



UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA

ESCOLA UNIVERSITÀRIA D'ÒPTICA
I OPTOMETRIA

DEPARTAMENT D'ÒPTICA I OPTOMETRIA

COLONIZACION FUNGICA DE LENTES DE CONTACTO

Memoria presentada para optar al grado de
Doctora en Ciencias (sección Biológicas) por la
Universitat Politècnica de Catalunya realizada
por M^a SOLEDAD MARQUES CALVO

V^o B^o,
el director de la memoria

Dr. D. Josep M^a Torres-Rodríguez
(Departament de Genètica i Microbiologia,
Universitat Autònoma de Barcelona)

Terrassa, abril de 1998

*"Los hongos son una tribu maldita,
una invención del diablo, ideada
por él para perturbar el resto de la
naturaleza creada por Dios"*

S. Veillard

(Botánico francés, s. XVIII)

INDICE

Prefacio	15
1. INTRODUCCION	23
1.1. LENTES DE CONTACTO	27
1.1.1. MATERIALES DE LAS LENTES DE CONTACTO	28
1.1.1.1. Lentes rígidas	29
1.1.1.2. Lentes hidrofílicas	31
1.1.2. LENTES DE CONTACTO SEGUN SU USO	35
1.1.2.1. Lentes de uso continuado	35
1.1.2.2. Lentes de uso diario	38
1.2. ADHESION DE MICROORGANISMOS A SUPERFICIES	39
1.2.1. HIDROFOBICIDAD Y ADHESION	40
1.2.2. CONDICIONES DE CULTIVO, HIDROFOBICIDAD Y ADHESION	45
1.2.3. MECANISMOS DE ADHESION A DIFERENTES SUPERFICIES	47
1.2.4. ADHESION FUNGICA	50
Factores que condicionan la adhesión fúngica	52
Temperatura	52
Medio de cultivo	53
Hidrofobicidad celular	53
Adhesión de los conidios	56
1.3. PRINCIPIOS BASICOS DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL ...	59
1.3.1. ORIGENES Y PRINCIPIOS OPTICOS DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL	59
1.3.2. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL	65

2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	69
3. MATERIAL Y METODOS	75
3.1. LENTES DE CONTACTO HIDROFILICAS PROCEDENTES DE USUARIOS	75
3.1.1. PROCEDENCIA DE LAS LENTES	75
3.1.2. ANALISIS DE LAS LENTES Y DE LA SOLUCION HUMECTANTE	77
Observación de las lentes mediante microscopía óptica convencional	78
Aislamiento de los hongos	79
Identificación de los hongos	81
Observación de las lentes mediante microscopía electrónica de barrido	82
Preparación de las muestras	82
<i>Preparación de los pares estereoscópicos</i>	83
3.2. LENTES DE CONTACTO NUEVAS	86
3.2.1. LENTES HIDROFILICAS	87
Caracterización química de los materiales	88
3.2.1.1. LENTES DE USO CONTINUADO	88
3.2.1.1.1. Lentes	88
3.2.1.1.2. Medios de cultivo utilizados en la incubación	89
Suero fisiológico	90
Medio líquido de Sabouraud	90
Lágrima sintética	90
3.2.1.1.3. Especies	91
Levaduras	91
<i>Candida</i>	92
<i>Candida albicans</i>	94
<i>Candida tropicalis</i>	96
<i>Torulopsis</i>	97
<i>Torulopsis glabrata</i>	97

Hongos filamentosos	98
<i>Aspergillus</i>	98
<i>Aspergillus niger</i>	100
3.2.1.1.4. Obtención y concentración del inóculo	101
Levaduras	101
Suero fisiológico	101
Medio líquido de Sabouraud	102
Lágrima sintética	102
Hongos filamentosos	103
Suero fisiológico	103
Medio líquido de Sabouraud	103
Lágrima sintética	103
3.2.1.1.5. Incubación de las lentes	104
3.2.1.1.6. Observación de las lentes	105
3.2.1.2. LENTES DE USO DIARIO	108
3.2.1.2.1. Lentes	108
3.2.1.2.2. Medios de cultivo utilizados en la incubación ...	112
3.2.1.2.3. Especies	112
3.2.1.2.4. Concentración del inóculo	113
Suero fisiológico	113
Medio líquido de Sabouraud	113
3.2.1.2.5. Incubación de las lentes	113
3.2.1.2.6. Observación de las lentes mediante microscopía óptica convencional	114
3.2.1.2.7. Observación de las lentes mediante microscopía electrónica de barrido	116
3.2.1.2.8. Observación de las lentes mediante microscopía confocal	116
3.2.2. LENTES RIGIDAS PERMEABLES A LOS GASES	118
3.2.2.1. LENTES	119
3.2.2.2. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LA INCUBACION	119
3.2.2.3. ESPECIES	120
3.2.2.4. CONCENTRACION DEL INOCULO	120

3.2.2.5. INCUBACION DE LAS LENTES	120
3.2.2.6. OBSERVACION DE LAS LENTES MEDIANTE MICROSCOPIA OPTICA CONVENCIONAL	121
3.2.2.7. OBSERVACION DE LAS LENTES MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL	121
3.3. METODOS DE ANALISIS ESTADISTICO	123
APENDICE	125
4. RESULTADOS	135
4.1. COLONIZACION FUNGICA DE LAS LENTES DE CONTACTO HIDROFILICAS PROCEDENTES DE USUARIOS	135
4.1.1. COLONIZACION DE LAS LENTES DE CONTACTO SEGUN SU CONTENIDO HIDRICO	135
4.1.2. CARACTERISTICAS MACRO Y MICROSCOPICAS DE LAS COLONIAS OBTENIDAS <i>IN VITRO</i> Y MORFOLOGIA DE LOS HONGOS EN LAS LENTES DE CONTACTO	139
Género-forma <i>Acremonium</i>	140
Género-forma <i>Alternaria</i>	141
Género-forma <i>Aspergillus</i>	143
Género-forma <i>Aureobasidium</i>	144
Género-forma <i>Gliomastix</i>	146
Género-forma <i>Humicola</i>	147
Género-forma <i>Penicillium</i>	148
Género-forma <i>Phoma</i>	150
4.1.3. MORFOLOGIA DE LOS HONGOS INVASORES DE LAS LENTES DE CONTACTO SIN CRECIMIENTO <i>IN VITRO</i>	151
Colonias compactas con hifas hialinas	152
Hifas hialinas que no forman colonias compactas	154
Colonias dematiáceas poco compactas	157
Colonias dematiáceas muy compactas	159

4.1.4. ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LAS LENTES DE CONTACTO	160
ICONOGRAFIA 4.1.	166
4.2. COLONIZACION FUNGICA DE LAS LENTES DE CONTACTO	
NUEVAS	205
4.2.1. LENTES HIDROFILICAS	205
Caracterización química de los materiales	205
4.2.1.1. COLONIZACION DE LAS LENTES POR LEVADURAS	209
4.2.1.1.1. Lentes de uso continuado	209
Colonización según el medio de cultivo utilizado en la incubación	211
Colonización según el lugar de incubación	213
4.2.1.1.2. Lentes de uso diario	214
Colonización según el material de las lentes	214
Colonización según el medio de cultivo utilizado en la incubación	226
Colonización según los días de incubación	229
4.2.1.2. COLONIZACION DE LAS LENTES POR HONGOS FILAMENTOSOS	230
4.2.1.2.1. Lentes de uso continuado	230
Colonización según el medio de cultivo utilizado en la incubación	232
Colonización según el lugar de incubación	233
4.2.1.2.2. Lentes de uso diario	234
Colonización según el material de las lentes	239
Colonización según el medio de cultivo utilizado en la incubación	247
Colonización según los días de incubación	251
4.2.1.3. ESTUDIO COMPARADO DE LA COLONIZACION DE LENTES DE CONTACTO POR <i>CANDIDA ALBICANS</i> Y POR <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	253
4.2.1.3.1. Lentes de uso continuado	253
Colonización según el medio de cultivo y lugar de incubación	253

4.2.1.3.2. Lentes de uso diario	254
Colonización con suero fisiológico	254
Colonización con medio líquido de Sabouraud	257
4.2.1.4. ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LAS LENTES DE CONTACTO	260
4.2.2. LENTES RIGIDAS PERMEABLES A LOS GASES	262
4.2.3. ANALISIS DE LAS LENTES DE CONTACTO NUEVAS, HIDROFILICAS Y RIGIDAS PERMEABLES A LOS GASES, MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL	264
 ICONOGRAFIA 4.2.	 270
 5. DISCUSION	 311
 5.1. COLONIZACION FUNGICA DE LAS LENTES DE CONTACTO HIDROFILICAS PROCEDENTES DE USUARIOS	 311
5.1.1. FACTORES RELACIONADOS CON EL USUARIO	320
5.1.2. FACTORES RELACIONADOS CON LA LENTE	324
5.1.3. FACTORES RELACIONADOS CON EL SISTEMA DE MANTENIMIENTO	326
5.1.4. FACTORES RELACIONADOS CON EL HONGO	328
 5.2. COLONIZACION FUNGICA DE LAS LENTES DE CONTACTO NUEVAS	 331
5.2.1. INFLUENCIA DEL HONGO	332
5.2.2. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO	336
Medio de cultivo	336
Periodo de incubación	342
Lugar de incubación	345
5.2.3. INFLUENCIA DEL TIPO DE MATERIAL DE LAS LENTES	346
 5.3. ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LAS LENTES DE CONTACTO HIDROFILICAS	 354

5.4. ANALISIS DE LAS LENTES DE CONTACTO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL	360
6. CONCLUSIONES	369
7. BIBLIOGRAFIA	375

PREFACIO

PREFACIO

Los estudios que han servido de base para la realización de la presente memoria se han llevado a cabo en el Departament d'Òptica i Optometria de la Universitat Politècnica de Catalunya. La temàtica abordada queda encuadrada dentro de la línea de investigación de Contactología y Microbiología Aplicadas dedicada, por una parte, al estudio de las respuestas oculares y visuales con lentes de contacto. Por otro lado, se destina al reconocimiento y cuantificación de contaminantes químicos y biológicos de diferentes polímeros, principalmente los que constituyen las lentes de contacto, así como a la evaluación de los sistemas de mantenimiento y aseptización de las mismas.

La realización del presente estudio ha sido posible gracias al apoyo eficaz y desinteresado que he recibido de diversas personas. Creo que cualquier acción de un individuo es fruto, no sólo de su propio esfuerzo, sino también de la interacción con otras personas. Por este motivo, antes de proceder a la exposición detallada del trabajo realizado, deseo dejar constancia de mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que, de una forma u otra, han contribuido a que la presente memoria sea una realidad.

Al Dr. Josep M^a Torres-Rodríguez del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona (IMIM), director de este trabajo, por la confianza demostrada en mí, así como por sus consejos y su interés.

A mis amigos del despacho, Sara Lluch, M^a Dolores Merindano, Jordi Morató y Xavi Rocabayera con los que he compartido momentos buenos y no tan buenos. Les agradezco que hayan soportado estoicamente y sin haberme maldecido en exceso, los particulares aromas procedentes de los cultivos y de los procesos de esterilización con los que me vi obligada a martirizarles.

A Gilberto Dalesio, Javier García y Bernat Sánchez de Alcon-Cusí por proporcionarme una gran parte de las lentes de contacto para identificar los depósitos presentes. Asimismo, a todas las empresas y laboratorios (principalmente Conóptica, Ciba Visión, Baush & Lomb y Barnes Hind) que gentilmente han colaborado facilitando, de forma gratuita, las lentes nuevas con las que he llevado a cabo los estudios de colonización.

A la Dra. M^a Àngels Calvo de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona por dedicar parte de su tiempo a identificar taxonómicamente aquellos hongos que se me resistían.

A los Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona por la ayuda recibida en el tratamiento y observación de las lentes de contacto con microscopía electrónica de barrido y especialmente a Susana Castel que me ha

explicado los fundamentos de la microscopía confocal.

A la Dra. M^a José Figueras del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili (Reus) por todo lo que me ha enseñado sobre microscopía electrónica, por la confianza demostrada en mí y por ser casi tan "tozuda" como yo.

A mis amigos del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Politècnica de Catalunya, especialmente al Dr. Sebastián Muñoz Guerra y a Antxón Martínez de Ilarduya, por la ayuda brindada en la caracterización química de los polímeros de las lentes de contacto empleadas en el estudio.

A Jaume Pujol, actual director del Departament d'Òptica i Optometria de la Universitat Politècnica de Catalunya y a Ferran Laguarda, su antecesor en el cargo, por el apoyo prestado y por las horas que hemos pasado resolviendo temas relacionados con la dirección del departamento y que me han permitido dejar de respirar conidios transitoriamente.

Al resto de amigos y compañeros del Departament d'Òptica i Optometria, especialmente a Carmen Blasi porque, a pesar de que su estado de ánimo no fuera el óptimo, siempre me ha brindado su ayuda y se la he tomado.

A mis padres por haberme alentado siempre en mi trabajo, no escatimando esfuerzos de todo tipo para que pudiese dedicarme por entero a mi vocación y por creer que soy la mejor hija que tienen.

A todas aquellas personas que quiero y que me han brindado su ayuda. En particular, a Joaquín, Josefina, Montse, Mariona, Carmen, Amalia, Iago, Anna, Pol i Júlia, por contribuir a que me olvidara de lo duro que, en muchos momentos, es hacer una tesis. A Maria y Guillem por nuestras cenas acompañadas de conversaciones científicas relacionadas "amb els fongs i les baietes". Asimismo, agradezco a M^a José su colaboración desinteresada.

Un reconocimiento muy especial a Jacint, al cual le agradezco que exista. Su presencia o solamente su recuerdo han supuesto para mí una fuerte dosis de moral para llevar adelante el trabajo planteado. Con muchísimo cariño, gracias.

*La presente memoria se ha estructurado en **siete capítulos** subdivididos en un número variable de apartados.*

El primero capítulo incluye una introducción en la que se consideran los aspectos generales relacionados con la colonización fúngica de las lentes de contacto. Posteriormente, se especifican las consideraciones más relevantes sobre los materiales de las lentes de contacto utilizadas, ya que constituyen el sustrato a colonizar por los hongos. Seguidamente, se expone una revisión bibliográfica efectuada sobre los factores que conducen a la adhesión de microorganismos a superficies y, en especial, de los hongos. Se ha considerado interesante incluir dicho apartado por ser éste el primer proceso necesario para su colonización y sobre el cual existen todavía innumerables incógnitas. Asimismo, se ha creído oportuno efectuar al final del capítulo una descripción de los orígenes, principios ópticos, ventajas y limitaciones de utilización de la microscopía confocal, por la novedad que supone su utilización para observar muestras colonizadas por hongos.

El segundo capítulo se destina a la justificación del estudio realizado y se indican, asimismo, los objetivos que se pretenden conseguir con la realización del mismo.

En el tercer capítulo se describe la metodología utilizada en la identificación taxonómica de los hongos invasores de las lentes de contacto hidrofílicas utilizadas previamente por los usuarios para intentar conocer su etiología. También se expone el método experimental empleado en provocar la colonización de lentes nuevas hidrofílicas y rígidas permeables a los gases por levaduras y hongos filamentosos y el llevado a cabo para la observación de las

lentes y del micelio invasor con métodos invasivos (microscopía electrónica) y no invasivos (microscopía óptica convencional y confocal). Al final de dicho capítulo se exponen los métodos de análisis estadístico utilizados en el estudio de ambos grupos de lentes.

El cuarto de los capítulos se destina a la exposición de los resultados obtenidos en los diferentes apartados después de aplicar la metodología correspondiente y de realizar el análisis estadístico de los datos en aquellos apartados que ha podido llevarse a cabo. Asimismo, contempla dos anexos iconográficos que aparecen al final de cada uno de los principales apartados establecidos, es decir, las lentes de contacto procedentes de usuarios y las nuevas a las que se provocó la colonización por hongos. Recogen fotomicrografías obtenidas con microscopía óptica convencional, microscopía electrónica y microscopía confocal.

En el quinto capítulo se procede a la discusión de dichos resultados y siempre que sea posible, a efectuar comentarios sobre los mismos, apoyando o rebatiendo los resultados publicados en la bibliografía sobre estudios efectuados con anterioridad por otros investigadores.

En el capítulo sexto se indican las principales conclusiones extraídas de la realización del trabajo de investigación, en base a los objetivos propuestos.

El último capítulo comprende las referencias bibliográficas, ordenadas alfabéticamente, utilizadas e indicadas en la memoria, omitiéndose otras citas que, si bien aludían de un modo u otro a aspectos concretos, no se han reflejado en la misma.

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

Los hongos son un grupo de microorganismos eucariotas, mayoritariamente terrestres, que presentan un importante papel en la naturaleza como mineralizadores de la materia orgánica. Asimismo, son capaces de degradar una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos. A pesar de que son menos importantes como patógenos humanos que las bacterias y virus, hay varias especies que se describen como parásitos del hombre o como patógenos oportunistas. En este sentido, las primeras referencias bibliográficas que señalan la presencia de hongos en la conjuntiva y la aparición de queratitis micóticas, sin utilización de lentes de contacto, datan de los años cincuenta y continúan de manera ininterrumpida en las siguientes décadas (Haggarty & Zimmerman 1958; Manchester Jr & Georg 1959; Gingrich 1962; Kaufman & Wood 1965; Nema et al. 1966; Naumann et al. 1967; Williamson et al. 1968; Wilson et al. 1969; Segal et al. 1974; Azar et al. 1975; Krachmer et al. 1978; O'Day et al. 1984; Parrish et al. 1987; Vajpayee et al. 1990; Zigelbaun et al. 1991; Thomas & Geraldine 1992; Rosa et al. 1994; Toulemont et al. 1994; Pagliarusco et al. 1995; Weissgold et al. 1996).

Por otro lado, los hongos también pueden estar presentes en los usuarios de lentes de contacto y, en este sentido, empiezan a publicarse en los años setenta los primeros datos relacionados con el crecimiento de hongos en lentes de contacto en usuarios que no presentaban alteraciones oculares en el segmento externo ocular (Bernstein 1973; Filippi et al. 1973; Shapiro 1974; Palmer et al. 1975; Sagan 1976; Berger & Streeten 1981; Liotet & Warnet 1981; Churner & Cunningham 1983; Simitzis-Le Flohic et al. 1986; Wilson & Ahearn 1986; De Gioia et al. 1987; Batellier et al. 1992).

No obstante, la presencia de hongos en las lentes también puede estar asociada a la aparición de queratopatías, generalmente de difícil solución (Adams et al. 1983; Bloomfield et al. 1984; Galentine et al. 1984; Weissman et al. 1984; Koidov-Tsiligani et al. 1989; Schein et al. 1989; Behrens-Baumann 1993; De Gottrau et al. 1993; Donnerfeld et al. 1996). No obstante, la incidencia no es

más elevada porque la superficie ocular está protegida contra la invasión de microorganismos por un conjunto de sustancias protectoras. Según Bron & Seal (1986) son la lisozima, la β -lisina, la lactoferrina, la transferrina, la ceruloplasmina, determinadas inmunoglobulinas y el complemento. No obstante, no debe olvidarse que numerosos hongos saprófitos son patógenos oportunistas y que en condiciones favorables pueden producir una infección local. Las queratitis infecciosas son un problema que puede ir asociado a portadores de lentes de contacto, especialmente de lentes terapéuticas. *Candida* es la levadura más comunmente aislada de este tipo de lentes en pacientes que toman antibióticos y corticoesteroides de uso tópico por causa de una patología corneal crónica (Wilhelmus et al. 1988; Carmichel et al. 1990).

Las micosis oculares más virulentas se desarrollan en personas que, normalmente o de forma temporal, sufren un traumatismo y/o presentan problemas de inmunodepresión. Predisponen a la infección las deficiencias de la película lagrimal, defectos en la función de los leucocitos neutrófilos y de los macrófagos, alteraciones de la respuesta inmune de las células, deficiencias en la producción de anticuerpos (especialmente de inmunoglobulina A), diabetes, alcoholismo, SIDA, etc. (Jones 1975).

La predisposición a la infección en portadores de lentes de contacto puede ser debida a alteraciones del epitelio corneal por falta de oxigenación. La disminución del flujo lagrimal provoca la reducción de la función limpiadora de la lágrima e incrementa la susceptibilidad de la córnea a las infecciones. En condiciones normales es difícil que los hongos permanezcan o proliferen en el saco conjuntival, ya que la barrera física y/o el mecanismo de defensa inmune del huésped lo protege. Evidencias en este sentido indican que las infecciones son más frecuentes en pacientes con actividad inmunitaria celular y humoral deprimida.

El avance conseguido en los últimos años por la contactología con la creación de nuevos materiales y diseños de lentes de contacto, ha provocado el incremento del número de usuarios. Como se expone en el apartado 1.1.1. de

la presente memoria, en la actualidad hay una gran diversidad de materiales empleados en la fabricación de las lentes de contacto. Entre otros factores, el tipo de material puede condicionar la colonización del polímero por parte del hongo y facilitar su crecimiento por la matriz. Por tanto, los diferentes materiales existentes en el mercado y, principalmente las lentes fabricadas con hidrogeles, están expuestas a un problema creciente en la práctica clínica diaria, la contaminación fúngica (Churner & Cunningham 1983; Wilson & Ahearn 1986).

Se ha descrito en la bibliografía una gran variedad de hongos contaminantes de lentes de contacto (véase apartado 5.1.), siendo frecuentes los representantes de los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Acremonium* y *Paecilomyces*, entre otros. (Krachmer et al. 1978; Liesegang & Forster 1980; Hurtado et al. 1995). Muchos de ellos han sido también aislados de úlceras corneales de sus usuarios.

El proceso de contaminación de una lente de contacto por un hongo comporta su **colonización** por parte del microorganismo, proceso que se define como la ocupación o invasión de un nuevo hábitat por parte de un ser vivo. Concretamente, la colonización fúngica de las lentes o de cualquier tipo de sustrato comporta la adhesión del microorganismo a su superficie y la posterior liberación de enzimas que degradarán los polímeros permitiendo, en ocasiones, la invasión y proliferación por la matriz (Wilhelmus et al. 1988).

Asimismo, las lentes de contacto colonizadas por hongos sufren un proceso de **biodeterioro**, palabra sin una definición clara que satisfaga a todos los investigadores. Generalmente, se lo describe como un proceso de descomposición química (fragmentación de cadenas) por acción enzimática de organismos. Una amplia variedad de ellos, incluidos insectos, pájaros, roedores, crustáceos, microorganismos y plantas superiores, actúan como agentes etiológicos. Su actividad altera materiales orgánicos o de origen orgánico, así como sustratos inorgánicos (Carlile & Watkinson 1994). Pueden interferir también en los procesos de fabricación, alterando las emulsiones industriales, disminuyendo la eficacia de la maquinaria o siendo responsable del mal

funcionamiento y bloqueo de los aparatos (Smith & Pateman 1977). El biodeterioro existe porque la vida es un proceso cíclico en el cual los organismos vivos desempeñan diferentes papeles y, en ocasiones, actúan en detrimento de la economía humana. No obstante, estos procesos llevados a cabo por los organismos citados pueden ser aprovechados por el hombre para solucionar problemas de eliminación de desperdicios o para el reciclaje de materiales. En este caso, se habla de **biodegradación**.

Los hongos son importantes agentes de biodeterioro y biodegradación de diferentes tipos de materiales. Estos procesos tienen lugar cuando los nutrientes y las condiciones macroclimáticas que influyen en el crecimiento (temperatura, humedad, pH, aireación, etc.) así como las microclimáticas del sustrato son adecuadas para el microorganismo (Thomas 1977). La frecuente implicación de los hongos en los procesos de biodegradación se debe a su papel saprofítico y su habilidad para utilizar una amplia gama de sustratos en una gran variedad de nichos ecológicos.

El biodeterioro pueden ser mecánico cuando se produce un simple ataque físico del material. El de tipo químico (Hueck 1965) está relacionado con la utilización del sustrato y con las alteraciones provocadas por los productos metabólicos formados después de su asimilación (ácidos orgánicos corrosivos, pigmentos o micotoxinas). La reacción química más frecuente en el biodeterioro y en la biodegradación es la hidrólisis catalizada por diferentes hidrolasas. Finalmente, puede existir biodeterioro de un material por la mera presencia de los hongos que lo utilizan como soporte, pero que no se nutren de él sino de los contaminantes existentes en su superficie. En cualquier caso, los microorganismos deben tener la facultad de entrar en íntimo contacto con el material a degradar.

El biodeterioro ocurre en todos los lugares, pero es especialmente importante en los trópicos donde el calor y la humedad favorecen el crecimiento fúngico. En estas mismas zonas, los hongos pueden destruir libros y obras de arte, elementos y piezas de aviones, así como tanques de queroseno utilizado como

combustible (Miura et al. 1977) y atacar las lentes de cámaras fotográficas, binoculares y microscopios; el adhesivo utilizado para unir las lentes facilita el crecimiento de los microorganismos, cuyas hifas se extienden por la superficie o por su interior, grabándolas con metabolitos ácidos. Los ejemplos citados son sólo una muestra de la variada actividad destructora de los hongos. En ocasiones, el biodeterioro provocado por hongos puede ser prevenido controlando, entre otros parámetros, la disponibilidad de agua y de oxígeno del medio o utilizando fungicidas.

La colonización de las lentes por parte de los hongos también conlleva su biodeterioro. En primer lugar, comporta su adhesión a la superficie y posteriormente la secreción de enzimas hidrolíticos que despolimerizarán los materiales hidrofílicos, permitiendo la proliferación por la matriz, es decir, la invasión. Las causas de la colonización de las lentes por hongos pueden ser diversas y serán comentadas en el apartado 5.1. de la presente memoria.

1.1. LENTES DE CONTACTO

El desarrollo de las investigaciones sobre las lentes de contacto ha estado condicionado, en gran medida, por la necesidad de sintetizar materiales que proporcionen suficiente oxígeno a la córnea. No obstante, una elevada transmisibilidad de oxígeno requiere una alta humectabilidad, características que han de ir asociadas con una gran resistencia a los depósitos, durabilidad y estabilidad (Lippman 1990). El proceso de evaluación que puede hacerse sobre cada uno de los materiales existentes en la actualidad es limitado, ya que existe mucha dificultad en obtener las fórmulas químicas completas. Cabe indicar que éstas, normalmente, no están disponibles al ser celosamente protegidas por su propietario.

En la actualidad hay una gran variedad de materiales de lentes de contacto y de posibilidades de uso de las mismas. Atendiendo a estos aspectos, se exponen seguidamente ciertas consideraciones en relación a los distintos tipos de lentes de contacto.

1.1.1. MATERIALES DE LAS LENTES DE CONTACTO

Las primeras lentes de contacto que se fabricaron en el siglo XIX fueron de vidrio, dadas las buenas propiedades ópticas de este complejo polímero inorgánico. Hasta 1948 las lentes de contacto que más se emplearon fueron las esclerales, fabricadas mediante el soplado de vidrio y siendo posteriormente talladas y pulidas. Simultáneamente, se fabricaron lentes corneales de vidrio bajo la dirección de la casa Zeiss aunque, debido al peso y las irregularidades de su superficie, no tuvieron éxito y se incrementó la demanda de las lentes esclerales.

Las lentes de contacto actuales son polímeros orgánicos, es decir, macromoléculas constituidas por uniones químicas covalentes entre uno o más tipos de unidades repetitivas de bajo peso molecular (monómeros). Las propiedades particulares de cada macromolécula emanan de la composición y ordenación de los monómeros. Así, según la proporción de enlaces o puentes entre las cadenas, se obtienen materiales con propiedades elásticas, plásticas o con la misma consistencia que el vidrio (Navarro et al. 1989).

La polimerización conduce a la formación del polímero. En ella las macromoléculas se forman por unión de monómeros no saturados con apertura de su doble enlace y sin que se separen moléculas sencillas en el proceso.

Atendiendo a la forma de la macromolécula originada, se pueden dividir los polímeros en:

- * Macromoléculas lineales. Son largas cadenas no ramificadas, ordenadas de

forma prácticamente paralela, o constituyendo una especie de ovillo más o menos compacto.

- * Macromoléculas ramificadas. Son polímeros en los que la cadena principal presenta una serie de ramificaciones laterales.
- * Macromoléculas reticuladas o entrecruzadas. En su constitución aparecen macromoléculas con cadenas y ramificaciones entrelazadas en las tres direcciones del espacio. De esta manera es posible que el polímero formado sea una especie de red tridimensional.

El desarrollo de la industria química ha conducido a la síntesis de una amplia variedad de materiales utilizados en la fabricación de lentes de contacto. Son principalmente acrílicos, poliamidas, derivados celulósicos, policarbonatos, siliconas, etc. (Bürki 1989). Estos polímeros orgánicos han generado los dos grandes grupos de lentes de contacto que actualmente existen en el mercado: las rígidas (o duras) y las hidrofílicas (o blandas). No obstante, hasta el momento, no se ha encontrado un material que reúna todas las propiedades físicas y químicas óptimas, es decir, un polímero que sea hidrofílico, posea una permeabilidad al oxígeno suficiente, tenga una buena humectabilidad y una mínima formación de depósitos orgánicos y/o inorgánicos en su superficie.

1.1.1.1. LENTES RIGIDAS

En 1936 se inició el uso del metacrilato de metilo (MMA) como material idóneo para fabricar prótesis oculares y lentes corneales, utilizado en forma de poli(metacrilato de metilo) (PMMA). El verdadero inicio de la fabricación de lentes de contacto corneales con MMA tuvo lugar en 1948, año a partir del cual la industria de las lentes de contacto inicia un importante auge. Su empleo como un sistema óptico más para neutralizar ametropías irrumpió con fuerza y hasta la actualidad los materiales, la forma y el tamaño de las lentes han sido

altamente variables (Saona 1989).

El PMMA es inerte a los tejidos oculares, ligero de peso, muy transparente, rígido, poco flexible y fácil de limpiar. Su absorción de agua es mínima y se rompe y raya fácilmente. La pobre resistencia al rayado es un inconveniente en la utilización de las lentes, ya que hay una tendencia a la acumulación de suciedad, grasa, etc., hecho que impide su correcta humectación. No obstante, el inconveniente más grave que tiene el material es su baja permeabilidad al oxígeno (Jacob 1985).

Como se acaba de indicar, el PMMA tiene algunas propiedades ideales para ser utilizado como material de lentes de contacto. Entre ellas cabe destacar, las buenas propiedades ópticas, durabilidad, estabilidad dimensional, resistencia, dureza, humectabilidad, biocompatibilidad, reducida capacidad de adsorción de proteínas y otros componentes lagrimales, facilidad de fabricación y bajo coste. No obstante, su baja permeabilidad al oxígeno limita su uso. Debido a ello, ya en los años setenta se empezó a pensar en la síntesis de un material rígido que presentara esta característica y, por tanto, proporcionara mayor comodidad a sus usuarios. Este es el caso del acetato butirato de celulosa (CAB) patentado por Ivani en 1975, aunque la primera lente sintetizada con este material se debió a Stahl en 1974. Sin embargo, su relativa dureza determina que muestre más predisposición a deformarse y a rayarse que el PMMA, al mismo tiempo que presenta una mayor tendencia al incremento de la acumulación de depósitos (Lippman 1990).

La silicona también forma parte de los materiales rígidos permeables a los gases. Al igual que el CAB, tampoco forma una barrera al oxígeno, pero las lentes poseen serias limitaciones, incluyendo un grado de hidrofobicidad poco adecuado, ya que los monómeros que lo constituyen poseen dicha característica. Este hecho comporta que interactúe con componentes lagrimales insolubles y con los conservantes de algunas soluciones de mantenimiento. Las lentes son altamente lipofílicas, lo cual conduce al acúmulo de lípidos en su superficie.

Se efectuaron modificaciones de este material para aumentar la humectabilidad, siendo los acrilatos de silicona (también denominados acrilatos de siloxano) los más utilizados. En ellos se sustituyen átomos de hidrógeno por átomos de flúor, lo que origina la formación de los acrilatos de flúorsilicona. En general, son inertes, hidrofóbicos y lubricantes. Su propiedad más importante es la elevada permeabilidad al oxígeno, hecho que condiciona una mejor nutrición de la córnea, así como un incremento de la humectabilidad de la lente y una disminución de la formación de depósitos. Estos polímeros se asocian con pequeñas cantidades de MMA para aumentar la rigidez y con N-vinilpirrolidona (NVP) o ácido metacrílico (MA) para incrementar la humectabilidad (Navarro et al. 1989).

1.1.1.2. LENTES HIDROFILICAS

Las primeras lentes de contacto hidrofílicas (comúnmente denominadas lentes blandas) aparecieron a principios de la década de los 70 como fruto de las investigaciones pioneras de Otto Wichterle y sus colaboradores, referentes a la transformación del PMMA en una sustancia hidrofílica. En 1964, BAUSCH & LOMB introdujo por primera vez en Estados Unidos el poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA) para fabricar lentes de contacto blandas, mediante la técnica de moldeado por centrifugación procedente de Checoslovaquia. En 1967, se desarrolló en Estados Unidos una segunda técnica de fabricación de lentes de contacto blandas denominada torneado. Estas primeras lentes blandas torneadas tenían un contenido acuoso del 55%. Se trató de un polímero de bionita compuesto por el monómero metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y dos copolímeros. Dicho hallazgo condujo a la producción de uno de los materiales más significativos en contactología, el PHEMA (Saona 1989).

Las lentes de contacto hidrofílicas están fabricadas con unos materiales poliméricos denominados hidrogeles o geles. Son una amplia familia de polímeros con la propiedad común, que les diferencia de los demás, de poder

absorber cantidades variables de agua comprendidas entre el 5 y el 90 %. Los hidrogeles de mayor interés son los derivados de polímeros y copolímeros de ésteres metacrílicos que contienen, como mínimo, un grupo hidroxilo en la cadena lateral. Desde un punto de vista óptico, un hidrogel es un material rígido que en contacto con el agua se hidrata y se convierte en flexible (Gil del Río y Baronet 1980).

El PHEMA es un polímero hidrofílico que se obtiene por polimerización del HEMA con determinados copolímeros y que se entrecruza con pequeñas proporciones de dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), agente reticulante que proporciona la estructura tridimensional. La cantidad del monómero reticulante, así como el tipo de copolímero, condicionarán el contenido hídrico final del material. Se consideran copolímeros aquellos monómeros que se adicionan al HEMA para obtener unas propiedades que no se consiguen cuando el polímero está formado sólo por HEMA. La mayoría de los materiales usados en la fabricación de las lentes de contacto se copolimerizan con monómeros más hidrofóbicos que el HEMA con el objetivo de aumentar su dureza, aunque se pierde flexibilidad y permeabilidad al oxígeno (Navarro et al. 1989).

Los monómeros más usados para la fabricación de hidrogeles son:

- * Metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA)
- * Metacrilato de 2-etoxietilo (EOEMA)
- * Metacrilato de 2,3-hidroxipropilo (DHPMA)
- * Metacrilato de metilo (MMA)
- * Metacrilato de glicerilo (GMA)
- * Dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA)
- * Acido acrílico (AA)
- * Acido metacrílico (MA)
- * Diacetona acrilamida (DAA)
- * N-vinilpirrolidona (NVP)

La mayoría de ellos son hidrofílicos y confieren al polímero un incremento

de su hidratación y por tanto, de humectabilidad. El MA es un monómero iónico y con carga negativa a pH fisiológico. Su adición a la formulación de un polímero da como resultado una lente de contacto de las denominadas iónicas, es decir, con grupos iónicos (carga negativa) en su superficie. Esta adición produce un aumento en el contenido en agua de la lente y en contrapartida, favorece la acumulación de depósitos en su superficie, especialmente de proteínas lagrimales con carga positiva, como la lisozima.

Los polímeros no iónicos son compuestos resultantes de la asociación de moléculas no ionizables. Monómeros no iónicos como el HEMA, GMA, NVP y DAA tienen una baja carga negativa. Los materiales no iónicos de baja hidrofilia generalmente están compuestos por HEMA unido a un solo tipo de monómero, (NVP, GMA, MMA, etc.), y su contenido en agua varía entre el 38 y 45%. Dicho monómero se incorpora al HEMA para conferirle dureza, resistencia mecánica, humectabilidad, etc. No obstante, existen polímeros no iónicos que no poseen HEMA.

Por su parte, los materiales no iónicos de alta hidrofilia están constituidos por HEMA asociado a pares de monómeros como es el caso de NVP, MA, DAA y AA. La unión de ellos con un agente reticulante genera un polímero cuyo grado de hidrofilia oscila entre el 50 y el 90%.

La propiedad que poseen ciertos materiales plásticos de absorber agua depende del balance hidrofóbico/hidrofílico y de la polaridad de ciertos grupos que posea el material. Como es sabido, el contenido en agua de una lente hidrofílica afecta a la cantidad de oxígeno disuelto en ella, de manera que a mayor contenido en agua de la lente, mayor será la cantidad de oxígeno que logre transmitir a la córnea. La permeabilidad al oxígeno y los coeficientes de difusión del mismo gas dependen del tipo de hidrogel, de su grado de entrecruzamiento y en consecuencia, del contenido en agua. De otro lado, la permeabilidad de los polímeros que contienen un sólo tipo de grupos ácido o básico, es menor que cuando contienen varios de estos grupos.

La Food & Drug Administration (FDA) clasifica las lentes hidrofílicas en cuatro grupos, según su carácter iónico y su contenido hídrico (tabla 1):

- Grupo I. Lentes no iónicas y de bajo contenido hídrico (hasta un 50%).
- Grupo II. Lentes no iónicas y de elevado contenido hídrico (mayor del 50%).
- Grupo III. Lentes iónicas y de bajo contenido hídrico (hasta un 50%).
- Grupo IV. Lentes iónicas y de elevado contenido hídrico (mayor del 50%).

Tabla 1.- Clasificación de los principales polímeros hidrofílicos en relación con los cuatro grupos establecidos por la FDA (White & Scott 1993).

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
POLIMEROS NO IONICOS		POLIMEROS IONICOS	
CONTENIDO HIDRICO <50%	CONTENIDO HIDRICO >50%	CONTENIDO HIDRICO <50%	CONTENIDO HIDRICO >50%
tefilcon	lidofilcon B	butilcon A	butilcon A
tetrafilcon A	surfilcon	detafilcon A	perfilcon
hefilcon A&B	lidofilcon A	phemfilcon A	ocufilcon B&C
isofilcon	scafilcon A	droxilfilcon A	etafilcon A
polymacon			metafilcon
crofilcon			vifilcon A

Un material puede ser de elevada permeabilidad al oxígeno aunque sea

hidrofóbico (lentes rígidas), ya que la superficie puede haber sido tratada para presentar la máxima hidrofilia posible y aumentar su humectabilidad. Según lo expuesto, la transmisibilidad al oxígeno de un polímero aumenta con el porcentaje de hidratación del material, pero también con su grosor. La transmisibilidad a dicho gas se incrementa de forma lineal con la disminución del espesor y exponencialmente al aumentar la hidratación (Phillips & Stone 1989).

Aunque las ventajas de las lentes de alta hidratación para la fisiología ocular son notables, la aceptación de estas lentes para uso diario está muy limitada por una serie de desventajas: mayor incidencia de depósitos, costes más elevados, menor duración, problemas de reproductibilidad y coloración de las lentes.

La estabilidad dimensional de un material es la capacidad que posee de mantener las dimensiones originales de curvatura y diámetro. Las causas de su cambio dimensional son debidas a variaciones de la temperatura, del pH y a la pérdida de agua por evaporación. En este sentido, se produce un incremento de la deshidratación a pH ácido.

1.1.2. LENES DE CONTACTO SEGUN SU USO

Actualmente, las lentes de contacto pueden permanecer en el ojo un número variable de días y ser sometidas o no, a los procesos de limpieza y desinfección. Por ello surgen los conceptos de lentes de uso diario, de uso continuado y lentes desechables.

1.1.2.1. LENTES DE USO CONTINUADO

Las lentes de uso continuado se definen como unas lentes que permanecen en el ojo incluso cuando se duerme, durante periodos de tiempo que pueden ir

desde unos días hasta meses (Rosenthal 1985; Phillips & Stone 1989). El término continuado o prolongado es preferible al término permanente, ya que éste último significa que no hay que quitarlas del ojo para nada y no es explícito (Biri 1985).

Estas lentes presentan un gran atractivo para los pacientes puesto que representan una alternativa al uso de sus gafas, al proporcionar una corrección óptica en todo momento, sin tener que estar supeditado a la limpieza y al cuidado de sus lentes.

Según Hales (1980), el material ideal para las lentes de uso continuado ha de cumplir las siguientes características:

- * No debe interferir en los requerimientos nutritivos del ojo.
- * Debe ser permeable a los gases.
- * Debe ser fácil de manipular.
- * Debe proporcionar una visión correcta.
- * Debe ser resistente a los depósitos.
- * Debe ser confortable.
- * No debe alterar la flora conjuntival.

En la actualidad, existe un gran número de materiales para lentes de contacto que cumplen estos requisitos y que, por lo tanto, pueden adaptarse al uso continuado.

Los requerimientos para el uso de las lentes de manera continuada son más explícitos que para las lentes de uso diario, puesto que permanecen en el ojo durante periodos largos de tiempo, incluyendo aquellos en los que el ojo está cerrado y el aporte de oxígeno a la córnea es mínimo. A pesar de ello, hay pacientes que necesitan de este tipo de lentes de uso continuado, bien sea por su incapacidad de manejo de las mismas o por requerirse para usos terapéuticos.

Las lentes desechables tienen una gran aceptación como lentes de uso continuado y uso flexible (Weinstock 1980). El uso flexible se refiere al hecho de que estas lentes se quitan por la noche y se conservan en una solución salina, por lo tanto, no se duerme con ellas y no se puede hablar así de uso continuado.

El tiempo aconsejado para este tipo de lentes de uso continuado desechables es de una semana, con descanso de una noche. La lente permanece en el ojo durante 7 días. En la séptima noche se extrae, se tira y se duerme sin ella. No obstante, algunos especialistas consideran que el esquema desechable proporciona mayor seguridad si se quitan las lentes para tirarlas después de 14 días de uso (Weinstock 1980).

Este tipo de lentes está manifestando un importante incremento del número de usuarios. Su coste reducido así como la eliminación de los líquidos de conservación y de las pastillas enzimáticas predisponen a su elección. El sistema de lentes desechables no soluciona todos los problemas asociados al uso de lentes de contacto, posiblemente minimiza algunos, pero genera otros nuevos.

Según Ruben & Khoo (1989) las lentes de uso continuado pueden provocar complicaciones oculares como conjuntivitis con secreción, síndrome de ojo seco, queratitis punteada superficial, erosiones e infiltrados corneales, infecciones y vascularización. Por otra parte, los problemas más comunes de las lentes están relacionados con su fácil rotura debido a su reducido espesor, caída y pérdida, decoloración y aparición de depósitos.

En un principio, podría parecer que la escasa o nula manipulación de las lentes de uso continuado reduciría la aparición de depósitos fúngicos y, por tanto, la infección. No obstante, los periodos sin desinfección, especialmente si son largos, podrían aumentar el riesgo de queratitis infecciosa. Se ha comprobado que la incidencia de procesos infecciosos en portadores de este tipo de lentes es muy elevada. Estudios epidemiológicos llevados a cabo por Schein et al. (1989), asocian el incremento de riesgo de queratitis ulcerativas asociadas a la utilización de lentes de contacto blandas de uso continuado.

Otro tipo de lentes de contacto de uso continuado son las lentes terapéuticas. Principalmente, sirven de vendaje en patologías del segmento externo ocular, proporcionan un aporte de medicamentos al ojo y son una ayuda visual al mismo tiempo. Están indicadas en casos de defectos epiteliales, córneas irregulares, casos de edemas corneales, ojos secos, pacientes que presentan parálisis del VII par craneal, casos de triquiasis, afaquias, etc.

Estas lentes presentan una serie de problemas debidos, en parte, a su uso continuado y en parte a las condiciones especiales del paciente al que han de ser adaptadas :

- * Depósitos proteicos y lipídicos en la superficie de la lente.
- * Invasiones fúngicas.
- * Mineralización.
- * Vascularizaciones corneales.
- * Queratoconjuntivitis.
- * Edemas corneales.

No obstante, el problema más común es la adsorción de lípidos y proteínas sobre la lente. Este hecho provoca todas las demás complicaciones, al no ser extraída la lente en un periodo largo de tiempo y no poder proceder a su limpieza.

1.1.2.2. LENTES DE USO DIARIO

Son aquellas que se quitan del ojo cada día después de su utilización (Rosenthal 1985). En general, se someten a los procesos de limpieza y desinfección correspondientes, por tanto, las lentes de uso diario se consideran no desechables. Son las primeras que se fabricaron y las que utiliza en la actualidad un mayor número de usuarios.

Una de las principales alternativas que existen actualmente en el terreno de las lentes hidrofílicas son las lentes desechables. Gran parte de las ventajas que ofrece este sistema se basa en la continua reposición. Materiales y parámetros utilizados influyen directamente en la satisfactoria respuesta fisiológica que proporcionan las lentes de usar y tirar. Las alternativas disponibles de este tipo de lentes son una alta y una baja hidratación unida a espesores mínimos y diversidad en la ionicidad de los materiales. Se utilizan principalmente como lentes de uso continuado.

1.2. ADHESION DE MICROORGANISMOS A SUPERFICIES

La adhesión de microorganismos juega un papel determinante en la colonización de plantas, animales y polímeros de distinta naturaleza, así como en la patogénesis de las infecciones microbianas. Los microorganismos pueden adherirse a una gran variedad de superficies entre las que se incluyen los biomateriales (Jacques et al. 1986; Pascual et al. 1986; Jacques & Costerton 1987; Ruggieri et al. 1987; Pascual et al. 1988; Reid et al. 1988); las lentes de contacto (Minagi et al. 1986; Pringle & Fletcher 1988; Klotz et al. 1989); los vegetales (Vesper et al. 1987; de Maagd et al. 1989); las partículas minerales (Parker & Munn 1984; Stenstrom & Kjelleberg 1985; Stenstrom 1989); el azufre elemental (Bryant et al. 1984); la cutícula de insectos (Cirigliano & Carman, 1984), etc.

En general, los estudios efectuados hasta el momento sobre adhesión bacteriana a diferentes superficies son muy numerosos. Comparativamente con éstos, cabe considerar escasos los trabajos publicados referentes a los mecanismos de adhesión de hongos a diversos sustratos. Como se comentará posteriormente, el género *Candida* y concretamente *C. albicans* es uno de los hongos más estudiados, posiblemente por su relación con patologías en pacientes inmunosuprimidos.

En el presente apartado se efectúa una revisión de los conceptos básicos sobre la adhesión de microorganismos a diferentes materiales. Concretamente se citan los antecedentes históricos más relevantes que hacen referencia a la hidrofobicidad y la adhesión celular y se analiza la relación existente entre dicho parámetro y las propiedades hidrofóbicas de la superficie celular y de los polímeros colonizados. Asimismo, se comentan los mecanismos de adhesión a diferentes superficies y la importancia de las condiciones de cultivo en la hidrofobicidad celular y en la adhesión. Por último, se hace referencia a los principales resultados publicados sobre adhesión fúngica, sin considerar la importancia de este fenómeno en los procesos micóticos que afectan al hombre.

En relación al tema que nos ocupa, existen varios términos utilizados a veces como sinónimos pero que presentan diferencias conceptuales. La **adsorción** es la acumulación de moléculas o de células sobre un sustrato o interfase. Es un proceso bidimensional que puede ser físico o químico. La adsorción física es reversible y está relacionada con la presencia de fuerzas físicas (van der Waals, puentes de hidrógeno, etc.). La especificidad entre las dos superficies es muy baja. Por su parte, la adsorción química es generalmente irreversible y se caracteriza por interacciones químicas más potentes (enlaces iónicos o covalentes). Muestra, en general, una alta especificidad entre la partícula adsorbida y la superficie. La adsorción química entre la superficie celular y un sustrato se denomina también **adhesión** y se refiere a una adsorción más o menos irreversible mediada, a menudo, por un polímero extracelular. El término **adherencia** se ha utilizado a veces en la presente memoria como sinónimo de adhesión porque así figura en la bibliografía en lengua castellana. No obstante, procede puntualizar que está aceptado por pocos investigadores y no aparece en la literatura anglosajona (Characklis & Marshall 1990).

1.2.1. HIDROFOBICIDAD Y ADHESIÓN

Durante los últimos años, en numerosos estudios se ha relacionado la

hidrofobicidad de la superficie celular con los fenómenos de adhesión a diferentes materiales. De hecho, el conocimiento de las propiedades hidrofóbicas superficiales de las células puede facilitar la manipulación de los microorganismos, adhiriéndolos o eliminándolos de los mismos.

El interés por el estudio de la hidrofobicidad microbiana se inició cuando Mudd & Mudd (1924) observaron el comportamiento de determinadas bacterias en la interfase aceite-agua. Reed & Rice (1931) demostraron cuantitativamente que microorganismos no humectables (micobacterias) podían pasar desde la fase acuosa hasta la oleosa. En las décadas siguientes los estudios sobre hidrofobicidad fueron muy esporádicos. Dyar & Ordal (1946), Dyar (1948), Hill et al. (1963) y Hogg & Old (1987) propusieron que los lípidos superficiales de *Staphylococcus* y *Streptococcus* actuaban como hidrofobinas. La relación entre el efecto hidrofóbico y la agregación de *Corynebacterium xerosis* fue analizada por Stanley & Ros (1967).

En los años setenta el interés por la hidrofobicidad microbiana siguió distintas direcciones. Así, van Oss & Gillman (1972), Cunningham et al. (1975) y van Oss (1978) evaluaron el papel que desempeña en la patogenicidad, tomando como medida el ángulo de contacto. El efecto de las interacciones hidrofóbicas en la adhesión bacteriana al poliestireno y otros polímeros no humectables fue analizado principalmente por Fletcher (Fletcher 1976; Fletcher & Loeb 1979; Fletcher & Pringle 1983; Pringle & Fletcher 1983, 1988). Durante la misma década prestaron especial atención a la oxidación microbiana de los productos lipídicos, inicialmente como fuente potencial de proteínas y, por tanto, como posible mecanismo de limpieza del medio ambiente.

A finales de los setenta y principios de los ochenta, diversas técnicas sobre hidrofobicidad fueron introducidas por investigadores escandinavos (Magnusson & Johansson 1977; Smyth et al. 1978; Kjelleberg et al. 1980; Lindahl et al. 1981; Abbot & Hayes 1984). Iimura et al. (1980) relacionaron la hidrofobicidad de la superficie celular de *Saccharomyces* con la posibilidad de formar películas celulares. En el mismo año, Rosenberg et al. contemplan la adhesión bacteriana

a hidrocarburos líquidos como un método sencillo para estudiar la hidrofobicidad celular superficial. En la misma década, se analizó una gran variedad de fenómenos que relacionaban la adhesión microbiana con las interacciones hidrofóbicas. Ejemplos en este sentido incluyen la adhesión bacteriana a superficies minerales (Parker & Munn 1984; Stenstrom & Kjelleberg 1985; Stenstrom 1989), a peces (Burchard 1986; Daly & Stevenson 1987; Sar & Rosenberg 1987; Bandin et al. 1989), a dispositivos anticonceptivos intrauterinos (Jacques et al. 1986; Jacques & Costerton 1987; Reid et al. 1988) y a bioprótesis (Galdiero et al. 1987). Una atención especial se prestó al papel potencial de la hidrofobicidad en relación a la adhesión de las bacterias orales a la superficie de los dientes (Doyle et al. 1982; Nesbitt et al. 1982 a; Nesbitt et al. 1982 b; Olsson & Westergren 1982; Weiss et al. 1982; Gibbons & Etherden 1983; Gibbons et al. 1983; Rosenberg et al. 1983; Westergren & Olsson 1983; About & Hayes 1984; Fives-Taylor & Thompson 1985; Morris et al. 1985; Oakley et al. 1985; Hogg & Manning 1987; Hogg & Old 1987; van der Mei et al. 1987; Jenkinson & Carter 1988; Koga et al. 1990), a la mucosa bucal (Rosenberg et al. 1983, 1989), así como a materiales de restauración de piezas dentarias por parte de *Candida* (Klotz et al. 1985; Satou et al. 1988). Las primeras evidencias directas que expresan que los microorganismos orales tienen superficies externas hidrofóbicas fueron publicadas en 1982 por Nesbitt et al., Olsson & Westergren, y Weiss et al. Investigaciones posteriores sobre la adhesión microbiana a tejidos con lectinas frecuentemente tendieron a descuidar la contribución potencial de los efectos hidrofóbicos. Posteriormente se pasa a una etapa en la que surgen diversas controversias en relación al alcance de los efectos hidrofóbicos como mediadores de la adhesión en la cavidad oral, en particular (Doyle et al. 1982; Busscher & Weerkamp 1987) y en la superficie de cualquier célula, en general (Harber et al. 1983; Nealon & Mattingly 1984; Runnels & Moon 1984; Nataro et al. 1985; Schiemann & Swanz 1985; Scott & Smyth 1987; Sherman et al. 1985; Drumm et al. 1989; Pal & Hale 1989).

El término "hidrofobicidad" de la superficie celular se entiende intuitivamente pero está definido de forma imprecisa. Este término significa literalmente "aversión al agua" y se ha usado principalmente para explicar la relativa

insolubilidad de sustancias no polares, su tendencia a agregarse en agua o la incapacidad de algunas sustancias a ser humectadas por este solvente.

Ben-Naim (1980) define la hidrofobicidad como un proceso de interacción, en el cual dos moléculas de soluto distantes se asocian. La energía libre que el proceso conlleva implica una fuerza directa entre las dos moléculas del soluto y una indirecta asociada con los cambios acaecidos en el disolvente, en este caso, el agua. La hidrofobicidad se ha explicado en términos cualitativos que sugieren que las moléculas interactuarán si sus características estructurales y químicas son similares. Los investigadores físico-químicos reconocen que las interacciones hidrofóbicas entre superficies dependen mayoritariamente de la propia agua. Cuando la porción apolar de una molécula queda inmersa en la fase acuosa está rodeada por capas estructuradas de agua. Estas moléculas de agua tienen un nivel de energía superior que las de la solución. Si se asume que la porción apolar es totalmente incapaz de interactuar con las moléculas de agua (por ejemplo, cuando la porción inmersa es una molécula de hidrocarburo), la energía requerida en introducir esta entidad hidrofóbica en la fase acuosa es semejante a la energía requerida para formar una "cavidad" en el agua, del tamaño del cuerpo sumergido (Arakawa et al. 1979; Bishop 1987). Las moléculas de agua próximas a la porción apolar asumen una configuración de alta energía. Cuando dos superficies apolares se aproximan, las moléculas de agua se comprimen y pueden ser liberadas a la fase acuosa más alejada de las dos superficies y, por tanto, con menor energía. Este proceso, energéticamente favorable, está asociado con un aumento de la entropía concomitante con una disminución del orden del sistema.

La teoría que explica la adhesión de los microorganismos a las superficies sólidas se basa en el concepto de la energía libre interfacial entendida como la fuerza que controla la adhesión celular (Andrade 1973). De acuerdo con ella, la adhesión se ve incrementada cuando la tensión interfacial (energía superficial libre) entre la partícula y el líquido es pequeña.

Se puede, por tanto, considerar que la adhesión está mediada, en primer

lugar, por interacciones hidrofóbicas con una disminución de las interfases energéticamente desfavorables. Desde este punto de vista, los microorganismos llamados hidrofóbicos no se adherirán a las superficies por enlaces energéticos, sino más bien por exclusión de la fase acuosa. Según Duncan-Hewitt (1990) el efecto hidrofóbico es, principalmente, una función derivada de unas propiedades anómalas del solvente, el agua. Las células con determinadas superficies hidrofóbicas son capaces de adherirse tanto a superficies humectadas como no humectadas. No obstante, el grado de adhesión será diferente si el sustrato es hidrofóbico o hidrofílico (Fletcher & Loeb 1979; Paul & Jeffrey 1985).

La tendencia de todos los microorganismos a poseer propiedades superficiales hidrofóbicas viene determinada por una compleja interacción de componentes externos polares y apolares (Rosenberg & Rosenberg 1981). En numerosos microorganismos estudiados, las partes de la superficie que incrementan la hidrofobicidad (hidrofobinas) o la reducen (hidrofilinas) coexisten en la superficie celular (Smyth et al. 1978; Hermansson et al. 1982; Rosenberg M et al. 1982; Rosenberg E et al. 1983; Ofek et al. 1983; Parker & Munn 1984; Bar-Ness et al. 1988; Pines et al. 1988; Bar-Ness & Rosenberg 1989; Koga et al. 1990). Su concentración relativa, distribución, configuración y yuxtaposición determinarán la tendencia de la célula a mostrar sus propiedades superficiales.

Existe una relación directa entre la adhesión de un microorganismo a un sustrato y la hidrofobicidad del material. No obstante, con frecuencia es muy difícil relacionar las interacciones hidrofóbicas con un fenómeno de adhesión determinado. A menudo, las moléculas que inhiben dichas interacciones pueden también producir cambios estructurales en la superficie del polímero (por ejemplo, detergentes). Si las superficies son anfipáticas por sí mismas (por ejemplo, los lipopolisacáridos o el ácido lipoteicoico), tales componentes pueden inhibir la adhesión interfiriendo con las interacciones hidrofóbicas.

Un gran número de pruebas para medir la hidrofobicidad se han desarrollado específicamente para predecir la adhesión celular. Se han propuesto numerosos métodos para cuantificar este parámetro superficial de los

microorganismos. Unos miden las condiciones hidrofóbicas de la superficie en su conjunto, e incluyen análisis sobre la adsorción de moléculas hidrofóbicas; otros, miden la hidrofobicidad en términos de adhesión a hidrocarburos, a poliestireno y otras superficies hidrofóbicas sólidas. Sin embargo, en todos ellos, un *mínimo punto de contacto entre la célula y el material es suficiente para clasificar al microorganismo como hidrofóbico*, aunque el resto de la célula pueda ser relativamente hidrofílico (Marshall & Cruickshank 1973; Marshall et al. 1975). Los análisis sobre hidrofobicidad deben efectuarse controlando el material utilizado, ya que las interacciones hidrofóbicas pueden a menudo promover la adhesión a una amplia gama de superficies e interfaces.

Al medir la hidrofobicidad se debe tener presente que las bacterias con propiedades hidrofóbicas superficiales, en ocasiones tienen tendencia a adherirse entre ellas constituyendo un agregado (Stanley & Rose 1967; Morris et al. 1985). Asimismo, se debe indicar que la adhesión de los microorganismos a superficies hidrofóbicas puede estar condicionada por la densidad celular (van Pelt et al. 1985).

1.2.2. CONDICIONES DE CULTIVO, HIDROFOBICIDAD Y ADHESION

Resulta pertinente prestar una atención especial a las condiciones de cultivo de los microorganismos, ya que su crecimiento afecta profundamente a sus propiedades hidrofóbicas (Dyar & Ordal 1946; Dyar 1948; Rosenberg et al. 1980; Rosenberg 1981; Ofek et al. 1983; Robinson et al. 1983; Fattom & Shilo 1984; Wrangstadh et al. 1986, 1988; Wyroba et al. 1987; Bar-Ness et al. 1988; Hart & Vreeland 1988; Bar-Ness & Rosenberg 1989).

Para la mayoría de microorganismos, la adhesión a una superficie sólida es directamente proporcional a la hidrofobicidad de su superficie, si el medio en el que está suspendido es agua o un tampón. Cuando la suspensión acuosa es más compleja la colonización preferencial del sustrato dependerá del

microorganismo y de su mecanismo de anclaje (Loeb et al. 1983). Además, la presencia de proteínas en solución modificará la adhesión microbiana de forma particular para cada organismo, aumentándola o disminuyéndola. Al colocar el material en una solución que contiene proteínas aquél queda rápidamente cubierto por ellas (Brasch & Lyman 1969). Las proteínas adsorbidas a la superficie del material lo tornan más humectable o hidrofílico disminuyendo, en ocasiones, la adhesión microbiana. Por ejemplo, si el polimetilmetacrilato (PMMA) se cubre con suero y saliva (Fujioka-Hirai et al. 1987) disminuye la adhesión de *Streptococcus mutans*, pero si se trata con fibronectina se incrementa la adhesión de *Staphylococcus aureus* (Vaudaux et al. 1984). Asimismo, la adhesión del microorganismo a esta superficie depende de la presencia de receptores para la proteína, de modo que si aquél posee receptores para una proteína específica, aumentará la adherencia al polímero.

La hidrofobicidad de la superficie celular también depende del medio de cultivo en el que crecen los microorganismos, así como de la temperatura de incubación. El tiempo de permanencia de los microorganismos con el plástico y el medio de cultivo seleccionado afecta indudablemente a su adhesión al mismo. Cuanto mayor es el número de días, más posibilidad tienen las células de elaborar polímeros extracelulares capaces de facilitar la adhesión (Klotz 1990).

Los agentes surfactantes reducen las interacciones hidrofóbicas y, por tanto, disminuyen la adhesión de los microorganismos a plásticos. Este fenómeno se explica por la reducción de la tensión superficial del medio de suspensión causada por el surfactante, creándose una situación en la cual las tensiones interfaciales (energías superficiales libres) de los microorganismos, sustrato y medio de suspensión son tales que no tiene lugar la adhesión. El mismo efecto pueden producir algunos tratamientos con antibióticos que provocan una disminución de la hidrofobicidad superficial de las células (Op den Camp et al. 1985; Gower et al. 1986; Schadow et al. 1988). Los alcoholes como el metanol, etanol, propanol y butanol también inhiben la adhesión celular al producir cambios en la tensión superficial del medio de suspensión (Drumm et al. 1989). Así por ejemplo, la adición de propanol reduce la adherencia de *E. coli* a

superficies hidrofóbicas (poliestireno), pero no a las hidrofílicas.

1.2.3. MECANISMOS DE ADHESION A DIFERENTES SUPERFICIES

Los microorganismos tienen un potencial superficial negativo. La atracción entre dos superficies con dicha carga es, por tanto, inhibida por una barrera de repulsión electrostática; neutralizándola aparecen las fuerzas de atracción de van der Waals, así como interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (Tadros 1980; Douglas 1987 a,b). Estos aspectos están muy poco estudiados en hongos.

Marshall et al. (1971) sugieren que la adhesión no específica a materiales es la forma usual utilizada en los organismos acuáticos y sucede en dos fases. La primera es reversible y consiste en una débil asociación del microorganismo con la superficie, a través de las fuerzas de van der Waals. La segunda fase es irreversible y se consigue con la síntesis y secreción de material extracelular fibrilar que asocia las dos superficies y supera la barrera de repulsión. La adhesión específica de algunos microorganismos a superficies concretas comporta la existencia de interacciones con moléculas complementarias entre el microorganismo y la propia superficie. La adhesión de bacterias a las células animales se realiza por este mecanismo. Las bacterias y algunas levaduras poseen moléculas de unión o adhesinas en su superficie que son capaces de interactuar con receptores de las membranas celulares del huésped, de forma análoga a las interacciones antígeno-anticuerpo (Douglas 1987 a,b; Kanbe et al. 1993). Un proceso inicial de acoplamiento débil se continúa con un anclaje permanente que requiere la formación de enlaces específicos entre las moléculas complementarias.

La adhesión microbiana a plásticos tiene un gran interés económico, y médico. El término "plástico" está relacionado con polímeros orgánicos, típicamente hidrofóbicos, no humectables, con energía libre superficial o tensión superficial reducida. La topografía de la superficie del polímero desempeña un

importante papel en la adhesión celular. Aunque macroscópicamente poseen superficies lisas, su análisis ultraestructural revela que poseen numerosas irregularidades que pueden albergar a un elevado número de bacterias (Karlán et al. 1980; Peters et al. 1982; Elliott et al. 1988). Por tanto, la rugosidad, puede afectar también a la adherencia (Dougherty 1986; Harris & Martin 1987). La adhesión de los microorganismos a su superficie genera la destrucción de los materiales (Lewin 1984). Numerosos investigadores piensan que las interacciones hidrofóbicas entre los microorganismos y los plásticos son importantes factores en las primeras etapas de la adhesión.

El potencial infeccioso originado por la adhesión de microorganismos a polímeros con aplicaciones médicas es muy grande. Por ejemplo, más de 4 millones de americanos llevan lentes de contacto de uso continuado durante varias semanas. Se estima que uno de cada 500 usuarios padece queratitis infecciosa ulcerativa cada año como consecuencia de utilizar dichas lentes (Poggio et al. 1989). En Estados Unidos son insertados anualmente catéteres en la vejiga urinaria de más de 5 millones de pacientes y aproximadamente un millón de ellos contrae una infección secundaria en el tracto urinario provocada por el catéter (Givens & Wenzel 1980). En el mismo país, más de 20 millones de pacientes reciben cada año diferentes terapias a través de catéteres intravenosos. Alrededor de un 0.2 % de ellos desarrollará tromboflebitis purulenta como consecuencia de complicaciones en la canulación percutánea (Sugarman & Young 1989). Es importante establecer los factores determinantes en el proceso de la adhesión microbiana a la superficie de los polímeros, ya que si éstos se conocen se podrán seguir estrategias para evitar o interrumpir la colonización.

Todos los plásticos con aplicaciones médicas están sujetos a la colonización por microorganismos después de su implantación (Kiremtitci-Gumisderelioglu & Pesmen 1996). La microbiota normal residente es la causa principal de dicha colonización. La adhesión microbiana a estos materiales está condicionada por varios factores. En primer lugar, el microorganismo debe aproximarse a la superficie y entrar en contacto con ella. Si es "relativamente hidrofóbico" y se

suspende en un medio acuoso (por ejemplo las superficies mucosas), las fuerzas hidrofóbicas pueden incrementar la concentración del microorganismo en las interfases líquido-aire y líquido-sólido (Marshall 1972). Cuando un organismo se encuentra adyacente a la superficie de un plástico y permanece estrechamente unido a él, las fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas son importantes. En soluciones acuosas, las interacciones electrostáticas constituyen la fuerza físico-química predominante en la adherencia de los microorganismos "relativamente hidrofílicos" a superficies con elevada energía superficial, como es el caso del vidrio (Mozes et al. 1987). Las mismas interacciones contribuyen a la adhesión de los microorganismos "relativamente hidrofóbicos" a superficies con reducida energía superficial. Las interacciones electrostáticas no sólo juegan un papel directo en el proceso de la adhesión a plásticos sino que también pueden condicionarlo al influir en la magnitud de las interacciones hidrofóbicas. Diversas proyecciones de la superficie celular (posiblemente proteínas hidrofóbicas) penetran a través de las fuerzas repulsivas electrostáticas incrementando la adhesión microbiana. Los pilli bacterianos y las fibrillas pueden actuar de esta forma. La adhesión irreversible del microorganismo al sustrato, puede conseguirse con la elaboración de un glicocálix (Gristina & Naylor 1988). La adhesión de los microorganismos a los polímeros sólidos se utiliza comunmente para cuantificar la hidrofobicidad de la superficie celular (Rosenberg 1981).

La adhesión de los microorganismos a la superficie de los plásticos es tratada con frecuencia en términos físico-químicos, ya que dichos materiales no son biológicos y su superficie es esencialmente inerte. En este caso, se tratan a los microorganismos como partículas coloidales y puede llevar a resultados erróneos. En este sentido, determinadas bacterias (*Escherichia coli*, *Aeromonas liquefaciens* y *Pseudomonas fluorescens*) se adhieren a plásticos tanto vivas como muertas (Meadows 1971). Pero no todos los organismos pueden hacerlo cuando están muertos; así, por ejemplo, la adhesión de algunos microorganismos patógenos a plásticos es un proceso metabólico activo.

John et al. (1989) observaron que las células muertas de *P. aeruginosa* son capaces de adherirse a la superficie de las lentes de contacto de hidrogel. Dart

& Badenoch (1986) analizaron la adherencia bacteriana a lentes blandas y rígidas de PMMA, comprobando que *S. aureus* y *P. aeruginosa* se adherían en mayor número al último material. La adhesión de microorganismos a lentes de contacto rígidas, como las fabricadas con PMMA, probablemente no sólo dependa de las interacciones hidrofóbicas. *P. aeruginosa* se adhieren en mayor número a lentes blandas utilizadas que a lentes nuevas (Butrus et al. 1987). Miller y Ahearn (1987) sugieren que en la adhesión de *P. aeruginosa* a las lentes de contacto hidrofílicas es importante la formación de una matriz extracelular; en general, sus resultados concuerdan con otros estudios previos en los que se indica que la mayoría de aislamientos bacterianos se adhieren mejor a superficies hidrofóbicas que hidrofílicas. Sin embargo, algunas cepas lo hacen por igual a los hidrogeles que al poliestireno. Dichos autores observaron también que *P. aeruginosa* se adhiere más fácilmente a los polímeros no iónicos que a los iónicos, lo que indica la importancia de las interacciones electrostáticas en la adhesión de esta especie a las lentes de hidrogel. Estos resultados concuerdan con los expuestos por Pringle y Fletcher (1988) en los que se demuestran que *P. fluorescens* y *Acinetobacter* sp poseen una menor adhesión cuando el contenido hídrico de las lentes de hidrogel aumenta.

1.2.4. ADHESION FUNGICA

Todos los hongos obtienen los nutrientes necesarios para su crecimiento por absorción. Producen una amplia gama de exoenzimas, de enzimas asociados con la pared y la membrana celular, así como macromoléculas especializadas que degradan una amplia variedad de sustratos hasta un tamaño tal que pueden ser absorbidos y transportados hasta el citoplasma de la célula (Garraway & Evans 1984). Se desconoce el papel que desempeña la hidrofobicidad superficial en el crecimiento y nutrición, sin embargo, numerosos estudios sugieren que su expresión es nutricionalmente beneficiosa para el hongo. Por tanto, la nutrición heterotrófica, la secreción de enzimas extracelulares, la absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical, son características de los

hongos que precisan un íntimo contacto con el sustrato para llevarse a cabo.

El interés por el estudio de la hidrofobicidad superficial en estos microorganismos se ha incrementado en los últimos años, posiblemente por la acción que dicho parámetro ejerce en determinadas actividades fisiológicas y patológicas bacterianas. Dos géneros, *Saccharomyces* y *Candida*, han sido los más estudiados. El primero, por su utilización en la industria fermentadora, el segundo y concretamente *Candida albicans*, por ser un agente causal de enfermedades en pacientes inmunosuprimidos, especialmente en aquellos que sufren cánceres hematógenos.

Los estudios efectuados muestran que las interacciones hidrofóbicas contribuyen a la adhesión de hongos a plásticos, a células huésped y a la coadhesión celular. Las condiciones de crecimiento, el tipo de hongo y de polímero pueden condicionar el grado de participación de las interacciones hidrofóbicas.

Como se ha comentado anteriormente, existe un gran número de métodos para determinar la hidrofobicidad superficial en bacterias. Sin embargo, este número es limitado en el caso de los hongos, en parte, porque algunos de estos métodos no pueden ser aplicados directamente en este tipo de microorganismos. Los métodos más utilizados son la medida del ángulo de contacto, de la adhesión a hidrocarburos, a microesferas hidrofóbicas, cromatografía de interacciones hidrofóbicas y test de la agregación a sales (Hazen 1990). La determinación de la hidrofobicidad superficial de hongos es muy problemática debido a la complejidad de la superficie celular de estos microorganismos. En primer lugar, debe tenerse en cuenta que los hongos pueden ser monomórficos, dimórficos o polimórficos. Por tanto, es difícil decidir bajo qué forma debe efectuarse el análisis de la hidrofobicidad. Por otro lado, las poblaciones bacterianas poseen células de forma y tamaño relativamente invariable, en cambio, los hongos presentan multiplicidad de formas y estructuras. Actualmente es inviable valorar la hidrofobicidad superficial de cada una de las formas con los métodos existentes. Otro problema asociado con la evaluación de la

hidrofobicidad en hongos está relacionado con su pared celular. Es una estructura compleja que contiene numerosos tipos de macromoléculas como polisacáridos, proteínas y una pequeña cantidad de lípidos. El lugar concreto de la superficie externa dónde se evalúa la hidrofobicidad puede ser liso, rugoso o puede estar cubierto de estructuras fibrilares. Asimismo, las paredes de las levaduras tienen cicatrices, generalmente causadas por la formación de las yemas. Por tanto, una misma célula puede tener simultáneamente distinta topografía.

Factores que condicionan la adhesión fúngica

Temperatura

Como ya se ha indicado, las condiciones de crecimiento de los microorganismos como la temperatura, periodo de incubación y densidad celular influyen en su hidrofobicidad y, por tanto, en su adhesión. Las interacciones hidrofóbicas son entrópicamente dependientes, por tanto, son muy potentes cuando aumenta la temperatura (Israelachvili & Pashley 1982; Pashley et al. 1985; Israelachvili & McGuiggan 1988). Si estas interacciones están relacionadas con la adhesión, sería evidente que ésta disminuiría al descender la temperatura de incubación. Diversos investigadores han comprobado que este parámetro influye en la hidrofobicidad superficial de *C. albicans* (Hazen et al. 1986; 1988; Hazen & Hazen 1987 a,b; 1988 a,b; 1988; Kennedy & Sandin 1988; Shakespeare & Verran 1988; Kennedy et al. 1989). Generalmente, es más hidrofóbica cuando crece en fase estacionaria a temperatura ambiente (23-25 °C) que a 37 °C, aunque algunas cepas poseen niveles similares de hidrofobicidad a las temperaturas indicadas (Hazen et al. 1986; Hazen & Hazen 1987 a; Hazen 1989). Cuando las células crecen a 23 °C los puntos de hidrofobicidad se distribuyen aleatoriamente en *S. cerevisiae*, sin embargo, a 37 °C se sitúan polarmente.

Medio de cultivo

El medio de cultivo también influye en la hidrofobicidad de *C. albicans* (Lindahl et al. 1981; Hazen et al. 1986; Kennedy & Sandin 1988). Presenta la superficie hidrofóbica cuando se cultiva con caldo dextrosado de Sabouraud (Klotz et al. 1985) e hidrofílica si crece en otros medios líquidos (Sugarman 1982). No obstante, cuando se incuba a 37 °C en un medio que facilite la formación del tubo germinativo, la hidrofobicidad es más elevada que cuando lo hace en un medio complejo como el anteriormente citado o el extracto de peptona con glucosa. El incremento de éste glúcido o de galactosa provoca un aumento de la hidrofobicidad celular, ya que se produce una mayor síntesis de manoproteínas (adhesinas responsables de la adhesión a células epiteliales) de la capa más externa de su pared y, por tanto, aumenta la adhesión (Torres-Rodríguez y Carceller 1993). En general, no se han analizado todos los componentes de los distintos medios de cultivo que provocan el aumento de la hidrofobicidad superficial en esta levadura, ni tampoco la influencia del pH del medio, la viscosidad y el potencial iónico. No obstante, si se ha estudiado la influencia de determinados iones y se ha visto que el grado de adhesión de *C. albicans* aumenta al incrementarse el contenido de calcio en el medio de cultivo (McCourtie & Douglas 1981). Resultados similares se obtuvieron con los cloruros de potasio, calcio y magnesio. Se ha sugerido que los iones divalentes reducen las fuerzas de repulsión electrostáticas que operan en la superficie, afectando a su hidrofobicidad y promoviendo la adhesión.

Hidrofobicidad celular

Las interacciones hidrofóbicas pueden intervenir en la adhesión de los hongos a los sustratos sólidos que contienen nutrientes. Por ejemplo, *C. albicans* se adhiere a las lentes de contacto rígidas en proporción directa a su ángulo de contacto (Butrus & Klotz 1986) y la adhesión se incrementa si componentes lagrimales como la albúmina, lactoferrina, lisozima y fibronectina se añaden a la suspensión celular. Posiblemente, tenga lugar la adsorción de las proteínas a la

superficie de las lentes. Además, *C. albicans* posee receptores específicos para la albúmina (Page & Odds 1988) y la fibronectina (Skerl et al. 1984) que contribuirían a incrementar la adhesión. Esta levadura se adhiere en mayor número a lentes blandas utilizadas que a lentes nuevas (Butrus & Klotz 1986). Del mismo modo se produce la adhesión de los conidios de determinados hongos patógenos a las superficies enceradas de las plantas y la producción posterior de apresorios y haustorios (Hoch & Staples 1987). Ener & Douglas (1992) demostraron una fuerte relación positiva entre la hidrofobicidad superficial de las células de *C. albicans* y su adhesión a células del epitelio bucal (Ray et al. 1984; Fowler & Jones 1992). Por otra parte, especies de importancia médica de esta misma levadura producen surfactantes que pueden quedar adheridos a la pared celular o ser expulsados al medio extracelular (Kaeppli & Fiechter 1976; 1977; Kaeppli et al. 1978; Klotz & Penn 1987; Klotz 1989). La pared asociada con el surfactante hace que la célula sea más hidrofóbica. Miura et al. (1977) demostraron que las cepas hidrofóbicas de *C. tropicalis* y de *C. intermedia* eran más capaces de asimilar hidrocarburos que las cepas hidrofílicas. Las células de *C. albicans* asociadas al surfactante se unen más fácilmente a sustratos inertes (Klotz 1989) y a las células epiteliales (Klotz & Penn 1987). Según indica Yaskovich et al. (1995) en el género *Candida* existen diferencias inter e intraespecíficas en la hidrofobicidad superficial celular, y por tanto, en su adhesión a superficies acrílicas de dentaduras, lo cual indica que esta característica puede determinar la jerarquía de la virulencia entre las diferentes especies (Edgerton et al. 1993). La superficie del mismo tipo de materiales es colonizada fácilmente por *C. albicans* cuando queda cubierta por la saliva (Nikawa et al. 1996).

Existe muy poca información en relación a la influencia que ejerce la consistencia del medio en la hidrofobicidad superficial de los hongos con importancia médica. Kennedy & Sandin (1988) no encontraron diferencias significativas en este parámetro si las células de *C. albicans* crecían en caldo o en agar dextrosado de Sabouraud a 25 y 37 °C. Es posible que las células que crecen en medio sólido muestren valores de hidrofobicidad muy variables por las distintas condiciones nutricionales existentes entre el centro y la periferia de la

colonia. Este hecho no es tan evidente si el crecimiento tiene lugar en un medio líquido.

La fase de crecimiento puede influir también sobre los niveles de hidrofobicidad superficial celular. Al colocarlas en medio fresco a 23 °C, las células hidrofóbicas se tornan hidrofílicas en 30 minutos. Al entrar en la fase exponencial, son moderadamente hidrofóbicas, pero va aumentando su hidrofobicidad al aproximarse a la fase estacionaria, en la cual vuelven a ser hidrofílicas (Hazen et al. 1986; Hazen & Hazen 1988 a). Las células de las hifas más adultas poseen una distribución poco uniforme de los lugares hidrofóbicos (Hazen et al. 1986).

En algunas especies de *Candida*, como por ejemplo *C. albicans*, la hidrofobicidad juega un importante papel en su adhesión a materiales inertes como los utilizados en catéteres de tal modo que la especie puede ser un foco de infecciones locales o diseminadas. Se desarrollan estomatitis cuando ésta coloniza la superficie de dentaduras acrílicas (Odds 1988). Asimismo, candidosis y septicemias tienen lugar, principalmente, en pacientes con catéteres insertados (Rotrosen et al. 1983).

Es importante conocer el mecanismo que comporta la adhesión a plásticos y resinas con el objetivo de evitar su colonización. Sin embargo, la adhesión de los microorganismos a las superficies inertes es un fenómeno muy complejo (Seaman & Goodwin 1986; Gristina 1987). Según ha sido demostrado una combinación de interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas (electrostáticas) pueden jugar un papel en la adhesión de hongos, como *Candida* sp, a acrílicos y otros plásticos (Kennedy et al. 1989). Minagi et al. (1986), al estudiar la superficie libre de energía y la adherencia de *C. albicans* y *C. tropicalis* a varias resinas de dentaduras, demostraron que el grado de implicación depende de las características del polímero y del estado hidrofóbico de la pared celular del microorganismo; *C. tropicalis* se mostró altamente hidrofóbica (ángulo de contacto = 118.6°), mientras que la primera era hidrofílica (ángulo de contacto = 51.1°). Los resultados demostraron que las interacciones hidrofóbicas estaban

relacionadas con la adhesión de levaduras a resinas altamente hidrofóbicas. Al disminuir la hidrofobicidad superficial de las resinas también se reducía la adhesión celular. Por otra parte, la adhesión de levaduras hidrofílicas a las resinas estuvo generalmente relacionada con el grado de hidrofilia del material. Cepas uropatogénicas de *C. albicans* se adhieren débilmente a la superficie de polímeros hidrofílicos, mientras que su adhesión es muy superior cuando se tratan materiales hidrofóbicos (Kiremtitci-Gumisdereloglu & Pesmen 1996). Asimismo, las células de *C. albicans* se adhieren mejor a materiales acrílicos cuando presentan rugosidades que cuando son lisos (Verran et al. 1991).

Adhesión de los conidios

Un amplio número de factores físicos, químicos y ambientales pueden condicionar la adhesión de los conidios a las distintas superficies. Según se muestra en la figura 1, Jones (1994) indica que existe un contacto inicial pasivo entre los conidios y el sustrato, especialmente si la superficie es rugosa y/o poseen apéndices externos. Es una fase reversible. Posteriormente, las secreciones externas comportan la adhesión irreversible al sustrato. Los hongos acuáticos desarrollan conidios morfológicamente muy diversos con apéndices que ayudan a su anclaje. Además, pueden liberar cubiertas mucilaginosas simples o muy elaboradas para incrementar la superficie de contacto. Los componentes amorfos van acompañados, en ocasiones, de estructuras fibrilares que proporcionan una adhesión más fuerte con el sustrato. Se ha descrito también la presencia de fimbrias en la superficie de conidios fúngicos en *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Ustilago violaceae*, etc. En esta última especie son largos, finos y flexuosos. También aparecen dichas estructuras a modo de largas proteínas fibrilares, sin glúcidos, en sus hifas (Gardiner & Day 1985). Su función concreta es desconocida, pero puede estar relacionada con la adhesión.

Los conidios de *Aspergillus* y, particularmente de *A. niger*, son hidrofóbicos. Cole et al. (1979) analizaron químicamente la pared de los conidios de esta

especie y determinaron que la parte más externa estaba constituida, mayoritariamente, por proteínas y lípidos acompañados por una pequeña porción de glúcidos. Cubriendo dichos componentes se encontró una capa amorfa que parece ser la responsable de la hidrofobicidad superficial y de la adhesión de los conidios, pero que no ha sido químicamente caracterizada. En el dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* se identificó una capa similar compuesta por glucoproteínas y lípidos (Wu-Yuan & Hashimoto 1977). Por otra parte, estudios del fitopatógeno *Erysiphe graminis* han demostrado que la adhesión a superficies inertes puede desencadenar la secreción de materiales adherentes que quizás no estén relacionados con la hidrofobicidad superficial (Kunoh et al. 1988; Nicholson et al. 1988).

Según Rose & Harrison (1987), la pared de los blastoconidios de *C. albicans* contiene entre cinco y ocho capas distintas dependiendo de las condiciones de crecimiento y de las técnicas citoquímicas empleadas en el análisis. La capa más externa, implicada directamente en la adhesión, es fibrilar-flocular, a veces discontinua y está formada principalmente por glúcidos y manoproteínas (adhesinas responsables de la adhesión a células epiteliales). Su presencia está condicionada por la naturaleza del medio de crecimiento. Si éste contiene altos niveles de glucosa, galactosa o sacarosa se incrementa la formación de dichas proteínas y, simultáneamente, aumenta la hidrofobicidad y la adhesión. La superficie celular ha sido descrita como una cubierta capsular con expansiones fibrilares a modo de púas. Dichas expansiones pueden representar apéndices análogos a las fimbrias de las bacterias, cuya importancia en la adhesión está claramente demostrada. Tronchin et al. (1991) indican que los lípidos de la pared de *C. albicans* también intervienen en su adhesión a células epiteliales.

Dependiendo de las condiciones de cultivo, también se ha podido observar en *C. albicans* la existencia de una cubierta superficial de material amorfo. Además, una densa red fibrilar, histoquímicamente similar a la pared celular, asocia a los individuos entre sí. Este entramado de fibras también se ha puesto de manifiesto en *C. tropicalis*, mientras que es prácticamente inapreciable en otras especies de *Candida* menos patógenas.

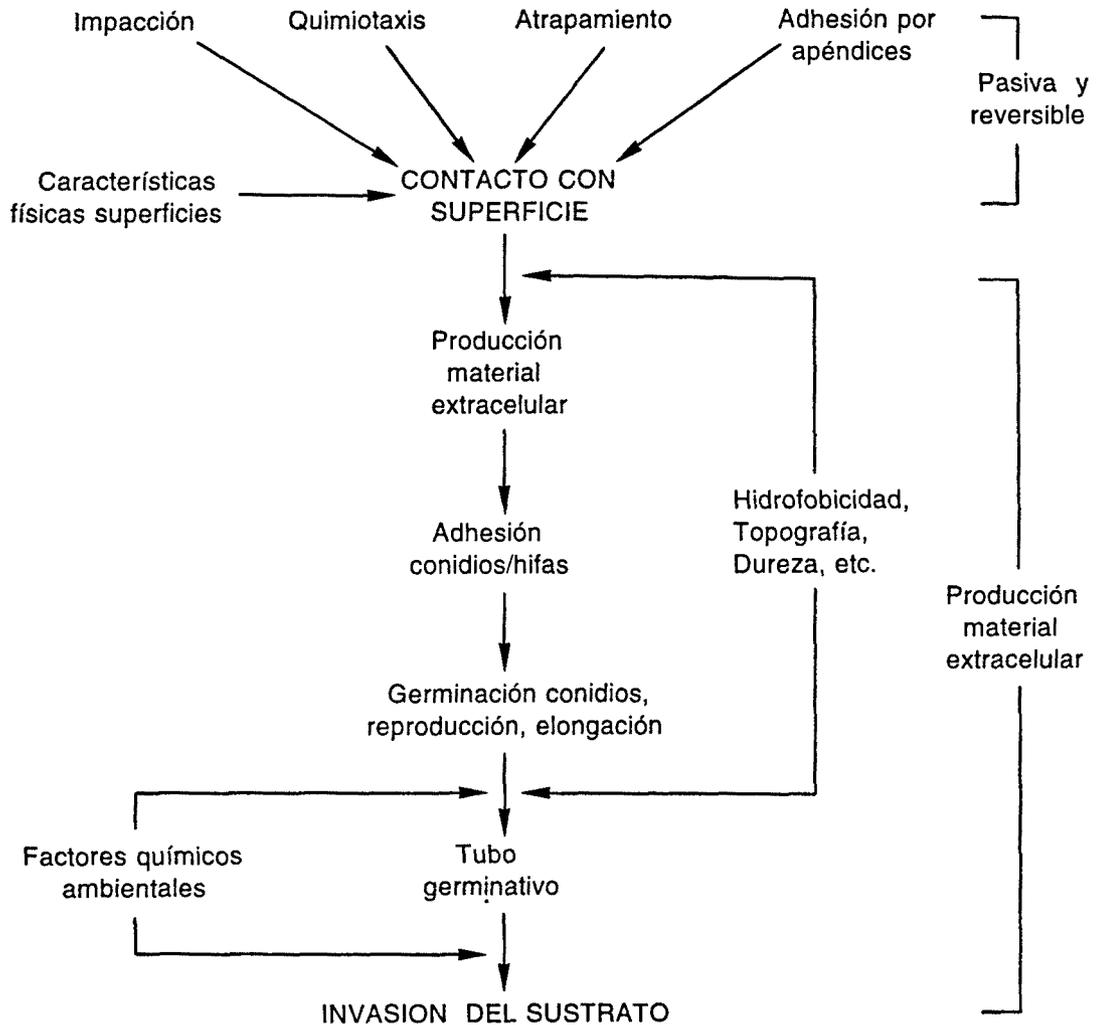


Figura 1.- Etapas de la colonización de sustratos por hongos. (Tomada de Jones 1994, modificada).

Cuando *C. albicans* crece en medio líquido puede segregar una cubierta, cuya cantidad aumenta con la edad del cultivo y que contiene polisacáridos y enzimas. No obstante, la naturaleza de la matriz extracelular y la topografía superficial de *C. albicans* muestra unas considerables variaciones según el medio de cultivo en el que crece el organismo. Asimismo, los conidios de *Colletotrichum graminicola* segregan glucoproteínas que permiten su asociación con el sustrato. Su adhesión a las hojas que parasita depende de la edad de las

mismas, y parece ser que requieren superficies hidrofóbicas para que el proceso se lleve a cabo. La adhesión no está condicionada por el número de conidios y sí por la edad de los mismos (Mercure et al. 1995).

1.3. PRINCIPIOS BASICOS DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL

La microscopía confocal constituye un descubrimiento revolucionario que se originó por la necesidad de observar estructuras submicroscópicas. Por la novedad que supone la utilización de dicho instrumento para observar muestras colonizadas con hongos, se ha optado por incluir en este apartado de la introducción la descripción de sus orígenes, principios ópticos, ventajas en relación a la microscopía óptica convencional y limitaciones de utilización. No se pretende hacer un análisis exhaustivo de los aspectos indicados, sino únicamente poner de manifiesto y comentar las consideraciones más relevantes de la microscopía confocal.

1.3.1. ORIGENES Y PRINCIPIOS OPTICOS DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL

Marvin Minsky, un alumno postdoctoral de la Universidad de Harvard, patentó en 1957 un microscopio óptico revolucionario que le permitía observar con claridad capas sucesivas de una muestra de cerebro sin tener que hacer cortes histológicos. Fue el prototipo de los actuales instrumentos (Minsky 1988). Su instrumento, denominado microscopio confocal, se ha ido modificando paulatinamente y se ha convertido en uno de los progresos más notables de la microscopía óptica de nuestro siglo.

Minsky desarrolló la técnica mientras reflexionaba sobre el funcionamiento del cerebro. Razonó que, si fuera posible cartografiar las conexiones entre todas

las neuronas, el diagrama de circuitos revelaría indicios del modo en que opera el cerebro (Lichtman 1994).

En los microscopios ópticos convencionales (figura 2 A), cuando el objetivo enfoca la luz tomada de planos situados por debajo de la superficie del tejido cerebral (o de cualquier material grueso y translúcido), la imagen se torna rápidamente incomprensible. La luz es reflejada por tantas y tan diminutas partículas que resulta imposible distinguir el objeto de su entorno. Para conseguir una representación nítida de un plano individual de una muestra, lo ideal sería recoger luz reflejada del plano de interés y sólo desde él. Pero el material situado por encima y por debajo también devuelve luz, creando imágenes borrosas. Al mismo tiempo, el fenómeno de dispersión reduce el contraste y la resolución. La dispersión se produce al incidir la luz sobre partículas diminutas y reflejarse en ellas, incidiendo de nuevo en otras partículas y así hasta alcanzar la superficie detectora. Las señales producidas por esta luz desviada al azar no aportan información sino que crean un resplandor difuso que tiende a encubrir la luz procedente del plano de interés (Shotton & White 1989; Wright et al. 1993; Lichtman 1994).

Con unas pocas modificaciones del microscopio óptico convencional, Minsky minimizó la difuminación de la imagen y reforzó el contraste. Evitó que se produjera gran parte de la dispersión. Para ello hizo pasar una fuente de luz convencional a través de un objetivo que enfocaba los rayos en un haz bicónico. Después llevó el foco de este haz, que era nítido e intenso, sobre una porción mínima de la muestra, a la profundidad deseada. La fuente puntual de luz estaba producida por un pequeño orificio ("pinhole") colocado en un filtro espacial. Así, garantizó que esta zona sería la más intensamente iluminada de la muestra y, por tanto, la que reflejaría más luz. El resto de la muestra apenas recibiría iluminación, suprimiendo con ello la dispersión (figura 2 B). La microscopía óptica convencional, por el contrario, ilumina la muestra entera y desvía la luz incidente (White et al. 1987; Shotton & White 1989; Wright et al. 1993; Lichtman 1994).

La estrategia de dirigir la luz sobre una región circunscrita limitó la

dispersión total. No obstante, no impedía que la luz fuese devuelta y dispersada por el tejido iluminado supra y subyacente a la zona de interés (el tejido que se encontraba dentro de las porciones cónicas del haz iluminador). Gracias a un segundo "pinhole", Minsky impidió también que gran parte de esta luz espúrea alcanzase la superficie detectora. Sabía que la luz procedente de la muestra era enfocada por un segundo objetivo en un plano situado muy por encima de la misma y colocó en este plano un filtro espacial con un "pinhole" que detenía prácticamente la totalidad de la luz procedente del tejido exterior al punto, es decir, la luz que llegaba por encima y por debajo del plano focal (White et al. 1987; Shotton & White 1989; Wright et al. 1993; Lichtman 1994).

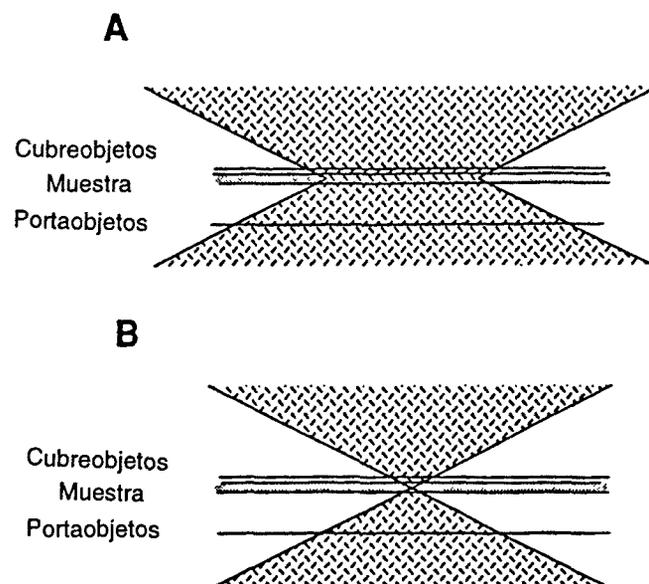


Figura 2.- Comparación entre la iluminación de una muestra por un microscopio óptico convencional (A) y un microscopio confocal (B) observada con un objetivo de inmersión en aceite, cuando la apertura numérica es máxima. (Tomada de Wright et al. 1993).

Se formaba así una imagen casi perfecta del punto, no perturbada por la dispersión ni difuminada por la luz procedente de planos no enfocados. El segundo "pinhole" tenía el mismo foco que el primero, es decir, era confocal respecto a él. Esta es la clave de la microscopía confocal, la eliminación del reflejo difuso en la muestra usando una fuente de luz puntual sobre ella y un "pinhole", situado en frente del detector, confocal con el de la fuente de luz (figura 3).

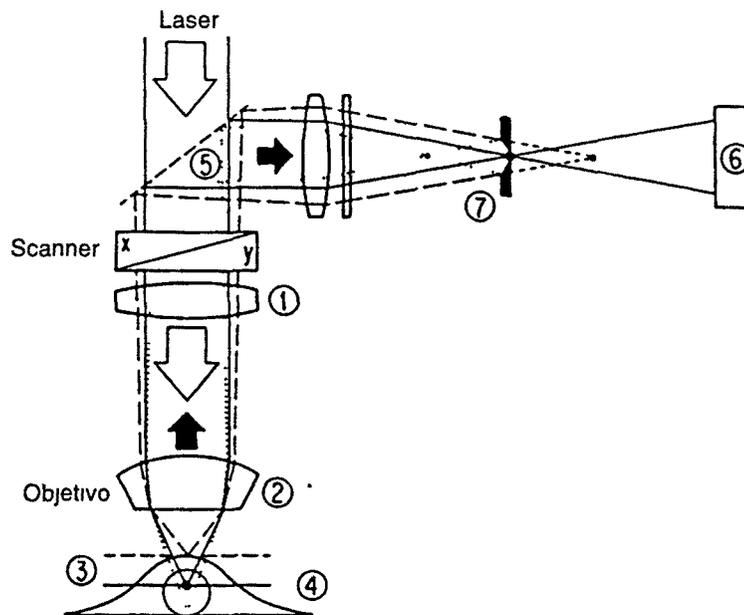


Figura 3.- Diseño básico de un microscopio confocal de barrido. 1: lente; 2: objetivos; 3: región exterior al plano focal; 4: plano focal; 5: reflector dicróico; 6: detector; 7: "pinhole". (Tomada de Wright et al. 1993).

El problema obvio que plantearon las dos primeras fases del método de Minsky era que proporcionaban una imagen nítida pero sólo de un punto diminuto. Para producir una representación del plano entero, añadió la exploración secuencial por líneas o "barrido". Movi6 la muestra poco a poco barriendo el plano de enfoque con el punto luminoso a lo largo de líneas

paralelas inmediatas. Al final, cada una de las áreas situadas a una profundidad dada era iluminada por el haz de luz fuertemente concentrado, enviando en secuencia una señal clara a través del orificio filtraste hasta el detector. Minsky maniobró la muestra con dos diapasones electromagnéticos de horquilla. Uno lo desplazó a lo largo de cada línea y el otro lo hizo pasar de una línea a la siguiente paralela del plano (Lichtman 1994).

Para ver la imagen completa de un plano, hacía que la luz que atravesaba el segundo "pinhole" incidiera en un detector fotomultiplicador. Este detector, convertía la energía luminosa en señales eléctricas con las que se confeccionó una imagen en una pantalla de larga persistencia, tomada de un radar. Subiendo o bajando el objetivo y repitiendo el proceso de barrido, aparecía en la pantalla otro plano de la muestra. La elección de una pantalla grande fue un error táctico. Como Minsky dedujo más tarde, la imagen presentada era excesivamente grande (Lichtman 1994).

Actualmente, para formar imágenes en dos dimensiones, el láser explora la muestra horizontal y verticalmente y la luz reflejada por ella es detectada y convertida en una señal de video que aparece en una pantalla de ordenador. El resultado de las imágenes conseguidas con microscopía confocal es un conjunto de secciones ópticas con un contraste excepcional y que permiten ver detalles sorprendentes.

Investigadores y fabricantes han ideado muchos métodos para combinar las características esenciales de la microscopía confocal: iluminación de una pequeña porción de la muestra, filtrado de la luz de retorno a través de una abertura alineada con la región iluminada y barrido de la muestra. Algunos microscopios poseen platinas dotadas de movimiento lateral, mientras que el haz de luz permanece inmóvil. En ellos, la iluminación axial es constante, hecho que disminuye las aberraciones ópticas del objetivo y del condensador y proporciona la misma respuesta óptica en todo el campo explorado. No obstante, la velocidad de barrido es baja y la muestra se mueve constantemente durante el proceso, originándose imágenes distorsionadas y una disminución de su resolución. Este

hecho es especialmente aparente en una suspensión de células vivas en medio acuoso. En este principio se basó el microscopio original de Minsky. En otros instrumentos, es la luz la que se desplaza y la muestra permanece fija; son los más comúnmente empleados en estudios biológicos, ya que no existe movimiento de la muestra viva y tienen una buena resolución y una velocidad de barrido relativamente elevada. Por último, hay instrumentos en los que la platina y la luz son inmóviles. Incorporan discos giratorios (de Nipkow) provistos de numerosos orificios para el paso de la luz que facilitan el barrido rápido y que permiten la observación de planos completos de la muestra a tiempo real (White et al. 1987; Shotton & White 1989; Wright et al. 1993; Lichtman 1994).

Para obtener información tridimensional de una muestra, se efectúan secciones ópticas (figura 4). Tal como se ha indicado anteriormente, conforme un microscopio confocal barre planos sucesivos de la muestra, produce un conjunto de imágenes, cada una de las cuales constituye una sección óptica. Representan imágenes de finos cortes efectuados mecánicamente (Wright et al. 1993).

Los microscopios confocales obtienen imágenes estereoscópicas por manipulación digital de las secciones. La reconstrucción tridimensional es posible como resultado del avance tecnológico de los ordenadores y la mejora en el almacenamiento de imágenes digitales. En casi todos los microscopios confocales actuales la imagen se construye en un ordenador, o en una cámara de video y después es recogida en un monitor de alta resolución. Trabajan conjuntamente con programas de procesamiento digital de imágenes que, no sólo registran el brillo de cada zona de la muestra, sino también la ubicación de ese área, es decir, su localización en un plano individual (coordenadas x e y), así como la profundidad de éste (coordenada z). Los lugares definidos mediante la terna de coordenadas se llaman "vóxeles", equivalentes en tres dimensiones de los elementos de imagen, o "píxeles" de una imagen bidimensional. Los programas de procesamiento de imágenes compilan "vóxeles" y preparan con ellos reconstrucciones tridimensionales de objetos microscópicos. También los manipulan, lo que permite hacer girar alrededor de un eje las imágenes

reconstruidas y observarlas desde todos los ángulos. La microscopía confocal ha facilitado la capacidad de ver el interior de las muestras y de crear imágenes estereoscópicas (Lichtman 1994).

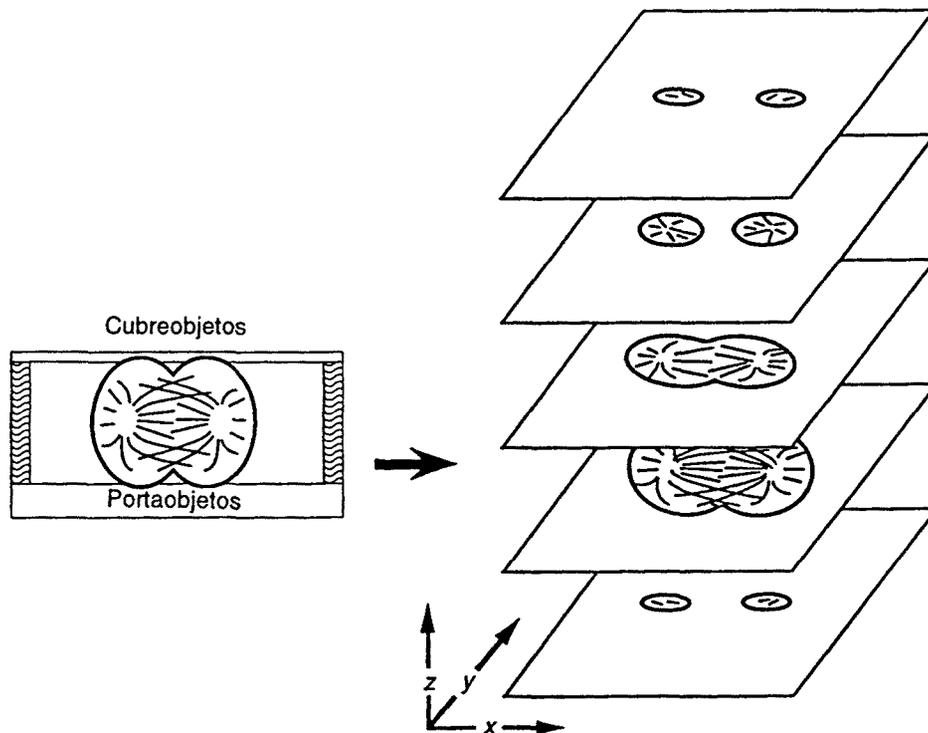


Figura 4.- Demostración esquemática del principio de sección óptica. (Tomada de Wright et al. 1993).

1.3.2. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL

Se citan a continuación las principales ventajas y limitaciones que ofrece la microscopía confocal cuando se utiliza el láser como fuente de iluminación (Shotton 1989; Paddock 1991; Brakenhoff et al. 1993).

- * Alta intensidad de la luz generada por el láser.
- * Aumenta de forma ostensible la resolución axial (eje z) en relación al microscopio óptico convencional.
- * Mejora la resolución lateral (ejes x, y) si la apertura confocal es suficientemente pequeña.
- * Resolución intermedia entre el microscopio óptico convencional y el electrónico.
- * La iluminación de un sólo "vóxel" en el plano focal reduce la dispersión de la luz y aumenta el contraste.
- * Las imágenes pueden ser obtenidas y registradas por fluorescencia o por reflexión.
- * Permite efectuar secciones ópticas, no invasivas, de forma rápida y fácil en los planos x-y, x-z, y-z.
- * Procesamiento fácil de las imágenes obtenidas.
- * Posibilita la reconstrucción tridimensional de las imágenes.
- * Permite girar las imágenes reconstruidas alrededor de un eje y observarlas desde todos los ángulos.
- * Presenta, en general, velocidad reducida de barrido que limita obtener las imágenes en tiempo real.
- * Requiere trabajar conjuntamente con programas de procesamiento digital de imágenes.
- * Deterioro de las imágenes obtenidas por fluorescencia por pérdida rápida de color.
- * Sombreado producido por las estructuras fluorescentes próximas a las del plano focal.
- * Desplazamiento de algunos organismos vivos al ser iluminados con el láser y alteración por el calor.
- * Coste económico relativamente elevado.

2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Todas las consideraciones expuestas anteriormente ponen de manifiesto que la invasión fúngica en lentes de contacto es un problema potencial grave para sus portadores. A pesar de que la queratopatía se pueda superar con tratamientos específicos, los tejidos corneales se ven dañados por la presencia previa de hifas fúngicas que se expandieron por toda la córnea, produciendo su opacidad e impidiendo que la luz llegara a la retina. Por tanto, las lesiones corneales existentes después de una queratomycosis únicamente se pueden eliminar si se procede a un transplante de la córnea afectada.

Cabe precisar que la mayoría de los trabajos de investigación publicados sobre hongos y lentes de contacto versan sobre los géneros y/o las especies que las colonizan y que producen queratopatías de diferente índole. No obstante, restan aún hoy en día, múltiples cuestiones por esclarecer. No se conoce hasta el momento ningún estudio detallado que, desde un punto de vista biológico, trate a los hongos como los auténticos protagonistas de la problemática generada. El tipo de microorganismo y su estado fisiológico son de una relevancia vital al considerar la colonización de las lentes de contacto. Asimismo, también cabe hacer hincapié en la importancia que tiene el conocimiento de las características químicas de los polímeros de las lentes, sustrato de todas aquellas especies capaces de colonizarlo y, por tanto, de deteriorarlo.

La existencia de escasos estudios y resultados poco coincidentes entre los distintos trabajos publicados previamente en la literatura, mi formación académica como bióloga y las características propias del Departamento al que estoy adscrita, me estimularon a analizar la colonización de las lentes de contacto por hongos. El presente estudio pretende analizar profundamente la problemática expuesta y abordar el tema con nuevas metodologías, con el objeto de ampliar los conocimientos que actualmente se poseen sobre el mismo.

Por tanto, el presente estudio se ha llevado a cabo con la finalidad de conocer mejor todos los aspectos relacionados con la colonización fúngica de las

lentes de contacto y el biodeterioro de las mismas. El **objetivo general** que se pretende alcanzar consiste en:

- * *Analizar algunos de los factores implicados en el proceso de colonización fúngica (adhesión e invasión) de las lentes de contacto nuevas y procedentes de usuarios.*

Sobre esta base de carácter general se han planteado los **objetivos específicos** que se detallan a continuación:

1. Proceder a la identificación taxonómica de los hongos colonizadores de las lentes de contacto hidrofílicas procedentes de usuarios.
2. Conocer la influencia que los distintos factores extrínsecos e intrínsecos al hongo ejercen en la aparición de los depósitos fúngicos de las lentes de contacto indicadas para intentar prevenir futuras contaminaciones.
3. Analizar la importancia del tipo de material de fabricación en los procesos de colonización fúngica. Valorar si existe relación entre el porcentaje hídrico y el carácter iónico de los diferentes materiales hidrofílicos de las lentes nuevas y su colonización por hongos.
4. Determinar las posibles diferencias de colonización de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas al ser cultivadas con levaduras o con hongos filamentosos.

Se pretende que los objetivos expuestos se puedan llevar a cabo después de la realización de los procesos experimentales en el laboratorio. Por tanto, procede enumerar a continuación un conjunto de objetivos relacionados con el proceso empírico del estudio y cuya consecución permitirá determinar si se han

conseguido los objetivos específicos indicados y, en consecuencia, el objetivo general.

5. Provocar experimentalmente la colonización de levaduras y hongos filamentosos en las lentes de contacto hidrofílicas y rígidas permeables a los gases.
6. Comprobar la influencia de diferentes medios de cultivo, periodos y lugares de incubación de las lentes hidrofílicas, en la adhesión e invasión de los hongos a las lentes.
7. Estudiar la morfología y la penetración de las hifas superficiales, así como del micelio invasor de levaduras y de hongos filamentosos en las lentes de contacto hidrofílicas y en las rígidas permeables a los gases, al ser analizadas con métodos invasivos (microscopía electrónica) y no invasivos (microscopía óptica convencional y confocal).

3. MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

En el presente capítulo se describe el material y la metodología utilizada para identificar taxonómicamente los hongos colonizadores de lentes de contacto hidrofílicas procedentes de usuarios (apartado 3.1.) y para provocar la colonización fúngica de lentes nuevas (apartado 3.2.), tanto hidrofílicas (apartado 3.2.1.) como rígidas permeables a los gases (apartado 3.2.2.). Asimismo, se explica el material empleado y el procedimiento seguido para realizar el análisis ultraestructural (apartados 3.1.2. y 3.2.1.2.7.) y mediante microscopía confocal (apartado 3.2.1.2.8.) de las lentes motivo de estudio. Por último, se incluye un apartado destinado a exponer los métodos de análisis estadístico utilizados para el procesamiento de las lentes (apartado 3.3.).

3.1. LENTES DE CONTACTO HIDROFILICAS PROCEDENTES DE USUARIOS

3.1.1. PROCEDENCIA DE LAS LENTES

El material analizado consistió en 330 lentes hidrofílicas de porcentaje hídrico variable procedentes, principalmente de 14 ópticas y de 2 laboratorios de contactología de Cataluña.

Usuarios de lentes de contacto asintomáticos o que padecían algún tipo de molestia en el segmento externo ocular visitaron a su contactólogo para que efectuase la revisión de las lentes. Este proceso efectuado con el biomicroscopio, puso de manifiesto, en algunos casos, la presencia de diferentes tipos de contaminantes. El especialista sometió las lentes a diversos métodos de limpieza y desinfección para intentar eliminar los depósitos presentes y posibilitar su reutilización. Uno de los tratamientos más utilizados en la práctica diaria para

intentar eliminar cualquier tipo de depósito, consiste en someter las lentes al sistema de limpieza y desinfección Blalents. Las lentes se colocan en un estuche cubiertas por una solución de peróxido de hidrógeno al 19%. Se introducen en un recipiente con agua y se someten a la acción de ultrasonidos durante 20 minutos. Se elimina el peróxido y a continuación se cubren las lentes con agua desionizada. Por último se sumergen en solución salina. La temperatura durante todo el proceso es de 100 °C. Tratamientos de este tipo producen, en general, la muerte del hongo colonizador aunque las hifas permanecen siempre en la matriz de la lente. Cuando al contactólogo no le fue posible eliminar los depósitos presentes, colocó las lentes en sus estuches correspondientes y los envió a nuestro laboratorio para que procediéramos a la identificación del contaminante.

El usuario podía presentar los depósitos en una o en ambas lentes. Cuando se encontraban sólo en una de ellas, el contactólogo la colocó en un portalentes individual de vidrio o de plástico. Si los contaminantes aparecían en las dos, las ubicó en el mismo tipo de estuches que en el caso anterior, o en otros de plástico destinados a guardar las dos lentes conjuntamente. Las lentes se cubrieron siempre con solución salina estéril. Se debe indicar que en el último tipo de portalentes la misma solución bañó ambas lentes.

Los días transcurridos desde que las lentes quedaron inutilizadas hasta que se efectuó el estudio en nuestro laboratorio fueron difíciles de determinar. No se pudo precisar en muchos casos el periodo de tiempo transcurrido desde que el usuario dejó las lentes en la óptica y éstas llegaron al laboratorio para efectuar el análisis. En el momento de su recepción se colocaron a 4 °C y la revisión se efectuó el mismo día.

Se confeccionó un formulario (véase apéndice) que, debidamente cumplimentado por el óptico y el usuario, debía acompañar cada lente destinada al estudio. Se intentó con ello poseer la máxima información sobre el usuario, la lente deteriorada y el sistema de mantenimiento utilizado. De esta forma, se pretendía disponer de los datos que permitiesen deducir mejor la etiología de los depósitos, así como determinar si existe algún material más fácilmente

colonizable por los hongos.

El 98.8% de las lentes fueron enviadas al laboratorio sin los formularios correspondientes. Únicamente el 1.2% de los mismos fueron parcialmente cumplimentados y, por tanto, se obtuvo sólo parte de la información. De la mayoría de las lentes se desconoce su material de fabricación, el sistema de limpieza y desinfección utilizado, así como los datos relacionados con los usuarios.

En ningún caso se dispuso de la información sobre el material de fabricación de las lentes utilizadas y, en consecuencia, no se conocía su contenido hídrico. Por ello, con el objetivo de poder comprobar la posible relación existente entre la aparición de los depósitos fúngicos y el grado de hidrofilia del material, éste fue calculado a temperatura ambiente mediante un espectrofotómetro manual especial para lentes de contacto (Atago, CL-1). El aparato está dotado de una escala en la cual se indican los valores porcentuales de los contenidos hídricos de los diferentes materiales de fabricación de las lentes de contacto. Para establecer el parámetro se debe calibrar previamente el espectrofotómetro con el sobrenadante de una solución saturada de cloruro sódico. A continuación se coloca la lente sobre el prisma y se comprueba en la escala el valor del contenido acuoso. Se debe indicar que el grado de hidrofilia del material de las lentes únicamente pudo hallarse experimentalmente en aquellos casos en los que no presentaron roturas. Las lentes que se rompieron lo hicieron a causa de la presión efectuada por los dedos sobre el prisma donde son ubicadas para efectuar la lectura, especialmente cuando su espesor era mínimo.

3.1.2. ANALISIS DE LAS LENTES Y DE LA SOLUCION HUMECTANTE

Las lentes recibidas y las soluciones en las que estaban inmersas, fueron sometidas a diversos análisis con el objetivo de determinar los depósitos presentes.

Observación de las lentes mediante microscopía óptica convencional

Todas las lentes fueron observadas con microscopía óptica y alguna de ellas mediante microscopía electrónica de barrido (véase apartado 3.1.2.). Con una pinza estéril se extrajo cada lente de su estuche y se procedió, en primer lugar, a su observación microscópica. Se colocó entre un portaobjetos y un cubreobjetos previamente bañados en alcohol de 70° y se observó con un microscopio triocular Nikon (Optiphot, modelo X2F2R) con objetivos plan acromáticos y diferentes sistemas de iluminación (campo claro, campo oscuro, contraste de fase y luz polarizada). Se eliminaron del estudio las lentes que sólo poseían depósitos químicos (n = 291) y únicamente se analizaron aquellas que presentaron colonias fúngicas asociadas o no a contaminantes químicos (n = 39).

Cada lente colonizada por hongos se colocó en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de suero fisiológico estéril preparado según se especifica en el apéndice que aparece al final del capítulo. Se tapó y se sometió a la acción de un agitador (Heidolph, modelo reax 2000) durante un minuto a potencia 7, con el objetivo de eliminar las posibles hifas fúngicas adheridas de forma laxa a la superficie lenticular. En algún caso fue necesario proceder al lavado de la lente con una gota de surfactante para facilitar la eliminación del micelio superficial.

Se observaron microscópicamente las características del micelio invasor, es decir, básicamente el número de colonias presentes, lugar de invasión, forma, tamaño, pigmentación. Se realizaron microfotografías de las colonias fúngicas colonizadoras de las lentes mediante un equipo de fotomicrografía Nikon (modelo Microflex-UFX-35-DX).

Con el objeto de observar el desarrollo del micelio fúngico que ocupa la matriz lenticular, se seleccionaron diversas lentes colonizadas por hongos hialinos y dematiáceos y se prepararon para ser procesadas por congelación. Para ello, se confeccionó un bloque con el medio de inclusión TBS (Tissue Freezing Medium) sobre las platinas porta muestras del microtomo criostático (Reichert-Jung, modelo 2800 Frigocut E) y se congeló con nieve carbónica. Se

efectuaron secciones del bloque con dicho microtomo de 10 μm de grosor con una temperatura de la cámara de -15 a -20 °C. Se prepararon los portaobjetos impregnándolos en una solución que contenía 100 ml de agua con gelatina al 2% y sulfato de cromo y potasio al 0.05%. Por último, se adhirieron a ellos los cortes efectuados con el microtomo. En el estudio, se tiñeron las colonias hialinas con azul de metileno para facilitar su observación. Este proceso no se consideró necesario con las lentes colonizadas por hongos dematiáceos ya que la pigmentación de su pared permitió una observación correcta de su morfología y se evitó así la tinción del polímero. Se montaron los cortes con glicerina y se observaron con campo claro mediante microscopía óptica.

Aislamiento de los hongos

Para el aislamiento de los hongos contaminantes se atendió a los distintos métodos descritos en la bibliografía (Liotet & Warnet 1981; Simitzis-Le Flohic et al. 1986; Jongebloed et al. 1987; Sankaridurg et al. 1993) y dado que, posiblemente, se efectuarían con las lentes estudios posteriores a la identificación taxonómica de los hongos colonizadores, se decidió no someterlas directamente al estudio sino proceder, en un principio, al cultivo de sus líquidos de suspensión por diversos motivos:

- * Las colonias invasoras poseían, en la mayoría de los casos, tamaños reducidos. Por tanto, su alteración o destrucción con la manipulación impediría tener las muestras en las condiciones originales para realizar estudios posteriores del hongo colonizador. Asimismo, al evitar al máximo la manipulación de las lentes, disminuiría el riesgo de aparición de contaminación secundaria que conduciría a resultados erróneos en análisis efectuados con posterioridad.
- * Las lentes hidrofílicas poseen espacios intermoleculares determinados por la propia estructura del material, que condicionan su humectabilidad (véase

apartado 1.1.). Esta estructura poco compacta del polímero facilita su colonización, ya que el líquido de suspensión que baña la lente difunde a través de estos espacios y el hongo invasor puede pasar fácilmente hacia él. De la misma forma, cuando el líquido que baña la lente está contaminado por hongos puede provocar la contaminación de la lente. Según la estructura citada y siempre que microscópicamente se observe un sólo tipo de hongo invasor, se considera muy difícil que la lente esté invadida por un hongo que sea taxonómicamente diferente al cultivado *in vitro* a partir de su líquido de conservación. En todo caso, si la lente estuviera colonizada por un hongo y la solución humectante se encontrara contaminada por otro distinto, lo más lógico sería pensar que crecerían ambos en el medio de cultivo, o ninguno de ellos en el caso que la lente hubiera sido desinfectada, al mismo tiempo que se comprobaría microscópicamente su presencia en la lente.

Se confirma que el hongo cultivado y el que observado en la lente corresponden al mismo género y/o especie cuando existen semejanzas entre determinadas características microscópicas del hongo en la lente y en su cultivo en el laboratorio (principalmente, la disposición y forma de las hifas y la pigmentación de la pared).

La citada estructura molecular presente en los polímeros hidrofílicos determinó que las lentes, antes de proceder a la identificación taxonómica de los hongos colonizadores, no fueran tratadas con desinfectantes para eliminar la contaminación superficial provocada por microorganismos. El tratamiento utilizado podría atacar fácilmente el micelio invasor y, en consecuencia, impedir la identificación del hongo, que era nuestro objetivo.

En la figura 5 se muestra a modo de resumen la metodología utilizada para proceder a la identificación taxonómica de los hongos colonizadores de las lentes de contacto hidrofílicas. Por cada lente de contacto colonizada se utilizaron 6 placas con agar maltosa de Sabouraud al 2% (Bio-Mérieux) cuya composición y preparación se especifican en el apéndice que figura al final del capítulo.

En cada placa se sembraron 3 gotas (100 μ l) de la solución humectante. Se incubaron 3 de ellas a 25 °C y el resto a 37 °C. Se colocaron en dos estufas bacteriológicas y de cultivos (P. Selecta, modelo Incubat) con la temperatura indicada. Por tanto, se efectuaron 9 puntos de siembra para cada temperatura. Se controló la posible aparición de colonias a lo largo de 7, 14 y 21 días de siembra. En el caso de que éstas no se originaran, existiese crecimiento fúngico en lugares distintos a los de siembra o aparecieran colonias macroscópicamente diferentes, se repitieron los cultivos con el objetivo de asegurar los resultados. Si las colonias originadas en todos ellos fueron morfológicamente iguales, se dieron por válidos los resultados obtenidos. Cuando no se obtuvo el crecimiento del hongo *in vitro* con la metodología indicada, se cultivaron las lentes en placas con el mismo medio de cultivo indicado. Se observaron las características macroscópicas de las colonias jóvenes y maduras y se efectuaron microfotografías con un microscopio estereoscópico (Nikon, modelo SMZ-2T) dotado de un equipo fotográfico (Nikon, modelo Microflex-UFX-35-DX).

Por otra parte, procede indicar que el líquido de suspensión de algunas lentes colonizadas por hongos que fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido (lente 303), se sometió a un cultivo en el laboratorio con medios específicos, con el objetivo de aislar las posibles bacterias helicoidales contaminantes de las muestras. Para ello se siguió el método descrito por Canale-Parola (1986) cuyos componentes químicos y preparación se especifican en el apéndice que aparece al final del capítulo. Se tomaron 2 ml del líquido de suspensión de las lentes y se añadieron las soluciones correspondientes. Al tercer día de incubación a 40 °C tendrían que empezar a desarrollarse los microorganismos y alcanzarían su máximo desarrollo a los siete días.

Identificación de los hongos

Para conseguir la identificación taxonómica del hongo contaminante se tomaron muestras de cada colonia y se observaron al microscopio óptico. Dicha

identificación fue difícil de establecer en algún caso, hecho que hizo necesaria la realización de microcultivos, es decir, cultivos en condiciones bien establecidas para obtener el crecimiento completo del hongo en un periodo breve de tiempo. Para ello, se dispuso de una placa de Petri estéril a la que se añadió agua con polisorbato 80 (Merck) para proporcionar y mantener la humedad del cultivo. Se colocó encima una varilla de vidrio en forma de V flameada con alcohol que actuó como soporte de un portaobjetos cubierto en su superficie con agar maltosa de Sabouraud al 2% (véase apéndice). Se efectuaron dos estrías paralelas con el inóculo correspondiente y se incubó la placa cerrada a 25 °C durante dos o tres días. Transcurrido el tiempo indicado, el portaobjetos se miró directamente mediante microscopía óptica.

Observación de las lentes mediante microscopía electrónica de barrido

Para el análisis ultraestructural se analizaron cuatro lentes de contacto hidrofílicas, adaptadas a dos usuarios distintos y retiradas por el contactólogo al comprobar la presencia de depósitos. Son las lentes 303, 304 306 y 307 analizadas según la metodología expuesta en presente apartado. Las características de dichas lentes y de los hongos colonizadores se comentan en el apartado 4.1.2. Se identificaron taxonómicamente los hongos colonizadores de las cuatro lentes indicadas según la metodología expuesta anteriormente. Todas las lentes estudiadas se sometieron a la acción de un surfactante y se aclararon con solución salina estéril, antes de ser observadas mediante microscopía óptica a diferentes aumentos. Se pretendía con ello eliminar el mayor número posible de hifas cuya presencia podía dificultar la observación de la superficie lenticular.

Preparación de las muestras

Se prepararon las lentes para ser observadas mediante microscopía electrónica de barrido. La metodología utilizada se basó en el proceso habitual

utilizado para el estudio de lentes de contacto con distintos tipos de depósitos (Simitzis-Le Flohic et al. 1983, Jongebloed et al. 1987, Buffington et al. 1988). Se fijaron durante 5 horas en una mezcla de glutaraldehído al 2.5% y tampón cacodilato 0.1 M a temperatura ambiente. Se realizaron 6 lavados cada 15 minutos con el mismo tampón y se efectuó una segunda fijación, por un periodo de 2 horas, con una solución tamponada de tetraóxido de osmio al 2%. Se utilizó el mismo tiempo para deshidratar las muestras con alcohol etílico de gradación creciente (30%, 50%, 70%, 90% y absoluto). Posteriormente, se colocaron en una mezcla de alcohol etílico absoluto y acetato de amilo 1:1 (v/v) durante 45 minutos. Por último un baño de acetato de amilo dejó preparadas las muestras para realizar su punto crítico y metalización, es decir, su recubrimiento con una capa de moléculas de oro de 30 nm, a fin de aumentar su contraste. Se montaron y se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (Hitachi S-2300, Leica-360 y Jeol JSM-6400) a una distancia de trabajo comprendida entre 6 y 8 mm y a una intensidad de 15 ó 25 Kv. La composición y preparación de las mezclas químicas utilizadas en el proceso descrito se especifican en el apéndice que figura al final del capítulo.

Los procesos indicados se llevaron a cabo en la Unitat de Microscòpia Electrònica dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona y en la Unitat de Microbiologia del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili (Reus).

Preparación de los pares estereoscópicos

En determinadas ocasiones se obtuvieron imágenes estereoscópicas de una zona concreta de las lentes hidrofílicas procedentes de usuarios colonizadas por hongos (véase apartado 4.1.4.). Para ello, se siguió la metodología descrita por Bozza & Rusell (1991); primero se tomó una fotografía de la misma y a continuación otra de la muestra inclinada. Cada una debe tener ajustado el enfoque y el contraste. Cualquier ángulo de inclinación tendrá como resultado la

obtención de un efecto tridimensional sobre la imagen cuando se observe estereoscópicamente. Los ángulos de inclinación más comunmente empleados oscilan entre 6 y 10 grados, valores que están dentro del rango de ángulos apreciables por ambos ojos al enfocar un objeto situado a una distancia de 25 cm.

Para asegurar que el área de interés pueda ser reconocida después de inclinar la muestra, se dibujó en la pantalla unos puntos de referencia útiles para volver a centrar el área después de inclinar la muestra. Una vez obtenidas las fotografías, los pares estereoscópicos se observaron mediante un estereoprisma.

El procedimiento descrito se llevó a cabo en la Unitat de Microbiologia del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili.

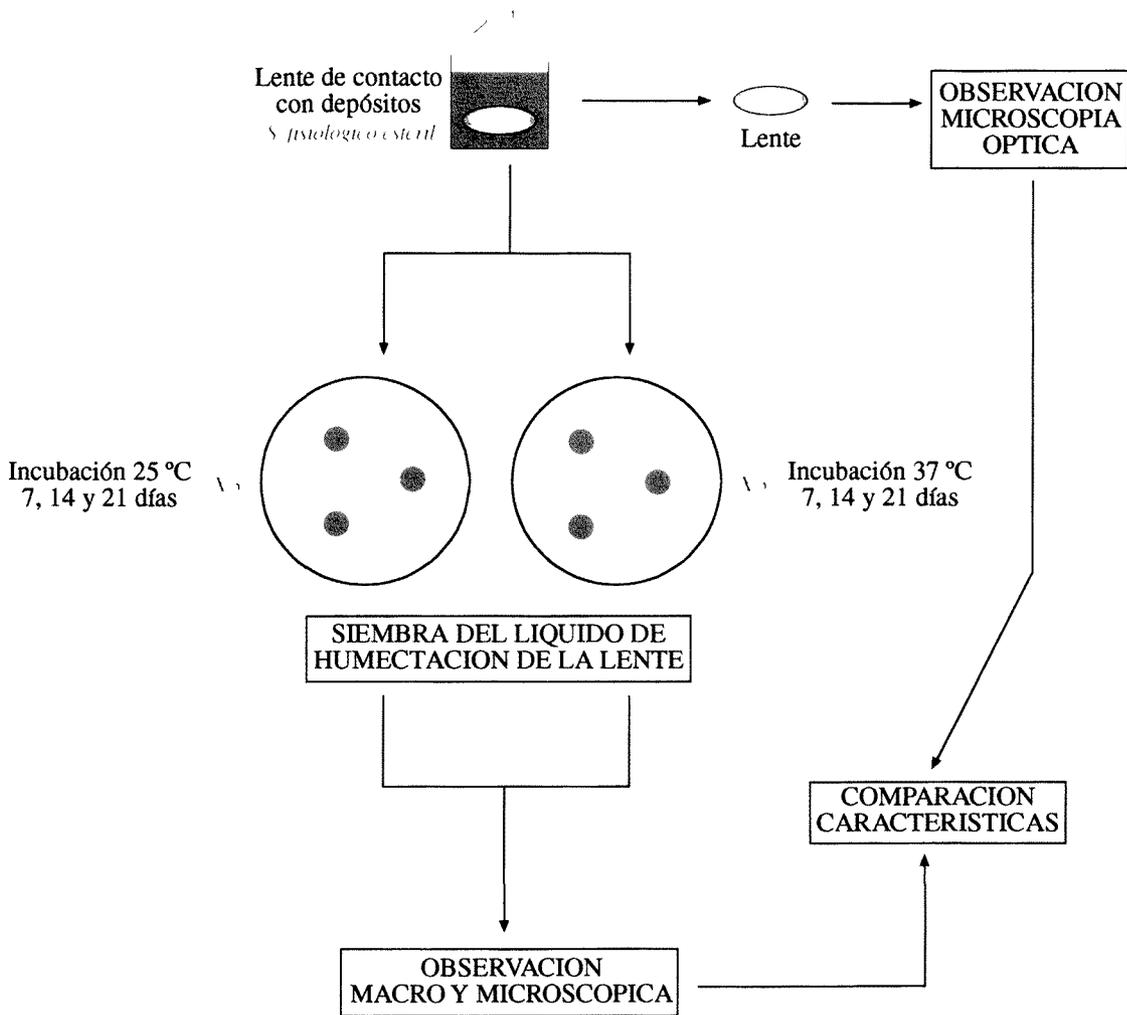


Figura 5.- Metodología utilizada para la identificación taxonómica de los hongos colonizadores de las lentes de contacto hidrofílicas procedentes de usuarios.

3.2. LENTES DE CONTACTO NUEVAS

En el presente apartado se describen los materiales y la metodología utilizada para provocar la colonización por levaduras y hongos filamentosos de lentes de contacto nuevas, es decir, no utilizadas por usuarios, tanto hidrofílicas (apartado 3.2.1.) como rígidas permeables a los gases (apartado 3.2.2.). Asimismo, se explica el método seguido para la observación de las lentes mediante microscopía confocal (apartados 3.2.1.2.8. y 3.2.2.7.). La metodología llevada a cabo para el análisis de las lentes hidrofílicas mediante microscopía electrónica (apartado 3.2.1.2.7.) es la misma que la expuesta para las lentes procedentes de usuarios (apartado 3.1.2.).

Antes de provocar la colonización de las lentes de contacto nuevas, se procedió a revisar la bibliografía existente sobre el tema. En relación a los medios de cultivo utilizados, se comprobó que en numerosas ocasiones se emplean medios líquidos para la incubación de las lentes. Son distintas soluciones que incluyen desde el agua destilada estéril (Tragakis et al. 1973), hasta medios ricos en sales (Simmons et al. 1986, Buffington et al. 1988). En todos los casos, se conoce la concentración del inóculo, que está comprendida entre 10^4 y 10^7 . Se emplean asimismo medios sólidos, como el agar de Sabouraud, conjuntamente con un fragmento de la colonia fúngica posible colonizadora de las lentes (Simitzis-Le Flohic et al. 1983).

Por otra parte, se revisó la normativa seguida por la American Society for Testing and Materials (ASTM) para determinar la resistencia de materiales poliméricos sintéticos a hongos (ASTM G 21-70, 1975). En este caso, el medio de incubación utilizado es rico en sales y además posee agar.

Revisados los medios de cultivo utilizados en las distintas metodologías indicadas, se decidió incubar las lentes con los tres medios líquidos especificados en el apartado 3.2.1.1.2., suero fisiológico, medio líquido de Sabouraud y lágrima sintética, ostensiblemente diferentes en su composición

química, fuente de carbono y de nitrógeno. Todos ellos serán comentados posteriormente.

En relación a las especies de microorganismos estudiados, se seleccionaron tanto levaduras como hongos filamentosos para analizar las posibles diferencias de adhesión e invasión existentes entre ambos grupos de hongos. Se estudiaron tres especies de levaduras, *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *Torulopsis glabrata*. Se seleccionó el género *Candida* por haber sido aislado de forma mayoritaria en las lentes de contacto (Liotet & Warnet 1981; Wilhelmus et al. 1988), de úlceras corneales asociadas al uso de lentes de contacto (Krachmer et al. 1978; Liesegang & Forster 1980) y de queratitis fúngicas relacionadas con el uso de lentes terapéuticas (Wilhelmus et al. 1988). Además, es la levadura más estudiada desde muchos puntos de vista y posiblemente de la que se dispone de más información. Por su parte, *Torulopsis* muestra una gran adherencia a acrílicos y plásticos.

Se seleccionó asimismo el género *Aspergillus* por ser un contaminante ambiental común, aislado también de lentes de contacto de hidrogel (Berger & Streeten 1981) y agente potencial de úlceras corneales (Krachmer et al. 1978; Liesegang & Forster 1980). Las principales características de las especies objeto de estudio se comentan en el apartado 3.2.1.1.3.

Todas las lentes hidrofílicas utilizadas en el estudio se dividieron por la mitad con un bisturí estéril para comprobar si a ambos lados de la zona de escisión se producía una mayor adherencia de hifas fúngicas y un incremento de la invasión de las mismas a través de la matriz lenticular. Las características de las lentes analizadas se exponen en los apartados 3.2.1.1.1. y 3.2.1.2.1.

3.2.1. LENTEs HIDROFILICAS

En el presente apartado se describe el material y la metodología seguida

para provocar la colonización de las lentes hidrofílicas por hongos, tanto las de uso continuado (véase apartado 3.2.1.1.), como las de uso diario (véase apartado 3.2.1.2.).

CARACTERIZACION QUIMICA DE LOS MATERIALES

Para proceder a la caracterización química de los materiales de las lentes de contacto hidrofílicas utilizadas en el estudio se colocaron en un desecador que contenía cloruro de calcio anhidro durante 3 días. Las muestras se trituraron y se mezclaron con bromuro potásico en una proporción en peso de 1:10. Se utilizó dicho diluyente porque no absorbe en la región del infrarrojo (IR) medio donde se efectúa la lectura. Se obtuvieron unas pastillas con las cuales se registraron los espectros IR mediante un aparato FTIR (Perkin-Elmer 2000) a temperatura ambiente. En todos los casos los espectros de IR se obtuvieron con 64 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} . Los estudios sobre caracterización química de los polímeros de las lentes se llevaron a cabo en el Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Politècnica de Catalunya.

3.2.1.1. LENTES DE USO CONTINUADO

3.2.1.1.1. Lentes

En los apartados 1.1.1. y 1.1.2. se especifican las principales características de los materiales de las lentes de contacto, así como su régimen de uso. Para llevar a cabo el presente apartado se utilizaron lentes de contacto de uso continuado hidrofílicas de polymacon con un contenido hídrico del 38.6%, pertenecientes al grupo I de la FDA, es decir, de baja hidrofilia (inferior al 50%) y no iónicas (véase apartado 1.1.1.2.). Este tipo de lentes se adaptan a los

usuarios en régimen de uso semanal continuado. Transcurrido dicho periodo se retiran y son sustituidas por otras nuevas.

Según la información disponible sobre el material, son lentes de poli (metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA) constituidas principalmente por dos monómeros, metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y dimetacrilato de dietilenglicol (EGDMA) que actúa de agente reticulante. El coeficiente de transmisibilidad de oxígeno que proporciona el material, medido entre 30 y 35 °C, es de 10.

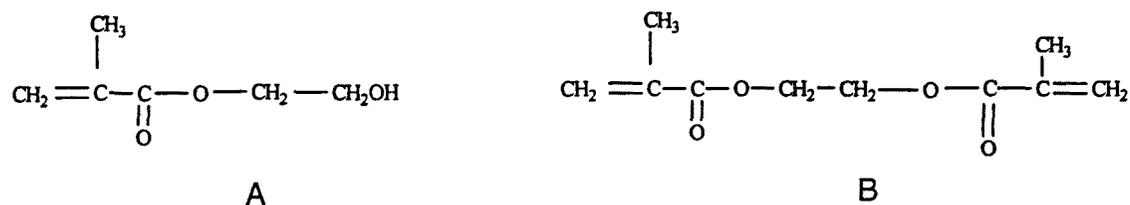


Figura 6.- Principales monómeros que constituyen el polímaco, HEMA (A) y EGDMA (B).

Tal como se ha indicado, las lentes fueron divididas por la mitad y, por tanto, se provocó la colonización de 40 medias lentes para cada cepa, medio de cultivo y lugar de siembra. Según se detallará posteriormente, se analizaron en total 11 cepas de distintas especies, incubadas en 2 lugares distintos (cámara de incubación y vial) y con 3 medios de cultivo (suero fisiológico, medio líquido de Sabouraud y lágrima sintética). Por tanto, se utilizaron 120 lentes (240 mitades) por cepa para efectuar los estudios de colonización de las lentes hidrofílicas de uso semanal continuado.

3.2.1.1.2. Medios de cultivo utilizados en la incubación

Para facilitar el crecimiento fúngico en las lentes de contacto se utilizaron

diferentes medios de cultivo líquidos. A todos ellos se les incorporó una proporción de 0.08 g/l de gentamicina para evitar la proliferación de bacterias que podría modificar los resultados relativos al crecimiento de los hongos. El pH de los distintos medios se valoró mediante un pHmetro (Metrohm 654), a una temperatura de 34 °C. Todos los medios fueron esterilizados, durante 20 minutos a 121 °C y 1 atmósfera de presión, en un autoclave Raypa modelo AE-750RV.

Suero fisiológico

Se eligió el suero fisiológico como medio de cultivo porque las lentes de contacto se sumergen en él después de su fabricación hasta que son desprecintadas por el contactólogo. Además, al ser un medio sin fuente de carbono ni de nitrógeno, se deseaba conocer si los hongos eran capaces de crecer a expensas del cloruro sódico y degradar el polímero de las lentes. Se preparó según figura en el apéndice y su pH resultante, previo a la incubación de las lentes, alcanzó un valor de 7.2.

Medio líquido de Sabouraud

Se seleccionó el caldo dextrosado de Sabouraud al 2% (Bio-Mérieux) por ser rico en carbono y nitrógeno y permitir, en consecuencia, un buen desarrollo de los hongos. La composición y preparación de dicho medio se especifican en el apéndice que figura al final del capítulo. El valor del pH antes de cultivar las lentes fue también de 7.0.

Lágrima sintética

Con el objetivo de proporcionar a los hongos un medio rico en diversos nutrientes, se preparó una solución denominada "lágrima sintética" con una

composición química similar a la real. Con este medio es posible comprobar si distintos lípidos y proteínas como la lisozima, lactoferrina y albúmina condicionan el crecimiento de los hongos, así como si facilitan la adhesión a las lentes de especies como *Candida albicans* (Butrus & Klotz 1986). No se creyó conveniente utilizar una lágrima artificial comercial, por su gran incidencia de sales y poca de lípidos y proteínas. Por lo tanto, se preparó una lágrima sintética según Mirejovski et al. (1991), aunque ligeramente modificada. Su composición, así como la de la lágrima sintética modificada utilizada en el estudio y la de la lágrima real, aparecen en el apéndice mencionado.

El pH de la lágrima sintética utilizada en el estudio previamente a la incubación de las lentes fue de 7.1, valor que se encuentra en el intervalo de pH de la lágrima real, por lo que no fue necesario añadir NaOH 10N para modificarlo, tal como indica Mirejovski et al. (1991).

3.2.1.1.3. Especies

Para provocar la colonización de las lentes hidrofílicas se emplearon independientemente levaduras y hongos filamentosos. Las especies utilizadas, su procedencia y características generales se comentan seguidamente.

Levaduras

Se emplearon distintas especies de levaduras procedentes de la colección del laboratorio de Micología del Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) de Barcelona. La cepas utilizadas fueron las siguientes:

<i>Candida albicans</i>	92009	(morfortipo 732634)
	93150	(morfortipo 332224)

<i>Candida tropicalis</i>	13/2	(morfortipo 732624)
	92077	(morfortipo 752632)
<i>Torulopsis glabrata</i>	93189	(morfortipo 000032)
	93370	(morfortipo 000032)

Los aislamientos se efectuaron de pacientes visitados o ingresados en el Hospital del Mar de Barcelona, a partir de uñas (cepa 92009 de *C. albicans* y las dos de *C. tropicalis*), de orina (cepa 93150 de *C. albicans*), de la punta de un catéter intravenoso (cepa 93189 de *T. glabrata*) y de líquido peritoneal (cepa 93370 de *T. glabrata*).

Candida

Candida es un género heterogéneo, actualmente clasificado dentro de la familia-forma Cryptococcaceae de hongos imperfectos, perteneciente al orden-forma Cryptococcales, de la clase-forma Blastomycetes.

El crecimiento de la levadura es aerobio. Las colonias pueden ser visibles ya a las 24-36 horas y alcanzar un tamaño de 1.5 a 2 mm, cuando se incuban en agar Sabouraud (Koneman & Roberts 1992). La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 37 °C. Las colonias son generalmente de color blanco vivo, pero pueden tomar un color crema o bronce con la edad. Son glabras, cremosas y pueden tener hifas sumergidas. Los blastoconidios son redondos, ovalados u oblongados y pueden encontrarse solos, originar racimos o cadenas (Kwon-Chung & Bennett 1992).

Las especies de *Candida*, y particularmente *C. albicans*, son frecuentemente miembros de la flora normal de boca, garganta, intestino grueso, vagina. Otras especies, como *C. tropicalis*, se aíslan de la piel y sobre todo debajo de las uñas de los dedos de los pies y en el ombligo. Así mismo, aparecen como

contaminantes en exudados u otras muestras tomadas en estas zonas. Las especies de *Candida* que existen a nivel cutáneo son poco patógenas, aunque se han aislado en determinadas formas clínicas (endocarditis, vaginitis y onicomicosis). No obstante, cuando encuentra en la piel condiciones favorables para su desarrollo (quemaduras, heridas, maceración, humedad, etc.) la coloniza, se multiplica y causa infecciones (Rippon 1990; Kwon-Chung & Bennett 1992).

Las infecciones oculares por *Candida* se producen a partir de lesiones en la córnea (queratitis) o pueden involucrar la retina (endoftalmitis) como una manifestación de diseminación de candidosis por vía hematológica. La infección ocular por *Candida* es grave y puede producir la pérdida de la función visual o la enucleación (Rippon 1990; Kwon-Chung & Bennett 1992).

Por otro lado, han sido descritos numerosos casos de contaminación fúngica en lentes de contacto (Krachmer et al. 1978; Liesegang & Foster 1980) provocados por este género.

Las levaduras del género *Candida*, como típicos agentes oportunistas, requieren unas condiciones especialmente favorable para su desarrollo. Entre ellas se han citado las siguientes:

- * Situaciones fisiológicas en que las defensas inmunológicas no se encuentran en estado óptimo (recién nacidos y ancianos).
- * Estados patológicos o sus tratamientos, que producen un efecto inmunodepresor (leucemia, linfoma, antimitóticos, etc.). Pacientes cuyas defensas están comprometidas por la enfermedad o por los efectos secundarios de las drogas usadas para tratar sus enfermedades, son fácilmente atacados por *Candida* que invade sus tejidos más profundos y produce severas infecciones.
- * Empleo de antimicrobianos que conducen a la destrucción de la flora normal con sobreinfección por levaduras, que son resistentes a estos

- agentes. Alteración de la mucosa intestinal, con el paso de las levaduras a través de ella. Disminución de la eficacia de los neutrófilos, para destruir la levadura.
- * Uso de corticoides (solos o asociados con antibióticos) que suprimen la respuesta de los neutrófilos frente a *Candida*, impiden la migración de los neutrófilos o afectan la fagocitosis y la digestión de las levaduras.
 - * En otros casos, las barreras naturales externas han desaparecido o bien son superadas por diferentes mecanismos (manipulaciones médicas o quirúrgicas) y las levaduras alcanzan directamente el medio interno (quemaduras, drogadicción, catéteres, intervenciones quirúrgicas, etc.).
 - * El incremento de glucosa en los tejidos del organismo es un factor que favorece el desarrollo y multiplicación de *Candida*, circunstancia importante en diabéticos que padecen con frecuencia candidosis.

Las especies de *Candida* se han aislado frecuentemente de ciertos comestibles y bebidas comunes. Los zumos de frutas envasados en cartón pueden estar contaminados por el género, mientras que no es tan probable su presencia cuando se conservan en latas o botellas de vidrio. Una amplia gama de vegetales crudos, comidas frías y bebidas sin alcohol también pueden contener la levadura. Parece ser que la contaminación de estos productos procede del hombre o de los animales.

Candida albicans

Candida albicans posee una gran cantidad de sinónimos: *Oidium albicans*, *Endomyces albicans*, *Monilia albicans*, *M. pinoyi*, *M. psilosis*, *Mycotoruloides triadis*, *Candida stellatoidea*, *C. claussenii* y *C. langeronii* (Kwon-Chung & Bennett 1992).

C. albicans crece fácilmente en los medios habituales a la temperatura ambiente o a 37 °C. En los cultivos con medios sólidos las colonias jóvenes se asemejan a las bacterianas, son lisas y cremosas, pero las más maduras son grandes y aparecen hundidas y rugosas. El agar con harina de maíz estimula la formación de clamidosporas que distinguen *C. albicans* de las otras especies (Koneman & Roberts 1992).

Es una especie polimórfica, es decir, en la superficie de los medios sólidos ricos crece como levadura gemante esférica u oval, pero cuando lo hace en la profundidad del medio, puede formar pseudohifas e inclusive hifas verdaderas. En los tejidos infectados y en muchos cultivos aparecen todas ellas, así como formas de resistencia, es decir, clamidosporas (Rippon 1990; Kwon-Chung & Bennett 1992).

Se encuentra en el hombre y otras especies animales, en vegetales y rara vez se ha aislado del suelo. Al parecer, es poco probable que *C. albicans* sobreviva y se multiplique en un ambiente no animal, aunque las condiciones insalubres conducen a la contaminación del ambiente o de los alimentos por el microorganismo. *C. albicans*, la levadura más patógena, es habitualmente de procedencia endógena, por ello, tiene una distribución natural muy restringida (Kwon-Chung & Bennett 1992).

En la especie humana, *C. albicans* forma parte de la flora microbiana de la boca y tubo digestivo. En la mujer se localiza además en la vagina, con mayor frecuencia durante el embarazo. Los demás microorganismos de la flora digestiva y vaginal ejercen un control sobre *C. albicans* (quizás por medio de sustancias inhibidoras). Estos microorganismos disminuyen en número o desaparecen por el uso de antibióticos, anovulatorios u otras sustancias que alteran el equilibrio ecológico de la flora microbiana habitual. También una dieta elevada en frutas parece que incrementa el número de levaduras intestinales. Es la principal especie de *Candida* aislada de la boca de pacientes que presentan las primeras manifestaciones de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en Europa y Estados Unidos (Klein et al. 1984).

En usuarios de lentes de contacto, *C. albicans* provoca problemas de ulceraciones corneales generalmente en pacientes portadores de lentes de uso continuado, asociados a un tratamiento con corticoesteroides.

Candida tropicalis

Los principales sinónimos de *Candida tropicalis* son *Oidium tropicalis*, *Monilia tropicalis*, *Candida vulgaris*, *Mycotorula japonicum*, *M. dimorpha*, *M. trimorpha*, *Trichosporon lodderi* y *Candida paratropicalis* (Kwon-Chung & Bennett 1992).

Las colonias no se diferencian morfológicamente de las de *C. albicans*. Son de color crema, brillantes o mates, blandas, lisas o arrugadas. Los bordes se tornan filamentosos cuando se incrementan los días de incubación. Microscópicamente las células son globosas, ovoides o alargadas. En algunos casos tienen forma de pera y los extremos de las pseudohifas o de las hifas parecen clamidosporas. Estas esporas no se producen regularmente y, a diferencia de las de *C. albicans*, tienen las paredes finas. Las pseudohifas largas y ramificadas, producen blastoporos simples o en cadenas junto a los septos. Algunos aislamientos de *C. tropicalis* forman tubos germinales en suero, aunque esta capacidad se pierde rápidamente en sucesivos subcultivos (Koneman & Roberts 1992).

Procede de aislamientos humanos y de fuentes naturales. Se ha obtenido de suelos orgánicos enriquecidos y medios acuáticos. Por esta razón, Do Carmo-Sousa (1969) clasifica a esta especie, conjuntamente con *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. guilliermondi*, como saprófita facultativa, mientras que *C. albicans* es saprófita animal obligada. *C. tropicalis* se ha aislado con más frecuencia que *C. albicans* de pacientes con leucemia o con enfermedades linforeticulares (Wingard et al. 1979). También se ha descrito como especie asociada a queratitis fúngica en usuarios de lentes de contacto de uso continuado y terapéuticas (Rosa et al. 1994).

Torulopsis

Torulopsis es un miembro de la clase-forma Blastomycetes, perteneciente al orden-forma Cryptococcales y a la familia-forma Cryptococcaceae de hongos imperfectos.

El género *Torulopsis* se ha diferenciado tradicionalmente de *Candida* por no poder originar pseudohifas. Sin embargo, su formación en este último género no siempre es posible, por lo que se crea una confusión en la clasificación de algunas de sus especies. Yarrow & Meyer (1978) cuestionan la validez del nombre *Torulopsis*, descrito en 1894 por Berlese y proponen transferir todas sus especies al género *Candida*. Por lo tanto, *Candida* se caracterizaría por "no tener pseudohifas generalmente y, si están presentes, ser rudimentarias o bien desarrolladas" en vez de por "formar pseudomicelio en todas las especies", como figura actualmente. McGinnis et al. (1984) rechazan el tratamiento taxonómico de los autores anteriores e indican que *Torulopsis* es morfológicamente distinto al género *Candida*. Sin embargo, el nombre *Torulopsis* no satisface a todos los investigadores. Según Odds et al. (1990) la separación de los dos géneros en base a la capacidad de formar pseudohifas es arbitraria e insatisfactoria.

Torulopsis glabrata

La especie de *Torulopsis* más común es *T. glabrata*, fácilmente distinguible de las especies de *Candida* por la falta de pseudohifas y por pequeñas secuencias del ARNr. *Cryptococcus glabratus* aparece como sinónimo de *T. glabrata* (Kwon-Chung & Bennett 1992).

Produce colonias de color crema, brillantes, blandas y cremosas, sin pseudohifas y sin filamentos periféricos cuando crecen en agar. Las células son ovoides y pueden formar pequeñas ramificaciones.

La vaginitis es la forma más común de infección provocada por la especie

(Rippon 1990). *T. glabrata*, al contrario que *C. albicans*, es una levadura haploide.

Hongos filamentosos

En el estudio de colonización de las lentes por hongos filamentosos se emplearon cinco cepas de *Aspergillus niger*.

<i>Aspergillus niger</i>	22 (MR-AN)
	24 (MR-AN)
	25 (MR-AN)
	2574
	2700 (equivalente a la cepa 9642 de la ATCC)

Las tres primeras procedieron del IMIM y se aislaron de muestras ambientales. Las dos últimas fueron solicitadas a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). La cepa 2574 es resistente a agentes antimicrobianos y por ello se utiliza como test para comprobar la eficacia de las soluciones conservantes. Por su parte, la cepa 2700 libera enzimas (pullulan 4-glucanohidrolasa, entre otros) que producen deterioro de plásticos, madera, productos conservantes (paranitrofenol), transmisiones y componentes de vehículos aéreos, equipos eléctricos y electrónicos, barnices, ceras, corcho, lacas, componentes automotrices y polímeros sintéticos.

Aspergillus

El género *Aspergillus*, pertenece a la familia-forma Moniliaceae, correspondiente al orden-forma Moniliales, de la clase-forma de los Hyphomycetes.

Aspergillus es un género de hongo filamentosos de crecimiento rápido que se encuentran con elevada frecuencia en los laboratorios clínicos. Debido a su producción de conidios pigmentados, muchas especies de *Aspergillus* forman colonias de colores vivos, que varían del verde al amarillo. También pueden verse colonias blancas y negras puras (Alexopoulos & Mims 1985).

Microscópicamente se caracteriza porque sus hifas están bien desarrolladas, profusamente ramificadas, son hialinas y septadas. El espacio protoplasmático comprendido entre dos septos posee, por lo general, más de un núcleo. El anamorfo es la forma de desarrollo más común de las especies de *Aspergillus* que se ve en los laboratorios clínicos. A medida que madura una colonia aparecen los conidióforos, generalmente no septados, cubiertos de cadenas de conidios pequeños, esféricos u ovals (Koneman & Roberts 1992).

Son hongos muy abundantes en la naturaleza que se aíslan a partir de diferentes vegetales en el suelo, en el aire y en materia orgánica en descomposición. Es difícil encontrar un material que contenga un poco de materia orgánica y algo de humedad, sobre el que *Aspergillus* no puedan crecer. Varias especies lo hacen sobre el cuero y los tejidos, reduciendo su valor comercial y confiriendo un olor característico (mohoso) a los zapatos y los vestidos. Es capaz de utilizar una variedad enorme de sustancias como alimento, gracias al gran número de enzimas que producen. Este género es un importante agente etiológico de biodeterioro. A menudo altera los alimentos y el grano almacenado cuando se acumulan aflatoxinas (secretadas por *A. flavus*) u ocratoxinas (liberadas por *A. ochraceus*). La especie *A. fumigatus* se aísla fácilmente de los nidos y plumas de aves y provoca enfermedades respiratorias a los animales y al hombre. Diversas especies de *Aspergillus* tienen relevancia industrial ya que producen ácidos orgánicos y enzimas y, por tanto, se aprovechan en la transformación de productos alimentarios y en diversas fermentaciones (Alexopoulos & Mims 1985).

A pesar de su ubicuidad, no producen habitualmente cuadros clínicos en el hombre sano, aunque sí que pueden ocasionar micosis oportunistas graves en

inmunosuprimidos y neutropénicos. La puerta de entrada habitual de *Aspergillus* es la respiratoria, ya que sus conidios se diseminan con gran facilidad por el aire. Los macrófagos alveolares constituyen un mecanismo de defensa importante frente a los conidios del hongo que alcanzan los alveolos. También puede localizarse en el oído, senos, sistema nervioso, piel, etc. Así mismo, han sido descritos numerosos casos de contaminación fúngica en lentes de contacto, provocadas por este género (Krachmer et al. 1978; Liesegang & Forster, 1980).

Aspergillus niger

La especie *Aspergillus niger* posee distintos sinónimos: *Sterigmatocystis nigra*, *Aspergillus nigriceps*, *A. welwitschiae*, *A. fumaricus* y, posiblemente, *A. nigricans* (Kwon-Chung & Bennet 1992).

Las colonias de *A. niger* crecen rápidamente en agar Sabouraud y a 25 °C. Comienza como una colonia blanca que puede volverse amarilla, pero rápidamente desarrolla un efecto de pimienta negra sobre la superficie, a medida que se producen conidios. El reverso de la colonia queda de color crema (Koneman & Roberts 1992).

Microscópicamente, las hifas presentan tabiques. Las paredes del conidióforo son lisas, incoloras, con un tono parduzco en la mitad superior. La vesícula es esférica y da origen a grandes métulas y fiálides más pequeñas, desde las cuales se producen conidios negros o marrones, globulares de paredes gruesas, regularmente rugosos que oscurecen la superficie de la vesícula. La cabeza conidial se divide en columnas con la edad.

A. niger forma parte de los hongos que de ordinario se denominan mohos negros, aunque no se le considera como un dematiáceo por la falta de pigmentación en la pared hifal. El género está ampliamente distribuido, desde la región ártica hasta los trópicos. Se encuentra a menudo en alimentos no protegidos a los que provoca su descomposición. Al hacerlo, algunas especies

producen micotoxinas. Hay cepas de *A. niger* que pueden vivir en queroseno y aprovecharlo como fuente de carbono. Como resultado disminuye el poder calórico del producto (deterioro). No obstante, esta especie tiene destacada importancia industrial en la producción de ácido cítrico, ácido glucónico y en la transformación de esteroides. Es la especie más utilizada en estudios sobre parasexualidad fúngica.

A. niger causa en el hombre colonización de lesiones cavitarias en los pulmones o senos paranasales. También se lo ha asociado con un alto porcentaje de casos de otomicosis (Rippon 1990).

3.2.1.1.4. Obtención y concentración del inóculo

Levaduras

Cada una de las cepas de levadura se sembró mediante estría oblicua en tubos con agar dextrosado de Sabouraud al 2% (Bio-Mérieux) dispuesto de forma inclinada. La composición y preparación del mismo se indica en el apéndice que aparece al final del capítulo. Posteriormente se procedió a la siembra de los microorganismos y se incubaron en la estufa (P. Selecta, modelo 371A) durante 24 horas a 37 °C. Una vez obtenidos los cultivos se sembraron en medio líquido de Sabouraud, preparado tal como se especificó en el apéndice mencionado y se mantuvieron en agitación a 37 °C durante 24 horas en un agitador orbital (P. Selecta, modelo Rotaterm) con plataforma calefactora.

Suero fisiológico

Se centrifugaron 10 ml del inóculo obtenido de cada cepa en una centrífuga (P. Selecta, modelo Centrónic S-577) durante 5 minutos a 1500 r.p.m. Se eliminó

el sobrenadante con una micropipeta (Biohit Proline) y se añadió suero fisiológico estéril. Se repitió dos veces más la misma operación y se agitó con el fin de conseguir una mezcla homogénea. La concentración obtenida de las distintas especies y cepas utilizadas estuvo comprendida entre 3.1 y 3.5×10^6 UFC/ml. Se determinó la misma mediante el método del nefelómetro de McFarland y fue corroborada realizando un recuento de colonias, según especifican las normas internacionales ISO 7954.

Medio líquido de Sabouraud

Se efectuó el procedimiento acabado de describir pero sustituyendo el suero fisiológico por el caldo dextrosado de Sabouraud al 2% (véase el apéndice que figura al final del capítulo). El inóculo obtenido después de 24 horas de incubación a 37 °C con agitación y preparado según se indicó, fue utilizado para realizar la incubación de las lentes. Se comprobó la concentración de los inóculos mediante recuento de colonias según se especifica en la norma internacional ISO citada. Los valores obtenidos coincidieron con los indicados al utilizar el suero fisiológico.

Lágrima sintética

Se realizó el proceso descrito con los dos medios anteriores, pero utilizando la lágrima sintética modificada descrita en el apartado 3.2.1.1.2. y en el apéndice del final del capítulo, en lugar del suero fisiológico y del caldo de Sabouraud. La concentración de los distintos inóculos, osciló entre 3.0 y 3.2×10^6 UFC/ml y fue hallada por el mismo procedimiento que en los casos anteriores, atendiendo a las normas indicadas.

Las suspensiones obtenidas con los tres medios de cultivo indicados se mantuvieron en la nevera a 4 °C por un periodo máximo de cinco días.

Hongos filamentosos

Al igual que las levaduras, cada una de las cepas de *A. niger* fue sembrada en tubos que contenían agar dextrosado de Sabouraud al 2% (véase el apéndice al final del capítulo), dispuesto de forma inclinada. Se incubaron durante 7 días a 25 °C en una estufa (P. Selecta, modelo Incubat).

Suero fisiológico

Se lavaron los conidios con 10 ml de suero fisiológico estéril que contenía 0.05% de polisorbato 80 (Merck). Se extrajo el lavado con una micropipeta y se repartió en tubos de centrifuga estériles. Se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadió a continuación más suero fisiológico, se agitó y se repitió dos veces el proceso de centrifugación. Se quitó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 ml de suero fisiológico. Se efectuó un recuento en placa, siguiendo la norma internacionales ISO 7954 y se comprobó que la concentración alcanzó valores diferentes según la cepa analizada, estando comprendidos entre 3.0 y 3.6×10^6 UFC/ml.

Medio líquido de Sabouraud

Se siguió la metodología descrita en el apartado anterior, pero en este caso, el medio utilizado fue el caldo dextrosado de Sabouraud al 2% (véase el apéndice del final del capítulo). Se obtuvo una concentración del inóculo que osciló entre 3.1 y 3.4×10^6 UFC/ml, según la cepa analizada.

Lágrima sintética

Se realizó el mismo procedimiento indicado con los otros medios de cultivo,

pero sustituyendo el suero fisiológico por la lágrima sintética comentada en el apartado 3.2.1.1.2. y preparada según se especifica en el apéndice. La concentración del inóculo de *A. niger* se estableció de igual forma que en los casos anteriores, resultando ser de 3.2 a 3.6×10^6 UFC/ml, según el microorganismo considerado.

Para realizar los recuentos y determinar la concentración de los conidios de los hongos filamentosos con los tres medios de cultivo indicados se escogieron los recuentos obtenidos a los tres días de incubación. Las suspensiones obtenidas se mantuvieron a 4 °C durante cinco días como máximo.

3.2.1.1.5. Incubación de las lentes

Las lentes de contacto se incubaron en dos lugares diferentes. Por una parte, se consideraron los mismos viales que contienen las lentes de contacto tras su fabricación. A cada uno de ellos se le añadió 8 ml del inóculo correspondiente y se incubaron durante 7 días a 34 °C para reproducir la temperatura corneal, con una humedad mínima del 85%. Se consideró este periodo de tiempo ya que es el número de días indicado por el contactólogo para usar las lentes desechables de uso continuado y ser reemplazadas por otras nuevas.

Por otra parte, se fabricó una cámara de incubación (figura 7) consistente en una cápsula de Petri de vidrio de 4.5 cm de diámetro y en cuyo interior se insertó un pequeño cilindro hueco de vidrio de 1 cm de diámetro. La lente se colocó sobre él con la concavidad hacia abajo, quedando un reducido espacio entre la lente y la parte inferior de la cámara y entre la lente y la tapa de la cápsula. Estos dos espacios albergaron el inóculo.

El diseño de la cámara de incubación intentó reproducir al máximo las condiciones reales de una lente de contacto adaptada en un ojo humano. Dicha

lente está bañada por la lágrima tanto por su cara externa como por la interna.

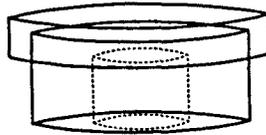


Figura 7.- Cámara de incubación diseñada para albergar el inóculo y la lente de contacto.

En este caso, el líquido que humectará la lente (suero fisiológico, lágrima sintética o Sabouraud líquido) estará contaminado por hongos (levaduras u hongos filamentosos). Cada cámara de incubación con 8 ml del inóculo correspondiente, se mantuvo bajo las mismas condiciones de cultivo que las especificadas para el caso de los viales.

3.2.1.1.6. Observación de las lentes

Se tomaron las lentes de sus respectivos lugares de incubación y se lavaron individualmente en tubos de ensayo que contenían 10 ml de suero fisiológico estéril. Se sometieron a agitación durante 1 minuto en un agitador vibrador para tubos (Heidolph, modelo Reax 2000) con el objetivo de eliminar las hifas lánxamente adheridas. Se colocaron entre un porta y un cubreobjetos y se observaron con un microscopio triocular (Nikon, modelo Optiphot X2F2R), con objetivos plan-acromáticos, condensador de campo claro, campo oscuro y contraste de fases y dotado de un equipo de fotomicrografía (Nikon, modelo Microflex-UFX-35-DX).

Se analizó la adhesión de las hifas/pseudohifas y se cuantificó la densidad de las mismas que estaba adherida a la superficie de los polímeros. Para ello,

se establecieron cuatro grados de adhesión de los cuales el grado 0 indicó la ausencia de la misma; el grado 1 determinó una densidad débil, es decir, que aparecía un máximo de 20 hifas/pseudohifas superficiales o grupos de ellas; el grado 2 implicó una densidad media de hifas/pseudohifas adheridas, comprendida entre 21 y 40. Por último, el grado 3 expresó una elevada densidad de las mismas, con valores superiores a 40.

A continuación se lavó manualmente cada una de las lentes con suero fisiológico estéril y se frotó con los dedos pulgar e índice para eliminar las hifas/pseudohifas adheridas a su superficie. Nuevamente se colocaron entre un porta y un cubreobjetos y se observaron con microscopía óptica a fin de cuantificar la invasión del hongo. La escala de valores utilizada fue la misma que la especificada anteriormente para determinar la adhesión. Por tanto, el grado 0 implicó la ausencia de invasión; el grado 1 expresó una invasión débil con la presencia de un máximo de 20 colonias internas; el grado 2 indicó una invasión media con un número de colonias invasoras que osciló entre 21 y 40. Se consideró el grado 3 cuando la invasión fue elevada, es decir, más de 40 colonias en la matriz.

La metodología utilizada en el estudio de colonización de las lentes de contacto hidrofílicas de uso continuado se resume en la figura 8.

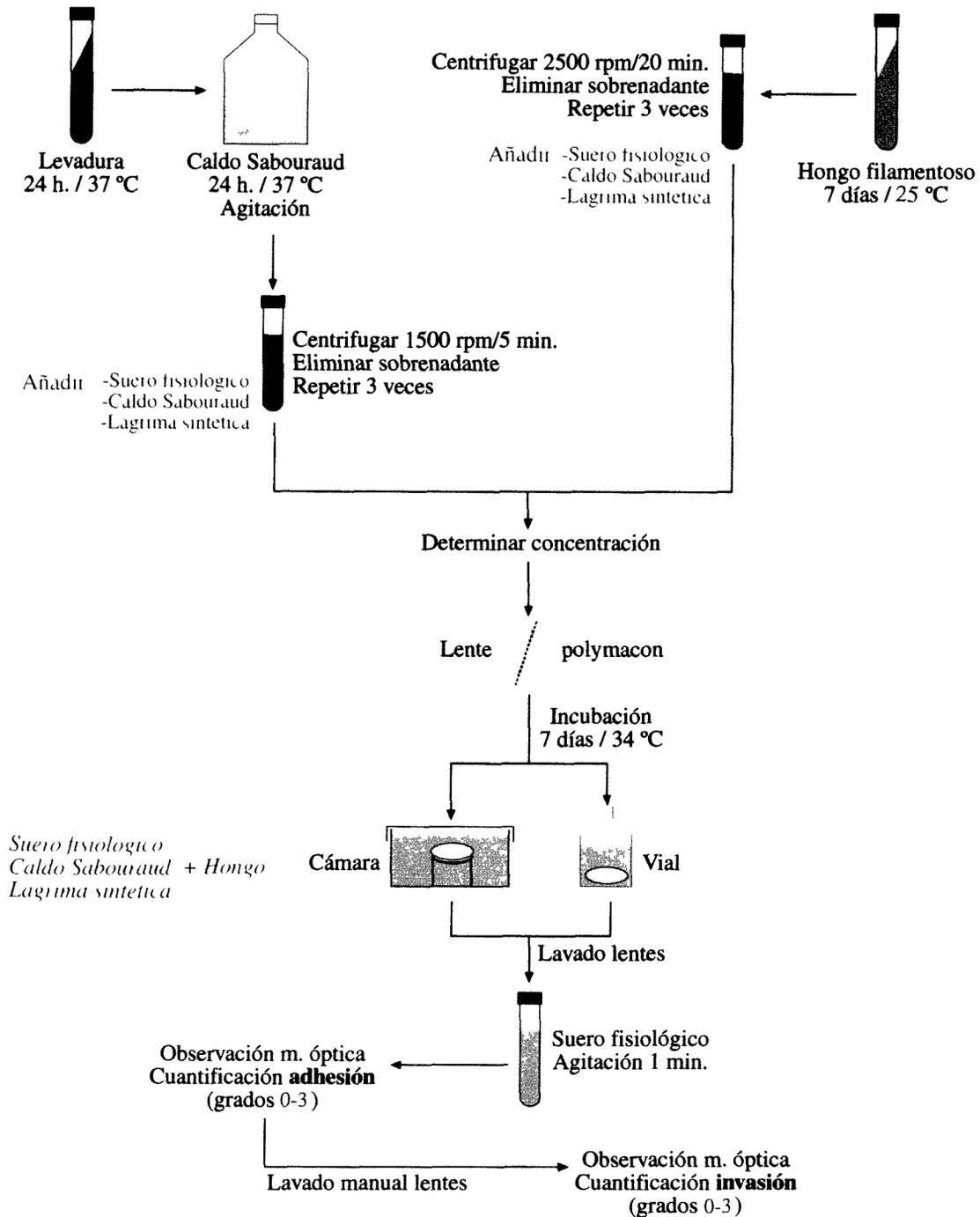


Figura 8.- Metodología utilizada para el estudio de la colonización fúngica de las lentes de contacto hidrofílicas de uso continuado.

3.2.1.2. LENTES DE USO DIARIO

En los apartados 1.1.1. y 1.1.2. de la presente memoria se exponen las consideraciones generales y las principales características de los materiales de las lentes de contacto, así como su régimen de uso.

Una vez obtenidos los resultados correspondientes a las lentes de uso continuado, se efectuaron algunas modificaciones en la metodología a seguir, así como en la selección de las cepas empleadas para provocar la colonización de las lentes de contacto utilizadas en régimen de uso diario.

3.2.1.2.1. Lentes

Se analizaron cuatro polímeros hidrofílicos distintos, cada uno de ellos incluido en un grupo de los establecidos por la FDA. Los materiales de las lentes de contacto fueron los siguientes:

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
POLIMEROS NO IONICOS		POLIMEROS IONICOS	
CONTENIDO HIDRICO <50%	CONTENIDO HIDRICO >50%	CONTENIDO HIDRICO <50%	CONTENIDO HIDRICO >50%
tefilcon	scafilcon A	butilcon A	vifilcon A

Según la información disponible sobre los monómeros que constituyen los

materiales indicados, el tefilcon está formado por metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y dimetacrilato de dietilenglicol (EGDMA), ambos hidrofílicos y que proporcionan al polímero un contenido hídrico del 37.5% y un coeficiente de transmisibilidad de oxígeno de 10, medido a 30-35 °C. Posee la misma composición química y características que el polymacon empleado en el análisis sobre la colonización de lentes de contacto hidrofílicas de uso continuado.

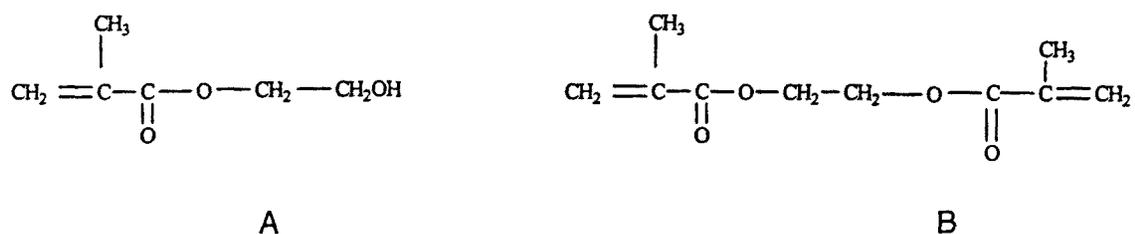


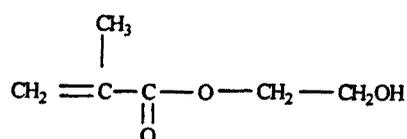
Figura 9.- Principales monómeros que constituyen el tefilcon, HEMA (A) y EGDMA (B).

Según la información disponible, el scafilcon A es el único de los materiales que no posee HEMA y únicamente presenta un monómero hidrofóbico, el metacrilato de metilo (MMA), y otro hidrofílico, la N-vinilpirrolidona (NVP). El grado de hidrofilia es del 71% y el coeficiente de transmisibilidad de oxígeno a la misma temperatura es de 35.7.

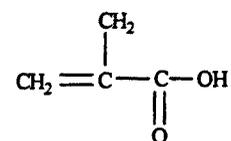


Figura 10.- Principales monómeros que constituyen el scafilcon A, MMA (A) y NVP (B).

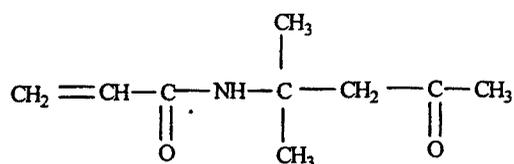
El tercer material empleado, el bufilcon A, está formado por HEMA, diacetona acrilamida (DAA), incluida para incrementar la permeabilidad al oxígeno, el ácido metacrílico (MA), monómero iónico que proporciona hidrofilia, y el trimetacrilato de trimetilpropano (TMPTMA) como agente de reticulación. En conjunto, constituyen un polímero con un contenido hídrico del 45% y un coeficiente de transmisibilidad de oxígeno de 12.5.



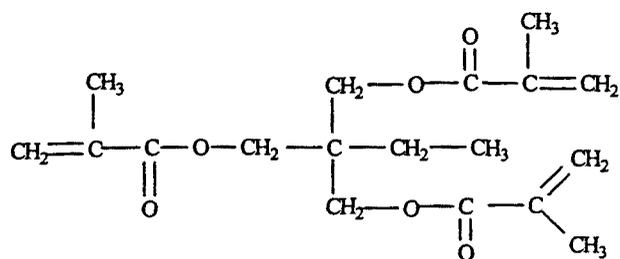
A



B



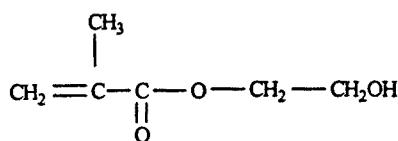
C



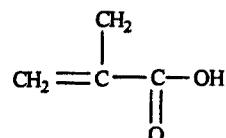
D

Figura 11.- Principales monómeros que constituyen el bufilcon A, HEMA (A), MA (B), DAA (C) Y TMPTMA (D).

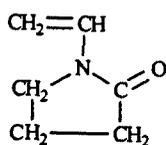
Por último, el vifilcon A posee HEMA, MA, NVP y EGDMA, su grado de hidrofilia es del 55% y su coeficiente de transmisibilidad de oxígeno de 30.5. Tanto este polímero como el que constituye el bufilcon A poseen nitrógeno en su estructura molecular; puede estar incluido en los grupos amida (bufilcon A) o formar parte de anillos conjuntamente con el carbono (vifilcon A).



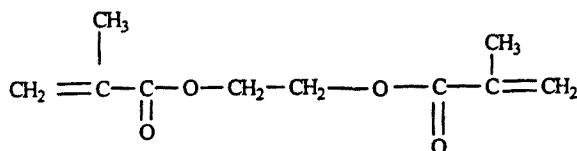
A



B



C



D

Figura 12.- Principales monómeros que constituyen el vifilcon A, HEMA (A), MA (B), NVP (C) Y EGDMA (D).

Al igual que en el caso de las lentes hidrofílicas de uso continuado (véase apartado 3.2.1.1.), las lentes se dividieron por la mitad con un bisturí estéril. Se provocó la colonización de 40 medias lentes para cada cepa, medio de cultivo y periodo de incubación. Se estudiaron 2 cepas de 2 especies (*Candida albicans* y *Aspergillus niger*), incubadas en 2 medios de cultivo diferentes (solución salina y medio líquido de Sabouraud) y se llevaron a cabo 4 periodos de revisión (3, 7, 14 y 21 días) para cada uno de los grupos de materiales analizados. En consecuencia, se necesitaron 320 lentes (160 por cepa), es decir, 640 mitades (320 por cepa) para efectuar los estudios de colonización de cada uno de los grupos de lentes establecidos por la FDA.

3.2.1.2.2. Medios de cultivo utilizados en la incubación

Como medios de cultivo se emplearon únicamente el suero fisiológico y el medio líquido de Sabouraud (véase el apéndice del final del capítulo). Los pH de los medios de cultivo utilizados alcanzaron prácticamente los mismos valores que los obtenidos para la incubación de las lentes hidrofílicas de uso continuado (véase apartado 3.2.1.1.). Mientras no se indique lo contrario, el material y la metodología empleada en el presente apartado son los mismos que los especificados en el apartado 3.2.1.1. de la memoria.

No se consideró la lágrima sintética para la incubación de las lentes de uso diario por dos motivos. El primero, estuvo relacionado con el elevado coste económico del medio. El número de lentes utilizadas fue considerable, hecho que condicionaba la preparación de varios litros de lágrima. El segundo, tuvo que ver con la baja frecuencia de colonización de las lentes de uso continuado al ser incubadas en el medio indicado (apartados 4.2.1.1.1. y 4.2.1.2.1.) que puede guardar relación con la presencia de determinados componentes químicos, especialmente las proteínas lagrimales.

3.2.1.2.3. Especies

Para el estudio se utilizaron las cepas 93150 de *C. albicans* y 2700 de *A. niger*. Fueron seleccionadas por ser las únicas que presentaron adhesión e invasión de las lentes de contacto desechables de uso continuado. Las principales características de dichas especies ya han sido descritas anteriormente al tratar la colonización de las lentes de uso continuado (véase apartado 3.2.1.1.3.).

3.2.1.2.4. Concentración del inóculo

Suero fisiológico

Los valores obtenidos tanto para las levaduras como para el hongo filamentoso fueron ligeramente superiores a los empleados en la incubación de las lentes hidrofílicas de uso continuado y estuvieron comprendidos entre 3.8 y 4.3×10^6 UFC/ml.

Medio líquido de Sabouraud

Los inóculos obtenidos después del periodo de incubación correspondiente y bajo las condiciones establecidas, dieron concentraciones que oscilaron entre 3.5 y 4.4×10^6 UFC/ml.

3.2.1.2.5. Incubación de las lentes

Las lentes de contacto se incubaron exclusivamente en las cámaras de incubación descritas en el apartado 3.2.1.1.5., bajo a las mismas condiciones de cultivo indicadas en las lentes hidrofílicas de uso continuado. Las cámaras fueron seleccionadas ya que permitieron una mayor adhesión del pseudomicelio/micelio de las especies de hongos analizadas a las lentes de uso continuado (véase los apartados 4.2.1.1.1. y 4.2.1.2.1.).

Las lentes de los diferentes grupos se observaron con microscopía óptica después de permanecer en contacto con el inóculo 3, 7, 14 y 21 días, al igual que en el caso de las lentes hidrofílicas de uso continuado. Cabe indicar que las lentes revisadas en cada uno de los días indicados eran nuevas y no procedían

del periodo de incubación anterior, de tal forma que no se interrumpía el crecimiento del hongo, su posible adherencia a los polímeros, ni su invasión, al ser agitadas y observadas al microscopio.

3.2.1.2.6. Observación de las lentes mediante microscopía óptica convencional

Todas las lentes se observaron mediante microscopía óptica, siguiendo la misma metodología especificada con las lentes hidrofílicas de uso continuado. Algunas también fueron analizadas con microscopía electrónica de barrido (apartado 3.2.1.2.7.) y con microscopía confocal (apartado 3.2.1.2.8.). Asimismo, determinadas las lentes colonizadas por *A. niger* se sometieron a procesos de congelación (véase apartado 3.1.2.1.). Los cortes efectuados también se observaron con microscopía óptica para ratificar la existencia de las hifas internas que colonizaron la matriz de las lentes. Se efectuaron las cuantificaciones correspondientes de adhesión y de invasión de filamentos fúngicos de todas aquellas lentes observadas con microscopía óptica, según se especifica en el apartado 3.2.1.1.6. de la presente memoria.

Un resumen de la metodología utilizada para provocar la colonización fúngica de las lentes de contacto hidrofílicas de uso diario se expone en la figura 13.

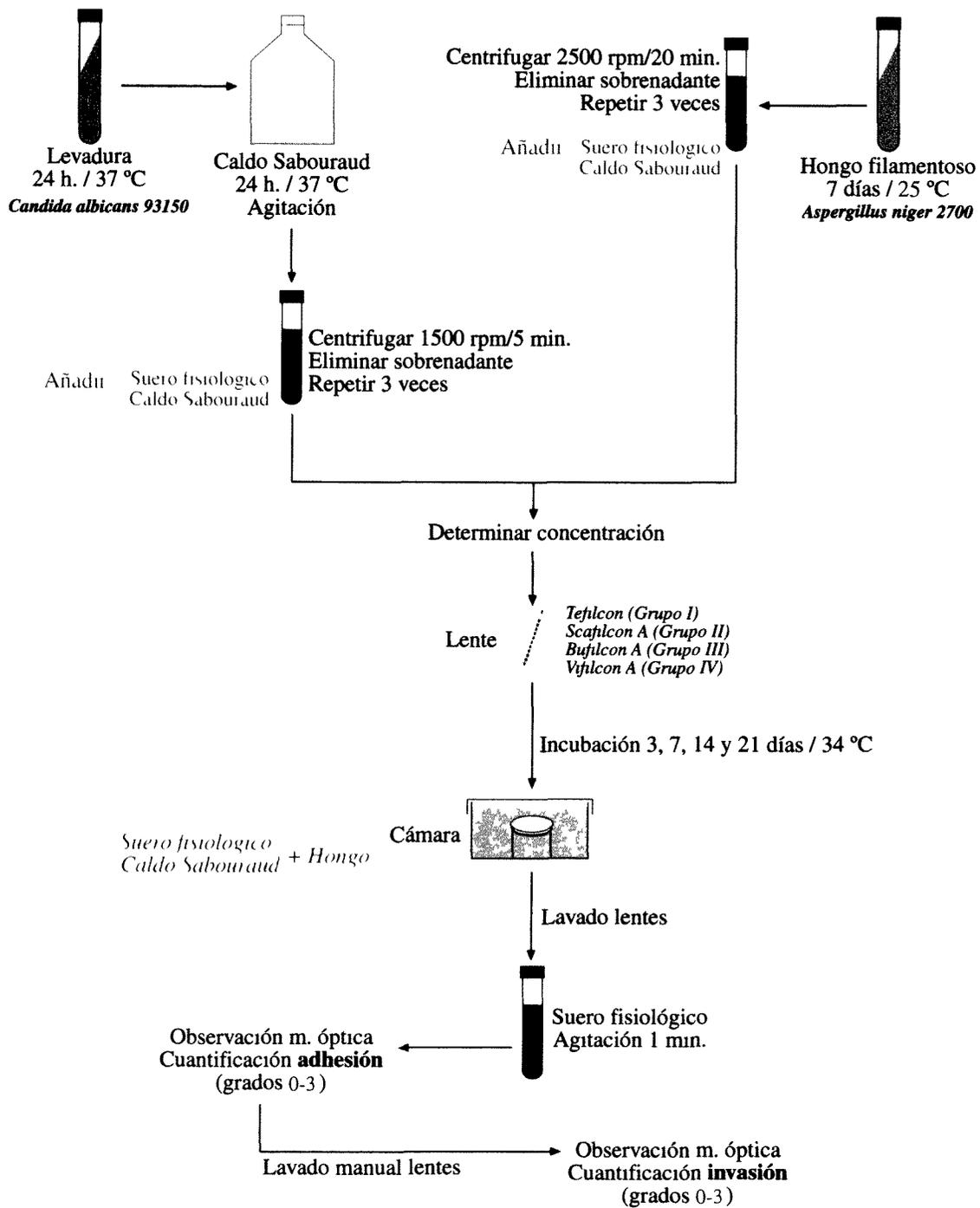


Figura 13.- Metodología utilizada para el estudio de la colonización fúngica de las lentes de contacto hidrofílicas de uso diario.

3.2.1.2.7. Observación de las lentes mediante microscopía electrónica de barrido

Fueron objeto de estudio 4 lentes hidrofílicas nuevas a las que se provocó la invasión de *C. albicans* 93150 y *A. niger* 2700 (véase apartado 3.2.1.). Todas las lentes presentaron un contenido hídrico superior al 50%. El material y la metodología utilizada han sido descritos en el apartado 3.1.2 para el caso de las lentes procedentes de usuarios.

3.2.1.2.8. Observación de las lentes mediante microscopía confocal

Una vez expuestos en la introducción (véase apartado 1.3.) los orígenes, principios ópticos, ventajas de la microscopía confocal en relación a la microscopía óptica convencional, y sus limitaciones de utilización, en el presente apartado se explica el procedimiento utilizado para el estudio de las colonias internas de las lentes de contacto mediante este método no invasivo.

Se seleccionaron al azar 8 lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario, colonizadas por *A. niger* 2700: 2 de tefilcon (grupo I), 2 de scafilcon A (grupo II), 2 de bufilcon A (grupo III) y 2 de vifilcon A (grupo IV), después de 21 días de incubación en medio líquido de Sabouraud. Por último, se eligieron de la misma forma 8 lentes hidrofílicas invadidas por *C. albicans* 93150, 2 de cada material, después de su incubación con el medio de cultivo anteriormente citado. Todas las lentes habían sido incubadas según la metodología expuesta en el apartado 3.2.1.2.

Con una pinza se tomó cada lente de la cámara de incubación correspondiente, se colocó en un tubo con 10 ml de suero fisiológico estéril y se agitó durante 1 minuto a potencia 7 (sobre un máximo de 10) en un agitador Heidolph (modelo reax 2000) para eliminar las hifas adheridas laxamente a la superficie lenticular. Fue necesario limpiar las lentes con un surfactante y

aclararlas debidamente cuando la cantidad de hifas superficiales fue muy abundante. La cara interna de las lentes hidrofílicas se puso en contacto con el portaobjetos y la externa se protegió con un cubreobjetos. Se observaron las lentes con el equipo de la Unidad de Microscòpia Confocal dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Consta de un microscopio confocal Leica TCS 4D invertido (Leitz DMIRBE) con objetivos NPlan 10 x / 0.22 Ph1, NPlan L 20 x / 0.30 Ph1, NPlan L 40 x / 0.50 Ph2, PLFluotar 40 x / 1.00 OIL, PL Apo 63 x / 1.40 OIL y PL Fluotar 100 x / 1.30-0.60 OIL. Para efectuar el estudio de las lentes se trabajó con los objetivos de 40 x, 63 x y 100 x, y siempre que las condiciones lo requirieran, se utilizó aceite de inmersión ($n = 1.518$).

Como fuente de iluminación está dotado de una lámpara halógena para observación por transmisión de luz y otra de vapores de mercurio para fluorescencia. Dispone de un láser de argón-kriptón de 75 mW con filtros de excitación de 488, 568 y 674 nm. En el estudio realizado se dispuso de una longitud de onda de 568 nm. La conducción y disección del láser se realiza mediante fibra óptica, evitando posibles problemas de calibración. Los filtros de emisión disponibles son PMT1: LP515, LP550, LP590, LP665, BPFITC y PMT2: LP530, LP590, LP665.

El sistema está controlado por un procesador (Motorola, modelo MVME 167,33 Mhz, 32 Mb de RAM) que funciona con el sistema operativo OS9. En este procesador está instalado el software de control, funciones y utilidades del TCS. La conexión con un PC (486 DX, 50 MHz, 8 Mb de RAM) que tiene instalado el programa Scanware, permite controlar el sistema TCS en entorno windows y OS9 simultáneamente. Se dispone de un monitor VGA de 14" y dos monitores de alta resolución de 21". El software del equipo propio del TCS tiene capacidad para hacer documentación de imágenes, medidas, densimetría, reconstrucciones 3D, rotaciones de las imágenes, etc. Además, dispone de softwares adicionales como el "Multicolor Analysis" (análisis de colocalizaciones, correcciones de cruzamiento, etc.) o el "Physiology Package" (cuantificaciones de iones, cinéticas, etc.).

Las imágenes salen en formato FLAT, por defecto, pero se pueden convertir en formato TIF y VOXEL. Se pueden almacenar en el disco duro del procesador o, preferentemente, en discos magneto-ópticos de 128 Mb. Uno de los monitores está conectado a un sistema fotográfico de alta resolución que permite hacer fotografías directas de pantalla en 35 mm, en blanco y negro o en color. La unidad también dispone de otro Pc (486 DX2, 66 MHz, 16 Mb de RAM) conectado a otra impresora (Epson Stylus Color), con una resolución de 700 p.p.

Se analizaron las lentes atendiendo a la reflexión de la luz emitida por las colonias y no se utilizaron, por tanto, marcadores fluorescentes. Seleccionado el objetivo a utilizar y el tamaño del "pinhole" correspondiente para conseguir la máxima confocalidad, se procedió inicialmente a realizar secciones ópticas del micelio interno en el plano focal horizontal (x-y). Para ello, se buscó la imagen obtenida por la mínima reflexión de las hifas de una colonia situada en la cara externa de la lente. A continuación, se profundizó hacia el interior de la matriz hasta observar la mínima luz reflejada producida por las hifas de la misma colonia que crecían en dirección a la cara interna de la lente. Se conoció, de esta forma, la profundidad que alcanzaron las hifas en el material. Posteriormente, se estableció el número de secciones ópticas a realizar en distintos planos y el intervalo entre ellas. La reconstrucción de la morfología colonial se obtuvo mediante la asociación de las secciones ópticas efectuadas siguiendo una proyección en 3D de toda la colonia. Es importante conocer la profundidad de foco para cada uno de los objetivos utilizados cuando una muestra es examinada axialmente a través del plano focal. Para hallarla, se utilizó la fórmula descrita por Kino & Corle (1989). Asimismo, se obtuvieron imágenes de las colonias invasoras a partir de secciones efectuadas en el plano vertical (x-z, y-z).

3.2.2. LENTES RIGIDAS PERMEABLES A LOS GASES

En el apartado 1.1.1.1. se exponen las consideraciones generales y las principales características de los materiales de las lentes de contacto rígidas.

Una vez conocidos los resultados obtenidos con las lentes de uso continuado y de uso diario y dada la limitación existente para conseguir lentes rígidas permeables a los gases, se modificó ligeramente la metodología a seguir para provocar la colonización de estas últimas, la cual queda resumida en la figura 14.

3.2.2.1. LENTES

Se usaron lentes de acrilato de flúorsilicona que, además de la alta transmisibilidad al oxígeno, absorben las radiaciones ultravioletas en grandes proporciones, gracias al filtro incorporado en la estructura del material. El flúor mejora la comodidad en el uso y disminuye la adhesión a los depósitos. Por su parte, la silicona es el componente flexible de las lentes rígidas permeables y reduce la atracción a los depósitos.

Se dispuso de 10 lentes rígidas permeables a los gases acabadas, es decir, tal como se encuentran en el mercado y 10 semiacabadas, fabricadas específicamente para el estudio, con los bordes sin pulir. Estas últimas se escogieron para determinar si la falta de pulido podía conducir a un incremento de su colonización en el borde. No se procedió a la división de las lentes en dos mitades, como en el caso de las lentes hidrofílicas, dada la imposibilidad de realizar el proceso sin producir el deterioro de la zona próxima a la escisión.

3.2.2.2. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LA INCUBACION

Únicamente se utilizó el medio líquido de Sabouraud para provocar la colonización de las lentes rígidas permeables a los gases (véase el apéndice del final del capítulo). El pH del mismo previo a la incubación de las lentes fue de 7.0. Mientras no se indique lo contrario, el material y la metodología empleada

en el presente caso son iguales a los especificados en los apartados 3.2.1.1. y 3.2.1.2.

3.2.2.3. ESPECIES

Al tener que efectuar el estudio con un número tan reducido de lentes, se creyó conveniente utilizar solamente la cepa 2700 de *A. niger* dado que posee unos enzimas hidrolíticos más potentes que *C. albicans* y, por tanto, parece más factible que, *a priori*, pudiera degradar el polímero de las lentes rígidas. Las características principales de la especie se describen en el apartado 3.2.1.1.3.

3.2.2.4. CONCENTRACION DEL INOCULO

La concentración del inóculo de *A. niger* obtenido para provocar la colonización de las lentes después del periodo de incubación correspondiente, fue de 5.5×10^6 UFC/ml.

3.2.2.5. INCUBACION DE LAS LENTES

Al igual que en el caso de las lentes hidrofílicas de uso diario, el material se colocó únicamente durante un periodo de 7 días en las cámaras de incubación descritas en el apartado 3.2.1.1.5., a 34 °C. Transcurrido dicho periodo se trataron individualmente de la misma manera que las lentes hidrofílicas y se observaron al microscopio.

3.2.2.6. OBSERVACION DE LAS LENTES MEDIANTE MICROSCOPIA OPTICA CONVENCIONAL

Todas las lentes fueron analizadas mediante microscopía óptica convencional y alguna de ellas también mediante microscopía confocal según se comentará a continuación. Se efectuaron las cuantificaciones correspondientes de adhesión de filamentos fúngicos y de invasión de todas aquellas lentes observadas con microscopía óptica, según se especifica en el apartado 3.2.1.1.6. de la presente memoria.

3.2.2.7. OBSERVACION DE LAS LENTES MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

Se eligieron al azar dos lentes rígidas permeables a los gases con los bordes sin acabar de pulir, deterioradas por *A. niger* 2700 después de ser incubadas en cámaras con medio líquido de Sabouraud durante 7 días, según se ha explicado en el presente apartado. La metodología utilizada para su observación mediante microscopía confocal ya se ha descrito para las lentes de contacto hidrofílicas nuevas (apartado 3.2.1.2.8.) con la diferencia de que las rígidas permeables a los gases fueron observadas sin colocar cubreobjetos.

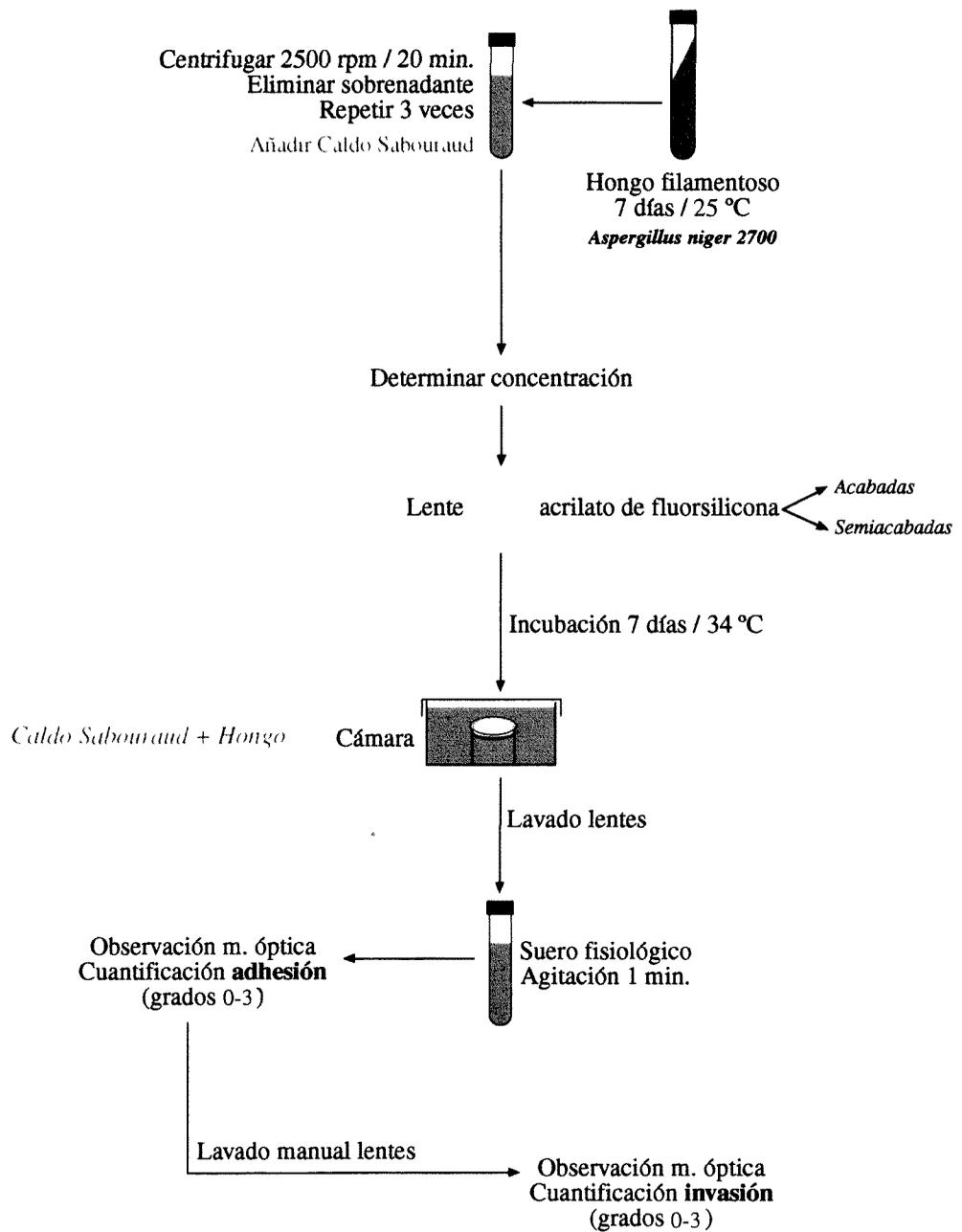


Figura 14.- Metodología utilizada para el estudio de la colonización de las lentes de contacto rígidas permeables a los gases.

3.3. MÉTODOS DE ANALISIS ESTADISTICO

Con el objeto de determinar la independencia entre el grado de adhesión o invasión y diversos parámetros relacionados con la colonización fúngica de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas, tales como el tipo de material, el medio de cultivo, el tiempo de incubación de los polímeros y la especie colonizadora (*Aspergillus niger* 2700 o *Candida albicans* 93150), se anotaron las frecuencias absolutas correspondientes a cada uno de los grados de adhesión o invasión observados en cada caso. Para determinar la significación de las posibles diferencias existentes en cada una de las comparaciones efectuadas se utilizaron tablas de contingencia de c columnas y r filas, empleando a tal efecto el estadístico Ji cuadrado ($\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$, donde O es la frecuencia observada y E la esperada) con $(c-1)*(r-1)$ grados de libertad y determinando los valores esperados a partir de los productos de los totales marginales (Zar 1996). Los cálculos se efectuaron mediante rutinas del paquete estadístico SPSS/PC+ (Norusis 1988).

Puesto que en cada experimento se emplearon 40 medias lentes (cada mitad se consideró como una unidad), en cada situación considerada la frecuencia relativa de lentes en que se registró adhesión o invasión fúngica sobre el total de lentes analizadas es $\hat{p} = X/40$. La distribución de estas frecuencias se ajusta a una binomial $B(40, p)$ y se asimiló a una normal $N(40*p, \sqrt{40*p*(1-p)})$, o lo que es lo mismo $N(\hat{p}, \sqrt{(\hat{p}*(1-\hat{p}))/40})$. Bajo estas premisas el intervalo de confianza al 95% para cada frecuencia relativa es $\hat{p} \pm 1.96 * \sqrt{(\hat{p}*(1-\hat{p}))/40}$. Dichos intervalos fueron relativizados multiplicando por 100.

Las afinidades entre los materiales constitutivos de las lentes de contacto según su respuesta a la adhesión o invasión fúngica en el conjunto de los días en que se efectuaron controles de las lentes (3, 7, 14 y 21 días), se determinaron mediante análisis de conglomerados ("cluster analysis"). Como medida de proximidad se empleó la raíz cuadrada de la suma de las distancias euclídeas al cuadrado, calculando cada una de ellas como la suma de los cuadrados de las diferencias entre las frecuencias absolutas (Bisquerra 1989). Los fenogramas

correspondientes se construyeron mediante el método del promedio entre grupos (UPGMA; Sneath & Sokal 1973), que define la distancia entre dos conglomerados como el promedio de las distancias entre todos los pares de elementos, en los que cada componente del par pertenece a un conglomerado distinto (Ferrán 1996). Los análisis de conglomerados se realizaron mediante el paquete estadístico NTSYS-pc (Rohlf 1994).