

# Revista Iberoamericana de Micología

www.elsevier.es/reviberoammicol



## Actividad de la micafungina contra las biopelículas de *Candida*

Guillermo Quindós\*, María Villar-Vidal y Elena Eraso

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Vizcaya, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 6 de febrero de 2009

Aceptado el 12 de febrero de 2009

#### Palabras clave:

Actividad in vitro

Biopelículas

*Candida*

Catéter

Micafungina

Resistencia

### RESUMEN

**Antecedentes:** Muchas de las micosis más recalcitrantes al tratamiento se asocian a la colonización y la formación de biopelículas que son difíciles de eliminar por parte de los mecanismos defensivos inmunológicos y con el tratamiento antimicrobiano habitual.

**Objetivo:** Describir la utilidad de la micafungina en las biopelículas fúngicas a partir de los datos publicados en los últimos años.

**Métodos:** Se ha realizado una búsqueda bibliográfica mediante el empleo de los términos "micafungin", "activity", "biofilm", "*Candida*", "*Aspergillus*", "fungi", "mycos\*", "susceptibility", en la base de datos PubMed/Medline de la National Library of Medicine de Estados Unidos desde enero de 2006 hasta enero de 2009.

**Resultados:** La mayoría de los antifúngicos convencionales (anfotericina B y fluconazol) y los nuevos azoles no tienen actividad en las biopelículas fúngicas. Sin embargo, la micafungina y las otras equinocandinas son muy activas en las biopelículas de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*, mientras que su actividad es variable con las de *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*. Sin embargo, su actividad es prácticamente nula contra las biopelículas de *Cryptococcus* y *Trichosporon*.

**Conclusiones:** La actividad antifúngica de la micafungina en las biopelículas de *Candida* refuerza su indicación terapéutica en el tratamiento de las candidemias y candidiasis invasoras asociadas a catéteres, prótesis y otros implantes biomédicos.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Activity of micafungin against *Candida* biofilms

#### ABSTRACT

#### Keywords:

Biofilm

*Candida*

Catheter

In vitro activity

Micafungin

Resistance

**Background:** Most recalcitrant infections are associated to colonization and microbial biofilm development. These biofilms are difficult to eliminate by the immune response mechanisms and the current antimicrobial therapy.

**Aim:** To describe the antifungal of micafungin against fungal biofilms based in the scientific and medical literature of recent years.

**Methods:** We have done a bibliographic retrieval using the scientific terms "micafungin", "activity", "biofilm", "*Candida*", "*Aspergillus*", "fungi", "mycos\*", susceptibility, in PubMed/Medline from the National Library of Medicine from 2006 to 2009.

**Results:** Most current antifungal agents (amphotericin B and fluconazole) and the new azole antifungals have no activity against fungal biofilms. However, micafungin and the rest of echinocandins are very active against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* biofilms but their activities are variable and less strong against *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* biofilms. Moreover, they have not activities against the biofilms of *Cryptococcus* y *Trichosporon*.

**Conclusions:** The activity of micafungin against *Candida* biofilms gives more strength to its therapeutic indication for candidaemia and invasive candidiasis associated to catheter, prosthesis and other biomedical devices.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: guillermo.quindos@ehu.es (G. Quindós).

Las micosis invasoras han aumentado su incidencia debido al mayor número de personas con enfermedades predisponentes, como los pacientes receptores de trasplantes de órganos, pacientes de sida y otros pacientes inmunodeficientes, recién nacidos de peso bajo, pacientes críticos con múltiples catéteres o pacientes con neoplasias. La mayoría de micosis invasoras están sometidas a múltiples maniobras diagnósticas y terapéuticas, se tratan con fármacos antimicrobianos de amplio espectro o son portadoras de catéteres y otros dispositivos intravasculares. La morbilidad y la mortalidad elevadas, junto con un pronóstico sombrío, las han convertido en un problema de salud importante<sup>104,124,125</sup>. Muchas de las micosis más recalcitrantes al tratamiento se asocian a la colonización y la formación de biopelículas. Tumbarello et al<sup>130</sup> han observado que la producción de biopelícula por *Candida* se asocia a una mortalidad más elevada en pacientes con candidemia, probablemente porque impide la erradicación completa de este microorganismo del torrente circulatorio. Se estima que entre el 10 y el 30% de los catéteres urinarios se asocia a la presencia de infección y formación de biopelículas, y lo mismo ocurre con el 5-10% de los materiales de fijación de fracturas óseas, el 3-8% de los catéteres venosos centrales, el 1-7% de los marcapasos, injertos vasculares, prótesis articulares y válvulas cardíacas mecánicas<sup>40,90,133</sup>. La formación de biopelículas es muy frecuente en prótesis dentales y laríngeas y en cualquier otro aparato o dispositivo biomédico empleado en contacto con las superficies cutáneas y mucosas<sup>28,31,33,77,127</sup>. Las biopelículas son difíciles de eliminar por los mecanismos defensivos inmunológicos<sup>75,85,87,88,114,115</sup> y con el tratamiento antimicrobiano habitual<sup>43,62,71,76,85,104,117</sup>. Las biopelículas pueden convertirse en un reservorio y fuente de infección humana<sup>14,15,28</sup> y el crecimiento microbiano sobre los dispositivos biomédicos puede alterarlos, disminuir su funcionalidad o inhabilitarlos<sup>1,85,127</sup>.

Una biopelícula es una comunidad microbiana bien estructurada con las células fúngicas inmersas en una matriz extracelular de naturaleza predominantemente polisacárida. Las biopelículas se unen de modo irreversible a un sustrato, y las células sésiles que la componen muestran características fenotípicas diferentes a sus correspondientes células de vida libre o planctónicas. El conocimiento alcanzado sobre biopelículas bacterianas es abundante, pero los estudios acerca de las biopelículas fúngicas son más recientes y menos numerosos<sup>8,26,43,71,76,85,86,96,103,104</sup>. La mayoría se han realizado con *Candida*, aunque otros géneros, como *Aspergillus*<sup>27</sup>, *Cryptococcus*<sup>78-81</sup>, *Fusarium*<sup>61</sup> o *Pneumocystis*<sup>34</sup>, son capaces de producir biopelículas. En el género *Candida* destacarían por su capacidad de producir biopelículas *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*<sup>1,2,7,18,30-32,56,72,111,123,135</sup>. Sin embargo, es probable que la mayoría de los hongos patógenos produzcan biopelículas como una ventaja adaptativa, tanto en la colonización de las células y tejidos humanos, como de prótesis, implantes y catéteres médicos<sup>16,39,50,61</sup>.

En las biopelículas candidiásicas conviven diferentes formas celulares con un sistema de comunicación intercelular (*quorum sensing*) que modula su desarrollo y permite el crecimiento y la dispersión celular<sup>57</sup>. Moléculas, como tirosol y farnesol, actúan como mensajeros en esta comunicación entre células<sup>3,59,60</sup>. Estas mismas biomoléculas también se han detectado en las biopelículas desarrolladas por otros hongos, como *Pneumocystis*<sup>34</sup>. El tirosol favorece la formación de las hifas y la biomasa de la biopelícula en las etapas iniciales (1-6 h). Se ha comprobado que las células sésiles producen cantidades significativamente mayores de tirosol que las planctónicas<sup>3</sup>. El farnesol inhibe la formación de hifas, evita el desarrollo excesivo de la biopelícula madura y favorece la dispersión celular a otras localizaciones<sup>3,19,59,60,104</sup>. Algunos antifúngicos, como fluconazol y voriconazol, estimulan in vitro la producción de farnesol por las células sésiles<sup>13,59,60,63</sup>. La dispersión celular también se ve facilitada por el ácido cis-2-decenóico y otros ácidos grasos de cadena corta que actuarían como señales de comunicación entre las células<sup>36</sup>. La combinación del farnesol o de ácidos grasos de cadena corta con fluconazol o vo-

riconazol tiene un efecto reductor de las biopelículas candidiásicas<sup>45,63</sup>.

La formación de las biopelículas de *Candida* tiene varios estadios diferenciados. En las fases iniciales ( $\leq 6$  h), se produce una adhesión celular al sustrato con la formación de capas sencillas de levaduras gemantes con gran actividad metabólica. Después se produce una progresiva maduración que va dotando a la biopelícula de una arquitectura cada vez más compleja con abundancia de hifas. En estas biopelículas maduras ( $> 24-48$  h), destaca la presencia de una serie de canales acuosos que permiten el flujo de agua, nutrientes y productos de desecho. El origen de estos microcanales parece asociarse al despegue y liberación de microcolonias de *Candida* dentro de la biopelícula<sup>33</sup>. Mukherjee et al<sup>85</sup> evaluaron la arquitectura y el grosor de las biopelículas en catéteres de pacientes que presentaban candidemias o candidiasis invasoras. Estas biopelículas, que estaban sometidas a un estrés de presión por la fuerza del torrente sanguíneo, tenían una estructura compacta y estaban compuestas en su mayoría por levaduras con una actividad metabólica importante. Además, observaron una gran variación de la morfología y arquitectura de las biopelículas según las condiciones ambientales. Tsang et al<sup>129</sup> observaron que la formación de biopelículas de *C. albicans* sobre discos de titanio no se modificaba por la presencia de alteraciones, estricciones o rugosidades de la superficie de este metal. Sin embargo, cuando estas biopelículas eran expuestas a diferentes concentraciones de anfotericina B, las biopelículas formadas sobre superficies poco o muy rugosas eran más sensibles a la acción fungicida que las desarrolladas sobre superficies con una rugosidad intermedia que permitían a las células sésiles sobrevivir en las alteraciones de la superficie metálica. También es importante la asociación de la capacidad de filamentación de *Candida* con la adhesión a las superficies: las hifas, por tigmotropismo, crecen hacia los lugares de la superficie donde hay más irregularidades, rugosidades u oquedades que van a facilitar la multiplicación del hongo, la producción de microcolonias y el desarrollo de biopelículas<sup>76</sup>.

### Mayor resistencia de las biopelículas a los antifúngicos

En 1995, Hawser et al<sup>52,53</sup> observaron que las biopelículas de *C. albicans* desarrolladas sobre discos de cloruro de polivinilo (PVC), eran entre 30 y 2.000 veces más resistentes a fluconazol, anfotericina B, 5-fluorocitosina, itraconazol y ketoconazol que las células planctónicas. Después de su publicación, la mayoría de los estudios realizados sobre la actividad antifúngica en biopelículas han constatado que el fluconazol y los nuevos triazoles (posaconazol, ravuconazol y voriconazol) carecen de una actividad importante contra las biopelículas de *C. albicans* y otras especies diferentes de *Candida*<sup>13,18,26,42,43,50,53,62,63,83,96,111</sup>. Sin embargo, las formulaciones lipídicas de la anfotericina B y las equinocandinas son más activas sobre las biopelículas que la anfotericina B desoxicolato o los azoles (tablas 1 y 2)<sup>122</sup>. La resistencia de las biopelículas de *Candida* a los antifúngicos es un fenómeno multifactorial en el que parecen intervenir diferentes mecanismos como: a) la barrera física formada por la matriz polimérica extracelular; b) la presencia de células persistentes, tolerantes o durmientes, con menor actividad metabólica; c) los distintos fenotipos celulares dentro de la biopelícula; d) la sobreexpresión de diferentes genes asociados con los mecanismos moleculares de resistencia a los antifúngicos, y e) un microambiente pericelular poco propicio para la actividad de los antifúngicos.

La matriz extracelular, formada por hidratos de carbono, proteínas, hexosamina, fósforo y ácidos nucleicos, está altamente hidratada y confiere a la biopelícula un aspecto gelatinoso<sup>2</sup>. La matriz es el soporte principal de la biopelícula y su producción aumenta con el tiempo de maduración<sup>2,25,26</sup>. Su composición varía según la especie: así, en las biopelículas de *C. albicans* está presente de forma mayoritaria la glucosa (32%), mientras que en las de *C. tropicalis* abunda la hexosamina (27%)<sup>2</sup>. La composición de la matriz puede ser la causa del distinto

**Tabla 1**  
Variables importantes en el estudio de las biopelículas de *Candida*

Variable	Referencia
<b>Métodos</b>	
<b>Estáticos</b>	
Placas de microtitulación	69, 82, 86, 94, 96, 97, 102, 105-107, 116, 132
Discos, membranas y filtros	70, 86, 101, 113, 116
<b>Dinámicos</b>	
In vivo	4, 12, 84, 86-88, 92, 122
Aparato de Calgary	51, 86, 93
Aparato modificado de Robbins	2, 68, 86, 102, 108
<b>Medio de cultivo</b>	
Leitura	9, 10, 58, 64, 65, 67, 96, 97, 102, 105-107, 132
Reducción de sales de tetrazolio (MTT, XTT, etc.)	5, 6, 9, 10, 24, 30, 32, 39, 53, 58, 64, 69, 82, 94, 96, 97, 102, 105-107, 110, 116, 119, 134
Fluorógenos/otros cromógenos	58, 66, 94, 110, 111, 116
Isótopos marcados/lectinas	53, 66, 94
<b>Microscopia</b>	
Microscopia	66, 85, 92-94, 102, 105-109, 116
<b>Sustrato</b>	
Cloruro de polivinilo (PVC)	25, 53
Metales (acero, titanio, etc.)	37, 129
Poliétilenotereftalato (PET)	25
Poliestireno	13, 22, 39, 67, 82, 94, 96, 102, 105-107, 116, 132, 134
Polimetilmetacrilato	25, 26, 38, 74
Poliuretano (elastano)	25, 53
Silicona	22, 24, 25, 32, 37, 53, 70, 101, 116, 119, 121, 122

grado de penetración de los antifúngicos. Se ha comprobado que la difusión de la 5-fluorocitosina y fluconazol es más lenta en las biopelículas de *C. tropicalis* que en las de *C. albicans*<sup>43</sup>. Esta composición no parece tener tanta importancia en la difusión de la anfotericina B y las equinocandinas<sup>2,32,43</sup>. Sin embargo, las biopelículas estudiadas con métodos dinámicos (tabla 1) son más resistentes a la anfotericina B y fluconazol, así como también lo son las biopelículas mixtas de *Candida* con *Staphylococcus epidermidis* que se vuelven también más resistentes a los antibióticos antiestafilocócicos, como la vancomicina<sup>2</sup>. El β-1,3-D-glucano, aumentado en las biopelículas, podría desempeñar un papel importante en la reducción de la actividad de los azoles y los polienos, cuya actividad frente a las biopelículas de *C. albicans* aumenta marcadamente cuando se añaden glucanasas in vitro<sup>88</sup>.

La existencia de células persistentes (tolerantes o durmientes) es controvertida<sup>68,71,73,75</sup>. Al-Dhaheeri y Douglas<sup>1</sup> observaron que no se encontraban células persistentes entre las poblaciones celulares planctónicas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, ni en las biopelículas de *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Sin embargo, detectaron células persistentes en las biopelículas desarrolladas por una de las 2 cepas de *C. albicans* estudiadas y en las de *C. krusei* y *C. parapsilosis*. LaFleur et al<sup>73</sup> observaron que las células persistentes eran muy tolerantes a la presencia de cicloheximida y anfotericina B, y eran capaces de continuar con el desarrollo de la biopelícula en presencia de estos compuestos. También, Khot et al<sup>68</sup> describieron una subpoblación de células levaduriformes dentro de las biopelículas que eran resistentes a la anfotericina B a diferencia del resto de las células sésiles. Estas células exhibían una regulación diferente de varios genes, como *ERG1*, *ERG25*, *SKN1* y *KRE1*, relacionados con la composición de la membrana y la pared celular fúngica.

Además, en las células sésiles de las biopelículas de *C. albicans* se ha observado una sobreexpresión de los genes que regulan la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y proteínas<sup>48</sup>, y que los mecanismos de bombeo de expulsión de fluconazol y otros antifúngicos también estaban aumentados en las células sésiles de diferentes modelos de biopelículas de *Candida*<sup>4</sup>. Mukherjee et al<sup>83</sup> observaron que las células sésiles de *C. albicans* expresan los genes *CDR* y *MDR1* (codifican bombas de expulsión de fármacos) en todas sus fases de desarrollo de la biopelícula. También se ha observado que las células sésiles de *C. tropicalis* sobreexpresan *ERG11* (codifica la 14 α-demetilasa del lanosterol) y *MDR1*<sup>7</sup>. Por otra parte, se ha detectado una sobreexpresión de *CgCDR1* y *CgCDR2* en las fases iniciales de la biopelícula formada por *C. glabrata*, pero no en las biopelículas maduras de esta especie, mientras que *CgERG11* no se sobreexpresaba en ninguna fase del desarrollo<sup>135</sup>. La expresión de bombas de expulsión de fármacos se ha asociado a la resistencia a los antifúngicos azólicos de las biopelículas inmaduras, pero parece improbable que sea un factor importante en la resistencia observada en biopelículas maduras de *Candida*<sup>73,83</sup>. En las biopelículas maduras se ha descrito una disminución del contenido de ergosterol y una reducción de la expresión de *ERG11*, lo que provoca que los azoles (fluconazol, posaconazol o voriconazol) que actúan inhibiendo la síntesis de ergosterol y los polienos (anfotericina B y nistatina) –cuyo mecanismo de acción impli-

**Tabla 2**  
Actividad antifúngica in vitro de la micafungina y otros antifúngicos utilizados en el tratamiento de las candidiasis invasoras

Especie o género	Células	Antifúngico								Referencia
		ABD	ABL	FLC	VCR	PSC	ANI	CAS	MICA	
<i>Candida albicans</i>	Planctónicas	+	+	+	+	+	+	+	+	5, 13, 17, 21, 24, 29, 65, 70, 83, 84, 91, 92, 95, 107, 110, 116, 124-126, 129, 131, 132, 134
	Sésiles (Biopelícula)									
	Adhesión	¿?	¿?	¿?	+	¿?	¿?	¿?	+	9, 24, 119
	Formación	¿?	¿?	¿?	+	¿?	+	+	+	9, 10, 24, 134
	Erradicación	-	+	-(+)	-(+)	-(+)	+	+	+	5, 10, 13, 24, 30, 32, 64, 65, 70, 83, 84, 92, 96, 101, 107, 110, 116, 119, 121, 122, 129, 131, 132, 134
<i>Candida glabrata</i>	Planctónicas	+	+	¿?	+	+	+	+	+	17, 21, 29, 65, 92, 95, 98-100, 116, 124-126
	Sésiles (Biopelícula)									
	Erradicación	¿?	-(+)	-(+)	-(+)	¿?	¿?	+	+	30, 44, 92, 96, 116
<i>Candida krusei</i>	Planctónicas	+	+	-	+	+	+	+	+	17, 21, 29, 65, 95, 98-100, 124-126
	Sésiles (Biopelícula)									
	Erradicación	¿?	-(+)	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	+	44, 96
<i>Candida parapsilosis</i>	Planctónicas	+	+	+	+	+	+	+	+	17, 21, 29, 70, 91, 92, 95, 96, 111, 116, 124-126, 128
	Sésiles (Biopelícula)									
	Erradicación	¿?	-(+)	¿?	-(+)	¿?	¿?	-(+)	-(+)	30, 32, 44, 70, 92, 96, 101, 111
Otras especies	Planctónicas	+	+	¿?	+	+	+	+	+	7, 17, 21, 29, 49, 92, 95, 105, 124-126, 132, 134
	Sésiles (Biopelícula)									
	Adhesión	¿?	¿?	+	+	¿?	¿?	¿?	+	9, 119
	Formación	¿?	¿?	+	+	¿?	+	¿?	+	9, 116, 119, 134
	Erradicación	-	+	-	-(+)	-(+)	+	+	+	7, 9, 30, 92, 96, 105, 116, 119, 132, 134

+; activo; -: inactivo; ¿?: contradictorio; ABD: anfotericina B desoxicolato; ABL: formulaciones lipídicas de anfotericina B; ANI: anidulafungina; CAS: caspofungina; FLC: fluconazol; MICA: micafungina; PSC: posaconazol; VCR: voriconazol.

ca la unión del antifúngico a esta molécula de la membrana celular- vean disminuida su actividad antifúngica. Sin embargo, la presencia de concentraciones menores de ergosterol en la membrana citoplásmica o la biosíntesis reducida de éste es poco probable que influyan en la actividad inhibitoria de la síntesis de  $\beta$ -1,3-D-glucano de la pared celular por las equinocandinas<sup>48,71,83,85</sup>. Para una información más detallada sobre los mecanismos moleculares de resistencia a los antifúngicos, puede consultarse la reciente revisión de Espinel-Ingroff<sup>46</sup>.

La densidad y la edad celulares son factores que se han asociado con la resistencia a los antifúngicos, pero sin unanimidad en los estudios<sup>97,118</sup>. También se ha asociado la densidad celular y el microambiente pericelular, con modificaciones del pH y de las concentraciones de metabolitos, con la disminución de la actividad de los antifúngicos, principalmente de los azoles y anfotericina B, contra las células sésiles de *C. albicans* en ausencia de sobreexpresión de bombas de expulsión y en cepas carentes del gen *CHK1*, que son insensibles a la molécula de *quorum sensing*, farnesol<sup>97</sup>.

### Actividad de la micafungina y otras equinocandinas contra las biopelículas fúngicas

Las 3 equinocandinas disponibles para el tratamiento de las micosis invasoras –anidulafungina, caspofungina y micafungina– y la nueva equinocandina en estudio –aminocandina– han mostrado una actividad excelente contra las biopelículas de *C. albicans* (tabla 2). Su acción es eficaz tanto en las fases iniciales de adhesión y desarrollo de la biopelícula, como en la erradicación de las biopelículas ya formadas<sup>5,23,24,64,67,96,132,134</sup>. Esta actividad es comparable e incluso mayor que la obtenida con las formulaciones lipídicas de anfotericina B y hay estudios in vitro e in vivo que, en mayor o menor medida, muestran la actividad de las equinocandinas contra las biopelículas de otras especies de *Candida*<sup>5,24,32,64,132</sup>. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios se han realizado con un número limitado de cepas o aislamientos clínicos y la especie más estudiada ha sido *C. albicans*.

A partir de estos estudios, hay 2 datos destacados: a) la actividad contra las biopelículas requiere concentraciones de equinocandina superiores a las que inhiben el crecimiento de las células planctónicas (entre 10 y 100 veces superiores), y b) esta actividad muestra una gran variabilidad entre especies e, incluso, dentro de los aislamientos clínicos de la misma especie, según el origen de éstos o del sustrato empleado para el estudio (tablas 1 y 2)<sup>5,67,70,119</sup>. Un ejemplo claro son *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, las cuales presentan aislamientos productores de biopelículas sensibles, menos sensibles y resistentes a las equinocandinas<sup>30,64</sup>. Esta mayor actividad en las biopelículas de las equinocandinas se relaciona con su acción en el  $\beta$ -1,3-D-glucano, que es esencial en la pared celular de *Candida* y desarrolla un papel importante en la adhesión de este microorganismo a las superficies<sup>87,88,116</sup>.

La micafungina es una nueva equinocandina fungicida para *Candida* y fungistática con otros hongos patógenos, como *Aspergillus*, tanto sobre células planctónicas<sup>99,120,134</sup>, como sésiles<sup>24,30,70</sup>. Los mecanismos por los que se produce la acción contra las biopelículas no son completamente conocidos<sup>70</sup>, pero puede asociarse tanto a su acción contra la matriz polimérica extracelular<sup>2,70</sup>, como a su actividad reductora del metabolismo de las células sésiles<sup>93</sup> y a su mejor difusión y alcance de la diana terapéutica<sup>2</sup>, el  $\beta$ -1,3-D-glucano de la pared<sup>96,98,99,116</sup>. Esta acción selectiva contra la pared fúngica provoca alteraciones estructurales (fig. 1) e inestabilidad osmótica que puede causar la muerte del hongo: las células gradualmente aumentan de tamaño, con deformación del contorno, formación de septos anómalos y una disminución prominente de la capa intermedia de la pared<sup>89</sup>.

Hay varios estudios que resaltan la importancia de la actividad antibiopelícula de las equinocandinas (tabla 2). Así, Seidler et al<sup>116</sup>

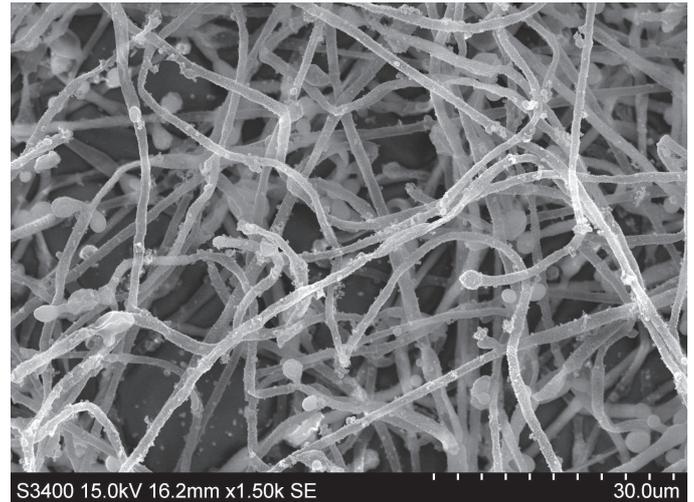


Figura 1. Efecto antifúngico in vitro de la micafungina (0,25  $\mu$ g/ml) en las células sésiles de *Candida albicans*.

observaron que la micafungina era activa frente a las biopelículas desarrolladas en poliestireno o secciones de catéter venoso central por diferentes aislamientos clínicos de 6 especies diferentes de *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*). También Katragkou et al<sup>67</sup> han descrito el efecto inhibitorio de las equinocandinas en el metabolismo de las biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* que eran resistentes a anfotericina B desoxicolato, fluconazol, nistatina, ravuconazol o voriconazol.

Villar-Vidal<sup>134</sup> observó que las concentraciones de micafungina (medias geométricas de las concentraciones mínimas inhibitorias [CMI]<sub>50</sub>) necesarias para inhibir las biopelículas preformadas eran 0,07  $\mu$ g/ml y 0,205  $\mu$ g/ml para *C. albicans* y *C. dubliniensis*, respectivamente. Sin embargo, hallaron una gran diversidad en la sensibilidad a la micafungina: los aislamientos de *C. dubliniensis* de sangre (media geométrica de la CMI = 0,17  $\mu$ g/ml) y orales (media geométrica de la CMI = 0,249  $\mu$ g/ml) eran menos sensibles que los aislamientos de *C. albicans* de sangre (media geométrica de la CMI = 0,05  $\mu$ g/ml) y orales (media geométrica de la CMI = 0,101  $\mu$ g/ml). Villar-Vidal<sup>134</sup> también evaluó la actividad de anidulafungina y micafungina en la fase inicial de la formación de biopelícula, ya que una vez iniciada la adhesión, se pone en marcha una complicada maquinaria celular que culmina con el desarrollo de una compleja biopelícula difícil de erradicar. Encontró que las concentraciones necesarias eran muy similares a las que inhibían el crecimiento de las células planctónicas (de 0,06 a 0,5  $\mu$ g/ml). Choi et al<sup>30</sup> obtuvieron resultados parecidos, con una reducción significativa de la actividad de las biopelículas de *Candida* ( $p < 0,05$ ) a concentraciones relativamente bajas de micafungina y caspofungina (0,0125 a 1  $\mu$ g/ml). La caspofungina y la micafungina ejercían un efecto reductor del 80% de la actividad metabólica de reducción del XTT con concentraciones entre 0,25 y 1  $\mu$ g/ml contra las biopelículas de *C. albicans* y *C. glabrata*; sin embargo, su actividad es mucho menor frente a las biopelículas de *C. parapsilosis*<sup>30</sup>.

Cateau et al<sup>24</sup> comprobaron que la micafungina tiene una actividad inhibitoria excelente de la adhesión de *C. albicans* a los catéteres de silicona, impide el desarrollo de biopelículas sobre este sustrato y erradica las biopelículas ya desarrolladas en 12 h a 5 días, manteniendo este efecto durante 48 h, lo que permite considerar su utilidad potencial para el sellado de catéteres intravasculares. La actividad antibiopelícula de las equinocandinas también se ha podido comprobar en diversos modelos animales o celulares<sup>121</sup>, sin que se encontraran ventajas significativas en esta actividad con la combinación de caspofungina con otros antifúngicos, como voriconazol<sup>122</sup>.

En la mayoría de los estudios no hay una correlación entre la CMI de equinocandinas obtenidas con las células planctónicas y las obtenidas con las células sésiles, pero sí una correlación de la actividad de las diferentes equinocandinas, aunque haya variaciones particulares entre ellas para cada aislamiento concreto<sup>2,134</sup>. La existencia de diferencias importantes en la actividad de las equinocandinas contra las biopelículas de *Candida* se ha descrito con anterioridad<sup>30,70</sup>. También se ha descrito una actividad menor de la anidulafungina contra las biopelículas desarrolladas por *C. tropicalis* que contra las desarrolladas por *C. albicans*<sup>132</sup>. Además, Melo et al<sup>82</sup> han descrito un efecto paradójico de la caspofungina, con un resurgimiento del crecimiento de las biopelículas formadas por las especies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*, con concentraciones de caspofungina superiores a la CMI. Este efecto paradójico no era tan claro con las biopelículas de *C. tropicalis*, porque las células planctónicas y sésiles de esta especie presentaban una sensibilidad menor a la caspofungina. Hay que valorar que la mayoría de los estudios de la actividad in vitro de los antifúngicos se han realizado con biopelículas de aislamientos de origen oral o de sangre. Como ejemplo, está el estudio de Jain et al<sup>65</sup>, los cuales observaron que las biopelículas de aislamientos obtenidos de catéteres urinarios mostraban una resistencia a caspofungina y fluconazol, aunque eran inhibidas por CMI<sub>50</sub> < 1 µg/ml de anfotericina B.

Esta menor actividad contra *C. parapsilosis* también la han descrito Khun et al<sup>70</sup> y Melo et al<sup>82</sup>, los cuales comprobaron que eran necesarias concentraciones más altas de equinocandinas para inhibir las biopelículas de *C. parapsilosis* (media geométrica, 9,1 µg/ml para 7 aislamientos), *Candida orthopsilosis* (media geométrica, 4 µg/ml para 8 aislamientos) y *Candida metapsilosis* (media geométrica, 2 µg/ml para 5 aislamientos)<sup>82</sup>. Finalmente, la caspofungina, y probablemente también las demás equinocandinas, no es activa contra las biopelículas de *Trichosporon ashaii*<sup>39</sup> o *Cryptococcus neoformans*<sup>78-81</sup>.

Debido a esta variabilidad de la sensibilidad de las biopelículas a los antifúngicos, se están evaluando nuevas estrategias para el tratamiento de las micosis asociadas a las biopelículas. Estas propuestas están en fase de estudio e incluyen nuevos compuestos (terpenos – como timol<sup>11,35</sup>, carvacrol<sup>35</sup> o geraniol<sup>35</sup>–, ácidos grasos de cadena corta<sup>45</sup>, baicaleína<sup>18</sup>, eugenol<sup>55</sup>, lizozima<sup>112</sup>, quitosano<sup>20</sup>, etc.) y combinaciones de fármacos (anfotericina B con doxiciclina o rifampicina<sup>44</sup>, miconazol con clorhexidina<sup>74</sup>, anfotericina B complejo lipídico con ácido etilendiaminotetracético [EDTA]<sup>101</sup>, nistatina, miconazol o anfotericina B con lizozima<sup>112</sup>, inhibidores de la calcineurina – ciclosporina y FK506– y fluconazol<sup>131</sup>, etc.), la inmersión de los biomateriales en soluciones microbicidas<sup>96</sup>, ondas acústicas<sup>54</sup>, modificación de la superficie o liberación de antimicrobianos de los catéteres y dispositivos biomédicos<sup>25,41,47</sup>, EDTA<sup>38,51,101</sup>, etc. La mayoría de estas aproximaciones serían útiles en aplicación tópica (cepillos de dientes, prótesis dentales, etc.) o en el sellado de catéteres o recubrimiento de materiales biomédicos<sup>5</sup>, pero todavía deben realizarse estudios más amplios que permitan valorar su utilidad real en la prevención y el tratamiento de las micosis invasoras asociadas al desarrollo de biopelículas.

## Conclusión

La actividad antifúngica de la micafungina sobre las biopelículas de *Candida* refuerza su indicación terapéutica en el tratamiento de las candidemias y las candidiasis invasoras asociadas a catéteres, prótesis y otros implantes biomédicos.

## Agradecimientos

Los autores han recibido financiación de los proyectos PI061895 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIC07/123-IT-222-07 del Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritz.

## Declaraciones de los autores

Los autores no tienen nada que declarar.

## Bibliografía

- Al-Dhaheer RS, Douglas LJ. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1884-1887.
- Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 2006;55:999-1008.
- Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell*. 2006;5:1770-1779.
- Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun*. 2004;72:6023-6031.
- Bachmann SP, Vandewalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, Lopez-Ribot JL. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3591-3596.
- Barros LM, Boriollo MF, Alves AC, Klein MI, Goncalves RB, Hofling JF. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. *Arch Oral Biol*. 2008;53:1172-1178.
- Bizerra FC, Nakamura CV, De Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*. 2008;8:442-450.
- Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9:588-594.
- Borecka-Melkusova S, Bujdakova H. Variation of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among genotypes of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* under antifungal treatment. *Can J Microbiol*. 2008;54:718-724.
- Borecka-Melkusova S, Moran GP, Sullivan DJ, Kucharikova S, Chorvat JD, Bujdakova H. The expression of genes involved in the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms exposed to fluconazole. *Mycoses*. 2009;52:118-128.
- Braga PC, Culici M, Alfieri M, Dal SM. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:472-477.
- Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM, Mylonakis E. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathog*. 2007;3:e18.
- Bruzual I, Riggle P, Hadley S, Kumamoto CA. Biofilm formation by fluconazole-resistant *Candida albicans* strains is inhibited by fluconazole. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59:441-450.
- Camacho DP, Consolaro ME, Patussi EV, Donatti L, Gasparetto A, Svidzinski TI. Vaginal yeast adherence to the combined contraceptive vaginal ring (CCVR). *Contraception*. 2007;76:439-443.
- Campos MS, Marchini L, Bernardes LA, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:419-424.
- Cannizzo FT, Eraso E, Ezkurra PA, Villar-Vidal M, Bollo E, Castella G, Cabañes FJ, Vidotto V, Quindós G. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. *Med Mycol*. 2007;45:357-361.
- Cantón E, Pemán J, Viudes A, Quindós G, Gobernado M, Espinel-Ingroff A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;45:203-206.
- Cao Y, Dai B, Wang Y, Huang S, Xu Y, Cao Y, Gao P, Zhu Z, Jiang Y. In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32:73-77.
- Cao YY, Cao YB, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, Zhu ZY, Chen WS, Jiang YY. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:584-589.
- Carlson RP, Taffs R, Davison WM, Stewart PS. Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2008;19:1035-1046.
- Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*. 2006;19:130-139.
- Cateau E, Berjeaud JM, Rodier MH, Imbert C. Fungal biofilm inhibition by a component naturally produced by *Candida albicans* yeasts growing as a biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:166-170.
- Cateau E, Levasseur P, Borgonovi M, Imbert C. The effect of aminocandin (HMR 3270) on the in-vitro adherence of *Candida albicans* to polystyrene surfaces coated with extracellular matrix proteins or fibronectin. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:311-315.
- Cateau E, Rodier MH, Imbert C. In vitro efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:153-155.
- Chandra J, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, McCormick TS, Anderson JM, Ghanoum MA. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:8795-8801.
- Chandra J, Zhou G, Ghanoum MA. Fungal biofilms and antimycotics. *Curr Drug Targets*. 2005;6:887-894.
- Chandrasekar PH, Manavathu EK. Do *Aspergillus* species produce biofilm? *Future Microbiol*. 2008;3:19-21.

28. Chassot F, Negri MF, Svidzinski AE, Donatti L, Peralta RM, Svidzinski TI, Consolero ME. Can intrauterine contraceptive devices be a *Candida albicans* reservoir? *Contraception*. 2008;77:355-359.
29. Chavez M, Bernal S, Valverde A, Gutierrez MJ, Quindós G, Mazuelos EM. In-vitro activity of voriconazole (UK-109,496), LY303366 and other antifungal agents against oral *Candida* spp. isolates from HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. 1999;44:697-700.
30. Choi HW, Shin JH, Jung SI, Park KH, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:1520-1523.
31. Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:377-383.
32. Cocuauod C, Rodier MH, Daniault G, Imbert C. Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:507-512.
33. Coogan MM, Fidel PL Jr, Komesu MC, Maeda N, Samaranyake LP. (B1) *Candida* and mycotic infections. *Adv Dent Res*. 2006;19:130-138.
34. Cushion MT, Collins MS, Linke MJ. Biofilm formation by *Pneumocystis*. *Eukaryot Cell*. 2009;8:197-206.
35. Dalleau S, Cateau E, Berges T, Berjeaud JM, Imbert C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:572-576.
36. Davies DG, Marques CN. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol*. 2009;191:1393-1403.
37. Depprich RA, Handschel JG, Meyer U, Meissner G. Comparison of prevalence of microorganisms on titanium and silicone/polymethyl methacrylate obturators used for rehabilitation of maxillary defects. *J Prosthet Dent*. 2008;99:400-405.
38. Devine DA, Percival RS, Wood DJ, Tuthill TJ, Kite P, Killington RA, Marsh PD. Inhibition of biofilms associated with dentures and toothbrushes by tetrasodium EDTA. *J Appl Microbiol*. 2007;103:2516-2524.
39. Di Bonaventura G, Pompilio A, Picciani C, Iezzi M, D'Antonio D, Piccolomini R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3269-3276.
40. Donelli G. Vascular catheter-related infection and sepsis. *Surg Infect (Larchmt)*. 2006;7 Suppl 2:S25-S27.
41. Donelli G, Francolini I, Ruggeri V, Guaglianone E, D'Ilario L, Piozzi A. Pore formers promoted release of an antifungal drug from functionalized polyurethanes to inhibit *Candida* colonization. *J Appl Microbiol*. 2006;100:615-622.
42. Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal biofilms: challenges and future directions. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008;6:141-144.
43. Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19:139-143.
44. El-Azizi M. Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against the biofilms of non-*albicans* *Candida* spp. by rifampicin and doxycycline. *J Med Microbiol*. 2007;56:645-649.
45. Ells R, Kock JL, Van Wyk PW, Botes PJ, Pohl CH. Arachidonic acid increases antifungal susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63:124-128.
46. Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25:101-106.
47. Etienne O, Gasnier C, Taddei C, Voegel JC, Aunis D, Schaa P, Metz-Boutigue MH, Bolcato-Bellemin AL, Egles C. Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials*. 2005;26:6704-6712.
48. Garcia-Sanchez S, Aubert S, Ibraqui I, Janbon G, Ghigo JM, D'Enfert C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell*. 2004;3:536-545.
49. Gutiérrez J, Morales P, González MA, Quindós G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol*. 2002;42:207-227.
50. Hamal P, Ostransky J, Dendis M, Horvath R, Ruzicka F, Buchta V, Vajsova M, Sauer P, Hejnar P, Raclavsky V. A case of endocarditis caused by the yeast *Pichia fabianii* with biofilm production and developed in vitro resistance to azoles in the course of antifungal treatment. *Med Mycol*. 2008;46:601-605.
51. Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. A subpopulation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilm cells are highly tolerant to chelating agents. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;272:172-181.
52. Hawser SP, Baillie GS, Douglas LJ. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*. 1998;47:253-256.
53. Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:2128-2131.
54. Hazan Z, Zumeris J, Jacob H, Raskin H, Kratysch G, Vishnia M, Dror N, Barliya T, Mandel M, Lavie G. Effective prevention of microbial biofilm formation on medical devices by low-energy surface acoustic waves. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:4144-4152.
55. He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*. 2007;163:137-143.
56. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. *Br J Biomed Sci*. 2006;63:5-11.
57. Hogan DA. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*. 2006;5:613-619.
58. Honraet K, Goetghebeur E, Nelis HJ. Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *J Microbiol Methods*. 2005;63:287-295.
59. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:2982-2992.
60. Hornby JM, Nickerson KW. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2305-2307.
61. Imamura Y, Chandra J, Mukherjee PK, Lattif AA, Szczotka-Flynn LB, Pearlman E, Lass JH, O'Donnell K, Ghannoum MA. *Fusarium* and *Candida albicans* biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:171-182.
62. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:14-19.
63. Jabra-Rizk MA, Shirtliff M, James C, Meiller T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS Yeast Res*. 2006;6:1063-1073.
64. Jacobson MJ, Piper KE, Nguyen G, Steckelberg JM, Patel R. In vitro activity of anidulafungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2242-2243.
65. Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries BC. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:1697-1703.
66. Jin Y, Zhang T, Samaranyake YH, Fang HH, Yip HK, Samaranyake LP. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*. 2005;159:353-360.
67. Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Za-Matafisi E, Tsantali C, Roilides E. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:357-360.
68. Khot PD, Suci PA, Miller RL, Nelson RD, Tyler BJ. A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and beta-1,6-glucan pathway genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3708-3716.
69. Krom BP, Cohen JB, Elhaney Feser GE, Cihlar RL. Optimized candidal biofilm microtiter assay. *J Microbiol Methods*. 2007;68:421-423.
70. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1773-1780.
71. Kumamoto CA, Vines MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol*. 2005;59:113-133.
72. Kumar CP, Menon T. Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. *Med Mycol*. 2006;44:99-101.
73. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3839-3846.
74. Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J. Composition of in vitro denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;242:345-3451.
75. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:107-131.
76. Lopez-Ribot JL. *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. *Curr Biol*. 2005;15:R453-R455.
77. Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, Aguirre JM, Eraso E, Quindós G. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Arch Oral Biol*. 2009;54:127-131.
78. Martinez LR, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. *Infect Immun*. 2006;74:6118-6123.
79. Martinez LR, Casadevall A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:1021-1033.
80. Martinez LR, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:4592-4601.
81. Martinez LR, Ibom DC, Casadevall A, Fries BC. Characterization of phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Mycopathologia*. 2008;166:175-180.
82. Melo AS, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:3081-3088.
83. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun*. 2003;71:4333-4340.
84. Mukherjee PK, Long L, Kim HG, Ghannoum MA. Amphotericin B lipid complex is efficacious in the treatment of *Candida albicans* biofilms using a model of catheter-associated *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:149-153.
85. Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol*. 2005;43:191-208.
86. Nett J, Andes D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9:340-345.
87. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Andes D. Beta -1,3 glucan as a test for central venous catheter biofilm infection. *J Infect Dis*. 2007;195:1705-1712.
88. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holyoda K, Hoff B, VanHandel M, Andes D. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:510-520.
89. Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK463), a water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J Electron Microscop* (Tokyo). 2002;51:247-255.
90. Opilla M. Epidemiology of bloodstream infection associated with parenteral nutrition. *Am J Infect Control*. 2008;36:S173-S178.

91. Ozkan S, Kaynak F, Kalkanci A, Abbasoglu U, Kustimur S. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:319-323.
92. Pai MP, Samples ML, Mercier RC, Spilde MN. Activities and ultrastructural effects of antifungal combinations against simulated *Candida* endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2367-2376.
93. Parahitiyawa NB, Samaranyake YH, Samaranyake LP, Ye J, Tsang PW, Cheung BP, Yau JY, Yeung SK. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. *APMIS*. 2006;114:298-306.
94. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008;72:157-165.
95. Pemán J, Cantón E, Gobernado M. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicenter study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24:23-30.
96. Pemán J, Cantón E, Valentín A. Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. *Rev Iberoam Micol* 2008;25:124-128.
97. Perumal P, Mekala S, Chaffin WL. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:2454-2463.
98. Quindós G, Eraso E. Actividad antifúngica in vitro de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25:83-91.
99. Quindós G, Eraso E, Carrillo-Muñoz AJ, Cantón E, Pemán J. Actividad antifúngica in vitro de la micafungina. *Rev Iberoam Micol*. 2009;26:35-41.
100. Quindós G, Sanchez-Vargas LO, Villar-Vidal M, Eraso E, Alkorta M, Hernandez-Almaraz JL. Activities of fluconazole and voriconazole against bloodstream isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a 14-year study in a Spanish tertiary medical centre. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:266-271.
101. Raad II, Hachem RY, Hanna HA, Fang X, Jiang Y, Dvorak T, Sherertz RJ, Kontoyannis DP. Role of ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) in catheter lock solutions: EDTA enhances the antifungal activity of amphotericin B lipid complex against *Candida* embedded in biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32:515-518.
102. Ramage G, Lopez-Ribot JL. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Methods Mol Med*. 2005;118:71-79.
103. Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 2006;6:979-986.
104. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005;4:633-638.
105. Ramage G, Vande WK, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3234-3240.
106. Ramage G, Vande WK, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:2475-2479.
107. Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2001;18:163-170.
108. Ramage G, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. A seed and feed model for the formation of *Candida albicans* biofilms under flow conditions using an improved modified Robbins device. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25:37-40.
109. Reese S, Guggenheim B. A novel TEM contrasting technique for extracellular polysaccharides in in vitro biofilms. *Microsc Res Tech*. 2007;70:816-822.
110. Repp KK, Menor SA, Pettit RK. Microplate Alamar blue assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Med Mycol*. 2007;45:603-607.
111. Ruzicka F, Hola V, Votava M, Tejkalova R. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiol (Praha)*. 2007;52:209-214.
112. Samaranyake YH, Cheung BP, Parahitiyawa N, Seneviratne CJ, Yau JY, Yeung KW, Samaranyake LP. Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol*. 2009;54:115-126.
113. Samaranyake YH, Ye J, Yau JY, Cheung BP, Samaranyake LP. In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. *J Clin Microbiol*. 2005;43:818-825.
114. San-Millán R, Elguezal N, Regúlez P, Moragues MD, Quindós G, Pontón J. Effect of salivary secretory IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene. *Microbiology*. 2000;146:2105-2112.
115. San-Millán R, Ezkurra PA, Quindós G, Robert R, Senet JM, Pontón J. Effect of monoclonal antibodies directed against *Candida albicans* cell wall antigens on the adhesion of the fungus to polystyrene. *Microbiology*. 1996;142:2271-2277.
116. Seidler M, Salvenmoser S, Muller FM. In vitro effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28:568-573.
117. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranyake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis*. 2008;14:582-590.
118. Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranyake YH, Samaranyake LP. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3259-3266.
119. Serefko A, Chudzik B, Malm A. In vitro activity of caspofungin against planktonic and sessile *Candida* sp. cells. *Pol J Microbiol*. 2006;55:133-137.
120. Serena C, Marine M, Quindós G, Carrillo AJ, Cano JF, Pastor FJ, Guarro J. In vitro interactions of micafungin with amphotericin B against clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1529-1532.
121. Shuford JA, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. In vitro biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57:277-281.
122. Shuford JA, Rouse MS, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. Evaluation of caspofungin and amphotericin B deoxycholate against *Candida albicans* biofilms in an experimental intravascular catheter infection model. *J Infect Dis*. 2006;194:710-713.
123. Song JW, Shin JH, Shint DH, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med Mycol*. 2005;43:657-661.
124. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27:359-366.
125. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:317-322.
126. Tortorano AM, Prigitano A, Biraghi E, Viviani MA. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: in vitro susceptibility of 375 *Candida albicans* isolates and biofilm production. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:777-779.
127. Trevisani L, Sartori S, Rossi MR, Bovolenta R, Scopioni M, Gullini S, Abbasciano V. Degradation of polyurethane gastrostomy devices: what is the role of fungal colonization? *Dig Dis Sci*. 2005;50:463-469.
128. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:606-625.
129. Tsang CS, Ng H, McMillan AS. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. *Clin Oral Investig*. 2007;11:361-368.
130. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, De Gaetano DK, La SM, Spanu T, Fadda G, Cauda R, Sanguinetti M. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1843-1850.
131. Uppuluri P, Nett J, Heitman J, Andes D. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1127-1132.
132. Valentín A, Cantón E, Pemán J, Quindós G. Actividad in vitro de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. *Rev Iberoam Micol*. 2007;24:272-277.
133. Viale P, Stefani S. Vascular catheter-associated infections: a microbiological and therapeutic update. *J Chemother*. 2006;18:235-249.
134. Villar-Vidal M. Actividad in vitro de las nuevas equinocandinas, anidulafungina y micafungina, contra las biopelículas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* 2008. Bilbao, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea. Tesis de Doctorado.
135. Won SJ, Shin JH, Kee SJ, Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Expression of *CgCDR1*, *CgCDR2*, and *CgERG11* in *Candida glabrata* biofilms formed by bloodstream isolates. *Med Mycol*. 2008;1-4.