

Análisis morfológico de biopelículas de *Candida albicans* producidas en diferentes condiciones de pH y temperatura analizadas por microscopía óptica y de fuerza atómica

Gloria Merino Guzmán ¹, Lilia Cedillo Ramírez ², Francisco Silva Andrade ³,
Andrés A. Muñoz García ², Elsa Iracena Castañeda Roldán ²

¹ Posgrado en Ciencias Ambientales, Área de Medio Ambiente y Salud, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. ² Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP). ³ Departamento de Físico Química de Materiales (ICUAP)

Morphological analysis of *Candida albicans* biofilms produced at different pH and temperature conditions analyzed by optic and atomic force microscopy

Abstract. Microbial biofilm formation plays an important role in the cycle of life and subsistence of many microorganisms. *Candida albicans* colonizes the surface of catheters, prosthetic and epithelium forming biofilms that are extremely resistant to antifungal drugs. In the present study, a strain of *C. albicans* was grown under different pH and temperature conditions in order to analyze the morphology of biofilms formed by optical microscopy (OM) and quantitatively by atomic force microscopy (AFM). Optical and atomic force micrographs showed the formation of biofilms in all conditions tested. Main morphological parameters of *C. albicans* biofilms (height, highlight and valleys) were determined by MFA, showing heterogeneity in perimeter, area and volume values reached.

Key words: yeasts, growth *in vitro*, morphology of biofilms, microscopic techniques.

Resumen. La formación de biopelículas microbianas juega un papel importante en el ciclo de vida y subsistencia de muchos microorganismos. *Candida albicans* coloniza la superficie de catéteres, prótesis y epitelio formando biopelículas que son extremadamente resistentes a drogas antifúngicas. En el presente estudio, una cepa de *C. albicans* fue cultivada bajo diferentes condiciones de pH y temperatura con la finalidad de analizar la morfología de biopelículas formadas mediante microscopía óptica (MO) y cuantitativamente por microscopía de fuerza atómica (MFA). Las micrografías ópticas y de fuerza atómica demostraron la formación de biopelículas en todas las condiciones probadas. Los parámetros morfológicos principales (altura, relieve y valles) de las biopelículas de *C. albicans* fueron determinados por MFA, mostrando heterogeneidad en los valores de perímetro, área y volumen alcanzados.

Palabras clave: levaduras, crecimiento *in vitro*, morfología de biopelículas, técnicas microscópicas.

Received 11 May 2009; accepted 9 July 2010.

Recibido 11 de mayo 2009; aceptado 9 de julio 2010.

Introducción

Candida albicans (C.P. Robin) Berkhout es el agente causal más común en infecciones intrahospitalarias ya que el 40% de

Autor para correspondencia: Gloria Merino Guzmán
gloria_merino_guzman@yahoo.com.mx

los pacientes se han contaminado con cepas de *Candida* a través de catéteres produciendo fungemia con alta mortalidad (Bandenhorts *et al.*, 1991; Anaissie *et al.*, 1993; Arisoy *et al.*, 1993; Hawser y Douglas, 1994). La habilidad de *C. albicans* para crecer sobre superficies y formar biopelículas está asociada con su virulencia, porque es un comensal de

mucosas y de la superficie intestinal que puede servir como fuente para infecciones invasivas (Reagan *et al.*, 1990; Riggle *et al.*, 1999; Donland, 2002; Shin *et al.*, 2002; Donland y Costerton, 2002; Khun *et al.*, 2002; Douglas, 2003). También se ha observado que *C. albicans* forma biopelículas sobre las superficies inertes de catéteres y prótesis dentales (Arisoy *et al.*, 1993).

El análisis de biopelículas de *C. albicans* por microscopía de fluorescencia muestra que están formadas por una capa basal de blastosporas, hifas y pseudohifas ordenadas en una estructura de doble capa, dentro de una matriz extracelular constituida fundamentalmente de polisacáridos y proteínas resistentes a un amplio espectro de antifúngicos que incluye anfotericina B y fluconazol (Hawser y Douglas, 1995; Baillie y Douglas, 1998; 2000; Donland, 2000; Khun *et al.*, 2002b; Lupetti *et al.*, 2002; Alem *et al.*, 2006a). En contraste, las biopelículas de *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice tienen un volumen menor que las biopelículas de *C. albicans* y están formadas exclusivamente por blastosporas. Por otra parte, las cepas invasivas de *C. albicans* producen biopelículas con un volumen significativamente mayor que las cepas de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* (H.W. Anderson) S.A. Mey. & Yarrow y *C. tropicalis* (Castell.) Berkhout, en ensayos determinados por peso seco (Khun *et al.*, 2002a). Esta forma de vida de los microorganismos adheridos a superficies se conoce desde hace mucho tiempo, pero no ha sido hasta hace poco cuando se ha visto su gran impacto médico e industrial.

Por otra parte, se conoce que en *C. albicans* se producen dos moléculas de comunicación intercelular o *quorum sensing*: farnesol y tirosol. Estas estructuras aceleran y bloquean la transición morfológica de levadura a hifa y actúan significativamente durante las fases temprana, intermedia y de crecimiento del organismo (Baillie y Douglas, 1999; Hornby *et al.*, 2001; Alem *et al.*, 2006b).

La microscopía de fuerza atómica (MFA) es una herramienta que se ha empleado en esta década para el estudio

de la morfología superficial de diversos materiales, como bióxido de silicio (SiO₂), cristales fotónicos como el ópalo y materiales que presentan transición de fase metal-semiconductor como el VO₂ (Silva Andrade *et al.*, 2004). Con la ayuda de este equipo, se han visualizado las bacterias a alta resolución, investigando las fuerzas de interacción entre objetos a escala de nanómetros, como la superficie de *Escherichia coli* y otras bacterias como *Bacillus coagulans* y *B. sphaericus*, lo que ha permitido obtener mayor información de los lipopolisacáridos característicos de las membranas de bacterias Gram-negativas que son ensamblados en cadenas de 600-3500 moléculas (Kotra *et al.*, 2000).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de formación de biopelículas *C. albicans* bajo diferentes condiciones de crecimiento, específicamente pH y temperatura, y determinar las características morfológicas de las estructuras formadas utilizando microscopía óptica y de fuerza atómica.

Materiales y métodos

Candida albicans (ATCC 10261) fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. La elección de *C. albicans* para realizar este estudio se basó en su relevancia clínica como patógeno oportunista de humanos. La cepa de *C. albicans* se descongeló y posteriormente fue resembrada en placas de medio dextrosa Saboraud (Laboratorios Difco, Detroit, MI, USA), incubándose a 37 °C durante 24 h. De este cultivo se realizó un subcultivo en medio líquido dextrosa Saboraud, que fue incubado a 37 °C durante ≈ 12 h. El crecimiento celular se ajustó a una DO_{540 nm} 0.8 obteniendo una suspensión de 1x10⁶ cel/mL (Baillie y Douglas, 2000).

Las condiciones para estudiar las fases del desarrollo de las biopelículas de *C. albicans* y sus cambios morfológicos fueron las siguientes: 1) Cinética de crecimiento a las 4, 8, 12 y 24 h, a un pH de 5.6 y una temperatura de incubación de 37 °C, 2) temperaturas de 25, 37 y 44 °C, manteniendo un pH a 5.6 durante 24 h, y 3) pH de 4.4 y 5.4 manteniendo la temperatura a 37 °C durante 24 h.

Para evaluar la cinética de formación de las biopelículas se colocaron 100 µL de medio RPMI 1640 en los 8 pozos de las placas de vidrio Lab-Tek II y 25 µl de la suspensión de 1x10⁶ cel/mL. Las placas se incubaron a 37 °C/2 h. Posteriormente se realizaron tres lavados con un tampón de fosfatos salinos (PBS) 0.15 M y pH 7.2, con la finalidad de remover las levaduras no adheridas a la superficie de las placas y eliminar las células planctónicas. Se adicionó nuevamente 100 µL de medio RPMI 1640 en cada pozo y las muestras se incubaron a 37 °C a los diferentes tiempos considerados (4, 8, 12 y 24 h), realizándose en cada tiempo de incubación tres lavados con la solución tampón de PBS. Cada prueba se evaluó por duplicado y las preparaciones se fijaron con PBS pH 7.2 y formalina al 4%, manteniendo los portaobjetos a temperatura ambiente (Baillie y Douglas, 2000).

Las biopelículas fijadas se analizaron en el microscopio óptico (MO) y de fuerza atómica. El mismo procedimiento descrito anteriormente fue empleado para las diferentes condiciones de temperatura (25, 37 y 44 °C) y pH (4.4 a 5.4) estudiadas. Se utilizó como control negativo a *C. albicans* a una densidad celular de 1x10² cel/mL y medio RPMI 1640 diluido al 10%.

Para la observación en el MO, las biopelículas fijadas se tiñeron con Giemsa 1:20, aplicando 250 µl de colorante en cada pozo durante 1 h. Posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada y entonces las muestras se secaron, desmontando las celdas y colocándolas en un cubreobjetos para su observación en un microscopio óptico Nikon Japan 310454 con focus lock 3-CCD.

Las micrografías de MFA se obtuvieron en un microscopio de fuerza atómica modelo Q-Scope™ 850, con cámara anti vibraciones. Todas las imágenes se visualizaron en el modo de contacto del microscopio, usando un cantilever de nitruro de silicio con un radio de 10 nm, un índice de barrido de 2 Hz y una escala de barrido entre 5 y 10 µm. Los datos acerca de la interacción del cantilever con la superficie fueron transmitidos a la computadora mediante una interfase electrónica para generar imágenes de superficie de las biopelículas en tercera dimensión. Los ejes X y Y de las imágenes se refieren a la escala de barrido y el eje Z corresponde a la altura de las biopelículas. El software del microscopio proporcionó los datos de altura, área, perímetro y volumen de canales y valles. Los canales corresponden a estructuras continuas profundas observadas como zonas oscuras o poros, mientras que los valles se observan como depresiones de la superficie de las biopelículas.

Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante una ANOVA y la prueba t de student, con la finalidad de determinar las diferencias entre las variables experimentadas (horas durante la cinética, temperaturas y pHs), así como para determinar las diferencias entre las áreas, volúmenes y perímetro de las estructuras formadas.

Resultados

El control negativo en 1x10² cel/mL en medio RPMI 1640 al 10% observado por MO mostró la adherencia de algunas células sobre la superficie de las placas a las 4 h, pero sin llegar a formar una biopelícula madura en ninguno de los tiempos estudiados (datos no mostrados), mientras que la cepa de *C. albicans* en 1x10⁶ cel/mL y en medio RPMI 1640, observado por MO y MFA, presentó la formación de biopelículas en todas las condiciones estudiadas (Figuras 1-3).

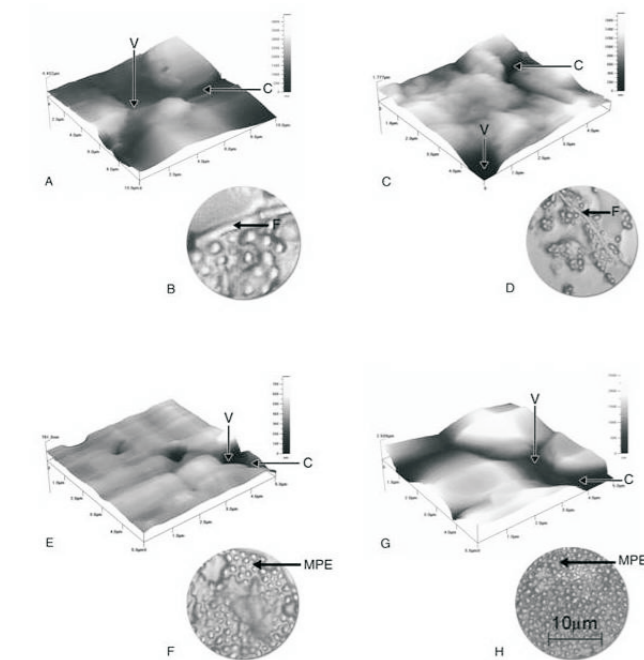


Figura 1. Cinética de crecimiento de las biopelículas de *C. albicans*. A-B: adherencia a las 4 h; C-D: formación de microcolonias a las 8 h; E- F: crecimiento y proliferación celular a las 12 h; G-H: estructura madura a las 24 h. Material polimérico extracelular=MPE, canales=C y valles=V.

Las observaciones realizadas en MO mostraron diferentes etapas de formación de las biopelículas de *C. albicans*, así como su morfología celular. En la fase inicial, 4 y 8 h de crecimiento, las células de *C. albicans* se pegaron y formaron microcolonias pequeñas o racimos, observándose un crecimiento menor en extensión sobre la superficie de cada pozo de las placas y presencia de hifas (Figuras 1A-1D); mientras que la fase de desarrollo intermedia, 12 h, se caracterizó por la producción de material polimérico extracelular (Figuras 1E-1F). Durante la fase de maduración, ocurrida a las 24 h de incubación, el soporte fue cubierto casi en su totalidad con regiones densas de células levaduriformes, observándose un crecimiento mayor en extensión (Figuras 1G-1H). Las comunidades de *C. albicans* fueron encerradas por material polimérico extracelular, presentando en todos los casos una característica morfología levaduriforme, con un incremento de la densidad celular dependiente de la fase de desarrollo de la biopelícula, siendo visualmente significativo a las 24 h durante la fase de maduración. La presencia de filamentos fue observada en la cinética a las 4 y 8 h de crecimiento. También se observaron filamentos durante la fase madura de 24 h, bajo las condiciones de crecimiento de 44 °C y pH 5.6 (Figuras 2E-2F) y a 37°C y pH 4.4 (Figuras 3A-3D). El análisis de las micrografías con MO y tinción de Giemsa mostraron la topografía característica de las biopelículas de *C. albicans* en la cinética de crecimiento, así como en las diferentes condiciones de temperatura y pH estudiadas.

Figura 2. Formación de las biopelículas de *C. albicans* a diferentes temperaturas. A-B: 25°C; C-D: 37°C; E-F: 44°C. En todos los casos se observan estructuras en etapa madura, con presencia de levaduras con morfología celular característica. Material polimérico extracelular=MPE, canales=C y valles=V.

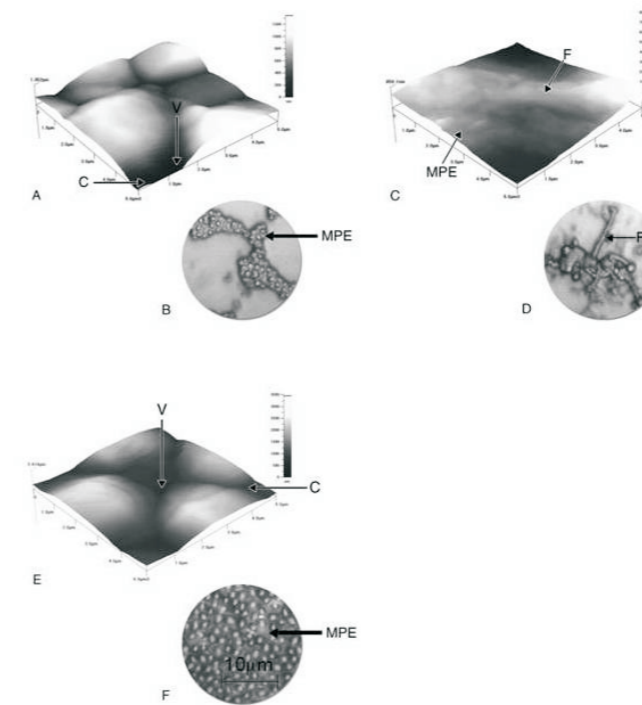


Figura 3. Formación de biopelículas de *C. albicans* a diferentes pHs. A-D: 4.4; E-F: 5.4. Se observan los canales=C, valles=V y material polimérico extracelular=MPE.

Las imágenes obtenidas por MFA mostraron topografías de superficie tanto en la cinética de formación de las biopelículas como en las etapas de maduración, bajo las diferentes condiciones de temperatura y pH evaluadas. En todos los casos, se observó una morfología de canales y valles, con área, perímetro y volumen de estas estructuras. Estos datos sugieren heterogeneidad en la superficie de las biopelículas de *C. albicans* (Figuras 1A, 1C, 1E y 1G; 2A, 2C y 2E; 3A, 3C y 3E). La formación de biopelículas maduras a las 24 h de crecimiento se observó en las condiciones de pH 5.6 y temperaturas de 25, 37 y 44 °C (Figuras 2A, 2C y 2E), así como a 37 °C y pHs de 4.4 y 5.4 (Figuras 3A, 3C y 3E).

La prueba t student aplicada a los resultados de formación de biopelículas de *C. albicans* en las diferentes condiciones estudiadas determinó diferencias significativas ($p < 0.001$) en la altura entre las 4 y 12 h ($2.3 \pm 0.57 \mu\text{m}$,

$0.39 \pm 0.085 \mu\text{m}$), entre las 8 y 12 h ($0.89 \pm 0.26 \mu\text{m}$, $0.39 \pm 0.085 \mu\text{m}$) y entre las 8 y 24 h ($0.89 \pm 0.26 \mu\text{m}$, $2 \pm 0.81 \mu\text{m}$). No hubo diferencia significativa entre las 4 y 24 h ($2.3 \pm 0.57 \mu\text{m}$, $2 \pm 0.81 \mu\text{m}$). Cuando se compararon las alturas promedio en el caso de variación de temperatura se encontraron diferencias significativas entre los 25°C y 37°C ($0.54 \pm 0.23 \mu\text{m}$, $2 \pm 0.81 \mu\text{m}$) y entre los 37°C y 44°C ($2 \pm 0.81 \mu\text{m}$, $0.39 \pm 0.15 \mu\text{m}$). También se observó diferencia significativa entre los pH 4.4 y 5.4 ($0.68 \pm 0.25 \mu\text{m}$, $2 \pm 0.81 \mu\text{m}$) ($p < 0.001$), siendo la última condición en donde se cuantificó la mayor altura.

Los datos del área, volumen, perímetro de canales y valles de la cinética de biopelículas a las 4, 8, 12 y 24 h se obtuvieron mediante el software WSMX 4.0 (Figura 4). En los canales, la mayor área se encontró a las 4 y 8 h (0.65 , $0.67 \mu\text{m}^2$), disminuyendo a las 12 y 24 h (0.59 , $0.6 \mu\text{m}^2$), mientras que los perímetros variaron entre 3.05 (4 h), 3.03 (8 h) y 3 μm (24 h), con un ligero incremento a las 12 h (3.08 μm). Los valores del volumen de los canales iniciaron con $0.04 \mu\text{m}^3$ a las 4 y 8 h, disminuyendo a 0.037 y $0.036 \mu\text{m}^3$ a las 12 y 24 h, respectivamente, lo que puede relacionarse con la maduración de la biopelícula, que alcanzó una morfología amorfa a las 24 h. El análisis de los valles mostró un valor de área mayor a las 4 y 8 h (0.15 y $0.13 \mu\text{m}^2$), disminuyendo a las 12 y 24 h (0.10 , $0.11 \mu\text{m}^2$); mientras que los perímetros y volúmenes fueron similares en los cuatro tiempos estudiados ($1 \mu\text{m}$ y $0 \mu\text{m}^3$) (Figura 5). Posteriormente con el programa Instat se realizó la prueba de ANOVA comparando los valores del área, volumen y perímetro correspondientes a los canales y valles en los diferentes tiempos de la cinética (4, 8, 12 y 24 h) no encontrándose diferencias significativas en todos los casos ($p > 0.05$).

Cuando se realizaron las variaciones de temperatura de 25, 37 y 44 °C a pH 5.6, los valores de los perímetros (4.11, 3.9 y 4 μm) y áreas (3.23, 3.33 y 3.11 μm^2) de canales fueron similares, mientras que los volúmenes disminuyeron (0.006 , 0.007 , $0 \mu\text{m}^3$). En el caso de los valles, el área fue

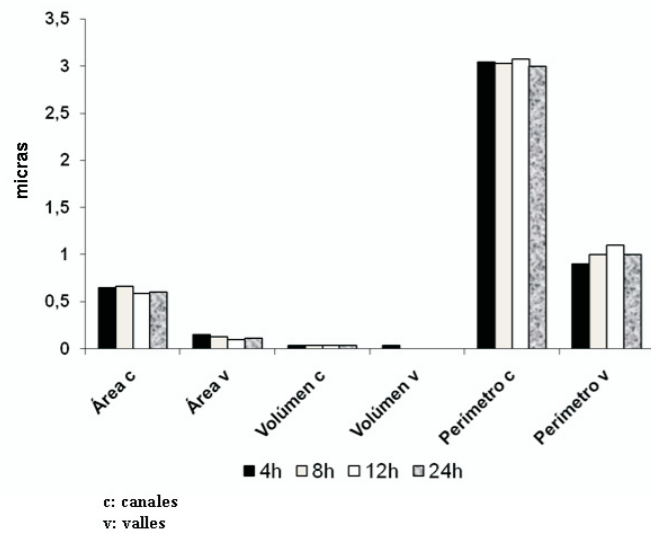


Figura 4. Comparación de áreas, volúmenes y perímetros de canales y valles desarrollados durante la cinética de crecimiento de las biopelículas de *C. albicans*.

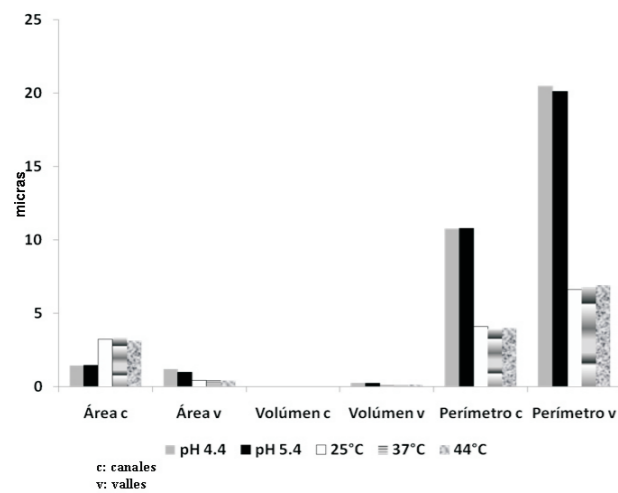


Figura 5. Comparación de las áreas, volúmenes y perímetros de los canales y valles de las biopelículas de *C. albicans* formadas a diferentes temperaturas y pH.

disminuyendo ligeramente al incrementarse la temperatura (0.43, 0.44 y 0.40 μm^2), y viceversa para los perímetros (6.6, 6.8 y 6.9 μm), mientras que los volúmenes fueron similares en las tres condiciones (0.10, 0.12 y 0.13 μm^3) (Figura 5).

Las áreas de los canales a pH de 4.4 y 5.4 fueron de 1.43 y 1.47 μm^2 , con perímetros de 10.75 y 10.8 μm y un volumen de 0.005 μm^3 , para ambas condiciones. En cuanto a

los valles, las áreas correspondieron a 1.2 y 0.99 μm^2 , manteniendo perímetros similares en ambos pHs (20.5 y 20.1 μm). De igual manera, los volúmenes medidos fueron similares, con 0.23 y 0.25 μm^3 , respectivamente (Figura 5).

Discusión y conclusiones

Las superficies a las cuales se adhiere *C. albicans* son principalmente membranas mucosas, piel, o sustratos abióticos usados en implantes médicos, similares a la superficie de placas Lab-Tek II empleadas en este estudio. *C. albicans* es un hongo dimórfico que tiene la habilidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales, ya que el microorganismo se adhiere y desarrolla polímeros extracelulares que lo proveen de una matriz estructural que facilita su sobrevivencia. Esta capacidad del microorganismo de formar las biopelículas a diferentes pHs y temperaturas, facilita la transferencia y proliferación rápida del hongo en muchos sitios *in vivo* e *in vitro* (Murillo *et al.*, 2005) (Biasoli *et al.*, 1999). En este estudio se utilizó medio RPMI 1640 como base para el crecimiento de *C. albicans* con un pH de 5.6 y a 37°C, estas condiciones permitieron la formación de biopelículas y el desarrollo de filamentos en las 4 y 8 h, así como a pH 4.4 y 37°C, con 24 h de crecimiento. En un estudio realizado por Kabli *et al.* (2006) se mostró que *C. albicans* no formó biopelículas en medio RPMI 1640 en pH de 4.4 hasta 7.4 a una temperatura de 34°C, aunque si se favoreció el crecimiento de las formas filamentosas. Dichos autores sugirieron que los pHs cercanos a la neutralidad fueron un factor determinante que no permitió la formación de las biopelículas de *C. albicans*, sin embargo en nuestro caso los pHs de 4.4, 5.4 y 5.6 permitieron la adherencia y formación de biopelículas maduras a las 24 h de incubación a 37°C. Otros estudios han demostrado que el pH óptimo para el crecimiento de *C. albicans* se encuentra en el intervalo de 4.5

a 5.6 (Ombrella *et al.*, 2008).

En cuanto a las temperaturas evaluadas, a 44 °C se logró observar la etapa madura en la formación de biopelículas de *C. albicans*. Esta característica podría estar relacionada con la presencia de una molécula de elevado peso molecular llamada farnesol, la cual se induce a 44° C y fue reportada por Hornby *et al.* (2001). Sin embargo, la búsqueda de esta molécula no se realizó en el presente trabajo.

Referente al análisis de las biopelículas mediante microscopía óptica (MO), el método fue muy limitado porque la amplificación de 1,000X no permitió una observación detallada de las estructuras superficiales, sin embargo este tipo de microscopía ayudó a comprobar que las biopelículas de *C. albicans* se formaron en las diversas condiciones de pH y temperatura, además de observar estructuras levaduriformes y en algunos casos hifas como las encontradas a las 4 y 8 horas en la cinética de crecimiento (37°C, pH 5.6), así como a 44°C y pHs de 4.4 y 5.6.

El empleo de soportes de vidrio (Lab-Tek II) para el desarrollo de las biopelículas de *C. albicans* y su posterior observación en el MFA, fue sugerido en un trabajo previo (Murillo *et al.*, 2005). En dicho reporte, al usar MFA en el estudio de la fase temprana de formación de biopelículas de *C. albicans*, se observó la adherencia de las células al soporte de vidrio, la presencia de hifas y la formación de microcolonias, reportando también la presencia de canales de agua menores a 10 μm de diámetro con un valor promedio aproximado a 1 μm . Parte de los resultados de Murillo *et al.* (2005) y colaboradores concuerdan con el presente trabajo, sin embargo, en esta investigación se logró visualizar cada etapa de la formación de las biopelículas hasta su estado maduro, lo que proporcionó mayor información en cuanto a dimensiones de área, perímetro y volumen de los canales y valles. Además, las imágenes obtenidas por MFA permitieron observar las estructuras a 40,000X de amplificación y medir los parámetros celulares en las diversas etapas de la biopelícula, puesto que en las micrografías, la superficie de la biopelícula

pudo analizarse en una imagen tridimensional.

La superficie celular de las biopelículas formadas en valores de pH de 4.4 a 5.4 no mostró diferencias significativas en las dimensiones de canales y valles. Los canales se observaron en las imágenes como poros o cavidades continuas que comunican a las diferentes partes de la biopelícula y las dimensiones de los valles indicaron la altura mínima o una tonalidad más oscura, incluso la presencia de hifas pudo observarse como una estructura cilíndrica de un color blanco a gris claro y el material polimérico extracelular se observó como una superficie de apariencia difusa. Es indiscutible que el microscopio de fuerza atómica posee ventajas muy importantes como lo es el poder de resolución a escala de nanómetros o subnanómetros; además, las imágenes pueden ser rotadas y analizadas con relativa facilidad, aunque la obtención de cada micrografías es muy laboriosa y requiere tiempo considerable (Silva Andrade *et al.*, 2004). La MFA también ha sido reportada en estudios de pared celular y formación de biopelículas en *C. parapsilosis*, logrando analizar su adherencia sobre superficies biológicas o inertes (Méndez *et al.*, 2006).

El estudio de la formación de biopelículas se ha realizado en otras especies de *Candida* mediante ensayos pioneros realizados por Hawser y Douglas en 1994, quienes utilizando colorimetría demostraron que varias especies de *Candida* pueden formar biopelículas, aunque *C. albicans* es la que las forma en mayor proporción. Los resultados del presente estudio demostraron la capacidad de *C. albicans* de desarrollar biopelículas bajo un intervalo amplio de pHs y temperatura. Asimismo, la utilización de la MFA permitió un análisis más detallado de las características superficiales de las biopelículas formadas por *C. albicans* en las diferentes condiciones ambientales evaluadas, lo que constituyó un estudio innovador en la biología de las biopelículas.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del ICUAP, a Antonio Yáñez Santos y Cristian Dionisio Román del Laboratorio de Microbiología Oral de la Facultad de Estomatología de la BUAP, así como a Eduardo Condado Picazo del Departamento de Diseño de la VEDC de la BUAP y al Laboratorio de Físico Química de Materiales del ICUAP.

Literatura citada

- Alem, M., A. Fattani, L.J. Douglas, 2006a. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology* 55:999-1008.
- Alem, M., M.D. Oteef, T.H. Flowers, L.J. Douglas, 2006b. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell* 5(10):1170-1179.
- Anaissie, E.J., G.P. Bodey, H. Pinczowski, 1993. Invasive candidiasis during granulocytopenia. *Recent Results Cancer Research* 132:137-145.
- Arisoy, E.S., A. Correa, D.K. Seilheimer, S.L. Kaplan, 1993. *Candida rugosa* central venous catheter infection in a child. *Journal of Pediatric Infectious Disease* 12(11):961-963.
- Baillie, G.S., L.J. Douglas, 1998. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42(8):2146-2149.
- Baillie, G.S., L.J. Douglas, 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology* 48(7):671-679.
- Baillie, G.S., L.J. Douglas, 2000. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46(3):397-403.
- Bandenhorts, L., P.L. Botha, J.V. Rensburg, 1991. The incidence of hospital fungal infections-yeast. *South African Medical Journal* 79:302-303.
- Biasoli, M.S., M.E. Tosello, H. Bottai, C. Cuesta, H.M. Magaró, 1999. Efecto de la temperatura y el pH en la adherencia de *Candida albicans* "in vitro". *Revista Iberoamericana de Micología* 16:46-49.
- Donlan, R.M., 2000. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *American Society for Artificial Internal Organs Journal* 46(6):S47-S52.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8(9):881-890.
- Donlan, R.M., J.W. Costerton, 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15(2):167-193.
- Douglas, L.J., 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* 11(1):30-36.
- Hawser, S.P., L.J. Douglas, 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infection and Immunity* 62(3):915-921.
- Hawser, S.P., L.J. Douglas, 1995. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(9):2128-2131.
- Homy, J.M., E.C. Jensen, A.D. Lisee, J.J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault, K.W. Nickerson, 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology* 67(7):2982-2992.
- Kabli, S.A., 2006. Morphogenesis of two *Candida albicans* strains as influenced by growth media, pH value and incubation temperature. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science* 1(2): 127-132.
- Khun, D.M., J. Chandra, P.K. Mukherjee, M.A. Ghannoum, 2002a. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity* 70(2):878-888.
- Khun, D.M., T. George, J. Chandra, P.K. Mukherjee, M.A. Ghannoum, 2002b. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(6):1773-1780.
- Kotra, L.P., N.A. Amro, G.Y. Liu, G.S. Mobashery, 2000. Visualizing bacteria at high resolution. *American Society for Microbiology News* 66(11):675-681.
- Lupetti, A., R. Danesi, M. Campa, M. Del Tacca, S. Kelly, 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine* 8(2):76-71.
- Murillo, L.A., G. Newport, C.Y. Lan, S. Habelitz, J. Dungan, N. M. Agabian, 2005. Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 4(9): 1562-1573.
- Reagan, D.R., M.A. Pfaller, R.J. Hollis, R.P. Wenzel, 1990. Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA finger printing and a DNA probe. *Journal of Clinical Microbiology* 28:2733-2738.
- Riggle, P.J., K.A. Andrutis, X. Chen, S.R. Tzipori, C.A. Kumamoto, 1999. Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infection and Immunity* 67:3649-3642.
- Shin, J. H., S.J. Kee, M.G. Shin, S.H. Kim, D.H. Shin, S.K. Lee, S.P. Suh, D.W. Riang, 2002. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Journal of Clinical Microbiology* 40:1244-1248.
- Silva Andrade F., F. Chávez, T. Prutskii, A. Ilinski, 2002. Microscopía de fuerza atómica, control de la superficie de los semiconductores. *Ciencia y Desarrollo* 28 (163):68-77.
- Ombrella, A. M., L.Racca, L. Ramos, 2008. Actividades proteínica y fosfolípica de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales. *Revista Iberoamericana de Micología* 25(1):12-16.