

EFECTO DE LA FILAMENTIZACION Y EL FLUCONAZOL SOBRE LA ADHERENCIA DE *Candida albicans*.

(Effect of filamentation and Fluconazole on the adherence of *Candida albicans*)

Marisa S. Biasoli¹; María E. Tosello¹
& Hortensia M. Magaró².

¹CEREMIC (Centro de Referencia de Micología).

²Área Parasitología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531 - (2000) - Rosario - Argentina.

Palabras clave: Fluconazol, filamentización, *Candida albicans*, adherencia.

Key words: Fluconazole, filamentation, *Candida albicans*, adherence.

RESUMEN

La adherencia y la filamentización son factores de virulencia que tienen gran importancia en el proceso de infección por levaduras del género *Candida*. El objetivo de nuestro trabajo fue el de comparar la capacidad de adherencia de una cepa de *Candida albicans* (aislada del tracto gastrointestinal humano) en su fase levaduriforme y en su fase filamentizada y estudiar la adherencia de estas 2 formas de la levadura, previamente tratadas con concentraciones subinhibitorias de Fluconazol(FCZ) a células epiteliales bucales (CEB), in vitro.

Los resultados obtenidos mostraron que la emisión de tubos germinativos aumentaba significativamente la adherencia de *C. albicans* a CEB ($p < 0,0001$).

Las levaduras se trataron con 2 concentraciones del antifúngico: 0,8 y 0,4 $\mu\text{g/ml}$ (CIM=0,8 $\mu\text{g/ml}$); las levaduras tratadas con 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de FCZ fueron significativamente más adherentes que las levaduras sin tratar ($p < 0,05$).

La exposición de las levaduras de la cepa *C. albicans* Ca 787 a la acción del FCZ, produjo alteraciones en la morfología y aumentó la tendencia de las levaduras a formar agregados celulares. Estos cambios produjeron una variación en la capacidad de adherencia de las levaduras y un cambio en la virulencia de estos microorganismos luego de la exposición al ATF.

INTRODUCCION

Las levaduras ejercen su virulencia a través de: la capacidad de adherencia, la formación de hifas o pseudohifas, la producción de enzimas líticas, la variabi-

SUMMARY

Adherence and filamentation are factors of virulence having much significance in the process of infection through yeast of the genus *Candida*. The goal of our work was to compare the adherence capability of a *Candida albicans* strain (isolated of the human gastrointestinal tract) in its yeast-like form and in its phase of filamentation and then to study the adherence of these two forms of yeasts, previously treated with subinhibitory concentrations of Fluconazol(FCZ), to buccal epithelial cells (CEB), in vitro.

Results showed that the emission of germinative tubes increased considerably the adherence of *C. albicans* to CEB ($p < 0,0001$).

Yeasts were exposed to two (2) concentrations of the antifungal drug: 0,8 and 0,4 $\mu\text{g/ml}$ (MIC=0,8 $\mu\text{g/ml}$). Yeasts treated with 0,8 $\mu\text{g/ml}$ of FCZ were moderately more adherent than yeasts without treatment ($p < 0,05$).

The exposure of yeasts of this *C. albicans* strain to the action of FCZ, produced alterations in the morphology and increased the tendency of yeasts to form cellular clumps. These changes would produce a variation in the adherence capability of the yeasts as well as a change in the virulence of these microorganisms after their exposure to ATF.

lidad fenotípica, etc. (1-4).

La adherencia de *Candida* a la superficie de las células del huésped se considera esencial para la expresión del potencial patogénico. Tanto para *Candida albicans*, como para otras especies del género, la capaci-

dad para adherirse a las células epiteliales, constituiría un paso inicial necesario en el proceso que lleva a la colonización, contribuiría a la persistencia del microorganismo dentro del huésped y al desarrollo de la infección fúngica. Esto sería requerido para iniciar el proceso de colonización, ya que un organismo debe estar firmemente unido a la superficie de un epitelio expuesto al flujo de un fluido para evitar ser arrastrado. Las células epiteliales de la cavidad oral, del tracto gastrointestinal y de la mucosa vaginal, poseen microorganismos adheridos que son constantemente eliminados por descamación. La progenie de esos microorganismos debe repetir la unión a las nuevas células epiteliales expuestas para mantener la colonización. Este efectivo mecanismo de defensa del hospedero conduciría, por presión selectiva, a la eventual eliminación de un microorganismo que posee una menor capacidad de adherencia. Por lo tanto, la adherencia es un paso muy importante a la colonización permanente (5-10).

La emisión de tubos germinativos por parte de las levaduras ha sido considerada desde hace bastante tiempo un factor de virulencia y se relaciona con una mayor capacidad invasiva, de penetración en los tejidos y de resistencia a la fagocitosis (1, 3).

El Fluconazol (FCZ), un compuesto triazólico, es un antifúngico de amplio espectro que actúa frente a una gran variedad de levaduras y hongos filamentosos (11, 12). Es de uso frecuente en la profilaxis de infecciones fúngicas en pacientes HIV (+), en pacientes neutropénicos, con leucemias agudas, con trasplantes de médula ósea, etc. Su utilización puede prevenir la colonización y/o la infección producida por diferentes especies de *Candida*. Concentraciones subinhibitorias del antifúngico están presentes en el transcurso del tratamiento, las que podrían interferir en el proceso de adherencia de las levaduras a las células epiteliales (13). Estas observaciones pueden ser relevantes en la terapia de las infecciones producidas por *C.albicans* y otras especies de *Candida*.

Nuestra hipótesis es que se produce una disminución o a lo sumo una no variación de la adherencia luego del tratamiento de las levaduras con FCZ. Por consiguiente los objetivos de nuestro trabajo fueron: a) comparar la capacidad de adherencia de una cepa de *C. albicans* en su fase levaduriforme y filamentizada y b) estudiar la adherencia a células epiteliales bucales (CEB), *in vitro* de estas 2 formas de la levadura, previamente tratada con concentraciones subinhibitorias de Fluconazol

MATERIALES Y METODOS

a) Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) al fluconazol (FCZ): Para este estudio se utilizó una cepa de *C.albicans* (Ca 787) aislada de heces

de un paciente que concurre al Servicio de Micología CEREMIC (Centro de Referencia de Micología).

La cepa *Candida krusei* ATCC 951705, utilizada como control de calidad en la reproducibilidad de resultados en los estudios de sensibilidad, fue cedida al Departamento de Micología del Instituto Nacional Microbiología «Dr. Carlos G. Malbrán»,

El FCZ fue suministrado por laboratorios Ga (droga pura con 99% de potencia).

Para el estudio de la sensibilidad *in vitro*, se guió la técnica del macrométodo de referencia en medio líquido, estandarizado por el Subcomité en pruebas de sensibilidad del «National Committee for Clinical Laboratory Standards» (NCCLS) (14). Para la cepa testigo *C. krusei* ATCC 951705 el CIM fue de 25 $\mu\text{g/ml}$ (para esta cepa el valor de referencia de la CIM = 16-64 $\mu\text{g/ml}$).

b) Levaduras: se utilizó la levadura Ca 787, para la cual se determinó una CIM para FCZ de 0,8 $\mu\text{g/ml}$. Se probaron el efecto de dos concentraciones de FCZ: 0,8 $\mu\text{g/ml}$ (valor de la CIM, 1xCIM) y 0,4 $\mu\text{g/ml}$ (0,5xCIM).

Para cada experimento, esta levadura fue repelida en medio Agar Sabouraud glucosado (ASG), a partir de una solución stock conservada a -20°C y se incubó a 37°C durante 24 h. Se tomó una colonia, se inoculó en 10 ml de Caldo Sabouraud Glucosa (CSG) y se incubó a 37°C , durante 24 h en agitación. De este desarrollo en medio líquido se tomaron 100 μl y se sembraron en:
- 20 ml de CSG, que correspondió al grupo testigo.
- 20 ml de CSG + FCZ en concentración final 0,8 μg
- 20 ml de CSG + FCZ en concentración final 0,4 μg

Estos cultivos se incubaron a 37°C en agitación durante un tiempo total de 48 h. A las 24 h se tomaron 6 ml del desarrollo del testigo y 6 ml de los cultivos con 0,4 $\mu\text{g/ml}$ y 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de FCZ. Las levaduras se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en el mismo buffer (PBS) hasta obtener una concentración final de $2,5 \times 10^7$ lev/ml.

Para estudiar el efecto del antifúngico sobre la capacidad de filamentización de *C. albicans* y a su vez este efecto podía modificar la adherencia, se incubó una alicuota (500 μl) de las levaduras expuestas a la acción de las diferentes concentraciones del antifúngico y una alicuota del grupo control, en 2 ml de medio 199 (Sigma) durante 2 h a 37°C .

Al cabo de ese tiempo, las suspensiones se centrifugaron, se lavaron 2 veces con PBS, se volvió a contar las levaduras y se llevaron a volumen final, para obtener una concentración de $2,5 \times 10^7$ lev/ml.

Este mismo procedimiento se repitió para las levaduras incubadas durante 48 h. En cada medio se registró la aparición o no del tubo germinativo (Fig. 1 a 5)

c) **Células epiteliales:** Se utilizó un pool de células epiteliales bucales (CEB) de varios donadores, que al momento de realizar la extracción, no presentaban signos ni síntomas de candidosis bucal. Las muestras se tomaron por raspado intenso con hisopo de la cara interna de las mejillas; se transfirieron a 6 ml de PBS y se lavaron 2 veces con el mismo buffer, para eliminar la microbiota acompañante. Se pasaron 6 veces a través de una jeringa con aguja de extracción (22 G 1), para romper los colgajos celulares y se resuspendieron en PBS hasta una concentración final de 5×10^5 cél/ml, por recuento en cámara de Neubauer. Las células fueron utilizadas dentro de las 2 horas de extraídas.

d) **Ensayo de adherencia:** Este ensayo se realizó para el grupo testigo y para las levaduras tratadas con 0,4 y 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de FCZ, en su forma levaduriforme y filamentizada, a las 24 y a las 48 h. Se siguió la técnica de Kimura *et al.* (15), con algunas modificaciones. Para ello se mezclaron 0,5 ml de la suspensión de cada levadura (concentración final de $2,5 \times 10^7$ lev/ml) con 0,5 ml de la suspensión del pool de células epiteliales (concentración final de 5×10^5 cél/ml) (relación levaduras/células = 50:1) en tubos de vidrio de 10 x 100 mm y tapa a rosca. Se trabajó a pH=7,2 (pH del buffer) y se incubó a 37°C durante una hora, en agitación (120 rpm). Al cabo de ese tiempo la mezcla de levaduras y células se filtró a través de papel Whatman N° 41 (poros de $\approx 20 \mu\text{m}$). Este tamaño de poro permitió el paso de las levaduras no adheridas, filamentizadas o no, y retuvo sólo las células epiteliales con las levaduras adheridas. El filtro se lavó con 10 ml de PBS para favorecer la eliminación de las levaduras no adheridas. A partir del papel filtro, las células con las levaduras adheridas se transfirieron a un portaobjetos, por presión del papel filtro sobre el vidrio, fijándose con alcohol metílico y se colorearon según la técnica de Gram-Nicolle. Se contaron al microscopio con objetivo de inmersión, el número de levaduras de cada forma, filamentizadas o no, adheridas a 100 células epiteliales bucales. Este ensayo se repitió 4 veces en diferentes días.

Para las levaduras tratadas, las concentraciones de FCZ con tiempo de incubación y morfología de la levadura, fueron las siguientes:

- 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de FCZ - 24 h - L (forma levaduriforme) y F (forma filamentizada);
- 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de FCZ - 48 h - L y F;
- 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de FCZ - 24 h - L y F;
- 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de FCZ - 48 h - L y F;

Se realizaron cuatro repeticiones del ensayo en las mismas condiciones, en diferentes días.

e) **Análisis estadístico de los datos:** La variable en estudio fue la adherencia = n° de levaduras adheridas/ 100 CEB. Los datos de esta variable, fueron analizados por ANOVA, previo ensayo de los supuestos correspondien-

tes (distribución normal de los errores aleatorios e igualdad de varianza). El diseño experimental elegido para este estudio, correspondió al caso de tres factores fijos cruzados (antifúngico, filamentización y tiempo) en bloques completos aleatorizados (pool de células epiteliales de varios donadores). El factor antifúngico fue estudiado a tres niveles: ausencia de FCZ (grupo testigo) y las dos concentraciones de FCZ: 0,4 y 0,8 $\mu\text{g/ml}$; la filamentización, a dos niveles: presencia o ausencia de tubos germinativos y el tiempo de incubación, a dos niveles: 24 y 48 h. Se utilizó la técnica de comparación de LSD (Least Significant Difference) para detectar diferencias a un nivel de significación del 5%.

RESULTADOS

En una primera inspección de tipo general, se observó aumento significativo ($p < 0,05$) de la adherencia promedio total a medida que aumentaba la dosis de FCZ, siendo 1,1 veces superior a 0,4 que a 0 $\mu\text{g/ml}$ y 1,4 veces superior a 0,8 que a 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de FCZ (Tabla 1). También hubo diferencia significativa ($p < 0,001$) entre formas, siendo la adherencia 2,3 veces superior en la forma filamentizada (Tabla 2). Sin embargo, tomando como modelo lo ocurrido en el grupo testigo donde la adherencia aumentó 1,47 veces desde las 24 a las 48 h y 2,96 veces desde la forma levaduriforme a la filamentizada (Tabla 3), se pudo apreciar que estas variaciones se hicieron menores en presencia de FCZ de 0,4 (1,27 y 2,86) y aun menores para la forma cuando aumentaba la dosis a 0,8 (1,70) (Tabla 3). Esto estaría demostrando que el FCZ tiene algún efecto sobre la acción de los factores tiempo y forma en la capacidad de adherencia de *C. albicans* a las células epiteliales bucales, especialmente sobre el último factor y al aumentar la dosis de 0,4 a 0,8 $\mu\text{g/ml}$.

Combinando tiempo y dosis, se observó, en relación al grupo testigo a las 24 h, que la forma levaduriforme aumentaba su adherencia hasta las 48 h de exposición 2,40 veces en ausencia de FCZ, 2,36 veces a dosis de 0,4 y 4,45 veces a dosis de 0,8. En la forma filamentizada, los mismos aumentos eran de 1,26 - 1,41 y 1,79 veces respectivamente (Tabla 2). Esto estaría indicando que el aumento natural de adherencia que debiera producirse entre 24 y 48 h, normalmente es menor en la forma filamentizada (1,26 respecto a 2,40), se mantiene en la forma levaduriformes a dosis de 0,4 de FCZ (2,36) y aumenta menos en la forma filamentizada a dosis de 0,8 de FCZ (Tabla 2).

DISCUSION

Candida albicans es un organismo complejo que puede desarrollarse con diferente morfología depen-

Tabla 1: Adherencia de *Candida albicans* Ca 787 en las 4 repeticiones, según grupo de tratamiento, tiempo de incubación y forma de la levadura (L= levaduriforme, F = Filamentizada)

Grupos de tratamiento												
	TESTIGO				FCZ 0,4 µg/ml				FCZ 0,8 µg/ml			
	24 hs		48 hs		24 hs		48 hs		24 hs		48 hs	
	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F
1	85	370	220	421	250	579	267	798	273	690	177	590
2	94	494	172	565	60	389	127	418	573	436	378	341
3	91	351	233	358	161	595	170	429	209	258	140	787
4	63	270	175	522	75	152	222	447	88	412	787	946

diendo de factores ambientales y de cultivo. Al menos tres formas se observan *in vitro* e *in vivo*. La levadura normalmente coloniza los pliegues de la piel y las membranas mucosas de la cavidad oral, el tracto vaginal y el tracto gastrointestinal (16). La conversión a la forma filamentizada ocurre por la germinación de los blastoconidios. A su vez, las levaduras pueden reproducirse por brotación o bien sufrir la elongación del brote para dar un pseudomicelio o pseudohifa. La formación de hifas ha sido considerada un factor de virulencia, mientras que la forma levaduriforme se asocia a una colonización no patológica de *Candida* (1,3). Este concepto no es estrictamente cierto, ya que en estudios histopatológicos de lesiones producidas por *Candida* se demuestra que las hifas no siempre están presentes y si se consideran otras especies de *Candida* potencialmente patógenas, muchas de éstas no producen pseudohifas, como *C.glabrata*, *C. famata*, *Rhodotorula* spp, etc. (17).

Sin embargo, al comparar la capacidad de adhe-

rencia de ambas formas, en nuestro estudio se demuestra que las levaduras filamentizadas son 2-3 veces más adherentes que las levaduras en su fase levaduriforme. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores, que han demostrado, utilizando diferentes tipos celulares y cultivo de tejidos, la relación entre el aumento de adherencia y la germinación de *C.albicans*: Kimura *et al.* (18), en CEB, Sobel *et al.* (19), en CEV, Samaranyake *et al.* (20), en células HeLa y células epiteliales renales embrionarias humanas y Lyman *et al.* (21) en tejido de vejiga. En el mismo sentido, Diez-Oreja *et al.* (22), trabajaron con una cepa mutante de *C. albicans* con incapacidad para filamentizar y comprobaron que tenía disminuida su capacidad para adherirse a células epiteliales humanas *in vitro* y que a su vez mostraba una baja virulencia en un modelo experimental de candidosis sistémica en ratones.

Estas observaciones confirman que las propiedades adherentes de los tubos germinativos estarían rela-

Tabla 2.- Adherencia promedio de *C.albicans* según grupo de tratamiento, forma de la levadura y tiempo de incubación

Grupo	Forma						Total
	Levadura			Filamentos			
	23h	48h	Var.	24h	48h	Var.	
Testigo	83,3	200	2,40	371,3	466,5	1,26	280,3
0,4 µm/ml FCZ	136,5	196,5	2,36	428,8	523,0	1,41	321,2
0,8 µm/ml FCZ	285,8	370,5	4,45	449,0	666,0	1,79	442,8

Tabla 3.- Adherencia promedio (*Desviación estándar) en cada grupo de tratamiento, según tiempo de exposición y forma de la levadura

	Testigo	FCZ 0,4	FCZ 0,8	Var.
24 horas	227,3 (165,7*)	282,6 (214,6)	367,4 (198,9)	1,30
48 horas	333,3 (156,6)	359,8 (215,7)	518,3 (303,1)	1,44
Variación:	1,47	1,27	1,41	
Levaduriforme	141,6 (66,3)	166,5 (77,0)	328,1 (240,9)	1,97
Filamentizada	418,9 (100,4)	475,9 (188,0)	557,5 (237,5)	1,17
Variación:	2,96	2,86	1,70	

Var. = Variación respecto a 24 horas en testigo

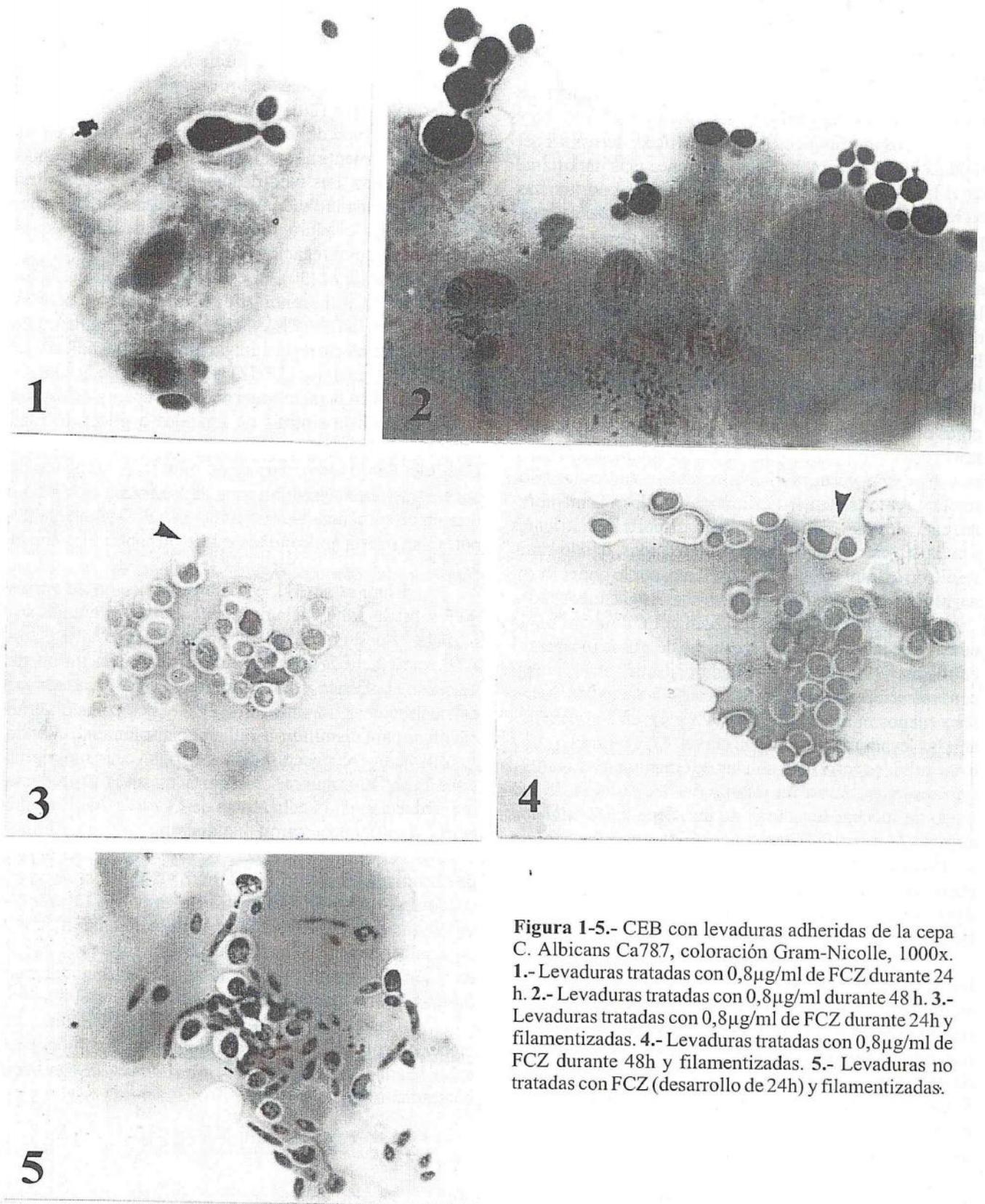


Figura 1-5.- CEB con levaduras adheridas de la cepa *C. Albicans* Ca787, coloración Gram-Nicolle, 1000x. 1.- Levaduras tratadas con 0,8µg/ml de FCZ durante 24 h. 2.- Levaduras tratadas con 0,8µg/ml durante 48 h. 3.- Levaduras tratadas con 0,8µg/ml de FCZ durante 24h y filamentizadas. 4.- Levaduras tratadas con 0,8µg/ml de FCZ durante 48h y filamentizadas. 5.- Levaduras no tratadas con FCZ (desarrollo de 24h) y filamentizadas.

cionadas a una pérdida o degradación de las moléculas de la pared celular (23) y al movimiento o reorganización de moléculas preexistentes (24), que resultaría en la exposición de un mayor número de sitios de unión (25, 26), es decir, un aumento en la expresión de las adhesinas de *Candida* durante la germinación.

Los antifúngicos (ATF) sintéticos, derivados del imidazol y del triazol, han sido el avance más importante en el tratamiento de las micosis sistémicas oportunistas en los últimos años (27). Los imidazoles y triazoles comparten, a grandes rasgos, los mecanismos de acción y resistencia y suelen agruparse como derivados azólicos o azoles. El fluconazol es un triazol que actúa inhibiendo la síntesis del ergosterol en el paso de la desmetilación del lanosterol en el carbono 14. La diana de los azoles es la enzima lanosterol-14-alfa-desmetilasa, que es uno de los miembros de la familia del citocromo P450, localizado en el retículo endoplásmico (28). La disminución del ergosterol y la acumulación de esteroides metilados, alteran la estructura y funciones de la membrana celular, que se vuelve más permeable y vulnerable a daños posteriores. Diferentes sistemas enzimáticos unidos a la membrana, como los que participan en el transporte de nutrientes y en la síntesis de quitina, se ven afectados, dando como resultado la inhibición del crecimiento, por lo que el fluconazol como el resto de los azoles son fungistáticos (28).

En nuestro estudio, si bien el FCZ no inhibió la emisión de tubos germinativos, luego de 2 h de incubación en medio 199 a 37°C, las levaduras tratadas con ambas concentraciones de FCZ mostraron TG apenas incipientes y menos numerosos (Figuras 3 y 4), en comparación con las levaduras no tratadas con el ATF (Figura 5). Estos resultados coinciden con los de Ghannoum *et al.* (29), quienes encontraron un retardo en la aparición de TG, luego de incubar levaduras de una cepa de *C. albicans* durante 24 h con FCZ (en concentraciones 0,5 x CIM y 1 x CIM) y exponerlas luego en suero a 37°C. No obstante, observaron que pasadas las 2 h de incubación, aproximadamente el 80% de las levaduras habían emitido TG, aún las expuestas a la mayor concentración de FCZ.

Si bien, los resultados obtenidos mostraron que las levaduras tratadas con 0,8 µg/ml de FCZ, son significativamente más adherentes que las levaduras no tratadas con el ATF, el aumento natural de la adherencia ocurrido en ausencia de FCZ fue menor cuando este estaba presente, especialmente a mayor dosis y en la forma filamentizada, lo que mostraría un efecto del ATF contrario al incremento natural de la adherencia, cuando aumenta el tiempo de incubación (Tabla 3).

En los extendidos de las levaduras tratadas con 0,8 µg/ml de FCZ, se pudieron observar levaduras grandes, de morfología alterada, distróficas y unidas formando grupos o agregados celulares, adheridas a las CEB

(Figuras 1 y 2).

De acuerdo a estas observaciones, el aumento de la adherencia para las levaduras de la cepa *C. albica* Ca 787 tratadas con 0,8 µg/ml de FCZ, se debería a tendencia de las mismas a formar agregados celulares difíciles de romper (30). Al mantenerse unidas, se adheriría todo el grupo de levaduras, lo que resultaría en un valor artificialmente aumentado de la adherencia de un pocas levaduras. Las modificaciones que el FCZ podría ejercer, en forma individual, sobre la capacidad de adherencia de cada levadura, quedarían enmascaradas por fenómeno de co-agregación antes mencionado.

Sobel *et al.* (30), al estudiar la acción del ketoconazol en la adherencia de *C. albicans* a células epiteliales vaginales (CEV), observaron un aumento de la misma, por efecto de la agregación de las levaduras. El ketoconazol (igual que el FCZ) actúa a nivel de la síntesis del ergosterol en la membrana de la levadura, y no estaría involucrado en la síntesis de ligandos o glicoproteína presentes en la capa más externa de la pared celular de *Candida*. Por lo tanto, para estos autores, el agregado de concentraciones subinhibitorias de ketoconazol, no tendría un efecto marcado en la adherencia. Esta misma hipótesis se podría aplicar a los resultados obtenidos con el FCZ.

Islam *et al.* (31), estudiaron la acción de varios ATF sobre la adherencia de *C. albicans* a diferentes superficies y observaron que la anfotericina B, que es un ATF que afecta la pared celular, reducía la unión de *Candida* al plástico y a la albúmina sérica bovina a bajas concentraciones, mientras que FCZ y ketoconazol, eran efectivos para disminuir la adherencia solamente cuando se utilizaban en concentraciones varias veces superiores a sus CIM. Otros autores observaron que el FCZ producía una reducción en la adherencia de *C. albicans*. Ellepola *et al.* (32, 33), encontraron una disminución en la formación de TG y en la adherencia de *Candida* a CEB, luego de ser tratada con ketoconazol, FCZ y 5-fluorocitosina en concentraciones subinhibitorias. Braga *et al.* (13), observaron que el FCZ provocaba una reducción significativa de la adherencia de *Candida* a CEV mientras que Segal *et al.* (34), detectaron un efecto similar, trabajando con bifonazol (otro agente azólico) sobre CEB.

Hasta el momento, los resultados disponibles del efecto de concentraciones subinhibitorias de fluconazol sobre la adherencia de cepas de *C. albicans*, *in vitro*, son contradictorios.

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este trabajo mostraron que la exposición de las levaduras de la cepa *C. albicans* Ca 787 a la acción del FCZ, afectó la formación de tubos

germinativos, produjo alteraciones en la morfología y aumentó la tendencia de las levaduras a formar agregados celulares. Estos cambios modificarían la interacción de *Candida* con las células del huésped debido a una diferente expresión de las proteínas de la pared por efecto del ATF.

Como consecuencia de las alteraciones mencionadas se produciría una variación en la capacidad de adherencia de las levaduras y un cambio en la virulencia de estos microorganismos luego de la exposición al ATF.

REFERENCIAS

- 1- Cutler, J.E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. Ann. Rev. Microbiol. 45:187-218
- 2- Calderone, R. A. (1994). Molecular pathogenesis of fungal infections. Trends Microbiol. 2:461-463
- 3- Senet, J.M. (1997). Risk factors and physiopathology of candidiasis. Rev. Iberoam. Micol. 14:6-13
- 4- Calderone, R.A. (1989). Host-parasite relationships in candidosis. Mycoses 32 (Suppl. 2):12-17
- 5- Gibbons, R.J. & Van Houte, J. (1975). Bacterial adherence in oral microbial ecology. Ann. Rev. Microbiol. 29:19-44
- 6- Reed, W.P. & Williams, R.C (1978). Bacterial adherence: First step in pathogenesis of certain infections. J. Chron. Dis. 31:67-72
- 7- King, R.D.; Lee, J.C. & Morris, A.L. (1980). Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. Infect. Immun. 27:667-674
- 8- Douglas, J.L. (1987). Adhesion to surfaces. En: Rose, A.H & Harrison, J.S. The Yeasts, vol 2: Yeasts and the Environment, 2nd ed
- 9- Sobel, J.D.; Myers, P.G.; Kayl, D.; Levinson, M.E. (1981). Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and epithelial cell. J. Infect. Dis. 143:76-82
- 10- Lee, S.C. & King, R.D. (1983). Characterization of *Candida albicans* adherence to human vaginal epithelial cells in vitro. Infect. Immun. 41:1024-1030
- 11- Como, J.A. & Dismukes, W.E. (1994). Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. New Engl. J. Med. 330: 263-272
- 12- Kibbler, C.C.; Mackenzie, D.W.R. & Odds, F.C. (1996). Principles and Practice of Clinical Mycology. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- 13- Braga, P.C.; Maci, M.; Dal Sasso, M.; Bohn M. (1996). Experimental evidences for a role of sub-inhibitory concentrations of rilopirox, nysatin and fluconazole on adherence of *Candida* spp. to vaginal epithelial cells. Chemotherapy 42: 249-265
- 14- NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards (1992). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, proposed standard. NCCLS Document M27-P12(25)
- 15- Kimura, L.H. & Pearsall, N.H. (1978). Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. Infect. Immun. 21: 64-68
- 16- Kwong-Chung, K.J. & Bennet, M.D. (1992). Medical Micology. Lea & Febiger. Philadelphia - London.
- 17- Odds C. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. J. Amer. Acad. Dermatol. 31:S2-S5
- 18- Kimura, L.H. & Pearsall, N.H. (1980). Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect. Immun. 28:464-468
- 19- Sobel, J.D.; Myers, P.G.; Kaye, D.; Levinson, M.E. (1981) Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and epithelial cell. Infect. Dis. 143:76-82
- 20- Samaranyake, L.P. & MacFarlane, T.W. (1982). Factors affecting the *in vitro* adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* epithelial cells of human origin. Arch. Oral. Biol. 27:869-873
- 21- Lyman, C.A.; Navarro, E.; Garrett, K.F.; Roberts, D.D.; Pizz P.A.; Walsh, T.J. (1999). Adherence of *Candida albicans* to bladder mucosa: development and application of a tissue explant assay. Mycoses 4 255-259
- 22- Diez-Orejas, R.; Molero, G.; Ríos-Serrano, I.; Vazquez, A.; G C.; Nombela, C.; Sanchez-Perez, M. (1999). Low virulence of morphological *Candida albicans* mutant. FEMS Microbiol. Lett. 176: 319
- 23- Tronchin, G.; Bouchara, J.P. & Robert R. (1989). Dynamic changes of the cell wall surface of *Candida albicans* associated with germination and adherence. Eur. J. Cell. Biol. 50:285-290
- 24- Casanova, M.; Martinez, J.P. & Chaffin, W.L. (1990). Fab fragment from a monoclonal antibody against a germ tube manoprotein blocks yeast-to-mycelium transition in *Candida albicans*. Infect. Immun. 3810-3812
- 25- Hostetter, M.K. (1994). Adhesins and ligands involved in interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. C Microbiol. Rev 7:29-42
- 26- Klotz, S.A. (1994). Plasma and extracellular matrix proteins mediate the fate of *Candida albicans* in the human host. Medical Hypothesis 42:328-334
- 27- Como, J.A. & Dismukes, W.E. (1994). Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. New Engl. J. Med. 330:263-272
- 28- White, T.C.; Marr, K.A. & Bowden, R.A. (1998). Clinical, cell and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. C Microbiol. Rev. 11: 382-402
- 29- Ghannoum, M.A.; Filler, S.G.; Ibrahim, A.S.; Fu, Y.; Edwards J.E.Jr. (1992). Modulation of interactions of *Candida albicans* with endothelial cells by fluconazole and amphotericin B. Antimicrob. Ag Chemother. 36:2239-2244
- 30- Sobel, J.D. & Obiedeanu, N. (1983). Effects of subinhibitory concentrations of Ketoconazole on *in vitro* adherence of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells. Eur. J. Clin. Microbiol. 2:445-452

31- Islam, K. & Hawser, S.P. (1999). Effect of antifungal agents on the binding of *Candida albicans* to immobilized amino acids and bovine serum albumin. L. Antimicrob. Chemother. 43:583-587

32- Ellepola, A.N:B. & Samaranayake, L.P. (1998). Adhesion of oral *C. albicans* to human buccal epithelial cells following limited exposure to antifungal agents. J. Oral Pathol. Med. 27:325-332

33- Ellepola, A.N:B. & Samaranayake, L.P. (1998). The effect of limited exposure to antifungal agents on the germ tube formation of oral *C. albicans*. J. Oral Pathol. Med. 27: 213-219

34- Segal, E.; Trygerman, O.; Gov, Y.; Sandovsky-Losica, H.; Berdicevsky, I. (1997). Adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells: effect of antimycotics. J. Mycol. Méd. 7:71-76