad de producir cambios en el potencial de membrana y la producción de factores de virulencia, reducción en la producción de polisacáridos extracelulares y prostaglandinas.
- **Inactivación fotodinámica:** se basa en el uso de luz visible y un colorante no tóxico llamado “fotosensibilizador” que cuando se activa conduce a la producción de especies ROS. Posteriormente, las ROS matan a las células microbianas específicas debido al daño provocado en el DNA, las proteínas y/o la membrana celular, siendo eficaces el azul de toluidina (0,1 mg/mL) y el azul de metileno. La ausencia de toxicidad de los colorantes y el bajo costo de la técnica hacen que este enfoque alternativo tenga un gran potencial⁽⁶²⁾.
- **Otras:** recientes estudios sugieren que las proteínas de la superficie celular Hwp1, Als1 y Als2, así como la proteína relacionada con la pared celular Sun41, podrían ser posibles dianas terapéuticas dado su papel crítico en la adhesión y virulencia del biofilm⁽¹⁾. Por último, el ibuprofeno y el ambroxol, en combinación con el fluconazol y voriconazol,

respectivamente, reducen la expresión de bombas de eflujo y, por tanto, una mayor eficacia en el tratamiento de las candidiasis⁽³⁷⁾.

5. CONCLUSIONES

1. Los biofilmes de *C. albicans* tienen gran repercusión clínica debido a que constituyen un elevado porcentaje de las infecciones fúngicas humanas y su tratamiento es difícil debido a la resistencia que presentan a los antifúngicos.
2. La liberación de las nuevas células fúngicas desde el biofilme hace que la infección se disemine por el organismo, especialmente en individuos inmunocomprometidos.
3. Es necesario desarrollar nuevos métodos para la eliminación y control de biofilmes en implantes y catéteres, a fin de disminuir el riesgo y la gravedad de las infecciones producidas.
4. Los genes implicados en la formación y desarrollo de biofilmes, así como los sistemas de *quorum sensing*, constituyen nuevas dianas en el desarrollo de inhibidores específicos como alternativa a los tratamientos disponibles actualmente.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan QT, *et al.* Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog* (2006) 2:e63. doi:10.1371/journal.ppat.0020063
2. Kojic, EM and Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* (2004) 17(2): 255–267. doi: 10.1128/CMR.17.2.255-267.2004.
3. Fox, EP; Nobile, CJ. The role of *Candida albicans* biofilms in human disease. In: Dietrich, LA.; Friedmann, TS., editors. *Candida albicans* symptoms, causes and treatment options. Nova Science Publishers; (2013). p. 1-24
4. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Ed.), 1996. Vocabulario científico y técnico, 3. ed. ed. Espasa Calpe, Madrid.
5. IUPAC-IUB Comm. on Biochem. Nomencl, 1970. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polypeptide chains. Tentative rules (1969). *Biochemistry* 9, 3471–3479.
6. Real Decreto 2625/2010, de 18 de febrero errores y erratas del Real Decreto 2032/2009, del 30 de diciembre, por el que se establecen las unidades legales de medida (Boletín Oficial del Estado número 18, de 21 de enero de 2010).
7. Cavalheiro M and Teixeira MC. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front Med* (2018) 5(28):1-15 doi: 10.3389/fmed.2018.00028
8. Gulati M and Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* (2016); 18(5): 310–321. doi:10.1016/j.micinf.2016.01.002.
9. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis* (2008) 14:582–90. doi:10.1111/j.1601-0825.2007. 01424.x
10. Tsui C, Kong EF and Jabra-Rizk, MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Path and Diseases* (2016) 74: 1-13. doi: 10.1093/femspd/ftw018

11. Ni L, Bruce C, Hart C, Leigh-Bell J, Gelperin D, Umansky L, *et al.* Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev.* (2009); 23:1351–1363.
12. Blankenship Jr and Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin in Microb.* (2006) 9:588–594. doi 10.1016/j.mib.2006.10.003
13. Nobile CJ, Nett JE, Andes DR, Mitchell AP: Function of *C. albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* (2006), 5: in press.
14. Soll DR. The regulation of cellular differentiation in the dimorphic yeast *Candida albicans*. *Bio Essays* (1985); 5 (1): 5-11.
15. Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal super glue: The biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. *PLoS Pathog* (2016); 12:e1005828.[PubMed: 27685086]
16. Thomas DP, Bachmann SP, Lopez-Ribot JL. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. *Proteomics.* (2006); 6:5795–5804. [PubMed: 17001605]
17. Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Ross KM, Andes DR. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryot Cell.* (2011); 10:1660–1669.
18. Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A and Lopez-Ribot JL. The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. *J Fungi.* (2017); 3(1). doi:10.3390/jof3010014.
19. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, Lounes-Hadj Sahraoui A, Fontaine J, Sanchez H, Hatfield RD, *et al.* Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio.* (2014); 5:e01333–01314. [PubMed: 25096878]
20. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T and Miyake Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *Jour of App Microb.* (2016); 122: 321-330. doi:10.1111/jam.13330.
21. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* (2006); 8(9):1382-1391.
22. Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramaniam AK, Kohler JR, *et al.* Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog.* (2010); 6:e1000828. [PubMed: 20360962].
23. Uppuluri P, Pierce CG, Thomas DP, Bubeck SS, Saville SP, Lopez-Ribot JL. The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. *Eukaryot Cell.* (2010); 9:1531–1537. [PubMed: 20709787].
24. Granger BL. Insight into the antiadhesive effect of yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* (2012); 11:795–805. [PubMed: 22505336]
25. Hornby JM and Nickerson KW. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrob Agents Chemother.* (2004); 48, 2305–2307.
26. Polke M, Leonhardt I, Kurzai O and Jacobsen ID. Farnesol signalling in *Candida albicans*-more than just communication. *Crit Rev in Microb.* (2017); doi:10.1080/1040841X.2017.1337711.
27. Cavalcanti YW, Morse DJ, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Wei X, Wilson M, *et al.* Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling* (2015) 31:27–38. doi:10.1080/08927014.2014.996143
28. Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, *et al.* The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol* (2008) 53:755–64. doi:10.1016/j.archoralbio.2008.02.015.
29. Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* (2009) 53:3914–22. doi:10.1128/AAC.00657-09.

30. Lindsay AK and Hogan DA. *Candida albicans*: molecular interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Fungal Biol Rev. (2014); 28:85–96
31. Morales, DK, Grahl N, Okegbe C, Dietrich LEP, Jacobs NJ and Hogan DA. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. MBio. (2013);4, e00526.
32. Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, and Rojas-Herrera RA. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. Rev Iber Micr. (2014); 31, 137-140.
33. Del Pozo JL and Cantón E. Candidiasis asociadas a biopelículas. Rev Iberoam Micol. (2016); 33(3): 176-183.
34. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol. (2006); 55:999–1008. [PubMed: 16849719]
35. Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, Ross KM, Sanchez H, Cain MT, Hamaker J, Mitchell AP, Andes DR. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: Implications for drug resistance. PLoS Pathog. (2012); 8:e1002848. [PubMed: 22876186]
36. VEDIYAPPAN G, ROSSIGNOL T, D'ENFERT C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. Antimicrob Agents Chemother. (2010); 54:2096–2111. [PubMed: 20194705]
37. Íñigo M, Pemán J and Del Pozo JL. Antifungal activity against *Candida* biofilms. Int J Artif Organs. (2012); 35(10) 780-791. doi: 10.5301/ijao.5000170
38. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNAase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. Mycoses. (2012); 55:80–85. [PubMed: 21668524]
39. Srikantha T, Daniels KJ, Pujol C, Kim E, Soll DR. Identification of genes upregulated by the transcription factor bcr1, involved in impermeability, impenetrability, and drug resistance of *Candida albicans* a/a biofilms. Euk Cell. (2013); 12:875–888. [PubMed: 23563485]
40. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol. (2003);11(1):30-36
41. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LLM, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. J Bacteriol. (2001); 183:5385-94
42. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. Infect Immun. (2003); 71:4333-4340.
43. Nailis H, Kucharikova S, Ricicova M et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model dependent and-independent gene expression. BMC Microbiol. (2010);10:114.
44. Mitchell KF, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, et al. Community participation in biofilm matrix assembly and function. Proc Natl Acad Sci USA (2015) 112:4092–7. doi:10.1073/pnas.1421437112
45. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. (1998); 11: 382–402.
46. Monapathi ME, Bezuidenhout CC, Rhode OHJ. Efflux pumps genes of clinical origin are related to those from fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from environmental water. Water Sci Technol. (2018); 77(4):899-908. doi: 10.2166/wst.2017.607
47. Mateus C, Crow SA Jr, Ahearn DG. Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. Antimicrob Agents Chemother. (2004); 48:3358-3366.

48. Prasad R, Panwar S. Physiological functions of multidrug transporters in yeast. *Curr Sci.* (2004); 86:62–73
49. Niimi K, Maki K, Ikeda, f, Holmes AR, Lamping E, Niimi M *et al.* Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* (2006); 50:1148-55.
50. La Fleur MD, Kumamoto C, Lewis L. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Ch.* (2006); 50:3839–46.
51. Bink A, Vandenbosch D, Coenye T *et al.* Superoxide dismutases are involved in *Candida albicans* biofilm persistence against miconazole. *Antimicrob Agents Ch.* (2011); 55:4033–7.
52. Cateau E, Berjeaud JM, Imbert C. Possible role of azole and echinocandin lock solutions in the control of *Candida* biofilms associated with silicone. *Int J Antimicrob Agents* (2011) 37:380–4. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.12.016
53. Piersigilli F, Auriti C, Bersani I, Goffredo B, Bianco G, Savarese I, *et al.* Antifungal lock therapy with combined 70% ethanol and micafungin in a critically ill infant. *Pediatr Infect Dis J* (2014) 33:419–20. doi:10.1097/INF.000000000000116,
54. Bonne S, Mazuski JE, Sona C, Schallom M, Boyle W, Buchman TG, *et al.* Effectiveness of minocycline and rifampin vs chlorhexidine and silver sulfadiazine-impregnated central venous catheters in preventing central line-associated bloodstream infection in a high-volume academic intensive care unit: a before and after trial. *J Am Coll Surg* (2015) 221:739–47. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2015.05.013
55. Hoque J, Akkapeddi P, Yadav V, Manjunath GB, Uppu DS, Konai MM, *et al.* Broad spectrum antibacterial and antifungal polymeric paint materials: synthesis, structure-activity relationship, and membrane-active mode of action. *ACS Appl Mater Interfaces* (2015) 7:1804–15. doi:10.1021/am507482y.
56. Zhai B, Zhou H, Yang L, *et al.* Polymyxin B, in combination with fluconazole, exerts a potent fungicidal effect. *J Antimicrob Chemother.* (2010); 65(5):931-938
57. Vogel M, Hartmann T, Köberle M, Treiber M, Autenrieth IB, Schumacher UK. Rifampicin induces MDR1 expression in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* (2008); 61(3): 541-547.
58. Stergiopoulou T, Meletiadis J, Sein T, *et al.* Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother.* (2009); 63(2):343-348
59. 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) 46:1773–80. doi:10.1128/AAC.46.6.1773-1780.2002
60. Ghannoum MA, Roilides E, Katragkou A *et al.* The role of echinocandins in *Candida* biofilm-related vascular catheter infections: in vitro and in vivo model systems. *Clin Infect Dis* (2015); 61(Suppl 6):S618–21
61. Zhou Y, Wang G, Li Y, *et al.* In vitro interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* (2012); 56(6):3250-3260
62. Bujdáková H. Management of *Candida* biofilms: state of knowledge and new options for prevention and eradication. *Future Microbiol* (2016) 11:235–51. doi:10.2217/fmb.15.139