Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica

Correlación entre factores de virulencia enzimáticos de cepas de Candida albicans y Candida tropicalis aisladas de micosis invasivas y su patogenicidad en larvas de Galleria mellonella

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Claudia CHÁVEZ ORTEGA

ASESOR

Dra. Vilma Ruth BÉJAR CASTILLO

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Chávez C. Correlación entre factores de virulencia enzimáticos de cepas de Candida albicans y Candida tropicalis aisladas de micosis invasivas y su patogenicidad en larvas de Galleria mellonella [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Claudia Chávez Ortega
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71490631
URL de ORCID	No aplica
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Vilma Ruth Béjar Castillo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08864601
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-2733-4492
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	José María Guevara Granados
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09273643
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Giuliana Mercedes Romero Barrenechea
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08491404
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Esther Lilia Valencia Bazalar
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06183418
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.1.4.4 Enfermedades prevalentes

Grupo de investigación	Tuberculosis & Enfermedades emergentes y re-emergentes
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP). R.R. 005557-2022-R-UNMSM
Ubicación geográfica de la investigación	Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos Edificio: Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" País: Perú Departamento: Lima Provincia: Callao Distrito: Bellavista Latitud: -12.054197 Longitud: -77.0871461
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2023 - 2024
URL de disciplinas OCDE	Enfermedades infecciosas https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú, Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD PRESENCIAL PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO(A) EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN EL ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Dr. José María Guevara Granados
Miembros: Lic. Giuliana Mercedes Romero Barrenechea
Lic. Esther Lilia Valencia Bazalar
Asesor(a): Dra. Vilma Ruth Béjar Castillo

UNMSM Firmado digitalmente por FERNANDEZ GIUSTI VDA DE PELLA Alicia Jesus FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 04.12.2024 10:37:51 -05:00

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 29 de Noviembre del 2024, siendo las 14:30 horas, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **"Correlación entre factores de virulencia enzimáticos de cepas de Candida albicans y Candida tropicalis aisladas de micosis invasivas y su patogenicidad en larvas de Galleria mellonella"** para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la Señorita:

Claudia Chávez Ortega,

Habiendo obtenido el calificativo de:

18 (En números)

Dieciocho (En letras)

Que corresponde a la mención de: Muy Buena

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

Presidente
Dr. José María Guevara Granados
D.N.I: 09273643

Miembro
Lic. Giuliana Mercedes Romero Barrenechea
D.N.I: 08491404

Miembro
Lic. Esther Lilia Valencia Bazalar
D.N.I: 06183418

Asesor(a) de Tesis
Dra. Vilma Ruth Béjar Castillo
D.N.I: 08864601

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Vilma Ruth Béjar Castillo en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N° 000073-2023-D-FM/UNMSM de la tesis, cuyo título es "Correlación entre factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* aisladas de micosis invasivas y su patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*", presentado por la bachiller Claudia Chávez Ortega para optar el título de Licenciada en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 10% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título correspondiente.

Firma del Asesor: 



DNI: 08864601

Nombres y apellidos del asesor: Vilma Ruth Béjar Castillo

DEDICATORIA

A mi madre, Olga Ortega, por su amor incondicional y por enseñarme con su ejemplo la importancia del esfuerzo y el valor de nunca rendirse.
A mi hermana, Sarita Chávez, por ser mi ejemplo de valentía y fortaleza en cada paso de este camino.
Con todo mi cariño, este logro es para ustedes.

AGRADECIMIENTO

Mi más profundo agradecimiento es para mi asesora, la Dra. Vilma Béjar, por su invaluable orientación y por compartir generosamente su amplio conocimiento. Su paciencia, dedicación y confianza en mis capacidades fueron una guía constante a lo largo de todo este trabajo, y su apoyo fue esencial para superar cada desafío.

Agradezco también al profesor Freddy Villanueva, quien no solo me brindó la oportunidad de desarrollar este proyecto, sino que también confió en mí desde mis primeros pasos como estudiante de pregrado. Su apoyo y confianza fueron fundamentales para mi crecimiento académico y personal.

A Cyntia Medina, mi compañera de laboratorio en el Instituto de Medicina Tropical, por brindarme la orientación y confianza necesarias para realizar el trabajo. Su apoyo fue clave para llevar a cabo esta investigación.

Un reconocimiento especial a la Sección de Micología del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por abrirme las puertas y proporcionarme los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación. El respaldo técnico y humano que recibí fue invaluable, y sin su colaboración, este estudio no habría sido posible.

A mis amigos más cercanos y a Andrés, quienes comprendieron cada ausencia, cada sacrificio, y estuvieron presentes en los momentos que más necesitaba su apoyo. Gracias por ser ese espacio seguro al que siempre podía regresar.

Finalmente, a mi familia, el verdadero motor detrás de cada uno de mis esfuerzos. A mi mamá y a mi hermana, por su apoyo constante; y a mis abuelitos, que desde el cielo me acompañaron en cada paso de este camino.

A todos, gracias por caminar conmigo en este viaje, que hoy culmina con profunda gratitud y satisfacción.

ÍNDICE

CAPÍTULO I 1
INTRODUCCIÓN 1
1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES 6
1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN 10
1.3 OBJETIVOS 11
1.3.1 Objetivo general 11
1.3.2 Objetivos específicos 11
1.4 BASES TEÓRICAS 12
1.4.1 BASE TEÓRICA 12
1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS 15
1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS 16
CAPÍTULO II 17
MÉTODOS 17
2.1 DISEÑO METODOLÓGICO 18
2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN 18
2.1.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN 18
2.1.3 POBLACIÓN 18
2.1.4 MUESTRA Y MUESTREO 19
2.1.5 VARIABLES 19
2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS 19
2.1.7 PROCEDIMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS 20
2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS 26
CAPÍTULO III 27
RESULTADOS 27
CAPÍTULO V 48
DISCUSIÓN 48
CAPÍTULO V 53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 53
5.1 CONCLUSIONES 54
5.2 RECOMENDACIONES 54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55
ANEXOS 61

TABLAS

Tabla N°1 Porcentaje de mortalidad de las larvas de *Galleria mellonella* inoculadas con diferentes cepas de *Candida albicans* a lo largo de los primeros siete días después de la inoculación. 29

Tabla N°2: Prueba de log-rank para la evaluación de funciones de supervivencia entre cepas de *Candida albicans*..... 30

Tabla N°3: Porcentaje de mortalidad de las larvas de *Galleria mellonella* inoculadas con diferentes cepas de *Candida tropicalis* a lo largo de los primeros siete días después de la inoculación. 32

Tabla N°4: Prueba de log-rank para la evaluación de funciones de supervivencia entre cepas de *Candida tropicalis*. 33

Tabla N°5: Prueba de log-rank para la evaluación de funciones de supervivencia entre especies de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. 34

Tabla N° 6: Actividad enzimática de Fosfolipasa. 36
Tabla N° 7: Actividad enzimática de Esterasa. 37
Tabla N°8: Actividad enzimática de Hemolisina. 38
Tabla N°9: Actividad enzimática de Proteinasa..... 39
Tabla N°10: Actividad enzimática de fosfolipasa en *Candida albicans* y *Candida tropicalis* 40
Tabla N°11: Actividad enzimática de esterasa en *Candida albicans* y *Candida tropicalis* . 41
Tabla N°12: Actividad enzimática de hemolisina en *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. 42

Tabla N°13: Actividad enzimática de proteinasa en *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. 43

Tabla N°14: Correlación entre la Patogenicidad y los factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida albicans*. 44

Tabla N°15: Comparación de la actividad enzimática de las cepas de *Candida albicans* con la mortalidad de las larvas en los primeros cinco días tras la inoculación y el tiempo medio de sobrevida. 45

Tabla N°16: Correlación entre la Patogenicidad y los factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida tropicalis* 46

Tabla N°17: Comparación de la actividad enzimática de las cepas de *Candida tropicalis* con la mortalidad de las larvas en los primeros cinco días después de la inoculación y el tiempo medio de sobrevida 47

FIGURAS

Figura N° 1: Curvas de mortalidad de los ensayos de supervivencia de *Galleria mellonella* infectados con cepas de *Candida albicans.* 28

Figura N° 2: Curvas de mortalidad de los ensayos de supervivencia de *Galleria mellonella* infectados con cepas de *Candida tropicalis*..... 31

Figura N° 3: Curvas de mortalidad de los ensayos de supervivencia de *Galleria mellonella* infectados con cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*..... 35

Figura N° 4: Fotografía del crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 (control positivo) en el medio de yema de huevo. 36

Figura N° 5: Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 (control positivo) en el medio de Tween 80. 37

Figura N° 6: Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 (Control positivo) en el medio de sangre de carnero. 38

Figura N° 7: Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 (control positivo) en el medio de Caseína. 39

RESUMEN

Introducción: Las infecciones fúngicas, especialmente aquellas causadas por *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, han mostrado un incremento notable en los últimos años, representando un desafío clínico significativo debido a su elevada mortalidad, particularmente en individuos inmunocomprometidos. Estas especies, que forman parte de la microbiota humana, pueden actuar como patógenos oportunistas, desencadenando infecciones que van desde candidiasis superficiales hasta formas invasivas. La producción de factores de virulencia, como enzimas extracelulares, desempeña un rol importante en su capacidad patogénica. No obstante, existe una limitada investigación que explore la correlación entre estos factores y la patogenicidad en modelos experimentales. **Objetivo:** Evaluar la correlación entre los factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* aisladas de micosis invasivas y su patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella.* **Método:** Se realizó un estudio observacional y correlacional con 30 cepas de *Candida* (15 de *C. albicans* y 15 de *C. tropicalis*) aislados de micosis invasiva. Se evaluaron la producción de fosfolipasa, proteinasa, hemolisina y esterasa, así como la patogenicidad mediante ensayos de sobrevida en larvas de *Galleria mellonella*. Los datos de patogenicidad se analizaron con Kaplan-Meier y el Log-rank test, y la correlación con los factores de virulencia enzimáticos se calculó mediante Spearman. **Resultados:** *Candida tropicalis* mostró mayor variabilidad en la patogenicidad de sus cepas, con diferencias significativas (p=0.02), mientras que *Candida albicans* no presentó diferencias significativas entre sus cepas (p=0.18). La producción de factores de virulencia enzimáticos mostró que *C. albicans* presentó mayor actividad de fosfolipasa comparado con *C. tropicalis* (p=0.01). Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre la actividad enzimática y la patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*. **Conclusión:** Aunque se identificaron diferencias en la producción de factores de virulencia enzimáticos entre *C. albicans* y *C. tropicalis*, no se observó una correlación entre estos factores y la patogenicidad en *Galleria mellonella*. Esto sugiere que otros mecanismos podrían estar involucrados en la virulencia de estas especies, resaltando la necesidad de más estudios.

Palabras claves: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, patogenicidad, *Galleria mellonella*, factores de virulencia enzimáticos, fosfolipasas, proteinasas, hemolisinas, esterasas.

ABSTRACT

Introduction: Fungal infections, particularly those caused by *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, have shown a significant increase in recent years, posing a major clinical challenge due to their high mortality rates, especially in immunocompromised individuals. These species, which are part of the human microbiota, can act as opportunistic pathogens, leading to infections ranging from superficial candidiasis to invasive forms. The production of virulence factors, such as extracellular enzymes, plays a crucial role in their pathogenicity. However, there is limited research exploring the correlation between these factors and pathogenicity in experimental models. **Objective:** To evaluate the correlation between the enzymatic virulence factors of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* strains isolated from invasive mycoses and their pathogenicity in *Galleria mellonella* larvae. **Method:** An observational and correlational study was conducted with 30 *Candida* strains (15 *C. albicans* and 15 *C. tropicalis*) isolated from invasive mycoses. The production of phospholipase, proteinase, hemolysin, and esterase, as well as pathogenicity, were assessed through survival assays in *Galleria mellonella* larvae. Pathogenicity data were analyzed using Kaplan-Meier and the Log-rank test, and the correlation with enzymatic virulence factors was calculated using Spearman´s correlation. **Results:** *Candida tropicalis* exhibited greater variability in the pathogenicity of its strains, with significant differences (p=0.02), while *Candida albicans* showed no significant differences among its strains (p=0.18). The production of enzymatic virulence factors showed that *C. albicans* had higher phospholipase activity compared to *C. tropicalis* (p=0.01). However, no significant correlations were found between enzymatic activity and pathogenicity in *Galleria mellonella* larvae. **Conclusion:** Although differences in the production of enzymatic virulence factors were identified between *C. albicans* and *C. tropicalis*, no correlation was observed between these factors and pathogenicity in *Galleria mellonella*. This suggests that other mechanisms may be involved in the virulence of these species, highlighting the need for further studies.

Keywords: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, pathogenicity, *Galleria mellonella*, enzymatic virulence factors, phospholipases, proteinases, hemolysins, esterases.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha observado un notable incremento en la frecuencia de infecciones causadas por hongos, representando un desafío clínico importante en el ámbito de la medicina, los agentes causales más comunes incluyen las especies del género *Candida* especialmente *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Estos hongos, que normalmente forman parte de la microbiota comensal del ser humano, pueden convertirse en patógenos oportunistas en individuos inmunocomprometidos, causando una diversidad de infecciones que abarca desde candidiasis mucocutánea hasta candidemia y candidiasis diseminada, con una alta mortalidad asociada (1)

Candida spp. es un microorganismo comensal que coloniza de manera natural las mucosas de los tractos mucocutáneo, gastrointestinal y genitourinario, se ha documentado la presencia de más de 17 especies diferentes de *Candida* como responsables de candidiasis invasiva en la población humana. A escala mundial, *Candida albicans* destaca como la especie más prevalente, abarcando aproximadamente el 66% de todos los casos de infección por *Candida.* No obstante, la predominancia de *Candida albicans* varía considerablemente según la región geográfica, con porcentajes que oscilan entre el 37% en América Latina y el 70% en Noruega (2). Tanto *Candida albicans* como *Candida tropicalis* son microorganismos que habitualmente forman parte de la microbiota comensal de la cavidad oral, presentes en alrededor del 50 – 70% de individuos sin problemas de salud aparentes. Sin embargo, estas cepas pueden adquirir capacidad patógena en determinadas circunstancias, como cambios ambientales locales o cuando el sistema inmunológico del huésped se encuentra debilitado (3).

La infección invasiva causada por estos microorganismos representa una condición grave, caracterizada por una elevada mortalidad y manifestada principalmente en dos formas clínicas: la candidemia y la infección diseminada de tejidos profundos. La candidemia, en particular, muestra una mortalidad cercana al 50%, sin importar el estado inmunológico del paciente. Actualmente, esta patología presenta grandes retos en su tratamiento clínico y su prevalencia ha aumentado en los últimos años (4,5).

La candidemia es la manifestación más común de la candidiasis invasiva, constituyendo aproximadamente el 30% de los casos. Esta infección es particularmente relevante en entornos hospitalarios debido a su alta morbimortalidad. Los orígenes o puntos de entrada de la candidemia son diversos, destacándose el tracto gastrointestinal y la piel, los cuales permiten la colonización y posterior invasión del torrente sanguíneo por especies de *Candida*, facilitando la diseminación sistémica de la infección. La candidemia se caracteriza por la detección de uno o más cultivos sanguíneos periféricos que resulte positivo para *Candida spp*. Por otro lado, la candidiasis invasiva diseminada se manifiesta con un cuadro febril sin foco evidente y sin mejoría tras el tratamiento con antibióticos de amplio espectro en individuos que presentan factores de riesgo, y se confirma mediante al menos dos hemocultivos positivos para la presencia de esta especie. Aunque *Candida albicans* es la cepa más comúnmente relacionada con infecciones fúngicas en pacientes en estado crítico, es importante destacar que la generación de una infección en el torrente sanguíneo requiere una notable proliferación de levaduras. Dentro de las especies más prevalentes de *Candida* se encuentran *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, siendo la primera la más predominante en esta categoría (6).

Entre los factores que favorecen la aparición de candidemia se incluyen la aplicación de tratamientos antimicrobianos de amplio espectro, la hospitalización en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) por más de 72 horas, el uso de terapia inmunosupresora, la alimentación parenteral, así como la realización de múltiples procedimientos médicos invasivos. En Perú, los estudios sobre candidemia han sido limitados. En tres centros hospitalarios de Lima y Callao, las condiciones más comúnmente vinculadas con esta infección incluyeron la cirugía reciente (38.9%), la ventilación mecánica (38.2%) y la nutrición parenteral total (36.3%) (7). *Candida tropicalis* ha sido reconocida como la segunda en términos de virulencia y relevancia clínica, después de *Candida albicans*. No obstante, en contraste con la abundante información disponible sobre *Candida albicans*, existe un conocimiento considerablemente menor sobre *Candida tropicalis* (8).

Las variedades de Candida presentan una amplia gama de atributos de virulencia que promueven la penetración en los tejidos del huésped. Estas características incluyen la capacidad de adherirse a los tejidos del huésped y la producción de enzimas extracelulares, especialmente proteasas. Estas enzimas extracelulares facilitan la entrada en el huésped y contrarrestan su sistema de defensa, dado que las proteínas y los fosfolípidos constituyen los elementos químicos fundamentales de la membrana celular del huésped, es necesario su deterioro para obtener nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo del hongo, así como para favorecer su propagación dentro del organismo huésped (9).

En América Latina y la India la especie más predominante es *Candida tropicalis* (10). Un análisis retrospectivo realizado en un hospital nacional de Perú, que abarcó el periodo de 2012 a 2016 y en el que se examinaron todos los casos con diagnóstico etiológico confirmado por hemocultivos, arrojó resultados relevantes. Dentro de estos, se evidenció que *Candida tropicalis* fue la especie más comúnmente aislada en casos de candidemia, constituyendo el 47% de los casos totales (11).

El modelo tradicional para evaluar la virulencia de *Candida* es el de candidiasis sistémica en ratones, aunque este enfoque es limitado debido a su alto costo, restricciones éticas y el tiempo que consume. Por ello, se han adoptado modelos alternativos de invertebrados, siendo las larvas de *Galleria mellonella* particularmente efectivas. Estas larvas presentan características que las hacen adecuadas para investigar la virulencia fúngica. Se ha observado que la inoculación de cepas altamente virulentas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* en *Galleria mellonella* desencadena respuestas inmunológicas significativas, validando así su uso para estudiar la virulencia y desarrollar nuevos tratamientos antifúngicos (12).

El uso de *Galleria mellonella* presenta varias ventajas sobre los modelos murinos desde una perspectiva ética y práctica. Los modelos invertebrados permiten realizar experimentos con un mayor número de cepas y replicaciones sin problemas bioéticos asociados con los vertebrados. Asimismo, la respuesta inmunitaria primaria de *Galleria mellonella* comparte similitudes con la de mamíferos, haciéndola un modelo

relevante para estudiar infecciones humanas. Este enfoque no solo es más ético, sino también más práctico y eficiente para investigaciones a gran escala (13).

C. albicans exhibe diversos estados de crecimiento celular que le permite persistir en diferentes tejidos de mamíferos, con morfologías de levadura e hifa que facilitan la colonización superficial y la invasión tisular, respectivamente. La capacidad de cambiar entre estas formas es necesaria para atravesar barreras mucosas y establecer enfermedades invasivas. Varios estímulos ambientales, como la temperatura del huésped, pH y disponibilidad de nutrientes influyen en su morfología. Este dinamismo morfológico es clave para su patogenicidad, destacando la importancia de estudiar estos mecanismos en el contexto de infecciones invasivas, como las analizadas en modelos in vivo como *Galleria mellonella* (14).

A pesar de su cercanía filogenética con *C. albicans*, *Candida tropicalis* presenta características únicas, como la capacidad de soportar altas concentraciones de NaCl y la codificación de múltiples genes que codifican proteínas adhesinas, también conocidas como adhesinas aglutinantes, que están involucradas en la adhesión de las células de *Candida* lo que facilita su colonización y la formación de enzimas por lo cuál están asociadas con la virulencia y su capacidad de causar infecciones invasivas. Los factores de virulencia de *C. tropicalis* que incluyen enzimas, adhesinas y mecanismos específicos de señalización y morfogénesis, son esenciales para comprender su proceso infeccioso y patogenicidad. Esto resalta la necesidad de estudios específicos sobre *C. tropicalis*, especialmente en comparación con *C. albicans*, para esclarecer su impacto en micosis invasivas y su comportamiento en modelos in vivo como *Galleria mellonella* (15).

El conocimiento detallado de los factores y mecanismo de la patogenicidad de *Candida* es esencial debido a su amplio espectro, que abarca desde el dimorfismo hasta la producción de diversas enzimas hidrolíticas, lo que permite que esta especie cause infecciones desde superficiales hasta sistémicas. A medida que aumenta el conocimiento sobre estos aspectos, se incrementa la posibilidad de prevención de

infecciones por *Candida* generando oportunidades para el desarrollo de nuevas posibilidades diagnósticas y terapéuticas (16).

La presencia de factores de virulencia enzimáticos y su nivel de producción, así como el efecto de estos factores de virulencia es un organismo modelo in vivo son variables en cada aislamiento de las cepas de *Candida*. Por lo tanto, este estudio tiene por objetivo evaluar la correlación entre factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* aisladas de micosis invasivas y su patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*.

1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

Mohan Das V. et al (2008) (17) "Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood". Realizaron un estudio sobre la actividad enzimática de proteinasa y fosfolipasa en especies de *Candida* aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, diálisis y oncología. Analizaron un total de 114 aislamientos donde identificaron varias especies: 37 de *Candida albicans*, 7 de *Candida glabrata*, 5 de *Candida guilliermondii*, 3 de *Candida kefyr*, 45 de *Candida krusei*, 5 de *Candida parapsilosis* y 12 de *Candida tropicalis*. Utilizando el método de Staib para proteinasa y el método de Samaranayake para fosfolipasa, determinaron que el 75% de los aislamientos produjeron proteinasa y el 45% fosfolipasa. Estos resultados sugieren que dichas enzimas juegan un papel crucial como factores de virulencia en fungemias, independientemente de la especie involucrada.

Bezerra E. et al (2015) (18) "Enzymatic and hemolytic activity in different Candida species". Llevaron a cabo un estudio centrado evaluar la capacidad in vitro de varias especies de *Candida* para producir factores de virulencia como la actividad hemolítica, desoxirribonucleasa (DNasa), proteinasa y fosfolipasa. Para ello, estudiaron 50 aislamientos clínicos, incluyendo 15 aislamientos de *Candida albicans*, 15 de *Candida tropicalis*, 10 de *Candida parapsilosis*, 5 de *Candida glabrata* y 5 de *Candida krusei*. La actividad hemolítica fue evaluada en agar de Sabouraud con un 3% de glucosa y

7% de eritrocitos de oveja. Mientras que las actividades de DNasa, fosfolipasa y proteinasa se determinaron mediante medios de cultivo específicos. De los aislamientos, el 96% exhibieron actividad hemolítica, 20% fueron positivos para DNasa, 38% mostraron actividad de proteinasa y 32% presentaron actividad fosfolipasa. Además, se encontraron diferencias significativas entre las especies para las actividades de fosfolipasa ($p<0.00$) y proteinasa ($p<0.05$).

Marcos L. et al (2020) (19) "Candida isolates causing candidemia show different degrees of virulence in *Galleria mellonella*". Evaluaron las diferencias intraespecies e interespecies en la virulencia de cepas de *Candida spp*. utilizando como modelo *Galleria mellonella*. Estudiaron 373 aislados de *C. albicans*, 203 de *C. parapsilosis*, 92 de *C. glabrata,* 53 de *C. tropicalis* y 18 de *C. krusei* aislados de pacientes con candidemia, inocularon 10 larvas por cada aislado y se calculó el porcentaje y la mediana de supervivencia. Los resultados mostraron que la mediana de supervivencia para *C. albicans, C. tropicalis* y *C. parapsilosis* fue de 2 días, para *C. glabrata* fue 3 días y para *C. krusei* 7 días; y se validaron con un examen histológico en las larvas infectadas. Concluyeron que existen patrones de virulencia específicos de cada especie de *Candida spp.*

García L. et al (2020) (12) "Early Virulence Predictors during the *Candida Species-Galleria mellonella* interaction". Exploraron los predictores tempranos de virulencia durante la interacción *C. tropicalis* y *G. mellonella*, además los evaluaron como predictores tempranos de virulencia de especies de *Candida spp.* Mostraron que existe una reducción de los hemocitos circulantes, una mayor producción de melanina, fenoloxidasa y actividades de lactato deshidrogenasa a las 12 y 24 h después de la inoculación de *Candida albicans, Candida tropicalis*, *C.parapsilosis* y *C. orthopsilosis*; mientras que las especies de baja virulencia como *C. guillermondii*, *C. krusei* y *C. metapsilosis* indujo variaciones modestas en estos parámetros.

Nouraei H. et al (2020) (20) "Comparative Analysis of Virulence Factors of Homozygous and Heterozygous Strains of *Candida albicans* Vaginal isolates". Evaluaron la actividad exoenzimática de cepas heterocigotas y homocigotas de *C.*

albicans. Utilizaron 60 cepas, 50% homocigóticas y 50% heterocigóticas, evaluaron la actividad de fosfolipasa, hemolisina y proteinasa. Los resultados indicaron actividad de beta hemolisina en el 100% de cepas homocigóticas y 96.7% de cepas heterocigotas. Concluyeron que ambas cepas presentaron actividades exoenzimáticas en diferente grado.

Mroczyńska M. et al (2021) (21) "Virulence of Clinical *Candida* Isolates". Evaluaron la correlación entre factores de virulencia y la supervivencia de larvas de *Galleria mellonella* infectadas con aislamientos clínicos de *Candida spp*. La actividad de diversos factores de virulencia extracelulares, incluyeron proteinasas, fosfolipasas, esterasas y hemolisinas. También se verificó su capacidad para formar biopelículas. Se utilizó larvas de *Galleria mellonella* como modelo de infección para estudiar la patogenicidad de distintas especies de *Candida* las cuales fueron de 15 aislados de *C. albicans*, 1 de *C. glabrata*, 1 de *C. inconspicua*, 1 de *C. krusei*, 3 de *C. palmioleophila* y 4 aislados de *C. parapsilosis*. Encontraron actividad de proteinasa en 24 aislados, actividad de fosfolipasa en 7 de 22 aislados, actividad de esterasa en 14 de 23 aislados, actividad de hemolisina en 18 de 24 aislados, formación de biopelículas en 18 de 25 aislados; y la evaluación de la patogenicidad en larvas de *G. mellonella* mostró que los aislados más virulentos fueron de *C. albicans* y *C. glabrata*, los aislados avirulentos fueron de *C. krusei*, la virulencia fue variada en *C. parapsilosis*, *C. inconspicua* tuvo virulencia moderada y un aislado de *C. palmioleophila* tuvo baja virulencia. La investigación concluye que existe correlación entre la virulencia de los aislados de *Candida* con la expresión de proteasas, hemolisinas y esterasas.

Sasani E. et al (2021) (22) "Virulence Factors and Azole-Resistant Mechanism of *Candida tropicalis* Isolated from Candidemia". Llevaron a cabo una investigación centrada en los factores de virulencia y los mecanismos de resistencia a los azoles en cepas de *Candida tropicalis* aisladas de pacientes con candidemia. En su estudio, analizaron diversas características como las actividades enzimáticas extracelulares, la hidrofobicidad de la superficie celular (CSH) y la capacidad de estas cepas clínicas para formar biopelículas. Además, evaluaron la susceptibilidad a los antifúngicos y midieron la expresión génica de ERG11, UPC2, MDR1 y CDR1 en ocho aislados. Los

resultados mostraron una variabilidad en la presencia de determinantes de virulencia, destacando una actividad de coagulasa en 9% de aislados, fosfolipasa en 11%, proteinasa en 69%, esterasa en 96% y hemolisina en 98%. Tanto la capacidad de formar biopelículas como la hidrofobicidad fueron observadas en el 100% de los aislados. Asimismo, todas resultaron sensibles a la anfotericina B, pero se reportó una mayor resistencia al voriconazol. En conclusión, las cepas de *Candida tropicalis* mostraron una marcada capacidad para la formación de biopelículas, actividad hemolítica y de esterasas, así como una notable hidrofobicidad, con la sobreexpresión de los genes ERG11 y UPC2 como uno de los posibles mecanismos de resistencia a los azoles.

Prasad D. et al (2021) (23) "*Non-Candida albicans Candida* species: virulence factors and species identification in India". Llevaron a cabo un estudio con el propósito de determinar la frecuencia de diversas especies de *Candida* en distintas muestras clínicas y examinar algunos de sus factores de virulencia. El estudio es de tipo transversal y se desarrolló en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Ciencias Médicas de Uttar Pradesh, Saifai, India, donde se obtuvieron 137 aislados de *Candida*. De estos, el 40% pertenecieron a *C. albicans*, mientras que el 60% pertenecieron a especies no *albicans*, siendo *C. tropicalis* la más prevalente con un 23%. En cuanto a los factores de virulencia, la producción de hemolisina (86%) y la actividad de proteínas extracelulares asociadas a la adhesión (78%) fueron los más destacados en *C. albicans*, seguido de *C. tropicalis* (59%). Los hallazgos de este estudio indican una variabilidad en la prevalencia y virulencia, siendo la adherencia a las células epiteliales más pronunciada en *C. tropicalis* y *C. albicans*, así como la producción de coagulasa respecto a las demás especies analizadas.

Curtis A. et al (2022) (24) "*Galleria mellonella* Larvae as a Model for Investigating Fungal-Host Interactions". Investigaron la virulencia de patógenos fúngico utilizando larvas de *Galleria mellonella* como modelo, aprovechando la similitud funcional entre su respuesta inmune y la inmunidad innata de los mamíferos. Empleando un enfoque experimental que aprovechó el modelo de infección en larvas de *Galleria mellonella* lo cual permitió analizar diversos factores de virulencia fúngica, como la producción

de toxinas y enzimas, y se evalúo tanto la eficacia como la toxicidad de agentes antifúngicos en un entorno in vivo. Los hallazgos obtenidos respaldan la validez de *G. mellonella* para analizar la virulencia de patógenos fúngicos y la eficacia de tratamientos antifúngicos, equiparándose a estudios en ratones. Se concluyó que el uso de larvas de *G. mellonella* ofrece numerosos beneficios, como su manipulación sencilla, obtención rápida de resultados, costos bajos y la falta de restricciones éticas y legales, lo que las posiciona como una herramienta experimental versátil.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es la correlación entre factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* aisladas de micosis invasivas y su patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*?

1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Candida albicans y *Candida tropicalis* son dos especies de hongos que causan infecciones invasivas con una prevalencia notablemente alta (7). En particular, se ha reportado que el 37% de los pacientes que padecen fungemia desarrollan shock séptico, en comparación con el 22% de aquellos que sufren bacteriemia (25). Estudios como el de Guzmán han revelado que el shock séptico causado por *Candida* tiene una tasa de mortalidad que puede ser hasta tres veces mayor que el asociado a infecciones bacterianas (26). Este aumento en la mortalidad se atribuye en parte a los retrasos en el diagnóstico y en el inicio de la administración de un tratamiento antifúngico adecuado, lo que exacerba la mortalidad en pacientes con infecciones fúngicas invasivas. El diagnóstico de candidiasis invasiva es más complejo que el de infecciones bacterianas, lo que conlleva a retrasos en el tratamiento oportuno y eficaz (25,26).

Los factores de virulencia de *Candida*, como las enzimas hidrolíticas extracelulares, cumplen un rol importante en la patogénesis de la candidiasis al facilitar la adaptación del hongo a diferentes tipos de infección y promover su supervivencia en el huésped (14). El uso de las larvas de *Galleria mellonella* como modelo de infección fúngica ha

demostrado ser una herramienta valiosa en estudios de patogenicidad, ya que permite reproducir condiciones fisiológicas similares a las de los mamíferos cuando se trabaja a temperaturas adecuadas (13). Sin embargo, en nuestro país, no se ha investigado a profundidad la correlación entre la producción de factores de virulencia enzimáticos de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* aisladas de micosis invasivas y la patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella* infectadas con estas especies. Este estudio aborda esa brecha de conocimiento, buscando aportar evidencia que mejore nuestra comprensión sobre la relación entre la virulencia enzimática y la patogenicidad de estos hongos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la correlación entre factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* aisladas de micosis invasivas y su patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la producción de fosfolipasas, proteinasas, hemolisinas y esterasas de los aislados de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*.

- Medir la supervivencia de las larvas de *Galleria mellonella* infectadas con *Candida albicans* y *Candida tropicalis*.

- Correlacionar los factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* y patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*.

1.4 BASES TEÓRICAS

1.4.1 BASE TEÓRICA

Candida albicans

Candida albicans, un hongo dimórfico del *Phylum Ascomycota*, es un microorganismo común que habita como comensal inofensivo en la flora microbiana del intestino, tracto genitourinario y piel humana. No obstante, bajo condiciones que comprometen la inmunidad del huésped o alteren el equilibrio microbiano, puede actuar como un patógeno oportunista. En tales circunstancias, este hongo puede causar infecciones en la piel, uñas y mucosas, aunque la forma diseminada de la infección es la complicación más grave, asociándose a tasas elevadas de mortalidad (27,28).

A pesar de que la invasión inicial de *Candida albicans* depende de los mecanismos inmunitarios del hospedero, este hongo presenta características intrínsecas que promueven su capacidad para causar infecciones. Entre sus principales factores de virulencia se encuentran las adhesinas, la capacidad de cambiar su morfología, la producción de enzimas hidrolíticas y su capacidad para modular la respuesta inmunitaria del hospedero (29).

Candida tropicalis

C. tropicalis, es un agente fúngico de relevancia como patógeno oportunista que ha ganado importancia en años recientes y también se encuentra en el medio ambiente, principalmente en ambientes marinos tropicales y subtropicales, es especialmente común en regiones de Asia y América Latina, tanto en infecciones superficiales como sistémicas. Estudios filogenéticos sugieren una relación cercana con *Candida albicans*, compartiendo varios rasgos fenotípicos clave, incluyendo la capacidad de formar hifas y biopelículas (30). Actualmente se considera un patógeno fúngico importante ya que se encuentra asociado a una alta tasa de mortalidad, debido a que es responsable de 3-66% de los casos de candidemia. En India, *C. tropicalis* es la

principal razón detrás de la candidemia nosocomial. Los estudios epidemiológicos realizados en el subcontinente indio revelaron que entre el 67% y el 90% de los casos de candidemia nosocomial fueron ocasionados por especies de NAC, siendo C. tropicalis la más prevalente en estos casos (31).

Candidiasis invasiva

La candidiasis invasiva es una enfermedad fúngica de gran relevancia clínica, principalmente causada por *Candida albicans,* aunque otras especies de *Candida no albicans* también juegan un rol significativo. Esta infección oportunista surge, sobre todo, cuando las defensas del huésped están comprometidas, permitiendo que la *Candida*, habitualmente parte de la flora comensal, se torne patógena. Entre sus manifestaciones más graves se encuentran la candidemia y la candidiasis diseminada, con una tasa de mortalidad atribuible de alrededor del 30%. Un factor crucial en su desarrollo es la alteración de la flora normal, comúnmente inducida por el uso prolongado de antibióticos de amplio espectro. Estos agentes antibacterianos suprimen la flora bacteriana comensal, permitiendo el sobrecrecimiento de hongos. La disrupción de las barreras físicas, como la piel y las mucosas, a través de dispositivos intravasculares, heridas quirúrgicas o tratamientos como quimioterapia, también favorece la diseminación sistémica del patógeno. Además, el uso prolongado de catéteres venosos centrales, cirugías abdominales y estancias en unidades de cuidados intensivos figuran entre los principales factores de riesgo. La creciente resistencia a los antifúngicos, particularmente al fluconazol, es una preocupación creciente en ciertas especies de *Candida*. El tratamiento temprano con antifúngicos y la extracción de catéteres, ha demostrado ser clave para reducir la mortalidad. Aunque existen avances en terapias innovadoras, su aplicación requiere una cuidadosa selección de pacientes. Aún persisten varias incógnitas, lo que subraya la importancia de adoptar un enfoque individualizado tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de la candidiasis invasiva (32,33).

Candidemia

La candidemia es la forma clínica más común de candidiasis invasiva, caracterizada por la detección de *Candida spp.* en hemocultivos. Un hemocultivo positivo para *Candida spp.* debe ser investigado minuciosamente, ya que está vinculado a un elevado riesgo de morbilidad y mortalidad. Las fuentes de infección pueden ser endógenas, provenientes de la flora gastrointestinal o de colonización mucocutánea, o exógenas, derivadas de la contaminación por manos del personal de salud o de instrumentos y objetos contaminados. Entre los factores de riesgo se incluyen hospitalización prolongada, la edad avanzada, la presencia de comorbilidades, trasplantes, cirugías gastrointestinales, implantes protésicos y colonización previa por *Candida spp.,* entre otros (34).

Enzimas hidrolíticas

Candida spp. secreta enzimas hidrolíticas, encargadas de facilitar las características comensales y patógenas, debido a que hacen posible la invasión en las superficies de la membrana mucosa y los vasos sanguíneos, además evitan la respuesta inmunitaria del huésped. Las enzimas producidas por el género *Candida spp*. son las proteinasas, fosfolipasas, hemolisinas y esterasas. La proteinasa es una enzima cuya capacidad es degradar diferentes proteínas de la barrera epitelial y mucosa del huésped, como el colágeno, la queratina y la mucina (9), además es responsable de la degradación de anticuerpos, complementos y citocinas. Existen cuatro categorías de proteinasa; la serina proteinasa, aspartil proteinasa, cisteína proteinasa y metaloproteinasa. *Candida spp*. secreta aspartil proteinasa (SAP), conformadas por 10 miembros, sap1-sap10 (9) . El aumento del nivel de expresión de los diversos genes SAP está asociado con el aumento de la virulencia de cándida, y a su vez está relacionado con los síntomas clínicos de la candidiasis (21).

La fosfolipasa es la enzima responsable de la ruptura de la membrana celular por hidrólisis de los enlaces éster en los glicerofosfolípidos, actualmente se encuentran identificados cuatro clases diferentes; A, B, C y D, sin embargo, solo 5 miembros de

la clase B son extracelulares y están relacionados directamente con la patogenicidad, generando la alteración de las membranas del huésped (22).

La hemolisina es la enzima encargada de destruir los glóbulos rojos, dañar la hemoglobina y liberar el hierro. Los elementos inorgánicos como el hierro son fundamentales para la supervivencia del microorganismo patógeno y para el establecimiento del proceso de infección (20).

Galleria mellonella

Galleria mellonella, conocida como la gran polilla de la cera, es un insecto de la familia *Pyralidae*; su ciclo de vida está dividido en huevo, larva, pupa y adulto. En la etapa de larva, está compuesta por una cabeza, un tórax dividido en tres segmentos con seis patas, y un abdomen que cuenta con diez segmentos y ocho propatas; la parte dorsal de la larva es conocida como "nuevo tejido inmune" debido a que en esta área se organiza la respuesta inmunológica. En el interior de la cavidad corporal se encuentra la hemolinfa, que funciona como el sistema circulatorio, y el cuerpo graso, un órgano biosintético comparable al hígado de los mamíferos. Este cuerpo graso alberga el sistema digestivo y la glándula de la seda. En la región ventral se localiza el sistema nervioso, que incluye varios ganglios (35). La inmunidad innata de *Galleria mellonella* se organiza en tres componentes principales: barreras físicas y químicas que protegen al insecto del ambiente externo, y las respuestas humoral y celular. La respuesta celular es llevada a cabo por los hemocitos, que son células sanguíneas de *G. mellonella*, cuyas funciones incluyen el almacenamiento de diversas sustancias y la defensa del organismo mediante mecanismos como la coagulación, fagocitosis, nodulación y melanización. Por otro lado, la respuesta humoral se basa en la secreción de moléculas solubles que actúan frente a los patógenos, incluyendo enzimas líticas como la lisozima, péptidos antimicrobianos y melanina (36).

1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

ATCC (American Type Culture Collection): Institución que mantiene y distribuye cultivos microbianos para fines de investigación y calidad (37).

Candidemia: Manifestación clínica de la candidiasis invasiva. Hemocultivo positivo para *Candida spp* (38).

DC+P (diámetro de la colonia más la zona de precipitación): Medida que combina el tamaño de la colonia con la zona circundante donde se forma un halo por actividad enzimática. En estudios microbiológicos, especialmente al evaluar la producción de enzimas en cepas de *Candida*, esta evaluación proporciona una visión completa de la actividad enzimática de la muestra, reflejando su influencia en el entorno (39)

Enzimas extracelulares: Enzimas que poseen la capacidad de degradar polímeros, lo que facilita el acceso a nutrientes esenciales para el crecimiento del microorganismo, además de inactivar moléculas involucradas en los mecanismos de defensa del huésped (40)

Factores de virulencia: Habilidades de agentes patógenos para producir invasión y resistencia a las defensas del huésped (41).

***Galleria mellonella*:** Es un organismo modelo alternativo utilizado en la investigación biomédica. Gracias a su sistema inmunológico primitivo pero similar al de mamíferos superiores, se emplea para estudiar la interacción entre patógenos humanos y el sistema inmunológico. Además, esta larva es útil para investigar la virulencia de patógenos bacterianos y fúngicos, así como para probar la eficacia de compuestos antimicrobianos y vacunas, debido a su manejo fácil, bajo costo y eficacia experimental (42)

Patogenicidad: Habilidad de un patógeno para inducir enfermedad en un huésped vulnerable (43).

Pz (Índice de actividad enzimática): El índice de actividad enzimática compara el tamaño de la colonia de una muestra con una cepa de referencia, brindando una medida relativa de su actividad enzimática. Es esencial para comprender el potencial patogénico de microorganismos como *Candida albicans* y *Candida tropicalis* (39).

1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Las cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* aisladas de micosis invasivas que presentan actividad enzimática se correlaciona significativamente con la patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*.

CAPÍTULO II

MÉTODOS

2.1 DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Correlacional (44). El estudio se clasifica como correlacional dado que su objetivo fundamental es determinar y examinar la relación entre dos grupos de variables: los factores de virulencia enzimáticos de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* y su patogenicidad en un modelo in vivo que corresponde a *Galleria mellonella*.

2.1.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Estudio observacional; analítico, transversal y prospectivo (44,45). El presente estudio es observacional, puesto que se recogió datos sin manipular las variables; en este caso, se registró la producción de enzimas y la supervivencia de las larvas. Además, es analítico, porque se evaluó la relación entre variables específicos, particularmente entre los factores de virulencia enzimáticos y la patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*. Asimismo, es transversal, ya que se recogieron datos en un momento específico, para evaluar la situación actual de la asociación de las variables. Por último, es prospectivo, ya que se planificó la recogida de datos hacia adelante, observando cómo evolucionan la producción de enzimas y la supervivencia de las larvas durante la investigación.

2.1.3 POBLACIÓN

La población está constituida por 30 cepas de *Candida* aisladas de candidiasis invasiva pertenecientes al cepario de la Sección de Micología del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2.1.4 MUESTRA Y MUESTREO

Se utilizó todas las cepas disponibles para el análisis de datos. Por consiguiente, dado que la muestra coincide con la población total, no se efectuó un proceso de muestreo.

2.1.4.1 CRITERIO DE INCLUSIÓN

- Cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* aisladas de candidiasis invasiva pertenecientes al cepario de la Sección de Micología del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2.1.4.2 CRITERIO DE EXCLUSIÓN

- Cepas no viables, las cuales no exhibieron un crecimiento óptimo al ser reactivadas tras el proceso de congelación.

2.1.5 VARIABLES

Las variables factores de virulencia enzimáticos y patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella* se encuentran definidas en el Anexo N°1.

2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se utilizaron cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* aisladas de micosis invasivas (conservadas a -70°C) del cepario de la Sección de Micología del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión, junto con larvas de *Galleria mellonella* obtenidas del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA).

2.1.7 PROCEDIMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Los procedimientos para el ensayo de sobrevida y la determinación de los factores de virulencia enzimáticos, con su respectivo análisis de datos se presentan a continuación.

Patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella* (ensayo de sobrevida)

Material biológico

- *Candida:* Se trabajó con 15 cepas de *Candida albicans* y 15 cepas de *Candida tropicalis;* que pertenecen al cepario de la Sección de Micología del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

  Cada cepa se mantuvo a -70 °C, por lo que fueron resembrados en Agar Dextrosa Sabouraud e incubados por 48 horas a 27°C.

  Listado de cepas de trabajo:

ESPECIE	CEPA
C. albicans	6529
C. albicans	7790
C. albicans	5880
C. albicans	2580
C. albicans	5628
C. albicans	4053
C. albicans	3399
C. albicans	5627
C. albicans	6606
C. albicans	2777
C. albicans	4267
C. albicans	4880
C. albicans	6548
C. albicans	6579
C. albicans	5948

ESPECIE	CEPA
C. tropicalis	7431
C. tropicalis	6814
C. tropicalis	6048
C. tropicalis	4325
C. tropicalis	7288
C. tropicalis	1460
C. tropicalis	1381
C. tropicalis	555
C. tropicalis	2265
C. tropicalis	7107
C. tropicalis	7217
C. tropicalis	3733
C. tropicalis	7080
C. tropicalis	2735
C. tropicalis	4082

- Larvas de *Galleria mellonella*: Estas larvas fueron obtenidos en colaboración con el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), ubicado en Av. Alfonso Ugarte, calle Los Diamantes, Urb. Los topacios, Nuevo Vitarte. Se seleccionaron 320 larvas del sexto estadio larval, asegurándose de que no presentaran coloración en la cutícula.

Procedimiento

Para el ensayo de patogenicidad, se utilizó el protocolo de Mroczyńska et al (21), donde se estableció dos grupos de control independientes de los grupos inoculados con *C. albicans* y *C. tropicalis*: un Control Absoluto, compuesto por 10 larvas que no recibieron ninguna inoculación, y un Control de Inoculación, en el cual 10 larvas fueron inoculadas con 10uL de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Ambos grupos fueron mantenidos en placas Petri a 37°C.

Se prepararon suspensiones de $5x10^7$ células/ml de las cepas de *Candida* estudiadas, en PBS 1X para su estudio. El conteo de células se llevó a cabo en cinco de los veinticinco cuadrados del área central de la cámara de Neubauer. La cuantificación se estandarizó aplicando la siguiente la fórmula: Recuento = (N° total de células contadas en 5 cuadrados * factor dilución) /0.02 mm^3. El factor de dilución aplicado fue de 200 y se realizó la conversión de unidades de mm^3 a ml. La ecuación se simplificó para contar 5 levaduras en 5 cuadrados, lo que resultó en un recuento de $5x10^7$ células/ml. Se inocularon 10 larvas con 10uL cuya concentración final fue de $5x10^5$ células de levadura/larva, la zona de inoculación fue en la última pro-pata izquierda, empleando jeringas de insulina 50U y calibre 29G. Tras la inoculación, las larvas fueron incubadas a 37°C en placas Petri, que se sellaron con papel aluminio para evitar la deshidratación. El seguimiento de las larvas se realizó cada 24 horas durante 7 días, registrando diariamente el número de larvas muertas por cepa en una ficha de resultados (21).
Para evaluar la mortalidad, las larvas fueron estimuladas suavemente con pinzas; la ausencia de respuesta al estímulo mecánico indicó la muerte. Las larvas fallecidas fueron retiradas de las placas Petri diariamente para evitar confusiones en los registros.

Análisis de Patogenicidad

Los datos de supervivencia se analizaron utilizando el método Kaplan-Meir para la construcción de curvas de mortalidad. Las diferencias en la patogenicidad entre cepas se evaluaron mediante la prueba de Log-rank (21). Se realizaron dos análisis de supervivencia: el primero comparó las cepas dentro de cada especie (intraespecie), y el segundo analizó las diferencias entre *C.albicans* y *C. tropicalis* (interespecie).

Determinación de producción de factores de virulencia enzimáticos

Para la evaluación de los factores de virulencia enzimáticos de las cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, se realizaron ensayos específicos para la detección de cuatro enzimas clave: fosfolipasa, proteinasa, hemolisina y esterasas. A continuación, se describe el procedimiento seguido para cada ensayo enzimático.

Ensayo de Fosfolipasa

El protocolo para determinar la actividad enzimática de fosfolipasa se basó en el procedimiento de Price M. et al (46).

Procedimiento

1. Se preparó el medio Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) suplementado con cloruro de Calcio (CaCl2) y cloruro de Sodio (NaCl), al cual se añadió sobrenadante de yema de huevo centrifugada para inducir la actividad fosfolipasa. El pH del medio se ajustó a 6.3.
2. Las cepas de *Candida* se reactivaron en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) incubadas durante 48 horas a 27°C.
3. Se preparó una suspensión de *Candida* en PBS, la densidad se ajustó al estándar de McFarland 0.5 (1-5 x 10^6 UFC/mL de células de levadura).
4. Se aplicaron dos inóculos de 10 uL de cada suspensión, distribuidos de manera equidistante sobre las placas preparadas.
5. Las placas se incubaron a 37°C durante 5 días.
6. Las cepas de *C. albicans* ATCC 90028 y *C.parapsilosis* ATCC 22019 se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

Lectura:

Se registró el diámetro de la colonia (DC) y el diámetro de la zona de precipitación (DC+P) circundante a la colonia. La actividad de la fosfolipasa (Pz) se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$Pz = \frac{\mathrm{DC}}{\mathrm{DC} + \mathrm{P}}$$

Ensayo de Proteinasa

El protocolo para determinar la actividad enzimática de proteinasa se basó en el procedimiento de Braga A. et al (47).

Procedimiento

1. Se preparó el medio Agar YNB con agar al 2%, glucosa al 0.5% y caseína al 0.5%, ajustando el pH a 7 con NaOH 1M.
2. Las cepas de *Candida* se reactivaron en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) incubadas durante 48 horas a 27°C.
3. Se preparó una suspensión de *Candida* en PBS, la densidad se ajustó al estándar de McFarland 0.5 (1-5 x 10^6 UFC/mL de células de levadura).
4. Se aplicaron dos inóculos de 10 uL de cada suspensión, distribuidos de manera equidistante sobre las placas preparadas.
5. Las placas se incubaron a 37°C durante 5 días.
6. Las cepas de *C. albicans* ATCC 90028 y *C. glabrata* ATCC 22019 se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

Lectura:

Al finalizar el tiempo de incubación, las placas se lavaron con agua destilada y se agregó HCl 1N durante 1 hora antes de la lectura. Cumplido el tiempo se registró el diámetro de la colonia (DC) y el diámetro de la zona de precipitación (DC+P) circundante a la colonia. La actividad de la proteinasa (PRz) se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$PRz = \frac{\mathrm{DC}}{\mathrm{DC} + \mathrm{P}}$$

Ensayo de Esterasa

El protocolo para determinar la actividad enzimática de esterasa se basó en el procedimiento de Slifkin M. (48).

Procedimiento

1. Se preparó el medio compuesto por agar, peptona, NaCl, CaCl2, y Tween 80 autoclavado.
1. Las cepas de *Candida* se reactivaron en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) incubadas durante 48 horas a 27°C.
2. Se preparó una suspensión de *Candida* en PBS, la densidad se ajustó al estándar de McFarland 0.5 (1-5 x 10^6 UFC/mL de células de levadura).
3. Se aplicaron dos inóculos de 10 uL de cada suspensión, distribuidos de manera equidistante sobre las placas preparadas.
4. Las placas se incubaron a 37°C durante 3 días.
5. Las cepas de *C. albicans* ATCC 90028 y *C. glabrata* ATCC 90030 se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

Lectura:

Se registró el diámetro de la colonia (DC) y el diámetro de la zona de precipitación (DC+P) circundante a la colonia. La actividad de la esterasa (Ez) se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$Ez = \frac{\mathrm{DC}}{\mathrm{DC} + \mathrm{P}}$$

Ensayo de Hemolisina

El protocolo para determinar la actividad enzimática de hemolisina se basó en el procedimiento de Manns J. et al (49).

Procedimiento

1. Se preparó el medio compuesto por Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) suplementado con glucosa al 3% y sangre fresca de carnero, ajustando el pH a 5.6 ± 0.2.
2. Las cepas de *Candida* se reactivaron en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) incubadas durante 48 horas a 27°C.
3. Se preparó una suspensión de *Candida* en PBS, la densidad se ajustó al estándar de McFarland 0.5 (1-5 x 10^6 UFC/mL de células de levadura).
4. Se aplicaron dos inóculos de 10 uL de cada suspensión, distribuidos de manera equidistante sobre las placas preparadas.
5. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO2 durante 2 días.
6. Las cepas de *C. albicans* ATCC 90028 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

Lectura:

Se registró el diámetro de la colonia (DC) y el diámetro de la zona de precipitación (DC+P) circundante a la colonia. La actividad de la hemolisina (Hz) se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$Hz = \frac{\mathrm{DC}}{\mathrm{DC} + \mathrm{P}}$$

Análisis de datos

La producción de factores de virulencia enzimáticos se determinó mediante su actividad enzimática. El cálculo se basó en la división del diámetro de la colonia (DC) entre el diámetro de la colonia más la zona de precipitación (DC + ZP). La actividad enzimática se clasificó de la siguiente manera: =1 (Actividad negativa), > 0.63 y ≤ 0.99 (Actividad débil) y ≤ 0.63 (Actividad fuerte) (21).

Correlación entre factores de virulencia enzimáticos y patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*

Para medir la correlación entre los factores de virulencia enzimáticos de *C. albicans* y *C. tropicalis* y la patogenicidad en larvas de *G. mellonella* se utilizó la prueba de correlación Spearman. Para el análisis los datos serán importados al programa estadístico STATA 16.0.

2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Dado que la presente investigación se realizó utilizando larvas de *Galleria mellonella,* un modelo invertebrado ampliamente aceptado en estudios de patogenicidad, no se requirió la aprobación de un comité de ética, ya que estos organismos no están sujetos a las normativas éticas aplicables a vertebrados.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Patogenicidad de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* en larvas de *Galleria mellonella*

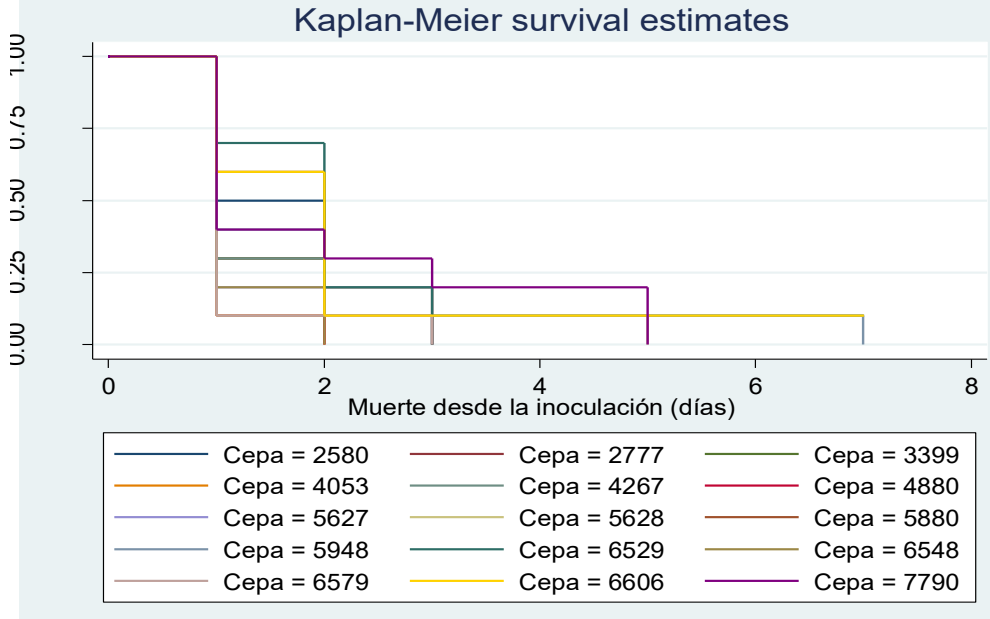
Se realizaron dos análisis de supervivencia, el primer análisis comprendió una evaluación intraespecie y el segundo análisis, una evaluación interespecie.

Primer análisis: Evaluación Intraespecie

Candida albicans

En este análisis se evaluaron 15 cepas de *Candida albicans.* La media de sobrevida de las larvas fue de 1.6 días. De las 150 larvas inoculadas, 148 murieron. Las dos larvas sobrevivientes fueron inoculadas con las cepas 3399 y 6606. La supervivencia de ambas larvas, así como las curvas de mortalidad producidas por las diferentes cepas de *Candida albicans* se observan en la figura N°1.

Figura N° 1: Curvas de mortalidad de los ensayos de supervivencia de *Galleria mellonella* infectados con cepas de *Candida albicans.*



Fuente: Elaboración propia

Para proporcionar una visión más detallada del comportamiento de cada cepa, se presenta la tabla N°1, donde se muestra el porcentaje de mortalidad diaria de las larvas infectadas. Se observó que 20% (3 de 15 cepas) alcanzaron el 100% de mortalidad en el día 2, 47% (7 de 15 cepas) en el día 3, 13% (2 de 15 cepas) en el día 5 y 7% (1 de 15 cepas) en el día 7.

Tabla N°1 Porcentaje de mortalidad de las larvas de *Galleria mellonella* inoculadas con diferentes cepas de *Candida albicans* a lo largo de los primeros siete días después de la inoculación.

ESPECIE	CEPA	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7
C. albicans	2777	70%	90%	100%	-	-	-	-
C. albicans	4267	70%	90%	100%	-	-	-	-
C. albicans	4880	90%	100%	-	-	-	-	-
C. albicans	6548	80%	100%	-	-	-	-	-
C. albicans	4053	90%	100%	-	-	-	-	-
C. albicans	5627	80%	90%	100%	-	-	-	-
C. albicans	2580	50%	90%	100%	-	-	-	-
C. albicans	7790	60%	70%	80%	-	100%	-	-
C. albicans	5880	40%	80%	100%	-	-	-	-
C. albicans	5628	90%	-	-	-	100%	-	-
C. albicans	6529	30%	80%	100%	-	-	-	-
C. albicans	6579	90%	-	100%	-	-	-	-
C. albicans	5948	60%	80%	90%	-	-	-	100%
C. albicans	3399	70%	90%	-	-	-	-	-
C. albicans	6606	40%	90%	-	-	-	-	-

Fuente: elaboración propia.

El análisis de las funciones de supervivencia de las larvas infectadas con 15 cepas diferentes de *Candida albicans* mediante la prueba de *Log-rank* reveló un P-valor de 0.18, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las cepas, tal como se muestra en la tabla N°2. Este resultado sugiere que las cepas de *C. albicans* presentan una sobrevida homogénea en las larvas.

Tabla N°2: Prueba de log-rank para la evaluación de funciones de supervivencia entre cepas de *Candida albicans.*

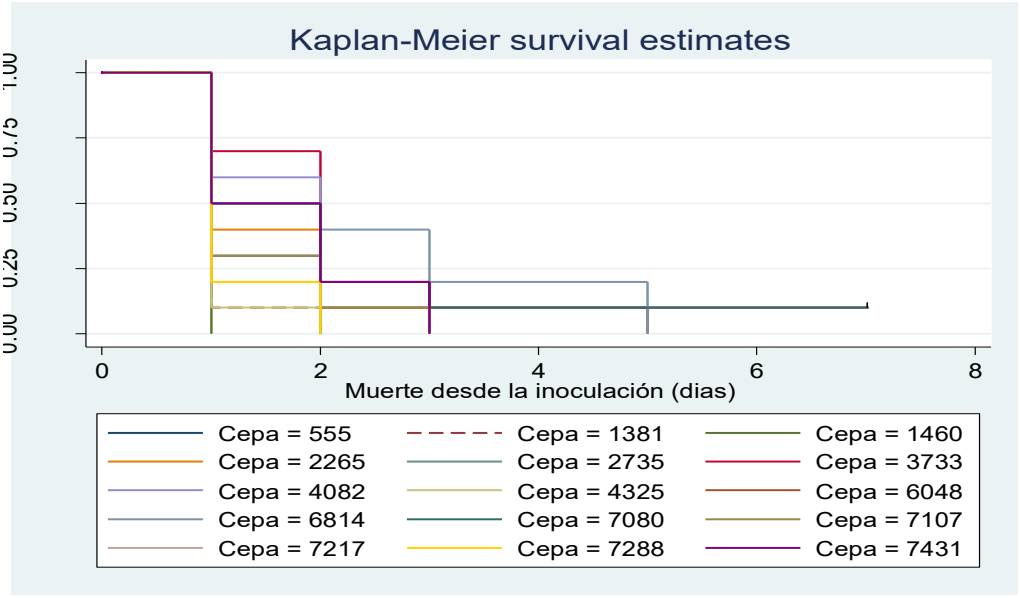
CEPA	Events observed	Events expected
2580	10	10.65
2777	10	9.34
3399	9	10.17
4053	10	7.39
4267	10	9.34
4880	10	7.39
5627	10	8.69
5628	10	8.53
5880	10	11.95
5948	10	11.47
6529	10	12.60
6548	10	8.04
6579	10	8.03
6606	9	12.13
7790	10	12.29
Total	148	148.00
	chi2(14) =	18.53
	Pr>chi2 =	0.18

Fuente: Elaboración propia.

Candida tropicalis

En este análisis se evaluaron 15 cepas de *Candida tropicalis.* La media de sobrevida de las larvas fue de 1.6 días. De las 150 larvas inoculadas, 146 murieron. Las 4 larvas sobrevivientes fueron inoculadas con las cepas 3733, 7080, 2735 y 4082. La supervivencia de las 4 larvas, así como las curvas de mortalidad producidas por las diferentes cepas de *Candida tropicalis* se observan en la figura N°2.

Figura N°2: Curvas de mortalidad de los ensayos de supervivencia de *Galleria mellonella* infectados con cepas de *Candida tropicalis.*



Fuente: Elaboración propia.

Para proporcionar una visión más detallada del comportamiento de cada cepa, se presenta la tabla N°3, donde se muestra el porcentaje de mortalidad diaria de las larvas infectadas. Se observó que 7% (1 de 15 cepas) alcanzó el 100% de mortalidad en el día 1 después de la inoculación, 33% (5 de 15 cepas) en el día 2, 20% (3 de 15 cepas) en el día 3 y 13% (2 de 15 cepas) en el día 5.

Tabla N°3: Porcentaje de mortalidad de las larvas de *Galleria mellonella* inoculadas con diferentes cepas de *Candida tropicalis* a lo largo de los primeros siete días después de la inoculación.

ESPECIE	CEPA	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7
C. tropicalis	7431	50%	80%	100%	-	-	-	-
C. tropicalis	6814	50%	60%	80%	-	100%	-	-
C. tropicalis	6048	50%	90%	-	-	100%	-	-
C. tropicalis	4325	90%	-	100%	-	-	-	-
C. tropicalis	7288	80%	100%	-	-	-	-	-
C. tropicalis	1460	100%	-	-	-	-	-	-
C. tropicalis	1381	90%	100%	-	-	-	-	-
C. tropicalis	555	70%	100%	-	-	-	-	-
C. tropicalis	2265	60%	100%	-	-	-	-	-
C. tropicalis	7107	70%	90%	100%	-	-	-	-
C. tropicalis	7217	80%	100%	-	-	-	-	-
C. tropicalis	3733	30%	80%	90%	-	-	-	-
C. tropicalis	7080	50%	80%	90%	-	-	-	-
C. tropicalis	2735	70%	90%	-	-	-	-	-
C. tropicalis	4082	40%	90%	-	-	-	-	-

Fuente: elaboración propia.

El análisis de las funciones de supervivencia de las larvas infectadas con 15 cepas diferentes de *Candida tropicalis,* mediante la prueba de *Log-rank* reveló un P-valor de 0.02, lo que indica diferencias estadísticamente significativas entre las cepas, tal como se muestra en la tabla N°4. Este resultado sugiere que las cepas de *C. tropicalis* presentan una sobrevida heterogénea en las larvas.

Tabla N°4: Prueba de log-rank para la evaluación de funciones de supervivencia entre cepas de *Candida tropicalis.*

CEPA	Events observed	Events expected
555	10	8.67
1381	10	7.24
1460	10	6.53
2265	10	9.38
2735	9	9.63
3733	9	13.01
4082	9	11.76
4325	10	7.78
6048	10	11.05
6814	10	13.08
7080	9	11.59
7107	10	9.20
7217	10	7.96
7288	10	7.96
7431	10	11.16
Total	146	146.00
	chi2(14) =	26.85
	Pr>chi2 =	0.02

Fuente: Elaboración propia.

Segundo análisis: Evaluación Interespecie

En este análisis se muestran las curvas de sobrevida de los grupos control y de las especies *Candida albicans* y *Candida tropicalis* en la figura N°3. Las 10 larvas del control Absoluto y las 10 larvas del control de inoculación se mantuvieron vivas durante los 7 días del estudio (sobrevida del 100%). Se evaluaron 15 cepas por cada especie y se inocularon 10 larvas por cada cepa. De las 300 larvas inoculadas, 6 sobrevivieron y 294 murieron. El análisis de las funciones de supervivencia de las larvas infectadas con *Candida albicans y* las larvas infectadas con *Candida tropicalis* mediante la prueba de *Log-rank* reveló un P-valor de 0.73, indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las funciones de supervivencia de las

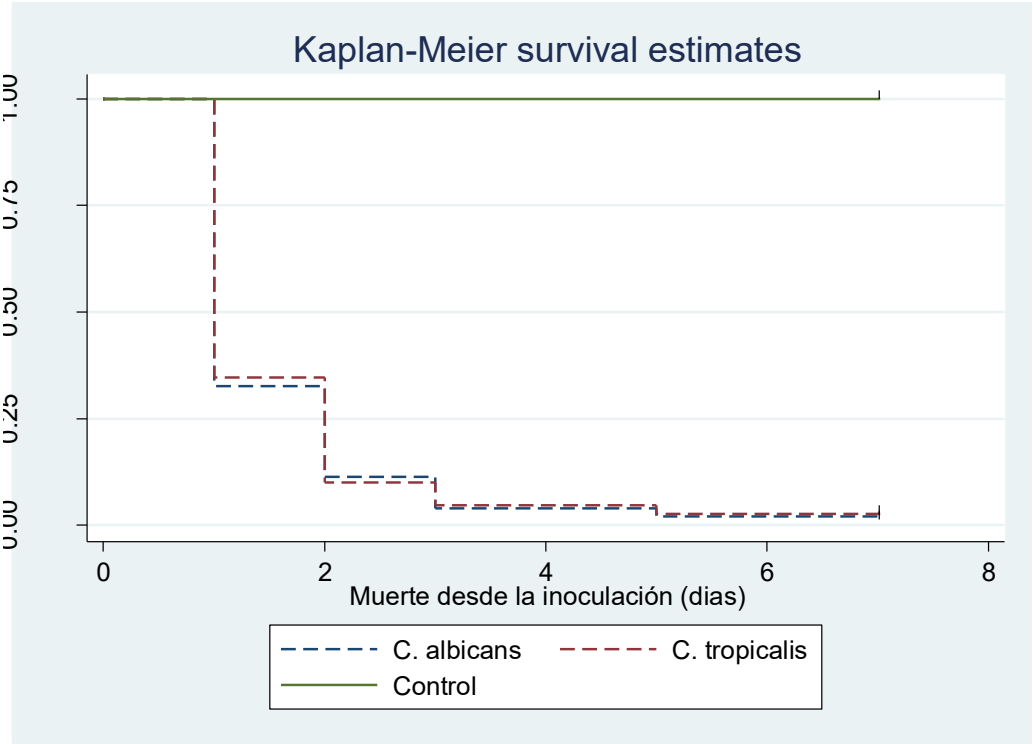
larvas infectadas con *C. albicans* en comparación con aquellas infectadas con *C. tropicalis*, tal como se muestra en la tabla N°5. Esto sugiere que ambas especies tienen una capacidad similar para infectar y matar a las larvas de *Galleria mellonella.* Sin embargo, al examinar los patrones de mortalidad diaria, se observó que la mayoría de las cepas de *C. tropicalis* alcanzaron el 100% de mortalidad en los primeros tres días después de la inoculación, mientras que *C. albicans* presentaron un comportamiento más variable, la mayoría de las cepas alcanzaron la mortalidad máxima entre los días 2 y 3, y una minoría prolongó la mortalidad hasta los días 5 y 7. Esto refleja una tendencia hacia una mayor rapidez en la mortalidad causada por C. tropicalis en comparación con C. albicans, aunque esta diferencia no se traduce en una significancia estadística en el análisis general.

Tabla N°5: Prueba de log-rank para la evaluación de funciones de supervivencia entre especies de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*.

ESPECIE	Events observed	Events expected
C. albicans	148	146.27
C. tropicalis	146	147.73
Total	294	294.00
	chi2(1) =	0.12
	Pr>chi2 =	0.73

Fuente: elaboración propia

Figura N°3: Curvas de mortalidad de los ensayos de supervivencia de *Galleria mellonella* infectados con cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis.*



Fuente: Elaboración propia

Producción de factores de virulencia enzimáticos

Fosfolipasa

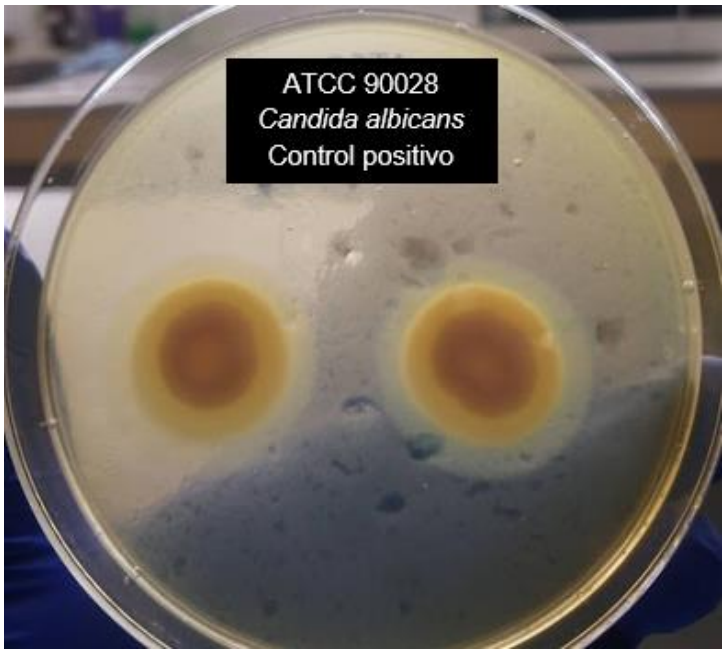
De las 30 cepas de *Candida spp*. analizadas, se observó actividad de fosfolipasa (Figura N°4) en 14 cepas, que representa el 47% del total. En contraste, se observó que 16 no mostraron actividad de fosfolipasa. De las cepas que presentaron actividad enzimática, 12 presentaron actividad débil y 2 presentaron actividad fuerte, tal como lo muestra la tabla N°6.

Tabla N° 6: Actividad enzimática de Fosfolipasa.

Fosfolipasa	Freq.	Percent
negativo	16	53%
débil	12	40%
fuerte	2	7%
Total	30	100%

Fuente: Elaboración propia.

Figura N° 4: Fotografía del crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 (control positivo) en el medio de yema de huevo.



Fuente: Elaboración propia.

Esterasa

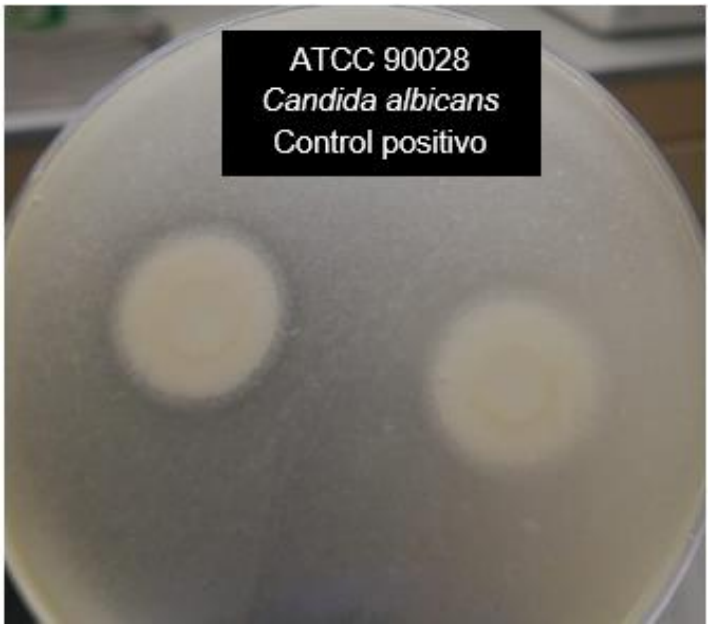
De las 30 cepas de *Candida spp*. analizadas, se observó actividad de esterasa (figura N°5) en 29 cepas, que representa el 97% del total. En contraste se observó que solo 1 no presentó actividad de esterasa. De los que presentaron actividad enzimática, 10 presentaron actividad débil y 19 presentaron actividad fuerte, tal como lo muestra la tabla N°7.

Tabla N° 7: Actividad enzimática de Esterasa.

Esterasa	Freq.	Percent
negativo	1	3%
débil	10	33%
fuerte	19	64%
Total	30	100%

Fuente: Elaboración propia

Figura N° 5: Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 (control positivo) en el medio de Tween 80.



Fuente: Elaboración propia

Hemolisina

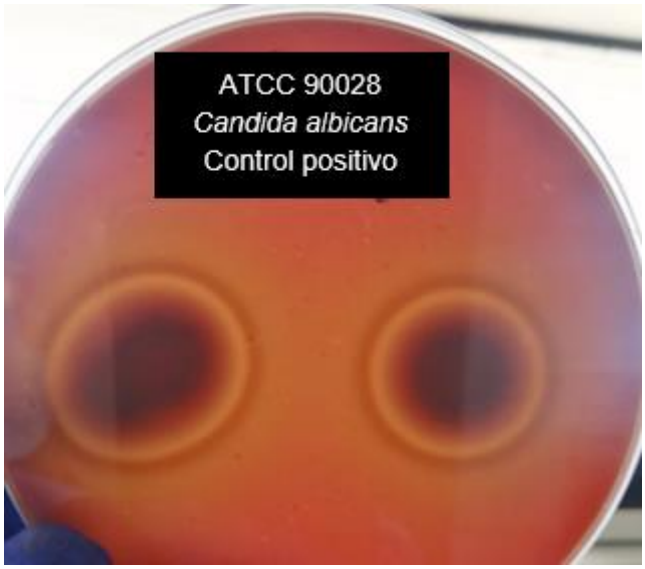
De las 30 cepas de *Candida spp*. analizadas, se observó actividad de hemolisina (figura N°6) en 28 cepas, que representa el 93% del total. En contraste se observó que solo 2 no presentaron actividad de hemolisina. De los que presentaron actividad enzimática, el 100% presentaron actividad fuerte, como se muestra en la tabla N°8.

Tabla N°8: Actividad enzimática de Hemolisina.

Hemolisina	Freq.	Percent
negativo	2	7%
fuerte	28	93%
Total	30	100%

Fuente: Elaboración propia

Figura N°6: Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 (Control positivo) en el medio de sangre de carnero.



Fuente: Elaboración propia

Proteinasa

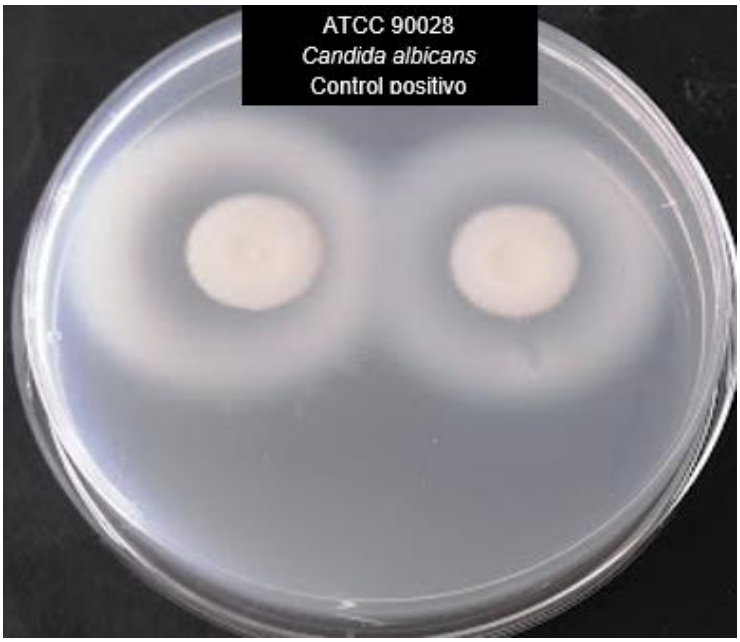
De las 30 cepas de *Candida spp*. analizadas, se observó actividad de proteinasa (figura N°7) en 20 cepas, que representa el 67% del total. En contraste se observó que 10 no presentaron actividad de proteinasa. De los que presentaron actividad enzimática, 13 presentaron actividad débil y 7 presentaron actividad fuerte, como se muestra en la tabla N°9.

Tabla N°9: Actividad enzimática de Proteinasa.

Proteinasa	Freq.	Percent
negativo	10	33%
débil	13	43%
fuerte	7	24%
Total	30	100%

Fuente: Elaboración propia

Figura N°7: Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 (control positivo) en el medio de Caseína.



Fuente: Elaboración propia.

Producción de Factores de virulencia por especies

Fosfolipasa

En este análisis se buscó diferencias entre la producción de fosfolipasa en *Candida albicans y* la producción de fosfolipasa en *Candida tropicalis.* De las 15 cepas de *Candida albicans* analizadas, se observó actividad de fosfolipasa en 11. De las cepas que presentaron actividad enzimática, 9 presentaron actividad débil y 2 presentaron

actividad fuerte. En contraste, de las 15 cepas de *Candida tropicalis,* solo 3 presentaron actividad enzimática. De las cepas que presentaron actividad de fosfolipasa, el 100% mostraron actividad débil. La prueba exacta de Fisher mostró un p-valor igual a 0.01. Por lo tanto, la diferencia entre la producción de fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* en comparación con la producción de fosfolipasa en cepas de *Candida tropicalis* es estadísticamente significativa; como se muestra en la tabla N°10.

Tabla N°10: Actividad enzimática de fosfolipasa en *Candida albicans* y *Candida tropicalis*.

	Fosfolipasa			
Especie	negativo	débil	fuerte	Total
C. albicans	4 27%	9 60%	2 13%	15 100%
C. tropicalis	12 80%	3 20%	0 0%	15 100%
Total	16 53%	12 40%	2 7%	30 100%

Fisher's exact = 0.01

Fuente: Elaboración propia

Esterasa

En este análisis se buscó diferencias entre la producción de esterasa en *Candida albicans y* la producción de esterasa en *Candida tropicalis.* De las 15 cepas de *Candida albicans* analizadas, se observó actividad de esterasa en el 100% de las cepas. De estas, 6 presentaron actividad débil y 9 presentaron actividad fuerte. De las 15 cepas de *Candida tropicalis,* 14 presentaron actividad enzimática. De las cepas que presentaron actividad de esterasa, 4 mostraron actividad débil y 10 actividad fuerte. La prueba exacta de Fisher mostró un p-valor igual a 0.70. Por lo tanto, la diferencia entre la producción de esterasa en cepas de *Candida albicans* en comparación con la

producción de esterasa en cepas de *Candida tropicalis* no es estadísticamente significativa; como se muestra en la tabla N°11.

Tabla N°11: Actividad enzimática de esterasa en *Candida albicans* y *Candida tropicalis*

	Esterasa			
Especie	negativo	débil	fuerte	Total
C. albicans	0	6	9	15
	0%	40%	60%	100%
C. tropicalis	1	4	10	15
	7%	26%	67%	100%
Total	1	10	19	30
	3%	33%	63%	100%

Fisher's exact = 0.70

Fuente: Elaboración propia

Hemolisina

En este análisis se buscó diferencias entre la producción de hemolisina en *Candida albicans y* la producción de hemolisina en *Candida tropicalis.* De las 15 cepas de *Candida albicans* analizadas, se observó actividad de hemolisina en 13 cepas, y todas presentaron actividad fuerte. De las 15 cepas de *Candida tropicalis,* el 100% presentaron actividad enzimática fuerte. La prueba exacta de Fisher mostró un p-valor igual a 0.24. Por lo tanto, la diferencia entre la producción de hemolisina en cepas de *Candida albicans* en comparación con la producción de hemolisina en cepas de *Candida tropicalis* no es estadísticamente significativa; como se muestra en la tabla N°12.

Tabla N°12: Actividad enzimática de hemolisina en *Candida albicans* y *Candida tropicalis*.

	Hemolisina		
Especie	negativo	fuerte	Total
C. albicans	2	13	15
	13%	87%	100%
C. tropicalis	0	15	15
	0%	100%	100%
Total	2	28	30
	7%	93%	100%

Fisher's exact = 0.48
1-sided Fisher's exact = 0.24

Fuente: Elaboración propia

Proteinasa

En este análisis se buscó diferencias entre la producción de proteinasa en *Candida albicans y* la producción de proteinasa en *Candida tropicalis.* De las 15 cepas de *Candida albicans* analizadas, se observó actividad de proteinasa en 10 de las cepas. De estas, 4 presentaron actividad débil y 6 actividad fuerte. De las 15 cepas de *Candida tropicalis,* 10 presentaron actividad de proteinasa, de estas, 9 presentaron actividad débil y 1 actividad fuerte. La prueba exacta de Fisher mostró un p-valor igual a 0.09. Por lo tanto, la diferencia entre la producción de proteinasa en cepas de *Candida albicans* en comparación con la producción de proteinasa en cepas de *Candida tropicalis* no es estadísticamente significativa; como se muestra en la tabla N°13.

Tabla N°13: Actividad enzimática de proteinasa en *Candida albicans* y *Candida tropicalis.*

	Proteinasa			
Especie	negativo	débil	fuerte	Total
C. albicans	5	4	6	15
	33%	27%	40%	100%
C. tropicalis	5	9	1	15
	33%	60%	7%	100%
Total	10	13	7	30
	33%	43%	24%	100%

Fisher's exact = 0.09

Fuente: Elaboración propia

Correlación entre factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida albicans* y su patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*

En las cepas de *Candida albicans* analizadas, no se observó una correlación significativa entre los factores de virulencia enzimáticos y la patogenicidad medida por la mortalidad de las larvas de *Galleria mellonella.* La actividad de fosfolipasa presentó un coeficiente de correlación de Spearman rho = 0.06, con un p-valor de 0.84, lo que indica una correlación muy baja y no significativa. La actividad de la esterasa tuvo un coeficiente de correlación de rho = 0.18, con un p-valor de 0.53, lo cual sugiere una correlación positiva moderada, pero sin significancia estadística. La actividad de la hemolisina mostró una correlación negativa débil rho = -0.07, con un p-valor de 0.81, igualmente no significativa. La actividad de la proteinasa tuvo una correlación débilmente negativa rho = -0.03, con un p-valor de 0.91, también sin significancia estadística. Estos resultados se observan en la tabla N°14.

Tabla N°14: Correlación entre la Patogenicidad y los factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida albicans.*

		Patogenicidad	Pz	Ez	Hz	PRz
Patogenicidad		1.00				
Pz	rho	0.06	1.00			
	p-valor	0.84				
Ez	rho	0.18	0.29	1.00		
	p-valor	0.53	0.30			
Hz	rho	-0.07	0.57	0.48	1.00	
	p-valor	0.81	0.03	0.07		
PRz	rho	-0.03	0.04	0.05	0.48	1.00
	p-valor	0.91	0.89	0.86	0.07	

Pz: actividad de fosfolipasa, Ez: actividad de esterasa, Hz: actividad de hemolisina, PRz: actividad de proteinasa. Rho: coeficiente de correlación de Spearman
Fuente: Elaboración propia

Para complementar los resultados de la correlación, se presenta la tabla N°16, en el que se visualiza el comportamiento de las cepas de *Candida albicans* en términos de mortalidad de las larvas en los primeros cinco días después de la inoculación y su actividad enzimática para fosfolipasas (Pz), esterasas (Ez), hemolisinas (Hz) y proteinasas (PRz) y el tiempo medio de sobrevida de las larvas inoculadas.

Tabla N°15: Comparación de la actividad enzimática de las cepas de *Candida albicans* con la mortalidad de las larvas en los primeros cinco días tras la inoculación y el tiempo medio de sobrevida.

ESPECIE	CEPA	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	Pz	Ez	Hz	PRz	Tiempo medio sobrevida (días)
C. albicans	2777	70%	90%	100%		1	0.68	0.45	0.61	1.4
C. albicans	4267	70%	90%	100%		1	0.64	1	1	1.4
C. albicans	4880	90%	100%			0.66	0.67	0.46	0.59	1.1
C. albicans	6548	80%	100%			0.79	0.66	0.44	0.62	1.2
C. albicans	4053	90%	100%			0.77	0.49	0.54	0.65	1.1
C. albicans	5627	80%	90%	100%		0.55	0.63	0.46	0.79	1.3
C. albicans	2580	50%	90%	100%		0.83	0.61	0.43	1	1.6
C. albicans	7790	60%	70%	80%	100%	0.84	0.63	0.43	0.79	2.1
C. albicans	5880	40%	80%	100%		1	0.74	1	1	1.8
C. albicans	5628	90%			100%	1	0.57	0.38	0.81	1.4
C. albicans	6529	30%	80%	100%		0.69	0.57	0.46	0.57	1.9
C. albicans	6579	90%		100%		0.81	0.61	0.39	1	1.2
C. albicans	5948*	60%	80%	90%		0.62	0.67	0.48	1	2
C. albicans	3399	70%	90%			0.81	0.63	0.45	0.54	1.8
C. albicans	6606	40%	90%			0.68	0.62	0.47	0.58	2.1

Pz: índice de actividad fosfolipasa, Ez: índice de actividad esterasa, Hz: índice de actividad hemolítica, PRz: índice de proteinasa. El color rojo indica actividad alta (≤ 0.63), el color verde indica actividad débil (0.63< valor ≤0.99) y el color gris indica la ausencia de actividad (valor = 1).
* única cepa de *Candida albicans* que alcanzó el 100% de mortalidad en el día 7.

Correlación entre factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida tropicalis* y su patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*

En las cepas de *Candida tropicalis,* tampoco se observaron correlaciones significativas entre la actividad de los factores de virulencia y la patogenicidad. La actividad de la fosfolipasa mostró una correlación negativa rho = -0.25, con un p-valor de 0.36, sin significancia estadística. La actividad de la esterasa presentó una correlación negativa rho = -0.30, con un p-valor de 0.28, sin llegar a ser significativa. No se pudo calcular la correlación para la actividad de la hemolisina debido a la falta de variabilidad en los datos. La actividad de la proteinasa presentó una correlación negativa rho = -0.30, con un p-valor de 0.27, tampoco significativa. Estos resultados se observan en la tabla N°16.

Tabla N°16: Correlación entre la Patogenicidad y los factores de virulencia enzimáticos de cepas de *Candida tropicalis*

		Patogenicidad	Pz	Ez	Hz	PRz
Patogenicidad		1.00				
Pz	rho	-0.25	1.00			
	p-valor	0.36				
Ez	rho	-0.30	-0.12	1.00		
	p-valor	0.28	0.66			
Hz	rho	.	.	.	.	
	p-valor	.	.	.		
PRz	rho	-0.30	0.18	0.11	.	1.00
	p-valor	0.27	0.53	0.69	.	

Pz: actividad de fosfolipasa, Ez: actividad de esterasa, Hz: actividad de hemolisina, PRz: actividad de proteinasa. Rho: coeficiente de correlación de Spearman
Fuente: Elaboración propia

Para complementar los resultados de la correlación, se presenta la tabla N°17, en el que se visualiza el comportamiento de las cepas de *Candida tropicalis* en términos de mortalidad de las larvas en los primeros cinco días tras la inoculación, su actividad enzimática para fosfolipasas (Pz), esterasas (Ez), hemolisinas (Hz) y proteinasas (PRz) y el tiempo medio de sobrevida de las larvas infectadas.

Tabla N°17: Comparación de la actividad enzimática de las cepas de *Candida tropicalis* con la mortalidad de las larvas en los primeros cinco días después de la inoculación y el tiempo medio de sobrevida.

ESPECIE	CEPA	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	Pz	Ez	Hz	PRz	Tiempo medio sobrevida (días)
C. tropicalis	7431	50%	80%	100%		1	0.48	0.39	0.75	1.7
C. tropicalis	6814	50%	60%	80%	100%	1	1	0.47	0.66	2.3
C. tropicalis	6048	50%	90%		100%	1	0.55	0.47	0.87	1.8
C. tropicalis	4325	90%		100%		1	0.70	0.45	0.82	1.2
C. tropicalis	7288	80%	100%			0.80	0.61	0.45	0.89	1.2
C. tropicalis	1460	100%				1	0.58	0.43	0.66	1
C. tropicalis	1381	90%	100%			1	0.58	0.58	0.87	1.1
C. tropicalis	555	70%	100%			0.76	0.62	0.45	0.49	1.3
C. tropicalis	2265	60%	100%			1	0.58	0.6	0.78	1.4
C. tropicalis	7107	70%	90%	100%		0.90	0.61	0.46	1	1.4
C. tropicalis	7217	80%	100%			1	0.65	0.43	1	1.2
C. tropicalis	3733	30%	80%	90%		1	0.49	0.4	1	2.3
C. tropicalis	7080	50%	80%	90%		1	0.66	0.46	0.71	2.1
C. tropicalis	2735	70%	90%			1	0.54	0.4	1	1.8
C. tropicalis	4082	40%	90%			1	0.73	0.48	1	2.1

Pz: índice de actividad fosfolipasa, Ez: índice de actividad esterasa, Hz: índice de actividad hemolítica, PRz: índice de proteinasa. El color rojo indica actividad alta (≤ 0.63), el color verde indica actividad débil (0.63< valor ≤0.99) y el color gris indica la ausencia de actividad (valor = 1).

.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Esta investigación buscó determinar la producción de fosfolipasas, proteinasas, hemolisinas y esterasas de los aislados de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*; medir la supervivencia de las larvas de *Galleria mellonella* infectadas y correlacionar los factores de virulencia enzimáticos y la patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella*.

Los resultados obtenidos proporcionan una visión más detallada sobre el perfil de virulencia enzimática de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, dos especies frecuentemente asociadas a micosis invasivas en nuestro país (11). Al comparar nuestros hallazgos con estudios previos, se evidencian patrones consistentes y divergentes en la actividad de diferentes enzimas, lo que refuerza la relevancia de estas cepas en la patogenicidad.

En cuanto a la actividad proteolítica en *C. albicans*, el 40% de los aislados mostró actividad proteolítica fuerte, mientras que el 27% presentó actividad débil y el 33% no mostró actividad. Estos resultados superan a los reportados por Bezerra et al., donde solo el 27% de los aislados de *C. albicans* presentaron actividad proteolítica (18). Sin embargo, son inferiores a los hallazgos de Sriphannam et al. y Mroczynska et al., quienes informaron que el 100% de los aislados de *C. albicans* mostraron dicha actividad (21,50). En cuanto a *C. tropicalis*, los aislamientos mostraron un comportamiento diferente. En el presente estudio, el 67% de los aislados de *Candida tropicalis* mostró actividad de proteinasa, un hallazgo similar al 69% reportado por Sasani et al (22). De los aislados de *C. tropicalis*, el 60% exhibieron actividad débil, mientras que solo el 7% mostró actividad fuerte y el 33% no presentó actividad. Estos resultados son consistentes con estudios previos, como el de Bezerra et al, quienes reportaron una mayor prevalencia de actividad débil en *C. tropicalis* (18).

La fosfolipasa desempeña un rol crucial en la destrucción de las membranas celulares del huésped, facilitando la invasión y diseminación de las células de *Candida* (9). En relación con esta enzima, el presente estudio encontró que el 60% de los aislados de *C. albicans* presentaron actividad débil, mientras que el 13% mostró actividad fuerte, y el 27% no presentó actividad. Estos hallazgos coinciden con estudios como el de

Mroczynska et al., donde se reporta que *C. albicans* es una de las principales productoras de fosfolipasa entre las especies de *Candida* (21). Respecto a *C. tropicalis*, el presente estudio mostró que la producción de fosfolipasa fue mucho más limitada, solo el 20% de los aislados presentó actividad débil y el 80% sin actividad detectable. Este bajo nivel de producción de fosfolipasa en *C. tropicalis* es consistente con estudios como el de Sasani et al. que también encontraron una baja expresión de esta enzima en esta especie (22). Estos resultados refuerzan la idea de que *Candida albicans* tiende a ser un mayor productor de fosfolipasa en comparación con otras especies de *Candida*, como lo indican estudios anteriores donde la actividad de fosfolipasa en *C. albicans* fue significativamente mayor que en *Candida-no albicans* (17,18). En el presente estudio, los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.01$) en la producción de fosfolipasa entre ambas especies, lo que respalda la importancia de esta enzima en la virulencia de *C. albicans*.

La esterasa es otra enzima importante, ya que participa en la degradación de lípidos, lo que facilita la invasión de los tejidos y la diseminación sistémica de la infección (21). El 60% de los aislados de *C. albicans* en el presente estudio mostró una actividad fuerte, y el 40% restante exhibió actividad débil. Lo que es consistente con otros estudios que reportan actividad de esterasas en esta especie, como el 92% reportado por Mroczynska et al. (21). Respecto a *C. tropicalis*, el 93% de los aislados de esta especie en nuestro estudio mostró actividad enzimática, un valor similar al 96% reportado por Sasani et al (22) y al 100% reportado por Sriphannam et al (50).

En relación con la hemolisina, el 87% de los aislados de *C. albicans* presentó actividad hemolítica fuerte, mientras que el 13% no mostró actividad. Esto es coherente con estudios como el de Prasad et al, que reportaron una elevada capacidad de *C. albicans* para producir hemolisina (86%) (23), un factor clave en la destrucción de las células sanguíneas del huésped y en la diseminación de la infección. En *Candida tropicalis*, el 100% de los aislados mostró una actividad fuerte hemolítica. Esto está en línea con estudios como el de Sasani et al., que reportaron una elevada actividad hemolítica en *C. tropicalis* (98%) (22). Estos hallazgos sugieren que *C. tropicalis* posee una capacidad robusta para causar hemólisis, un factor importante en su virulencia.

Los resultados obtenidos en este estudio, empleando un modelo de infección en *Galleria mellonella*, brindan información relevante sobre la patogenicidad de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Se evaluaron 15 cepas de cada especie y, aunque se observó una tendencia hacia una mayor variabilidad en la patogenicidad de *C. tropicalis*, las diferencias en las funciones de supervivencia entre *C. albicans* y *C. tropicalis* no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.73$). Esto sugiere que, a nivel de especie, ambas especies de *Candida* tienen una capacidad similar de infectar y matar a las larvas bajo las condiciones experimentales empleadas. Estos hallazgos están en consonancia con lo reportado por García et al., quienes tampoco encontraron diferencias significativas en la patogenicidad entre *C. albicans* y *C. tropicalis* ($p = 0.35$), con una supervivencia media de 2.3 ± 0.6 días para ambas especies (12). Sin embargo, los datos de esta investigación contrastan con lo descrito por Marcos et al., quienes reportaron que *C. albicans* fue significativamente más virulenta que *C. tropicalis* ($p<0.05$) (19), aunque las diferencias podrían deberse a la mayor concentración de inóculo utilizada en este estudio ($5x10^5$ frente a $5x10^7$ en el estudio de Marcos et al.).

El análisis entre cepas de *C. albicans* en nuestro estudio no mostró diferencias significativas en la virulencia ($p = 0.19$), un hallazgo que concuerda con los resultados de McCormick et al. quien no encontró diferencias entre cepas de *C. albicans* ($p = 0.62$ (13), sugiriendo que, en general, la variabilidad dentro de las cepas de *C. albicans* en su capacidad de causar muerte en *G. mellonella* es baja. Sin embargo, es importante destacar que, en contraste con estos hallazgos, Mroczynska et al. observaron variaciones significativas en la virulencia de los aislamientos de *C. albicans* (21), lo que subraya la importancia de considerar factores adicionales como el origen geográfico y las características fenotípicas de las cepas. El análisis de las cepas de *C. tropicalis* reveló diferencias significativas en la virulencia entre las cepas ($p = 0.02$), lo cual refuerza la idea de que *C. tropicalis* puede presentar una mayor variabilidad fenotípica en su capacidad patogénica en comparación con *C. albicans*. Este hallazgo es de interés particular, ya que podría implicar que ciertos aislamientos de *C. tropicalis*

son capaces de evadir las respuestas inmunes de las larvas de *G. mellonella* de manera más efectiva que otros, lo que se traduce en una mayor virulencia en algunos casos.

La correlación entre los factores de virulencia enzimáticos de *C. albicans* y *C. tropicalis* y su patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella* constituye el enfoque central de este estudio. A pesar de la escasez de estudios previos sobre este tema, investigaciones como el de Mroczynska et al. han mostrado correlaciones positivas significativas entre la actividad enzimática de proteinasa, hemolisina y esterasa y la supervivencia de las larvas infectadas con *Candida spp.* (21), utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Contrario a estos hallazgos, el presente análisis con el coeficiente de correlación de Spearman reveló que ninguna de las actividades enzimáticas evaluadas mostró correlaciones significativas con la supervivencia de las larvas. Sin embargo, es importante destacar que el estudio de Mroczynska incluyó diversas especies de *Candida*, mientras que nuestro estudio se centró exclusivamente en *C. albicans* y *C. tropicalis*, lo que podría explicar las diferencias en los resultados.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. El presente estudio confirma la notable capacidad de producción enzimática de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, aunque con perfiles de virulencia diferentes. *C. albicans* mostró una mayor actividad en fosfolipasa, mientras que *C. tropicalis* destacó en la producción de hemolisina.

2. *Candida albicans* y *Candida tropicalis* presentan una capacidad similar de causar muerte en el modelo de infección, sin diferencias significativas entre las funciones de supervivencia de las larvas infectadas con *C. albicans* y *C. tropicalis.* A nivel de cepas, se evidenció una mayor variabilidad en la patogenicidad de las cepas de *C. tropicalis*.

3. En las cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* estudiadas, los factores de virulencia enzimáticos analizados no presentan una correlación estadísticamente significativa con la patogenicidad en las larvas de *Galleria mellonella.*

5.2 RECOMENDACIONES

A pesar de no haberse encontrado correlaciones significativas entre los factores de virulencia enzimáticos y la patogenicidad en ambas especies, los resultados obtenidos aportan información valiosa sobre la variabilidad en la expresión enzimática de las cepas y su potencial patogénico en el modelo experimental de *Galleria mellonella.* Esto sugiere la necesidad de continuar evaluando otros posibles factores de virulencia y características genéticas que puedan influir en la virulencia de estas especies.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. Nat Rev Dis Primer. 11 de mayo de 2018;4:18026.

2. Lim CSY, Rosli R, Seow HF, Chong PP. Candida and invasive candidiasis: back to basics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. enero de 2012;31(1):21-31.

3. de Barros PP, Rossoni RD, Freire F, Ribeiro F de C, Lopes LA das C, Junqueira JC, et al. Candida tropicalis affects the virulence profile of Candida albicans: an in vitro and in vivo study. Pathog Dis. 1 de marzo de 2018;76(2):fty014.

4. Moreno-Loaiza M, Moreno-Loaiza O. Características clínicas y epidemiológicas de la candidemia en pacientes de un hospital de tercer nivel del sur del Perú, 2011-2014. Acta Médica Peru. octubre de 2017;34(4):289-93.

5. Polke M, Hube B, Jacobsen ID. Candida survival strategies. Adv Appl Microbiol. 2015;91:139-235.

6. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. Horiz Méd Lima. enero de 2018;18(1):75-85.

7. Macalupú SZ. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género Candida en Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 23 de marzo de 2018;126-31.

8. Chai LYA, Denning DW, Warn P. Candida tropicalis in human disease. Crit Rev Microbiol. noviembre de 2010;36(4):282-98.

9. Ramos L de S, Barbedo LS, Braga-Silva LA, Santos ALS dos, Pinto MR, Sgarbi DB da G. Protease and phospholipase activities of Candida spp. isolated from cutaneous candidiasis. Rev Iberoam Micol. 1 de abril de 2015;32(2):122-5.

10. Vásquez-Zamora KG, Villalobos-Barboza K, Vergara Espinoza MA, Ventura-Flores R, Silva-Díaz H, Vásquez-Zamora KG, et al. Frecuencia y susceptibilidad antifúngica de Candida spp. (no C. albicans) aislada de pacientes de unidades de cuidados críticos de un hospital de tercer nivel del norte del Perú. Horiz Méd Lima [Internet]. octubre de 2020 [citado 12 de diciembre de 2022];20(4). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1727-558X2020000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es

11. Villanueva F, Veliz J, Calvo KC, Bellido E, Martell S, Ortega S, et al. Características de las fungemias en un centro de referencia del Perú: análisis retrospectivo de cinco años. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 24 de septiembre de 2020;276-81.

12. García-Carnero LC, Clavijo-Giraldo DM, Gómez-Gaviria M, Lozoya-Pérez NE, Tamez-Castrellón AK, López-Ramírez LA, et al. Early Virulence Predictors during the Candida Species–Galleria mellonella Interaction. J Fungi. 27 de agosto de 2020;6(3):152.

13. McCormick-De la Cruz N, Marcos-Zambrano L, Escribano P, Guinea J. Estudio de factores de virulencia de "Candida albicans" responsable de micosis invasoras a partir de ensayos de supervivencia con "Galleria mellonella". 2015 [citado 29 de septiembre de 2024]; Disponible en: https://ebuah.uah.es/dspace/handle/10017/29540

14. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of Candida albicans. Virulence. 31 de diciembre de 2022;13(1):89-121.

15. Dos Santos MM, Ishida K. We need to talk about Candida tropicalis: Virulence factors and survival mechanisms. Med Mycol. 2 de agosto de 2023;61(8):myad075.

16. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. Candida albicans—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. J Fungi. 22 de enero de 2021;7(2):79.

17. Vinitha Mohan Das, Mamatha Ballal. Revista Iberoamericana de Micología. 2008 [citado 29 de septiembre de 2024]. Actividad proteinasa y fosfolipasa como factores de virulencia en especies de Candida aisladas de sangre - ScienceDirect. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1130140608700500

18. Bezerra de Melo E, Menezes R de P, Amante Pennati MP, dos Santos Pedrozo R. Enzymatic and hemolytic activity in different Candida species. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2015 [citado 29 de septiembre de 2024];32(2). Disponible en: https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-pdf-S1130140614000199

19. Marcos-Zambrano LJ, Bordallo-Cardona MÁ, Borghi E, Falleni M, Tosi D, Muñoz P, et al. Candida isolates causing candidemia show different degrees of virulence in Galleria mellonella. Med Mycol. 1 de enero de 2020;58(1):83-92.

20. Nouraei H, Sheykhi S, ZareShahrabadi Z, Khodadadi H, Zomorodian K, Pakshir K. Comparative Analysis of Virulence Factors of Homozygous and Heterozygous Strains of *Candida albicans* Vaginal Isolates. Int J Microbiol. 27 de junio de 2020;2020:e8889224.

21. Mroczyńska M, Brillowska-Dąbrowska A. Virulence of Clinical Candida Isolates. Pathogens. 12 de abril de 2021;10(4):466.

22. Sasani E, Yadegari MH, Khodavaisy S, Rezaie S, Salehi M, Getso MI. Virulence Factors and Azole-Resistant Mechanism of Candida Tropicalis Isolated from Candidemia. Mycopathologia. 1 de diciembre de 2021;186(6):847-56.

23. Prasad Singh D, Kumar Verma R, Sarswat S, Saraswat S. Especies de Candida no Candida albicans: factores de virulencia e identificación de especies en la India. Micología Médica Actual [Internet]. 2021 [citado 29 de septiembre de 2024]; Disponible en: https://chooser.crossref.org/?doi=10.18502%2Fcmm.7.2.7032

24. Curtis A, Binder U, Kavanagh K. Galleria mellonella Larvae as a Model for Investigating Fungal-Host Interactions. Front Fungal Biol. 2022;3:893494.

25. Alves J, Alonso-Tarrés C, Rello J. How to Identify Invasive Candidemia in ICU—A Narrative Review. Antibiotics. diciembre de 2022;11(12):1804.

26. Guzman JA, Tchokonte R, Sobel JD. Shock séptico debido a candidemia: Resultados y predicciones Factores del desarrollo del shock. Rev Investig En Med Clínica. 29 de marzo de 2011;0(0):65-71.

27. Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. Candida albicans biofilms and polymicrobial interactions. Crit Rev Microbiol. febrero de 2021;47(1):91-111.

28. Berman J. Candida albicans. Curr Biol. 21 de agosto de 2012;22(16):R620-2.

29. Panizo MM, Reviákina V. Candida albicans y su efecto patógeno sobre las mucosas. Rev Soc Venez Microbiol. julio de 2001;21(2):38-45.

30. Kumar A. A fungus among us: The emerging opportunistic pathogen Candida tropicalis and PKA signaling. Virulence. 31 de diciembre de 2018;9(1):659-61.

31. Yesudhason BL, Mohanram K. Candida tropicalis as a Predominant Isolate from Clinical Specimens and its Antifungal Susceptibility Pattern in a Tertiary Care Hospital in Southern India. J Clin Diagn Res JCDR. julio de 2015;9(7):DC14-6.

32. McCarty TP, White CM, Pappas PG. Candidemia and Invasive Candidiasis. Infect Dis Clin North Am. junio de 2021;35(2):389-413.

33. Tamo SPB. Candida Infections: Clinical Features, Diagnosis and Treatment. Infect Dis Clin Microbiol. 31 de agosto de 2020;2(2):91-102.

34. Cortés JA, Ruiz JF, Melgarejo-Moreno LN, Lemos EV. Candidemia en Colombia. Biomédica. 30 de marzo de 2020;40(1):195-207.

35. Serrano I, Verdial C, Tavares L, Oliveira M. El modelo virtuoso de Galleria mellonella para la experimentación científica - PMC. Antibiotics [Internet]. 2023 [citado 29 de septiembre de 2024];12(3). Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10044286/

36. Trevijano N, Zaragoza Ó. Immune Response of Galleria mellonella against Human Fungal Pathogens - PMC. Funji [Internet]. 2019 [citado 29 de septiembre de 2024];5(1). Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463112/

37. Odds FC, Davinson AD, Jacobsen MD, Tavanti A, White JA, Kibbler CC, et al. Candida albicans Strain Maintenance, Replacement, and Microvariation Demonstrated by Multilocus Sequence Typing | Journal of Clinical Microbiology. Journal Clinical Microbiology [Internet]. 2006 [citado 29 de septiembre de 2024];44(10). Disponible en: https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.00934-06

38. Tsuji OV, Rivera TC. Candidemia. Acta Pediátrica México. 2006;27(1):30-5.

39. Berrios Estela NF, Chapoñan Coronado RJ. Perfil de susceptibilidad y producción de fosfolipasas en Candida albicans y no albicans. Hospital Regional Lambayeque, 2017. 2021 [citado 29 de septiembre de 2024]; Disponible en: http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/10290

40. Castrillon L, Ramos AP, Desgarennes CP. Virulence factors of Candida sp. Dermatol Rev Mex. 1 de enero de 2005;49:12-27.

41. Moreno X, Núñez G, Rosales O, Ferrara G, Panizo MM. EVALUACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA Y PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD EN CANDIDA ALBICANS PROVENIENTES DE SECRECIONES VAGINALES | Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. Acta Científica De La Sociedad Venezolana De Bioanalistas Especialistas [Internet]. 2023 [citado 29 de septiembre de 2024];24(2). Disponible en: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ACSVBE/article/view/26181

42. Pereira MF, Rossi CC, da Silva GC, Rosa JN, Bazzolli DMS. Galleria mellonella as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. Pathog Dis. 11 de noviembre de 2020;78(8):ftaa056.

43. OPS/OMS, Organización Panamericana de la Salud. Taller sobre Planificación, Administración y Evaluación [Internet]. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/3300/Taller%20sobre%20planificacion%2C%20administracion%20y%20evaluacion%20Glosario.pdf?sequence=1&isAllowed=y

44. Zúñiga PIV, Cedeño RJC, Palacios IAM. Metodología de la investigación científica: guía práctica. Cienc Lat Rev Científica Multidiscip. 27 de septiembre de 2023;7(4):9723-62.

45. Sánchez Carlessi H, Reyes Romero C, Mejía Saénz K. Manual de términos en investigación científica, tecnológica y humanística. 1era ed. Universidad Ricardo Palma; 2018.

46. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in Candida albicans. Sabouraudia. marzo de 1982;20(1):7-14.

47. Braga AA, de Morais PB, Linardi VR. Screening of yeasts from Brazilian Amazon rain forest for extracellular proteinases production. Syst Appl Microbiol. agosto de 1998;21(3):353-9.

48. Slifkin M. Tween 80 Opacity Test Responses of VariousCandida Species. J Clin Microbiol. diciembre de 2000;38(12):4626-8.

49. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by Candida albicans. Infect Immun. noviembre de 1994;62(11):5154-6.

50. Sriphannam C, Nuanmuang N, Saengsawang K, Amornthipayawong D, Kummasook A. Anti-fungal susceptibility and virulence factors of Candida spp. isolated from blood cultures. J Mycol Medicale. diciembre de 2019;29(4):325-30.

ANEXOS

ANEXO N°1: Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo	Indicador	Valores
Factores de virulencia de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*	Habilidades de agentes patógenos para producir invasión, infección y modulación del sistema inmune en el ser humano. (41)	Producción de enzimas hidrolíticas: fosfolipasa, proteinasa, hemolisina y esterasa.	Cuantitativa	Actividad enzimática	Actividad enzimática (Pz)= DC/(DC+P) ● ≤0.63 = Fuerte ● 0.64 - 0.99 = Débil ● 1 = Negativo
Patogenicidad in vivo (Sobrevida)	Capacidad de un agente infeccioso de causar enfermedad en un huésped susceptible. (43)	Supervivencia de larvas de *Galleria mellonella* infectadas con *C. albicans y tropicalis*	Cuantitativa	Tiempo medio de Sobrevida	1-7 días