T 578.7 M3981
R 5545
F 27.12.2000 D.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

CENTRO DE REFERENCIA DE MICOLOGÍA
(CEREMIC)

"ESTUDIO DE LA ADHERENCIA, COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA"

Bioquímica Marisa Susana Biasoli

Director: Dra. Hortensia María Magaró

Tesis presentada para optar al Título de Doctor

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
BIBLIOTECA HIPOLITO GONZALEZ
U. N. R.

Año 2000

MB

Para mis grandes amores

Mis padres, Maruca y Ricàrdo;

Mi esposo, Armando;

Mis hijos, Lucía y Juan Manuel.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de Tesis, **Dra. Hortensia Magaró**, por la orientación y la confianza que me brindó en la realización de este Trabajo de Tesis.

A la **Dra. Bracalenti**, por su apoyo y estímulo constantes.

A mis compañeras **Alicia Luque**, por sus consejos y aliento y **María Elena Tosello**, por su ayuda y su aporte en la caracterización de las levaduras.

Al Personal técnico: a **Liliana Giraudo** y **Mónica De Luca**, por su asistencia en la preparación de reactivos y medios de cultivo y a **Juan Di Benedetti**, por su colaboración en la limpieza del material.

A **Mercedes Leiva, Hebe Bottai** y **Laura Gutierrez**, de la Cátedra de Estadística, por su aporte en la realización de los estudios estadísticos.

A **Alejandra Martínez** de la Cátedra de Morfología por la realización de los cortes histológicos de los tejidos de los ratones.

En general, a todos mis compañeros Docentes y No Docentes del CEREMIC, que en mayor o menor grado, me ayudaron a concretar este proyecto.

Marisa S. Biasoli

TRABAJOS COMUNICADOS

Parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados y presentados en Reuniones Científicas según se detalla a continuación:

TRABAJOS PUBLICADOS:

- Biasoli, M.S., Tosello, M.E., Bottai, H., Cuesta C., Magaró H.M. (1999). Efecto de la temperatura y el pH en la adherencia de *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol; 16: 46-49.

- Biasoli, M.S., Tosello, M.E., Magaró H.M. (2000) Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. Enviado a publicar.

RESUMENES PUBLICADOS:

- Biasoli M.S., Tosello, M.E., Magaró, H.M. (1996). Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to buccal ephitelial cells. Publicaciones Biológicas de la Sociedad de Biología de Rosario; 14: 293.

- Biasoli M.S., Tosello M.E., Magaró H.M. (1998). Relation between *Candida albicans* adherence and the different composition in carbohydrates in the culture medium. Biocell; 22, Resumen N° 5.

- Biasoli M. S., Tosello M.E., Magaró H.M.(1999). Study of the adherence of different yeasts of the genus *Candida*. Biocell; 23, Resumen N° 85.

- Biasoli M.S., Tosello, M.E., Magaró, H.M.(1999). Pathogenicity factors in *Candida* strains. Biocell, en prensa.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS:

- Biasoli M.S., Tosello M. E., Bottai H., Cuesta C., Magaró H.M. (1995). Estudios preliminares sobre el efecto de la temperatura y el pH sobre la adherencia de

Candida albicans. VII Congreso y XVII Jornadas Argentinas de Micología. Rosario, 25 de agosto.

- Biasoli M.S., Tosello M.E., Magaró H.M. (1996). Adherencia de *Candida albicans* y otras especies de *Candida* a células epiteliales bucales. II Congreso Rosarino y XVI Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 28 de noviembre.

- Biasoli M.S., Tosello, M.E., Magaró H.M. (1997). Influencia de la germinación en la adherencia de *Candida albicans*. III Encuentro Bioquímico. Rosario, 8 de agosto.

- Biasoli M.S., Tosello M. E., Magaró H.M. (1997). Relación entre la adherencia de *Candida albicans* y la diferente composición en hidratos de carbono del medio de cultivo. XVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 25 de noviembre.

- Biasoli M.S., Tosello M.E., Magaró H.M. (1998). Efecto del Fluconazol sobre la adherencia de *Candida albicans*. VIII Congreso y XVIII Jornadas Argentinas de Micología. Tucumán, 13 de agosto.

-Biasoli M.S., Tosello M.E., Magaró H.M.(1998). Estudio de la adherencia de diferentes levaduras del género *Candida*. III Congreso Rosarino y XVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 18 de noviembre.

- Biasoli M.S., Tosello M.E., Magaró H.M. Factores de patogenicidad en cepas del género *Candida*. XIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario. Rosario 3 de diciembre.

ÍNDICE

I-INTRODUCCIÓN 1
I.1- LAS LEVADURAS 1
I.1.1- Generalidades 1
I.1.2- Ecología de ***Candida*** en el organismo humano 3
I.1.3- Las levaduras relacionadas con la enfermedad en el hombre 5
I.2- FACTORES DE VIRULENCIA EN *CANDIDA* 9
I.2.1- Capacidad de adherencia 10
I.2.2- Producción de enzimas extracelulares 11
I.2.3- Producción de hifas o pseudohifas 12
I.2.4- Capacidad para producir switching o cambios fenotípicos 13
I.3- MECANISMOS DE ADHERENCIA 15
I.3.1- Estructura de la pared celular de ***C. albicans*** 15
I.3.2- Adhesinas de ***Candida*** 19
I.3.2.1- Adhesinas de estructura proteica 20
I.3.2.2- Adhesinas de estructura polisacárida 28
I.3.3- Mecanismo de adherencia a células epiteliales 31
I.4- EL ROL DEL TRACTO GASTROINTESTINAL EN LA CANDIDIASIS DISEMINADA 32
I.4.1- Infección del TGH por ***Candida*** 33
I.4.2- Rol de la colonización en la diseminación por ***Candida*** 34
I.5- OBJETIVOS 37
I.6- ABREVIATURAS 39

II- MATERIALES Y MÉTODOS 40
II.1- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS 40
II.1.1- Procesamiento de las muestras de heces 40
II.1.2- Desarrollo y purificación de las colonias de levaduras 41
II.1.3- Identificación de las levaduras aisladas 41
II.2.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS, *IN VITRO* 43
II.2.1- Adherencia de las diferentes cepas de levaduras 43
II.2.2- Efecto de la temperatura y el ph en la adherencia de ***C. albicans*** 46
II.2.2.1- Adherencia de las levaduras a diferentes valores de T° y pH 46
II.2.2.2- Adherencia de las levaduras a diferentes valores de pH 50
II.2.3- Efecto de hidratos de carbono en la adherencia de ***C. albicans*** 52
II.2.4- Efecto de la filamentización en la adherencia de ***C. albicans*** 54
II.2.5- Efecto del fluconazol (FCZ) en la adherencia de ***C. albicans*** 57
II.2.5.1- Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) al FCZ 57
II.2.5.2- Primer ensayo de adherencia de las levaduras tratadas con FCZ 59

MB

II.2.5.3- Segundo ensayo de adherencia de las levaduras tratadas con FCZ. 62
II.2.6- Efecto de otros microorganismos en la adherencia de ***C. albicans***..... 64
II.2.6.1- Efecto de la presencia de lactobacilos en la adherencia de ***C. albicans***..... 64
II.2.6.2- Efecto de la presencia de enterobacterias en la adherencia de ***C. albicans***..... 67

II.3- ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA* EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN..... 69
II.3.1- Modelo experimental utilizado..... 69
II.3.2-.- Metodología..... 69
II.3.3- Estudios histopatológicos..... 74

III- RESULTADOS..... 75
III.1- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS...... 75
III.1.1- Determinación del Nº de UFC e identificación de levaduras en materia fecal. 75
III.2- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS, *IN VITRO*.....77
III.2.1- Adherencia de las diferentes cepas de ***Candida***. 77
III.2.2- Efecto de la T° y el pH en la adherencia de ***C. albicans***. 85
III.2.2.1- Adherencia de levaduras a diferentes valores de T° y pH. 85
III.2.2.2- Adherencia de levaduras a diferentes valores de pH..... 88
III.2.3- Efecto de hidratos de carbono en la adherencia de ***C. albicans***. 90
III.2.3.1- Efecto de la glucosa..... 90
III.2.3.2- Efecto de la galactosa..... 92
III.2.3.3- Efecto de la sacarosa. 94
III.2.3.4- Efecto de la manosa. 97
III.2.4- Efecto de la filamentización en la adherencia de ***C. albicans***. 100
III.2.4.1- Para la cepa ***C. albicans* Ca 787**. 100
III.2.4.2- Para la cepa ***C. albicans* Ca CECT 1394**..... 103
III.2.5- Efecto del fluconazol (FCZ) en la adherencia de ***C. albicans***. 106
III.2.5.1- Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) al FCZ. 106
III.2.5.2- Primer ensayo de adherencia de las levaduras tratadas con FCZ. 106
III.2.5.3- Segundo ensayo de adherencia de las levaduras tratadas con FCZ..... 111
III.2.6- Efecto de otros microorganismos en la adherencia de ***C. albicans***. 121
III.2.6.1- Efecto de la presencia de lactobacilos en la adherencia de ***C. albicans***..... 121
III.2.6.2- Efecto de la presencia de enterobacterias en la adherencia de ***C. albicans***..... 123
III.3- ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA* EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN..... 125
III.3.1- Determinación del número de UFC de levaduras en los tejidos de ratón. 125
III.3.1.1- Evolución de la colonización y diseminación de la cepas de ***C. albicans***. 140
III.3.1.2- Evolución de la colonización y diseminación de la cepas de ***Candida spp***..... 148

III.3.2- Análisis Estadístico. 155
III.3.2.1-Comparación del número de UFC en estómago. 156
III.3.2.2-Comparación del número de UFC en intestino. 157
III.3.3-Estudios histopatológicos. 158

IV- DISCUSIÓN 163
IV.1- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS. 163
IV.2- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS, *IN VITRO*. 164
IV.2.1- Adherencia de las diferentes cepas de ***Candida***. 167
IV.2.2- Efecto de la T° y el pH en la adherencia de ***C. albicans***. 170
IV.2.3- Efecto de hidratos de carbono en la adherencia de ***C. albicans***. 172
IV.2.4- Efecto de la filamentización en la adherencia de ***C. albicans***. 175
IV.2.5- Efecto del fluconazol (FCZ) en la adherencia de ***C. albicans***. 177
IV.2.6- Efecto de otros microorganismos en la adherencia de ***C. albicans***. 184
IV.3- ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA* EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN 188
IV.3.1- Modelo experimental utilizado. 188
IV.3.2- Análisis de la colonización y diseminación de cepas de ***Candida*** 190
IV.3.2.1- Colonización y diseminación de cepas de ***C. albicans*** 191
IV.3.2.2- Colonización y diseminación de cepas de ***Candida spp.*** 194

V- CONCLUSIONES 207
VI- RESUMEN 212
VII- APÉNDICE I 216
VIII- BIBLIOGRAFÍA 219

I-INTRODUCCIÓN

I.1- LAS LEVADURAS

I.1.1- GENERALIDADES

Las levaduras comprenden un gran número de microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza; se las encuentra en las frutas, granos, miel y otros alimentos que contienen azúcar, en el suelo, aire, mar, piel y mucosa de mamíferos.

Pueden ser definidas como hongos unicelulares que se reproducen por brotación o fisión, carecen de clorofila y por lo tanto son heterótrofos, que viven a expensas de otros seres vivos (levaduras parásitas) o sobre materia orgánica muerta (levaduras saprófitas).

Muchas de ellas son útiles para el hombre y se emplean en procesos industriales como: producción de bebidas alcohólicas (cerveza, vino); producción de biomasa (pan, levaduras forrajeras); producción de diferentes productos metabólicos (enzimas, vitaminas, etanol, ácido cítrico, dióxido de carbono, etc., y productos sintetizados por la introducción de DNA recombinante en las levaduras).(1)

Otras levaduras son perjudiciales ya que descomponen alimentos, deterioran fibras textiles o causan enfermedades en las plantas, los animales y el hombre.

Existen más de 600 especies conocidas de levaduras, distribuidas en 60 géneros taxonómicos, de las cuales solo aproximadamente 20 especies son

capaces de producir enfermedades en humanos y animales. Dentro de ellas, las más aisladas como agentes causales de infecciones en el hombre son: ***Candida albicans*** y otras especies del género ***Candida,*** entre las cuales cabe mencionar ***C. parapsilosis, C. tropicalis, C. glabrata, C. krusei, C. guillermondi; Cryptoccocus neoformans, Malassezia furfur, Rhodotorula rubra, Saccharomyces cerevisiae*** y ***Trichosporon beigelii***. (2)

Muchas de estas levaduras, constituyen una población residente que en forma regular y universal son parte de la flora normal de la superficie cutánea, de la mucosa bucal, del intestino y de la mucosa vaginal. Las especies implicadas y el número en que se encuentran, varían con las superficies corporales, pero forman una población en equilibrio, dentro de un nicho ecológico particular.

Las especies que están relacionadas con enfermedad en el hombre y animales, son incapaces de producir infecciones en el individuo sano y normal. Se deben presentar algunas alteraciones en las defensas celulares del huésped, en la fisiología o en la flora normal antes que pueda tener lugar la colonización, infección y producción de enfermedad por levaduras del género ***Candida***.

La presencia de cambios en cualquiera de los factores antes mencionados puede permitir que este comensal humano normal infecte al hombre.

Las levaduras se adaptan rápidamente a los cambios del huésped y toman ventaja de cualquier tipo de alteraciones del mismo que le permitan colonizarlo, siendo las manifestaciones clínicas de las infecciones que se producen, muy variadas. Las infecciones pueden ser cutáneas, mucocutáneas, subcutáneas y profundas (localizadas o generalizadas) y pueden afectar cualquier parte del cuerpo.

MB

C. albicans es responsable de la mayor parte de las enfermedades ocasionadas por levaduras.

I.1.2- ECOLOGÍA DE *CANDIDA* EN EL ORGANISMO HUMANO

El sistema gastrointestinal humano tiene una población pequeña pero constante *de* ***C. albicans***. En condiciones normales, es probable que en esta población influyan los alimentos, dado que la dieta afecta en gran medida el número total de microorganismos existentes.

En los recién nacidos, antes de que se establezca la flora normal, es frecuente que la colonización inicial del intestino se acompañe de síntomas clínicos. También se puede presentar colonización perianal, seguida de eritema del pañal (2).

En el adulto, dos factores intrínsecos alteran el número de ***Candida albicans*** en el intestino. En primer lugar, se ha establecido que otros miembros de la flora intestinal ejercen un control sobre la densidad de población de las levaduras (3). Los estudios señalan una diversidad de factores antimicrobianos y es probable que ningún factor sea totalmente responsable. No obstante, al parecer, el ácido láctico es un potente inhibidor de ***C. albicans*** y se ha visto que hay correlación entre el número de lactobacilos y otros microorganismos productores de ácido láctico y la cantidad de levaduras presentes.

Otros estudios han destacado la importancia de las bacterias anaerobias del intestino para limitar el desarrollo de ***Candida*** (3). Los factores inhibidores secretados, los potenciales de óxido-reducción y la competencia por los

mb

nutrientes disponibles también están implicados en el control de la población de levaduras.

En un estudio realizado con microorganismos del tracto gastrointestinal humano (TGH), Magaró y col. (4), concluyeron que bacterias, protozoos y levaduras ocuparían diferentes nichos ecológicos en el intestino, que le permitirían a estos organismos relacionarse independientemente entre sí. Así, la presencia de uno u otro no influiría entre ellos y los cambios o patologías que pudieran presentarse dependerán de la virulencia de los microorganismos, la fisiología y otros factores que alteren el normal funcionamiento del TGH.

El segundo factor que influye en la población de ***C. albicans*** es la dieta. La ingestión excesiva de frutas frescas, dulces u otros materiales fermentables dará lugar a un aumento considerable en el número de levaduras intestinales, particularmente de ***C. albicans***.

Otras especies que pueden colonizar el TGH, además de ***C. albicans*** (51%) son: ***Candida glabrata*** (9,1%), ***C. parapsilosis*** (6,4%), ***C. tropicalis*** (5,9%) ***C. krusei*** (2,3%); ***C. guillermondi*** (0,7%) y ***C. kefyr*** (0,1%) son menos frecuentemente halladas.(5)

Las levaduras aisladas de la boca corresponden en su mayor parte a ***C. albicans*** (70%) seguida por ***C. tropicalis*** (6,7%), ***C. glabrata*** (6,6%), ***C. parapsilosis*** (1,9%), ***C. krusei*** (1,7%) y ***C. kefyr*** (1%).(5)

La piel normal también puede presentar flora de levaduras residentes, que incluye ***C. parapsilosis, C. guillermondi, C. krusei*** (2, 6). Otras especies como ***C. albicans y C. tropicalis*** no se encuentran con regularidad en la piel normal, salvo en la región ano-genital y alrededor de la boca. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por Biasoli y col. (7) en un estudio realizado sobre

material de piel de 300 pacientes. De todas las levaduras aisladas, el 83% correspondió a ***Candida spp*** ***(C. parapsilosis*** 63%, ***C. tropicalis*** 14%, etc.) y solo el 17% a ***Candida albicans***.

En la mucosa vaginal normal se puede aislar ***C. albicans***, y con menor frecuencia ***C. glabrata, C. tropicalis C. parapsilosis y C. krusei***. (2, 5, 7)

I.1.3- LAS LEVADURAS RELACIONADAS CON LA ENFERMEDAD EN EL HOMBRE

Por lo mencionado anteriormente, ***Candida albicans*** y otras especies del género, son consideradas microorganismos comensales de la flora normal del tracto digestivo, de la mucosa vaginal y de la piel. El delicado balance o equilibrio que existe entre comensal y huésped podría romperse y dar lugar al parasitismo, es decir, al desarrollo de una infección oportunista, denominada **candidiasis** o **candidosis**, las que se encuentran entre las enfermedades infecciosas más comunes en el hombre. Su principal agente causal es ***C. albicans***, pero cada vez es mayor el número de casos producidos por otras especies de ***Candida***.

De acuerdo a su evolución puede ser aguda, subaguda y crónica y por su localización, cutánea, mucocutánea, profunda ó diseminada.

Los factores desencadenantes de la enfermedad son generalmente modificaciones en los mecanismos de defensa del huésped, los cuales, secundariamente, inducen transformaciones en el comportamiento del hongo (9). Las manifestaciones clínicas y la severidad de la infección están en relación con la naturaleza y el grado de compromiso de las defensas normales del huésped.

MB

La aparición de ***Candida*** como patógeno oportunista puede ocurrir, incluso, como consecuencia de alteraciones leves o cambios fisiológicos en el huésped. La candidiasis mucocutánea ha sido observada en pacientes con deficiencias fisiológicas de la inmunidad celular, por ejemplo, el muguet de los recién nacidos; la vulvovaginitis por ***Candida*** asociada al embarazo o al uso de anticonceptivos y relacionada al efecto de la progesterona sobre las células T (8, 10). El estrés es también una causa, frecuentemente olvidada, de inmunodeficiencia temporaria, al producir cambios neuro-endocrinos que podrían modificar el sistema inmune y promover la proliferación fúngica (11).

Además de las causas fisiológicas, hay una larga lista de enfermedades que podrían facilitar la infección por estos hongos patógenos oportunistas. Déficits primarios o secundarios que afecten a líneas linfoides o mieloides, muestran el rol fundamental de estas células en el control de la infección fúngica. En general, la candidiasis cutáneo–mucosa es frecuente en pacientes con deficiencias en las células T, tal como ocurre en los pacientes con SIDA, en pacientes diabéticos y con otras endocrinopatías. (9, 12)

La infección más seria, la candidiasis profunda y/o diseminada, que compromete la vida del paciente, se desarrolla en individuos severamente inmunocomprometidos. La neutropenia es una de las principales causas de candidiasis sistémica; los pacientes sometidos a transplantes de órganos, ó con tumores sólidos ó con enfermedades malignas de la sangre, también tienen alto riesgo de sufrir candidiasis diseminada.

En comparación con la candidiasis superficial de piel y mucosas, la frecuencia de la candidiasis sistémica es mucho menor, pero ha aumentado en forma significativa en los últimos años. Este incremento de las infecciones

fúngicas nosocomiales ha sido documentado en casi todo el mundo, por ejemplo en Europa (13), Asia (14, 15), y en América del Norte y del Sur (16,17,18).

De acuerdo a un informe del Sistema de Control de Infecciones Nosocomiales (NNIS), realizado sobre 180 hospitales de los Estados Unidos, desde enero de 1980 a abril de 1990, se detectaron 27.200 casos de infecciones fúngicas nosocomiales, de las cuales 19.621 (72,1%), fueron producidas por ***Candida***. El porcentaje de infecciones por ***Candida*** en el torrente sanguíneo aumentó en un 487 % en este período (17, 19) y esta tendencia se mantiene para la década de los 90 (20). ***Candida*** pasó del 8º al 4º lugar dentro de los agentes productores de septicemias, siendo responsable de más del 10% de las septicemias nosocomiales (21, 22). Este notable incremento de las candidiasis en los pacientes inmunocomprometidos tiene importancia no solamente por los números en sí mismos, sino debido a que tienen asociado un alto porcentaje de mortalidad que puede llegar, incluso, al 50% (23, 24).

Treinta y siete publicaciones, desde 1952 a 1992 describen 1.591 casos de candidiasis sistémica en pacientes con cáncer y muestran que otras especies diferentes de ***C. albicans,*** son responsables de la infección en el 46% de los casos, en particular ***Candida tropicalis*** (25%), ***C. glabrata*** (8%), ***C. parapsilosis***, (7%) y ***C. krusei*** (4%) (22, 25). También se han observado otras levaduras patógenas emergentes, como ***Candida lusitaniae, C. famata, Malassezia furfur, Trichosporon beigelii, Hansenula anomala***, especies de ***Rhodotorula***, etc. Algunos microorganismos, considerados contaminantes ambientales o levaduras de importancia industrial, como ***Candida lipolytica, C. utilis y Saccharomyces cerevisiae***, han sido implicados como agentes productores de funguemias e infecciones sistémicas (26).

MB

Este considerable incremento de las infecciones por ***Candida*** en la década pasada y en la actual, está indudablemente ligada al desarrollo de nuevas drogas y técnicas terapéuticas que han permitido penetrar en lo más profundo de los tejidos del huésped, abriendo una brecha para la invasión oportunista de las levaduras. Éstos son llamados factores iatrogénicos que involucran a nuevas terapéuticas químicas y físicas tales como:

-Antibioticoterapia, particularmente la poli-antibioticoterapia que produce supresión y alteración de la flora bacteriana intestinal, que es la que mantiene el control sobre la población de ***Candida***, favoreciendo su desarrollo (3, 27).

-Corticoterapia, que directa o indirectamente podría afectar a neutrófilos polimorfonucleares (28), a macrófagos (29) y a la actividad de las células T, contribuyendo a una disminución de su actividad antifúngica (30).

- Quimioterapia, que produce la disminución de leucocitos, y facilita la infección fúngica (31). También altera la función de los neutrófilos (32) y favorece la ulceración de la mucosa gástrica, contribuyendo a la proliferación de las células de ***Candida*** (33).

- Cirugías, principalmente del tracto gastrointestinal, asociada a estrés físico o psicológico, favoreciendo el desarrollo fúngico (34).

- Uso de Catéteres, que pueden provocar un daño en la piel y además proveen un sustrato, el cual una vez dentro de los vasos sanguíneos en contacto con la sangre es rápidamente cubierto por fibronectina, fibrinógeno, plaquetas y otros componentes del plasma. Esto constituye un soporte para el asentamiento y proliferación de microorganismos, entre ellos ***Candida*** (35).

- Transplantes de órganos, en donde están involucrados la mayoría de las causas predisponentes antes mencionadas (36).

Todos estos factores iatrogénicos están relacionados a un deterioro de la superficie del cuerpo y/o de las defensas del huésped y, si bien han sido desarrollados para mejorar la sobrevida de pacientes en condiciones críticas, también han permitido el avance de esta y otras enfermedades oportunistas y la transformación del espectro de los patógenos nosocomiales.

I.2- FACTORES DE VIRULENCIA EN *CANDIDA*

Al ser células eucariotas diploides, las levaduras del género ***Candida*** poseen suficientes recursos genéticos como para desarrollarse en diferentes ambientes. Desde un simple medio de cultivo, que solo contenga una fuente de carbono y nitrógeno, a temperatura ambiente, hasta en la compleja estructura del cuerpo humano, ***Candida*** es capaz de crecer, reproducirse y colonizar.

Para pasar de un estado saprofítico o comensal en el organismo humano, a un comportamiento patogénico, ***Candida*** debe sufrir un cambio o "switch", a nivel celular y molecular. Esto implica el desarrollo de ciertas características fenotípicas, que le permitan, desde un estado de relativa quietud o reposo pasar a uno más activo y complicado como para poder sobrepasar las numerosas barreras naturales y penetrar en el organismo del huésped. La disminución de las defensas de éste no son suficientes para explicar la invasión y es necesario que el hongo desarrolle una estrategia que le permita colonizar, penetrar y crecer en los tejidos del huésped (6).

La levadura no es un componente pasivo del proceso infeccioso, sino que posee una serie de factores de virulencia. No existe un único factor que pueda ser considerado por sí solo como responsable de la patogenicidad de ***C. albicans***,

MB

sino que se ha propuesto una combinación de diferentes factores que contribuyen a una o más etapas de la infección (37, 38). Los principales son: **1**- capacidad de adherencia a diferentes superficies, **2**- producción de enzimas extracelulares (proteinasas y fosfolipasas), **3**- producción de hifas y pseudohifas, **4**- switching o variabilidad fenotípica y antigénica.

I.2.1- CAPACIDAD DE ADHERENCIA

La adherencia de ***Candida*** a la superficie de las células del huésped se considera esencial para la expresión del potencial patogénico ya que sería requerida para iniciar el proceso que lleva a la colonización y contribuiría a la persistencia del microorganismo dentro del huésped.

La colonización microbiana de una superficie expuesta al flujo de un fluido requiere que el organismo esté firmemente unido para evitar ser arrastrado. Por lo tanto, la adherencia es un paso muy importante, esencial en el proceso que conduce a una colonización permanente.

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 huésped conduciría, por presión selectiva, a la eventual eliminación de un microorganismo que posee una menor capacidad de adherencia. (39)

Las células de ***Candida*** adhieren a diferentes tipos de células del huésped, incluyendo células epiteliales (40, 41), plaquetas (42), células del endotelio (43,

44) y células fagocíticas (45, 46), así como también a proteínas de la matriz extracelular (47,48).

Candida también tiene la capacidad de adherirse a materiales inertes, que forman parte de dispositivos como catéteres, válvulas cardíacas, prótesis dentales y otros.

Se ha demostrado que las levaduras se pueden unir directamente al material plástico (49), y constituyen una delgada capa o biofilm sobre la superficie del dispositivo sintético. Las células de ***Candida*** así adheridas son más resistentes a la acción de drogas antifúngicas y proveen un foco para la posterior diseminación en el organismo del huésped (50).

I.2.2- PRODUCCIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES

En el proceso infeccioso, luego que se ha producido la unión de la levadura a las células del huésped, ***Candida*** necesita secretar enzimas para poder penetrar en los tejidos más profundos. Se han descripto varias enzimas secretadas por ***C. albicans***. Estas incluyen fosfolipasas, lipasas, fosfomonoesterasas, hexosaminidasas y al menos tres aspartilproteinasas (51, 52, 53). De estas enzimas, las proteinasas han sido las más estudiadas.

La actividad de proteinasa es producida sólo por las especies de ***Candida*** consideradas más patógenas, como ***C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis***. Tienen un amplio rango de especificidad. Su relación con la patogenicidad fue demostrada en estudios en que se utilizaron mutantes deficientes en proteinasas (54) y pudieron ser detectadas en muestras clínicas por métodos inmunológicos

nb

(55). No obstante, no hay una evidencia concluyente de que la actividad de proteinasa esté siempre asociada con infección, ya que otros factores genéticos, además de la deficiencia en la proteinasa, pueden limitar la patogenicidad de las cepas mutantes proteinasa-deficientes. En cambio, se ha sugerido que la proteinasa es un factor importante en una de las etapas del proceso que lleva a la infección por ***Candida*** (53).

I.2.3- PRODUCCIÓN DE HIFAS O PSEUDOHIFAS

Candida albicans es un organismo complejo que puede desarrollar con diferentes morfologías dependiendo de factores ambientales y culturales. Al menos tres formas han sido observadas *in vitro* e *in vivo*. La levadura o blastoconidia normalmente coloniza los pliegues de la piel y las membranas mucosas de la cavidad oral, el tracto vaginal y el tracto gastrointestinal. La conversión a la forma filamentosa ocurre por la germinación de las blastoconidias. A su vez, las blastoconidias pueden reproducirse por brotación o bien sufrir la elongación del brote para dar un pseudomicelio o pseudohifa, morfología que también pueden presentar otras especies de ***Candida***. Por estas características se considera a ***C. albicans*** un hongo dimórfico.

La formación de hifas 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 mayor resistencia a la fagocitosis (9, 37), mientras que la forma levaduriforme se asocia a una colonización no patológica de ***Candida*** (12). Este concepto no es estrictamente cierto, ya que en estudios

histopatológicos de lesiones producidas por ***Candida*** demuestran que las hifas no siempre están presentes, y, si se considera a otras especies de ***Candida*** potencialmente patógenas, productoras de infecciones oportunistas, muchas de éstas no producen pseudohifas, ni *in vivo* ni *in vitro*, como por ejemplo ***Candida glabrata, C. famata, Rhodotorula spp,*** etc.

Sobel y col., en un estudio con una cepa mutante de ***C. albicans,*** incapaz de producir hifas, demostraron que esta característica es un factor de virulencia importante pero no esencial en la patogénesis de la vaginitis por ***Candida*** (56).

Por otro lado existen evidencias favorables al concepto de que las hifas constituyen un factor de virulencia:

1- en una candidiasis sistémica existe una mayor especificidad en la detección de anticuerpos antimicelio de ***C. albicans*** que en la de anticuerpos antiblastoconidia,

2- ***C. albicans*** es capaz de mostrar tigmotropismo o sensibilidad de contacto, propiedad por la cual las hifas de ***C albicans,*** incubadas en un filtro perforado sobre una placa de agar pueden atravesar los poros y crecer sobre el medio de cultivo. Esta propiedad estudiada *in vitro*, podría facilitar la penetración a ciertos tejidos del huésped (57).

3- se ha demostrado que las hifas de ***Candida albicans*** adhieren mejor a las células del huésped que las formas levaduriformes (58, 59).

I.2.4- CAPACIDAD PARA PRODUCIR SWITCHING O CAMBIOS FENOTÍPICOS

Es poco probable que todos los factores de virulencia descriptos para ***C. albicans*** puedan ser expresados constante y continuamente por las levaduras en

histopatológicos de lesiones producidas por ***Candida*** demuestran que las hifas no siempre están presentes, y, si se considera a otras especies de ***Candida*** potencialmente patógenas, productoras de infecciones oportunistas, muchas de éstas no producen pseudohifas, ni *in vivo* ni *in vitro*, como por ejemplo ***Candida glabrata, C. famata, Rhodotorula spp,*** etc.

Sobel y col., en un estudio con una cepa mutante de ***C. albicans***, incapaz de producir hifas, demostraron que esta característica es un factor de virulencia importante pero no esencial en la patogénesis de la vaginitis por ***Candida*** (56).

Por otro lado existen evidencias favorables al concepto de que las hifas constituyen un factor de virulencia:

1- en una candidiasis sistémica existe una mayor especificidad en la detección de anticuerpos antimicelio de ***C. albicans*** que en la de anticuerpos antiblastoconidia,

2- ***C. albicans*** es capaz de mostrar tigmotropismo o sensibilidad de contacto, propiedad por la cual las hifas de ***C albicans***, incubadas en un filtro perforado sobre una placa de agar pueden atravesar los poros y crecer sobre el medio de cultivo. Esta propiedad estudiada *in vitro*, podría facilitar la penetración a ciertos tejidos del huésped (57).

3- se ha demostrado que las hifas de ***Candida albicans*** adhieren mejor a las células del huésped que las formas levaduriformes (58, 59).

I.2.4- CAPACIDAD PARA PRODUCIR SWITCHING O CAMBIOS FENOTÍPICOS

Es poco probable que todos los factores de virulencia descriptos para ***C. albicans*** puedan ser expresados constante y continuamente por las levaduras en

los diferentes microambientes. Actualmente existe la evidencia de que ***C. albicans*** posee una capacidad potencial de cambio fenotípico o switching, probablemente a través de un mecanismo de regulación transcripcional en la expresión génica (60). Esta capacidad de switching de ***C. albicans*** se manifiesta a través de un cambio espontáneo, frecuente y reversible entre diferentes fenotipos distinguibles por la macromorfología de la colonia y en algunos casos, por la morfología celular.

Uno de los sistemas de switching mejor caracterizados es la transición blanco-opaco (W-O), en la cepa WO-1 de ***C. albicans*** (61). Las células de esta levadura cambian espontáneamente entre una colonia blanca (W) y otra opaca (O). Las células en el tipo W muestran la forma levaduriforme multibrotante típica de la mayoría de las células de ***C. albicans***, mientras que las células de la fase O muestran un fenotipo unibrotante, con forma de haba, dos veces más grandes que las células W y con una gran vacuola en el citoplasma.

Esta capacidad de switch o cambio fenotípico podría favorecer la capacidad de ***C. albicans*** para adaptarse rápidamente a nuevos microambientes en el organismo humano, como por ejemplo, cuando las células de levaduras son transferidas de la región anal (donde forma parte de su microflora) a la vagina (62).

Esta adaptabilidad podría ser un factor regulador de la adecuada expresión de los diferentes factores de virulencia en las etapas de la colonización e invasión tisular, necesarias para establecer una infección patológica en el huésped (12).

I.3- MECANISMOS DE ADHERENCIA

Como se mencionó anteriormente, no existe un único factor que pueda ser considerado por sí solo como responsable de la patogenicidad de ***C. albicans***. Sin embargo, la capacidad de adherencia de las levaduras a las superficies del huésped, sería un paso o etapa crucial en el inicio de la infección.

El proceso de adherencia implica el reconocimiento de las células del huésped por medio de las adhesinas, moléculas presentes en la superficie del microorganismo y la existencia de receptores a nivel de las células del huésped que se denominan ligandos. Son múltiples los mecanismos de adherencia que usarían las células de levaduras, como también son numerosas las adhesinas disponibles por ***C. albicans*** que reflejarían la variedad de sitios que este patógeno puede invadir.

En todo este proceso de patogénesis, la pared celular de ***C. albicans*** cumple un rol fundamental, debido principalmente, a que posee las macromoléculas que intervienen en la adherencia a los tejidos del huésped.

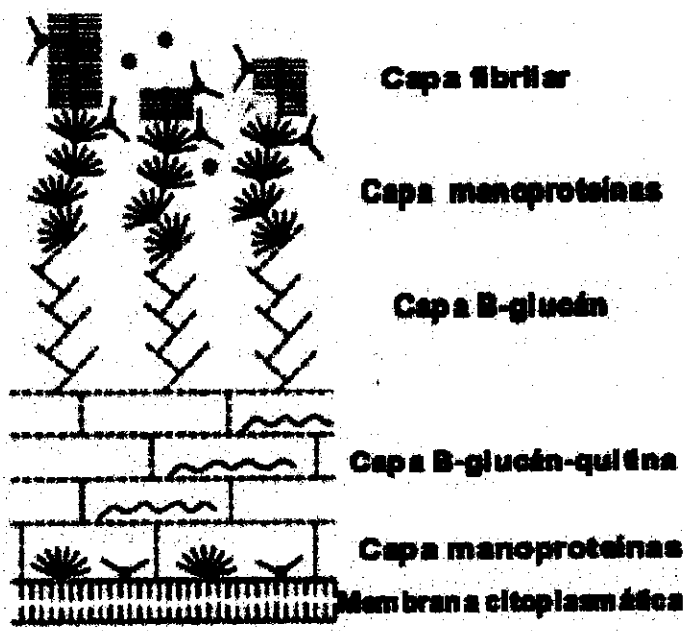
I.3.1- ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DE *C. albicans*

La pared celular de ***C. albicans*** representa, aproximadamente, el 30% del peso seco de la célula. Distintos estudios han mostrado que la pared celular está compuesta por manoproteínas (20%-30%), β-1,3-D-glucan (25%-35%), β-1,6-D-glucan (35%-45%), una pequeña proporción de quitina (0,6%-2,7%), proteínas (5%-15%) y lípidos (2%-5%) (63). La síntesis de los componentes de la pared

celular está determinada por las condiciones del medio de crecimiento y por el estado metabólico de la levadura.

Por observaciones con microscopía electrónica, la pared celular de *C. albicans* presenta varias capas. La presencia de esas capas es variable y parece estar relacionada con: la cepa analizada, las condiciones de crecimiento y la morfología (64). Por lo tanto, no hay consenso sobre el número de capas presentes en la pared celular. Diferentes autores han publicado la existencia de tres a ocho capas diferentes (64, 65).

La arquitectura de la pared celular incluye, en la parte más externa de la célula, una capa fibrilar, seguida, en orden, por zonas ricas en manoproteínas, glucán, glucán-quitina y nuevamente, manoproteínas, en contacto con la membrana celular, de acuerdo al siguiente esquema:



Capa fibrilar: es la capa más externa de la pared celular de ***Candida*** y diferentes autores confirman la presencia de esta capa fibrosa tanto en las blastoconidias como en los filamentos de ***C. albicans***.

La cantidad del material fibrilar producido depende del medio de cultivo, de la concentración de azúcares y se incrementa con el tiempo de cultivo. Este material se dispondría como hebras o apéndices, designados como fimbrias, que se extienden de 100 a 300 nm y de aproximadamente 5 nm de diámetro, que permitirían la unión de las células entre sí y con otras superficies, como células eucariotas o superficies plásticas (66).

Esta capa fibrosa está flojamente unida a la pared celular y contiene polisacáridos, proteínas y enzimas, como proteinasas, fosfatasa ácida y fosfolipasas. La secreción de este material fibrilar jugaría un importante rol en la adherencia y protección contra la fagocitosis, dos factores fundamentales de virulencia implicados en los mecanismos de patogenicidad.

El componente mayoritario de esta capa fibrilar es una glicoproteína de 66 kDa compuesta por un 80%-85% de carbohidrato (principalmente D-manosa) y 10%-15% de proteína. Estas fibras de manoproteína actuarían como adhesinas, mediando la unión de ***C. albicans*** a las células epiteliales. Si bien la fracción proteica, con actividad tipo lectina, sería la que en forma predominante desarrolla la función de adhesina de las manoproteínas de la capa fibrilar (66), también los restos oligosacáridos de la manana tendrían un rol importante en la adherencia de las levaduras (67).

Capa de manoproteína: se pueden detectar dos capas de manoproteína, una externa y otra interna, en contacto con la membrana nuclear. En ambas, la

fracción de manana está covalentemente unida a la proteína, ya sea como pequeños manooligosacáridos o como grandes complejos de manana unidos a través de uniones de N, involucrando dos restos de N-acetil-D-glucosamina y un residuo de asparagina del polipéptido. En este último caso, la cadena de manana consiste en residuos de manana unidos por enlaces α-1,6 para formar un esqueleto altamente sustituido por cortas cadenas de oligomanósidos, en su mayoría, con enlaces internos α-1,2 y una pequeña proporción de enlaces α-1,3 o β-1,2. Existe un acuerdo generalizado de que las cadenas laterales de manana contienen los epitopes que confieren especificidad serológica.

Una de las manoproteínas de superficie de ***C. albicans***, de 260 kDa, está compuesta por 1,5% de proteína y 98,45% de hexosa (68). Otras manoproteínas, que varían entre 50 y 165 kDa, contienen diferentes grupos peptídicos que poseen diversas funciones y distinta actividad de adherencia.

Capa de β-glucán-quitina: en el pasaje de la forma de levadura a la forma filamentosa en ***C. albicans*** se producen algunas modificaciones estructurales, que incluyen cambios en la composición química de la pared celular.

En el momento de la germinación, la capa de β-glucán-quitina se desarrolla como un componente mayoritario de la pared celular del tubo germinativo, mientras que las capas más externas sufren un retroceso progresivo. Si bien en la forma de levadura, esta capa de β-glucán-quitina se encuentra generalmente cerca de la membrana plasmática, es posible que en una fase temprana del crecimiento del tubo germinativo, se encuentre en la superficie más externa de la pared celular.

La quitina se encuentra tanto en la forma levaduriforme, como en los tubos germinativos y en las hifas de ***C. albicans***, donde la proporción es mayor.

I.3.2- ADHESINAS DE *CANDIDA*

Las posibles interacciones de ***Candida*** con las células del huésped involucran a las células fagocíticas y a las células de los distintos órganos susceptibles de ser infectados por el hongo, como también proteínas de la matriz extracelular y proteínas solubles. El balance de esta interacción entre la levadura y el huésped, podría permitir al hongo mantener su condición de comensal o establecer una invasión metastásica; y en el huésped, promover mecanismos de protección contra el sobrecrecimiento de la levadura en sitios de colonización normal o a falta de estos mecanismos, permitir la invasión de la levadura en sitios comúnmente estériles.

El rol de la interacción célula-levadura en la patogénesis de las candidiasis es complejo ya que, como se mencionara, existen múltiples factores de virulencia y su importancia puede estar influida por la cepa del hongo, por el tejido del huésped afectado y por las enfermedades de base que afecten al huésped. Conocer la base molecular y los mecanismos de esta interacción levadura-célula huésped, es de gran interés para poder comprender el inicio del proceso infeccioso.

No obstante que los componentes de la pared celular de ***Candida***, como quitina, β-glucán y lípidos, juegan un rol en la adherencia, las proteínas y manoproteínas de la pared celular son, sin duda, las moléculas mediadoras de la adherencia.

Las manoproteínas pueden ser divididas en dos grupos, peptido-mananos de alto peso molecular (260 kDa) y manoproteínas de bajo peso molecular (50-66 kDa). Ambas consisten en mananas de similares características y se diferencian en la fracción de proteína o péptido, que poseen diferente especificidad de adherencia.

I.3.2.1- ADHESINAS DE ESTRUCTURA PROTEICA

La fracción proteica de las manoproteínas puede ser dividida, de acuerdo a su función, en dos grupos:

a) **proteínas tipo lectinas** (interacción proteína-azúcar), que reconocen un receptor glicosídico (tanto de una glicoproteína como de un glicolípido) presente en la superficie de la célula del huésped.

b) **proteínas que se unen a ligandos con la secuencia RGD** (interacción proteína-proteína), que reconocen la secuencia triamino peptídica, arginina-glicina-acido aspártico.

a) Proteínas tipo lectinas: en forma análoga a muchos mecanismos de adherencia bacterianos, una proteína de la pared celular de la levadura interaccionaría como lectina con un receptor glicosídico (tanto de una glicoproteína como de un glicolípido) presente en la superficie de la célula del huésped.

Critchley y col (69), determinaron que restos glicosídicos conteniendo L-fucosa o N-acetil-D-glucosamina pueden actuar como receptores celulares epiteliales para ***C. albicans***. Cameron y col. (70), más recientemente,

caracterizaron una adhesina como una proteína que une fucosa de 15,7 kDa y que reconoce la secuencia del trisacárido L-fucosa (Fuc-α1,2-Gal-β1,4-GlcNAc), que corresponde a la secuencia terminal del antígeno H, encontrado en todos los grupos sanguíneos del sistema ABO.

Yu y col (71), aislaron y purificaron una adhesina fibrilar a partir de ***C. albicans***, que mediaba la unión a células epiteliales bucales (CEB), en la que la subunidad principal era una glicoproteína de 66 kDa, con un 80-85% de carbohidratos (principalmente residuos de manosa) y 10-15% de proteínas y que se unía a un resto de asial-GM_1 (Gal-β1,3-GalNAc-β1,4-Gal-β1,4-Glc-β1,1-Cer).

b) Proteínas que se unen a un ligando con la secuencia RGD: estas proteínas presentes en la pared celular de ***Candida*** son análogas a las integrinas de mamíferos, que son proteínas de la membrana que juegan un rol principal en la adherencia de las células a la matriz extra celular (MEC) y de los neutrófilos a las células del endotelio. Las integrinas se unen a proteínas que tienen una secuencia triamino-peptídica RGD. Esta secuencia se encuentra presente en proteínas de la MEC tales como fibronectina, laminina y colágeno, que se unen a la β_1 integrina, y también en el fibrinógeno y fragmentos de C3 (C3d y iC3b), que se unen a β_2 integrinas.

Se demostró que los péptidos conteniendo la secuencia RGD, eran capaces de bloquear la adherencia de ***C. albicans*** a células endoteliales y a proteínas de la MEC (72), *in vitro*. Estas proteínas de ***Candida*** análogas a las integrinas se pueden dividir en dos grupos:

1- Proteínas que se unen a proteínas séricas.

- Proteína de unión al **fibrinógeno**: la interacción de ***C. albicans*** con esta proteína ha sido mejor caracterizada que la interacción con otras proteínas séricas, como albúmina y transferrina, ya que la unión de la levadura al fibrinógeno es mucho más fuerte.

Casanova y col. (73) caracterizaron a la molécula que une al fibrinógeno como una manoproteína de 58 kDa, que se encontraría en la pared celular formando un complejo con varias subunidades. Los residuos glicosídicos representarían entre el 20-25% del peso molecular. Esta adhesina se encontraría heterogéneamente distribuida en la superficie del tubo germinativo y en menor proporción en la forma levaduriforme de ***C. albicans***.

La capacidad que presenta ***C. albicans*** para unirse al fibrinógeno, sería una propiedad relacionada a su virulencia, ya que la fibrina, que es una proteína de la coagulación, sería la proteína receptora para las células de ***C. albicans*** que se adhieren a los coágulos de sangre *in vivo,* en pacientes con septicemias.

- ***Manoproteínas tipo CR2/CR3***: La manoproteína CR2 (complement receptor 2, que se une al fragmento C3d) y la manoproteína CR3 (complement receptor 3, que se une al fragmento iC3b), fueron detectados en ***C. albicans*** por primera vez por Heidenreich y col. (74) cuando observaron que los glóbulos rojos de carnero sensibilizados con Ac y cubiertos por los fragmentos del complemento, C3d e iC3b, aglutinaban en presencia de los tubos germinativos de ***C. albicans***.

En las blastoconidias no se detectaron las proteínas de unión a C3d, aunque cuando se utilizaban anticuerpos con especificidad contra la proteína CR2 (que une C3d), reaccionaban con un epitope localizado en la membrana plasmática de

la blastoconidia, sugiriendo que durante el proceso de germinación este epitope se asociaría al de la pared celular, en la superficie de la célula (75).

En distintos experimentos para purificar la proteína CR2, que une C3d, se obtuvo una glicoproteína de 55-60 kDa, que por tratamiento con una glicosidasa, se obtenía una molécula de 45 kDa. Estos resultados sugieren que la estructura que se une a C3d es una proteína de 45 kDa con diferente grado de glicosilación.

En contraste con la proteína CR2 (que une C3d), la proteína CR3, con afinidad para iC3b, puede ser obtenida tanto de la forma de levadura como de la hifa de ***C. albicans***. Varias proteínas de diferentes pesos moleculares han sido propuestas con actividad para unir iC3b (165 kDa, 130 kDa, 66 kDa, 55 kDa) obtenidas por diferentes técnicas de extracción, aunque todas ellas representarían una misma proteína de 42 kDa, con diferente grado de glicosilación.

Brooimans y col. (76) describieron la síntesis de C3 por las células endoteliales. La degradación de esta proteína por la acción de proteinasas séricas o celulares podría proveer una fuente local de iC3b en la superficie endotelial. Este hecho permitiría a ***C. albicans*** a través de sus proteínas CR3, con afinidad para iC3b, unirse al endotelio, posibilitando la adherencia a las células del huésped.

2- *Proteínas que se unen a proteínas de la MEC:* Los componentes de la MEC conforman una red, cuya estructura se basa en las interacciones de las diferentes proteínas que la componen, ya que éstas poseen múltiples puntos de unión que están disponibles y le permiten unirse simultáneamente a otras moléculas. Varias de estas proteínas, presentes en la MEC, como **fibronectina,**

laminina, entactina y **colágeno**, podrían estar involucradas en la adherencia de C. ***albicans***.

Klotz demostró que las células de C. ***albicans*** se adherían en las zonas de unión en capas confluentes de las células endoteliales y que esta unión se exacerbaba cuando las células endoteliales eran desplazadas o se contraían, y como consecuencia, la MEC resultaba expuesta para la interacción con las levaduras (47, 77).

C. albicans y otras especies de ***Candida*** se adhieren a la **fibronectina**, una glicoproteína dimérica de 440 kDa, que circula en el plasma y forma parte de la MEC. La unión de ***C. albicans*** a fibronectina fue investigada utilizando, como inhibidores, pequeños péptidos derivados de la misma fibronectina. Los resultados mostraron que esta levadura tenía, al menos, un tipo de receptor de unión a la fibronectina soluble. Este receptor también podría ser utilizado por el hongo para interaccionar con otras proteínas de la MEC, como colágeno tipo I, tipo IV y laminina (48).

Klotz y col (78) extrajeron de la forma levaduriforme de ***C. albicans***, una proteína que se unía a fibronectina, que fue identificada como una glicoproteína de 60 kDa, compuesta por un 75-80% de carbohidratos y 20-25% de proteínas. A su vez, Penn y col. (79) demostraron que la fracción de fibronectina que se une más fuertemente a ***C. albicans*** es un fragmento de 120 kDa que posee el dominio RGD, que se une a la levadura.

La proteína **laminina** es un componente mayoritario de la membrana basal, y algunas bacterias patógenas reconocen laminina a través de receptores de superficie.

Bouchana y col. (80) detectaron la presencia de receptores para laminina en los tubos germinativos de ***C. albicans***. Estos receptores se localizan en la capa fibrilar más externa de la pared celular del tubo germinativo, identificándose como manoproteínas de 60 a 68 kDa, con más de 8.000 sitios de unión por célula.

López-Ribot y col (81) detectaron, en un extracto con β mercapto-etanol de la forma de levadura de ***C. albicans***, dos polipéptidos, de 37 kDa y 67 kDa que se unen a laminina. La fracción de 67 kDa sería una manoproteína, mientras que la de 37 kDa sería la fracción proteica de la manoproteína. Ninguna de estas dos moléculas se une a otras proteínas de mamífero, como fibronectina, colágeno tipo IV o fibrinógeno.

El tubo germinativo de ***C. albicans*** posee adhesinas para laminina distintas de las de levadura. La presencia de receptores diferentes para laminina expresados selectivamente para la forma levaduriforme y para los tubos germinativos, podría ser un factor que justifica el diferente comportamiento biológico en cuanto a la adherencia a los tejidos del huésped, de estas dos formas de ***C. albicans***.

Se ha determinado la unión de ***C. albicans*** a la **entactina** (82), una glicoproteína recientemente caracterizada que posee una secuencia RGD y que está presente en la MEC, especialmente en la membrana basal. Esta capacidad para unirse a la entactina fue detectada en moléculas de 25, 44 y 65 kDa, tanto en la forma levaduriforme como en las hifas de ***C. albicans***, aunque las características de la(s) molécula(s) aún no se conoce. Esta molécula de la pared celular también mostró habilidad para unirse a laminina y fibronectina.

Klotz y col. (83) demostraron que ***C. albicans*** se unen al **colágeno** tipo IV y tipo I, que son componentes de la membrana basal. Por un método de extracción

NB

con sustancias de acción detergente, se identificaron de la pared de la levadura y del tubo germinativo, dos proteínas de 60 y 105 kDa, con afinidad para el colágeno.

Otras proteínas de unión:

Las **proteínas hidrofóbicas,** que generan hidrofobicidad en la superficie celular de ***Candida albicans***, parecerían estar involucradas en las interacciones con el huésped y con otras funciones del hongo. Estas interacciones incluyen la habilidad del microorganismo para adherirse a superficies epiteliales y endoteliales (84, 85), a proteínas de la MEC (86), a dispositivos plásticos (49); y a otras funciones del hongo, como evadir la acción de las células fagocíticas y facilitar la toma de sustancias del medio (87).

Los componentes hidrofóbicos parecen ser más abundantes en los extractos de tubos germinativos que en los de levaduras (64).

Estudios realizados con cromatografía líquida de alta presión indicaron que las proteínas hidrofóbicas son usualmente menores de 50 kDa, mientras que las proteínas hidrofílicas son predominantemente mayores de 90 kDa (88). Probablemente esta diferencia se deba a los diferentes niveles de glicosilación entre estas proteínas de la pared celular.

Fimbrias: las fimbrias son apéndices finos y largos de la superficie celular, compuestos mayoritariamente por una glicoproteína de 66 kDa, con un 80-85% de carbohidrato (principalmente D-manosa) y 10-15 % de proteína.

Las fimbrias se unen directamente a las células epiteliales bucales y un extracto purificado de las mismas inhibe la adherencia de ***Candida*** a estas

MO

células. Esta unión estaría mediada por la proteína de la fimbria y el receptor sería un glicoesfingolípido presente en las células epiteliales bucales (89).

Proteínas de unión al plástico: además de adherirse a diferentes receptores del huésped, ***C. albicans*** y especies relacionadas, también pueden unirse al material plástico del instrumental médico. Las adhesinas estarían formadas por diferentes componentes de la capa fibrilar superficial responsables de la unión al plástico (proteínas de 60, 68 y 200 kDa) (49). Los componentes de alto peso molecular, serían manoproteínas que a través de interacciones hidrofóbicas se unirían a estos materiales.

La adherencia de las levaduras al plástico depende de las condiciones nutricionales y ambientales, de la levadura y de su estado morfológico, que son factores que afectan la expresión de proteínas y manoproteínas de la pared celular. ***C. albicans*** es menos adherente a este material que ***C. krusei*** y más que ***C. glabrata*** (90).

Luego de adherirse, las levaduras podrían propagarse y establecer la formación de biofilms. Un biofilm consiste en la formación de una o más capas de células embebidas en una matriz de material polimérico extracelular. En el biofilm que forma ***C. albicans***, las proteínas y manoproteínas liberadas al medio están química y antigénicamente relacionadas a los compuestos unidos a la pared celular y expresan dominios hidrofóbicos. Estos componentes no están firmemente unidos a la estructura de la pared y son fácilmente retenidos en el sustrato al que se pegan las levaduras.

La liberación del microorganismo a partir del biofilm formado en diferentes tipos de implantes médicos, como prótesis o catéteres, podrían contribuir o iniciar una infección diseminada aguda, cuya frecuencia se ha incrementado

MB

dramáticamente en los últimos años (20, 21, 22). Un gran número de las infecciones nosocomiales producidas por especies del género ***Candida*** derivan del uso de diferentes tipos de catéteres y prótesis. Los organismos adheridos al plástico podrían ser menos susceptibles a la acción de drogas antifúngicas (91) y además la colonización contribuiría al deterioro de los dispositivos (92).

Hawser et al. (93) demostraron que la extensión del biofilm depende del material del catéter; es mayor en el látex, material usado para catéteres urinarios, seguido por un elastómero de silicona y cloruro de polivinilo, frecuentemente utilizado en catéteres venosos. La adherencia en poliuretano y 100% de silicona es bastante menor. También los microorganismos pueden existir en biofilms mixtos, de levaduras y bacterias.

I.3.2.2- ADHESINAS DE ESTRUCTURA POLISACÁRIDA

Además de las sustancias proteicas de la pared celular que interaccionan con receptores del huésped presentes en diferentes tipos de células, en el suero o en la MEC, ***C albicans*** posee otras estructuras que se unen a otros ligandos del huésped.

Mananas: forman parte de las manoproteínas de la pared celular de ***Candida*** e intervienen en interacciones en donde se producen reconocimientos entre carbohidratos y proteínas. El carbohidrato (manana) pertenece a la adhesina de la levadura (manoproteínas), y el receptor presente en la célula huésped, es una proteína tipo-lectina.

Miyakawa y col. (67), encontraron que el factor 6, un oligosacárido de manana de la pared celular que confiere la especificidad para el serotipo A de ***C. albicans***, contribuye a la adherencia a células epiteliales.

Kanbe y Cutler (94) encontraron que una manotetrosa de la pared celular de ***C. albicans***, estaba involucrada en la unión de la levadura a tejidos esplénicos y nódulos linfáticos.

Quitina: es un polímero de N-acetil-glucosamina, presente en la capa interna de la pared celular de las levaduras, que ha sido involucrada como una adhesina de ***C. albicans*** para células epiteliales.

Lerher y col (95) demostraron que podían inhibir la adherencia de ***Candida*** a células epiteliales vaginales utilizando quitina y extracto de quitina soluble.

La proporción de quitina es mayor en las hifas, por lo que bajo esta forma se esperaría mayor actividad de adherencia por quitina.

En la siguiente tabla, se resumen las características de las principales adhesinas de ***Candida***, la localización de las mismas en la forma micelial y/o de levadura, sus respectivos receptores en las célula huésped y el tipo de células o tejidos del huésped que posee esos receptores.

ADHESINAS DE *CANDIDA*.

Mecanismo de adherencia	Adhesina de Candida	Localización	Receptor del huésped	Tejido del huésped
Interacción Proteína-Proteína	-Proteína de unión al fibrinógeno (mp 58 kDa)	M, < L	Fibrinógeno, fibrina, proteína con secuencia RGD.	MEC, sangre, coágulo fibrina.
	-Proteína tipo CR2 (mp 55-60 kDa , p 45)	M	C3d, proteína con secuencia RGD.	MEC, sangre
	-Proteína tipo CR3 (mp 160,130,55,66 kDa, p 42 kDa)	L, M	iC3b, proteína con secuencia RGD	Cél. epitelilales y endoteliales.
	-Proteína de unión a fibronectina (mp60 kDa)	L	Fibronectina, proteína con secuencia RGD	MEC, MB.
	-Proteína de unión a laminina(mp 67 kDa, p 37)	L, M	Laminina, proteína con secuencia RGD	MEC, MB
	-Proteína de unión a entactina (mp25, 44,65 kDa)	L, M	Entactina, proteína con secuencia RGD	MEC, MB.
	-Proteína de unión a colágeno (p 60 105 kDa)	L, M	Colágeno tipo IV, proteína con secuencia RGD	MB
Interacciones Hidrofóbicas	-Proteínas hidrofóbicas	M >> L	Proteínas y superficies hidrofóbicas	Cél. epiteliales y endoteliales.
Interacción Tipo-lectina (proteína-azúcar)	-Proteína de unión a fucosa (p15,7 kDa)	L, M	Glicoproteínas con residuo de fucosa (Fuc-α1,2-Gal)	Cél. epiteliales
	-Proteína de unión a N-acetil-D-glucosamina	L	Glicoproteínas con residuos de N-acetil-D-glucosamina	Cél. epiteliales
	-Fimbrias (fracción proteica de mp 66kDa)	L, M	Glicoesfingolípido (βGalNAc1,4βGal)	Cél. epiteliales
Interacción Tipo-lectina (azúcar-proteína)	-Manooligosacárido de mp, (factor 6 *C. albicans* serotipo A)	L, M	Proteína tipo-lectina	Cél. epitelilaes, keratinocitos.
	-Manotetrosa de mp, (factor 5 *C. albicans* serotipo B)	L, M	Proteína tipo-lectina?	Tejido esplénico, nódulos linfáticos
	-Quitina (polisac. Nac glucosamina)	L, M	Proteína tipo-lectina?	Cél. epiteliales
Interacción Proteína-Plástico	Proteína hidrofóbicas (p 60, 68 y 200 kDa)	M	Poliestireno	

Referencias: L: forma levadura; M: forma micelial; MEC: matriz extra-celular; MB: membrana basal; mp: manoproteína; p: proteína; RGD: arginina, glicina, ac. aspártico.

ADHESINAS DE *CANDIDA*.

Mecanismo de adherencia	Adhesina de Candida	Localización	Receptor del huésped	Tejido del huésped
Interacción Proteína-Proteína	-Proteína de unión al fibrinógeno (mp 58 kDa)	M, < L	Fibrinógeno, fibrina, proteína con secuencia RGD.	MEC, sangre, coágulo fibrina.
	-Proteína tipo CR2 (mp 55-60 kDa , p 45)	M	C3d, proteína con secuencia RGD.	MEC, sangre
	-Proteína tipo CR3 (mp 160,130,55,66 kDa, p 42 kDa)	L, M	iC3b, proteína con secuencia RGD	Cél. epitelilales y endoteliales.
	-Proteína de unión a fibronectina (mp60 kDa)	L	Fibronectina, proteína con secuencia RGD	MEC, MB.
	-Proteína de unión a laminina(mp 67 kDa, p 37)	L, M	Laminina, proteína con secuencia RGD	MEC, MB
	-Proteína de unión a entactina (mp25, 44,65 kDa)	L, M	Entactina, proteína con secuencia RGD	MEC, MB.
	-Proteína de unión a colágeno (p 60 105 kDa)	L, M	Colágeno tipo IV, proteína con secuencia RGD	MB
Interacciones Hidrofóbicas	-Proteínas hidrofóbicas	M >> L	Proteínas y superficies hidrofóbicas	Cél. epiteliales y endoteliales.
Interacción Tipo-lectina (proteína-azúcar)	-Proteína de unión a fucosa (p15,7 kDa)	L, M	Glicoproteínas con residuo de fucosa (Fuc-α1,2-Gal)	Cél. epiteliales
	-Proteína de unión a N-acetil-D-glucosamina	L	Glicoproteínas con residuos de N-acetil-D-glucosamina	Cél. epiteliales
	-Fimbrias (fracción proteica de mp 66kDa)	L, M	Glicoesfingolípido (βGalNAc1,4βGal)	Cél. epiteliales
Interacción Tipo-lectina (azúcar-proteína)	-Manooligosacárido de mp, (factor 6 *C. albicans* serotipo A)	L, M	Proteína tipo-lectina	Cél. epitelilaes, keratinocitos.
	-Manotetrosa de mp, (factor 5 *C. albicans* serotipo B)	L, M	Proteína tipo-lectina?	Tejido esplénico, nódulos linfáticos
	-Quitina (polisac. Nac glucosamina)	L, M	Proteína tipo-lectina?	Cél. epiteliales
Interacción Proteína-Plástico	Proteína hidrofóbicas (p 60, 68 y 200 kDa)	M	Poliestireno	

Referencias: L: forma levadura; M: forma micelial; MEC: matriz extra-celular; MB: membrana basal; mp: manoproteína; p: proteína; RGD: arginina, glicina, ac. aspártico.

MD

I.3.3- MECANISMO DE ADHERENCIA A CÉLULAS EPITELIALES

La adherencia de las levaduras a las células epiteliales es un paso importante en la patogénesis de las infecciones por ***Candida***. En este proceso estarían involucradas varias categorías de adhesinas de la pared celular de ***Candida*** :

-a) proteínas análogas a las integrinas, que se unen a proteínas del huésped que tienen la secuencia RGD (fibrinógeno, iC3b, C3d, fibronectina, laminina, etc.);

-b) fimbrias, que se unen a un receptor glicoesfingolipídico presente en las células epiteliales bucales;

-c) adhesinas tipo lectinas, en donde una proteína de la pared celular de la levadura interaccionaría con un receptor glicosídico (tanto de una glicoproteína como de un glicolípido) presente en la superficie de la célula del huésped;

-d) adhesina de manana, en la cual el factor 6, que es un oligosacárido de manana, forma parte de una manoproteína de la pared celular de la levadura y se une a una proteína tipo-lectina como receptor en la célula huésped.

De estos mecanismos, la interacción tipo lectina entre la fracción proteica de la manoproteína de ***Candida*** y el receptor glucosídico de la superficie de la célula huésped, sería el mecanismo más importante en la adherencia de ***Candida*** a células epiteliales (64).

La fracción proteica de diferentes cepas de ***Candida*** tendría especificidad hacia L-fucosa o N-acetil-glucosamina (69, 70). Fracciones purificadas de estas proteínas de ***Candida***, producirían una inhibición de la adherencia de la levadura a células epiteliales vaginales de hasta el 80% (95). El no obtener el 100% de inhibición, indicaría que existen otras adhesinas involucradas en la unión a este tipo de células.

I.4- EL ROL DEL TRACTO GASTROINTESTINAL EN LA CANDIDIASIS DISEMINADA

Candida albicans es un componente común de la flora oral y gastrointestinal del ser humano inmunocompetente que ha logrado evolucionar exitosamente como un comensal en personas sanas. Esta levadura podría ser adquirida a temprana edad, incluso durante el pasaje del recién nacido por el canal de parto (96).

Estudios en pacientes y en animales de experimentación indican que una gran variedad de factores, como antibióticos, corticosteroides, anticonceptivos, antiácidos, quimioterápicos, quemaduras, cirugía GI, diabetes mellitus, irradiación, neutropenia, disfunción en neutrófilos, células T o en células B, transplantes, etc. (estos factores fueron tratados más exhaustivamente en la sección I.3) son considerados como factores predisponentes que favorecen la colonización por especies del género ***Candida*** (3, 9, 10, 28, 29, 31-34, 36, 97).

Una vez que la colonización se ha establecido, las levaduras pueden causar una infección localizada del TGH, particularmente si se produce una interrupción de la integridad de la mucosa gastrointestinal. Este hecho, no sólo ayuda al establecimiento de una infección localizada, sino que predispone al huésped a sufrir una invasión de la submucosa del tracto gastrointestinal por este patógeno oportunista y, consecuentemente, una diseminación por vía hematógena a otros órganos (98).

La caracterización del ADN por técnicas moleculares de cepas de ***Candida*** que producían colonización e infección diseminada, permitió demostrar que las cepas responsables de la infección, eran idénticas a las que se encontraban colonizando previamente la mucosa del TGH de los pacientes (99). Estos estudios apoyan la

teoría de una adquisición endógena de la gran mayoría de estas infecciones diseminadas, aunque también se producen casos en los que la fuente de infección es exógena (100).

La mucosa del TGH es, probablemente, la puerta de entrada de ***C. albicans*** al organismo humano, especialmente en el huésped inmunocomprometido.

I.4.1- INFECCIÓN DEL TGH POR *CANDIDA*

La candidiasis gastrointestinal en humanos, puede involucrar prácticamente cualquier sitio del tracto alimentario.

La infección de la cavidad oral se puede manifestar como un afta, como candidiasis atrófica aguda o crónica o como queillitis angular. La afección esofágica puede ser parte del afta que se inicia en la boca y que puede extenderse hasta el ano, pero en los dos tercios de los casos, el esófago es el único sitio involucrado (101).

El estómago es el segundo sitio más frecuentemente atacado (101). La infección gástrica puede manifestarse como un afta, pero más frecuentemente se produce una úlcera en la mucosa. La mayoría de estos casos son diagnosticados por autopsia.

La infección del intestino grueso y delgado se produce con menor frecuencia que las afecciones en esófago y estómago. Al igual que en la infección gástrica, la del intestino es diagnosticada por exámenes realizados post-mortem.

I.4.2- ROL DE LA COLONIZACIÓN EN LA DISEMINACIÓN POR *CANDIDA*

Las levaduras del género ***Candida***, presentes en el TGH, serían la fuente más importante de diseminación de este patógeno oportunista, como lo demuestran diferentes datos epidemiológicos obtenidos de pacientes (100, 102). En un estudio realizado con 139 pacientes neutropénicos con enfermedades hematológicas malignas, Martino et al. (103) mostraron que desarrollaron candidiasis invasiva, el 22,2 % de los pacientes que fueron colonizados en múltiples sitios, el 4,8% de los pacientes fueron colonizados en un solo sitio y ninguno de los pacientes que no había sido colonizado por levaduras del género ***Candida.***

En un estudio similar en pacientes con cáncer (104), se detectó candidiasis diseminada en el 32% de los pacientes que habían sido colonizados por ***Candida*** en múltiples sitios y solo en un 0,4% de los pacientes que no habían sido colonizados.

Otros estudios sobre el compromiso del TGI en candidiasis diseminada fueron realizados por autopsia. Eras y col. (105) encontraron que de 2.517 autopsias realizadas en estos pacientes, en 109 pudieron corroborar histológicamente el compromiso del TGI.

Walsh y col. (101) detectaron 76 casos de candidiasis GI (13%) en 586 pacientes con leucemias o linfomas, mientras que el compromiso del TGI fue de 33 casos en 1.931 (1.6%) pacientes sin leucemias o linfomas.

Aceptando que la colonización de la mucosa del TGI por levaduras del género ***Candida*** es la principal vía de entrada de las mismas al torrente sanguíneo y a los diferentes órganos, el o los mecanismos por los cuales los microorganismos alcanzan el sistema circulatorio no está claramente establecido.

Volkheimer y Schulz (106), en 1968, describieron por primera vez el fenómeno de "persopción", por el cual grandes partículas, en este caso las levaduras, migran a través del revestimiento epitelial intacto de la mucosa intestinal, hasta alcanzar el torrente sanguíneo. Actualmente se ha propuesto un mecanismo de translocación de las levaduras hasta nódulos linfáticos del intestino, y existiría un tamaño crítico del inóculo por encima del cual las levaduras atravesarían fácilmente la barrera del TGH (107).

En el TGI normal, las levaduras están rodeadas por mucinas, Ig A secretoria y numerosas bacterias de la flora habitual, con las que deben competir por los nutrientes disponibles en la superficie de la mucosa. En estas condiciones las levaduras se reproducen por brotación y permanecen en un estado de relativo reposo. No obstante, una mínima modificación local de la superficie mucosa es suficiente para desencadenar el proceso patogénico de la levadura que se opera a través de un cambio morfológico (de la forma levaduriforme pasa a una forma filamentosa), de un aumento de sus propiedades adhesivas y de producción de enzimas, comportándose como un microorganismo más virulento.

Candida albicans es capaz de penetrar la barrera mucosa y establecer contacto con la capa de microvellosidades del intestino. Una vez que están pegadas a la superficie epitelial, las levaduras son capaces de producir la disolución local de las microvellosidades y penetrar dentro de la célula epitelial, sin producir un daño en la célula huésped salvo en el sitio de entrada y una pequeña pérdida del contenido citoplasmático (108). En este proceso de penetración está involucrada la actividad hidrolítica de enzimas extracelulares, como las proteinasas y fosfolipasas (109, 110).

Estudios histopatológicos permitieron la observación de múltiples abscesos intra-epiteliales en zonas adyacentes a regiones de colonización de ***C. albicans***, y

que consistían en un agregado denso de polimorfonucleares neutrófilos en gran parte degranulados y células de levaduras muy vacuoladas. Los productos liberados por los neutrófilos degranulados, como radicales oxígeno y mielo-peroxidasas, contribuyen a la muerte de las levaduras dentro del absceso. Los neutrófilos podrían haber migrado hasta el sitio de infección provenientes de la submucosa del tejido intestinal o gástrico y serían las primeras células de la defensa del huésped que llegarían a ese sitio. También se pueden observar un gran número de células mononucleares en secciones histológicas de regiones de la submucosa adyacente al sitio de infección (112).

La protección que brindan monocitos y macrófagos contra la infección de ***C. albicans*** es mínima en comparación con la protección provista por neutrófilos (111,112). Este hecho justifica la importancia de la neutropenia como causa predisponente en la candidiasis diseminada.

I.5- OBJETIVOS

En los últimos años se ha producido un aumento significativo en la frecuencia de las candidiasis sistémicas, siendo muchas de estas micosis de origen endógeno, a partir de levaduras que colonizan el tracto gastrointestinal del hombre.

La adherencia de ***Candida*** a la superficie de las células del huésped sería esencial para iniciar el proceso que lleva a la colonización y contribuiría a la persistencia del microorganismo dentro del huésped.

Es importante conocer las modificaciones que ejercen diferentes factores sobre la capacidad de adherencia de las levaduras aisladas de TGH, así como también la importancia que el proceso de adherencia de estos microorganismos tiene en la colonización y diseminación de las levaduras en el huésped. Por ello se plantearon los siguientes objetivos:

1- Aislar e identificar levaduras provenientes del tracto gastrointestinal humano, a partir de muestras heces obtenidas de pacientes que concurren al laboratorio de Análisis Clínicos del Centro de Referencia de Micología (CEREMIC).

2- Determinar la capacidad de adherencia de las levaduras aisladas, a células epiteliales bucales humanas, *in vitro*.

3- Estudiar las modificaciones que, sobre la capacidad de adherencia *in vitro*, ejercen:

3.1- La variación de la temperatura y el pH

3.2- La variación en la composición y concentración de azúcares del medio de cultivo para el crecimiento de las levaduras.

3.3- Los cambios morfológicos de la levadura, como la emisión de tubos germinativos.

3.4- La acción de una sustancia con actividad antifúngica (fluconazol).

3 5- La presencia de otros microorganismos del TGH, como Enterobacterias (***Escherichia coli***) y Lactobacilos (***Lactobacillus acidophillus y L. casei***).

4- Determinar la capacidad de **colonización** de las levaduras del género ***Candida*** en animales de experimentación, inoculados por vía oral con una suspensión de las levaduras.

5- Determinar la capacidad de **diseminación** de las levaduras del género ***Candida*** en animales de experimentación, inoculados por vía oral con una suspención de las levaduras.

6- Relacionar el grado de colonización y diseminación de las levaduras con los resultados de los estudios de adherencia, *in vitro*.

I.6- ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la variancia.
AHM	Agar Harina de Maíz.
ASG	Agar Sabouraud Glucosa.
ASGcl	Agar Sabouraud Glucosa Cloromicetina.
ATF	Antifúngico.
CEB	Células epiteliales bucales.
CEV	Células epiteliales vaginales.
CIM	Concentración inhibitoria mínima.
CSG	Caldo Sabouraud Glucosa.
DS	Desvío standard.
FCZ	Fluconazol.
LSD	Least significant difference
NCCLS	National Comitee for Clinical Laboratory Standards
MEC	Matriz extra celular
PBS	Buffer Fosfato Salino.
RGD	Secuencia triamino peptídica: arginina-glicina-ácido aspártico.
TGI	Tracto Gastro Intestinal.
TGH	Tracto Gastointestinal Humano.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
YCB	Yeast Carbon Base.
YNB	Yeast Nitrogen Base.

II- MATERIALES Y MÉTODOS

II.1- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS

II.1.1- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE HECES

Las levaduras utilizadas para este trabajo fueron aisladas a partir de muestras de heces de pacientes que concurrieron al Servicio Asistencial del Centro de Referencia de Micología (CEREMIC), durante un período de 20 meses. En su mayoría, dichos pacientes fueron derivados del Centro de Alergia del Hospital Provincial del Centenario. Las muestras fueron recogidas por deposición espontánea en un colector estéril, sin indicación de dieta previa y se remitieron al laboratorio dentro de las dos horas de recogidas.

Se procesaron de acuerdo a la siguiente técnica:

a- En condiciones de esterilidad se tomaron diez ansadas de diferentes zonas de la muestra, se resuspendieron en 5 ml de solución fisiológica estéril hasta formar una suspensión densa y se homogeneizaron en Vortex (Decalab).

b- La suspensiones se pasaron a tubos de centrífuga utilizando embudos con doble capa de gasa estériles, para retener los restos de mayor tamaño.

c- Con el filtrado resultante en el tubo de centrífuga, se realizó un examen directo en fresco y con colorante Gueguén (ver Apéndice I), y la suspensión restante se llevó a doble de volumen con ácido cítrico (Biopack) al 10% estéril (de acción bactericida), se homogeneizó y se conservó durante 24 horas a 4°C.

d- Se centrifugó descartándose el sobrenadante y el sedimento se sembró con ansa calibrada en dos placas de Petri, una con Agar Sabouraud Glucosa

(ASG) (ver apéndice I) y otra con Agar Sabouraud Glucosa Cloromicetina (ASGcl) (ver apéndice I), distribuyendo el material sembrado en forma pareja en toda la placa. Ambas placas se incubaron a 28°C durante 1 semana.

II.1.2- DESARROLLO Y PURIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE LEVADURAS

En las muestras que resultaron positivas se observó entre las 24 y 72 horas el desarrollo de colonias de aspecto cremoso, blando, de color blanco a crema. Estas colonias se contaron en ambas placas, de ASG y ASGcl. Se sacó un promedio de ambos recuentos y el resultado se expresó como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de materia fecal.

Una única colonia de este desarrollo se repicó en un tubo con medio ASG. Se incubó 24 hs a 28°C. Para obtener una colonia pura, se tomó una ansada de este desarrollo y se resuspendió en 5 ml de ácido cítrico al 10% (estéril). Se dejó durante 24 hs a 4° C, se centrifugó y el sedimento se sembró en una placa con ASG siguiendo un esquema de 3 estrías para el aislamiento de colonias en placa.

Se tomó una colonia aislada, se repicó a un tubo con ASG y se incubó 24 hs a 28°C. A partir de este cultivo puro se realizó un stock de la levadura en crioviales con una solución de glicerol-agua (ver Apéndice I), que fueron conservados en freezer a -20°c.

II.1.3- IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS AISLADAS

Una vez aisladas las levaduras, se identificaron a través de las siguientes pruebas:

a- Formación de tubo germinativo: se sembró un pequeño inóculo de la levadura en 0,5 ml de suero de caballo estéril, se incubó a 37° C de 2 horas 30´ a 3 hs, controlando cada media hora la aparición de tubos germinativos. Se sembró el mismo suero con una cepa de ***Candida albicans*** como control positivo.

b- Formación de clamidoconidias en medio Agar Harina de Maíz (AHM) (Ver Apéndice I): se sembró la levadura por triple estría en este medio, se cubrió con un cubreobjetos y se incubó a 28ºC durante 48 hs. Se observó la formación de pseudomicelios y clamidoconidias.

c- Producción de ureasa: la levadura se sembró en medio agar urea de Christensen (ver Apéndice I).

d- Pruebas de Auxonograma (o de asimilación) de hidratos de carbono: se realizó según técnica de Rippon (2) y se utilizó medio Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco) y los siguientes hidratos de carbono, en soluciones al 20%: glucosa (Sigma), galactosa (Sigma), sacarosa (Sigma), maltosa (Merck), lactosa (Mallinckrodt), melibiosa (Sigma), celobiosa (ICN), xilosa (Sigma), inositol (Sigma), eritritol (Sigma), L-arabinosa (Anedra), trehalosa (Sigma), glicerol (Merck), rafinosa (Merck), melizitosa (Sigma), ácido cítrico (Biopack) y almidón soluble (Mallinkrodt).

e- Prueba de Auxonograma de sustancias nitrogenadas: se realizó según técnica de Rippon (2) y se utilizó medio Yeast Carbon Base (YCB) (Difco) y soluciones al 1% de peptona (Britania) y nitrato de potasio (Merck).

f- Prueba de Zimograma o de fermentación de azúcares: se realizó según técnica de Rippon (2) y se utilizaron los siguientes hidratos de carbono (en soluciones al 20%): glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa y trehalosa.

Para la clasificación de las levaduras se utilizó la clave de Kreger-Van Rij (113) y la de Kurtzman y Fell (1).

g- Para cada levadura se utilizó el equipo comercial API 20C AUX system (Biomerieux, France).

II.2- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS, *IN VITRO*

II.2.1- ADHERENCIA DE LAS DIFERENTES CEPAS DE LEVADURAS

a) Levaduras: Se estudió la capacidad de adherencia, *in vitro,* de las 23 cepas de levaduras aisladas de muestras de heces. Además se utilizó una cepa de ***C. albicans*** proveniente de la Colección Española de Cultivos Tipo, la cepa **CECT 1394**, que deriva de la cepa ATCC 10231, cedida por el Prof. Dr. Federico Uruburu.

Para cada experimento, las levaduras fueron repicadas en medio ASG a partir de la solución stock conservada a -20°C y se incubaron a 37°C durante 24hs. Se tomó una colonia de este desarrollo, se inoculó en 10 ml de Caldo Sabouraud Glucosa (CSG) y se incubó a 37°C, durante 24 hs, en agitación a 120 rpm (Agitador Rolco). De este desarrollo se tomaron 100 µl, se sembraron en 10 ml de CSG y se incubaron en las mismas condiciones anteriores (el crecimiento en medio CSG produce predominantemente organismos de la forma levaduriforme). Las levaduras se recogieron por centrifugación, a 2500 rpm, se lavaron 2 veces con buffer fosfato salino (PBS, ver apéndice I), pH= 7,2, se pasaron varias veces a través de una jeringa con aguja de tuberculina, 25 g x 5/8

(0,5 x 16,0 mm), para romper los agregados de levaduras y se llevaron, con el mismo buffer, a una concentración final de 2,5 x 10^7 lev/ml, por recuento en cámara de Neubauer.

b) Células epiteliales: Se utilizó un pool de células epiteliales bucales (CEB) de varios dadores, que al momento de realizar la extracción, no presentaban signos ni síntomas de candidiasis 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 flora acompañante. Se pasaron 6 (seis) 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 x 10^5 cél/ml, por recuento en cámara de Neubauer. Las células fueron utilizadas dentro de las 2 horas de extraídas.

c) Ensayo de adherencia: Se siguió la técnica de Kimura y col. (114) con algunas modificaciones. Para ello se mezclaron 0,5 ml de la suspensión de cada levadura (concentración final de 2,5 x 10^7 lev/ml) con 0,5 ml de la suspensión del pool de células epiteliales (concentración final de 5 x 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, agitador Rolco). Al cabo de ese tiempo la mezcla de levaduras y células se filtró a través de papel Whattman N° 41 (poros de ≅ 20 µm), utilizando una bomba de vacío. Este tamaño de poro permitió el paso de las levaduras no adheridas y retuvo 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 de filtro, las células con las levaduras adheridas se transfirieron a un portaobjetos, por presión del papel de filtro sobre el vidrio, fijándose con alcohol metílico y se colorearon según la técnica de Gram-Nicolle. Se contaron en microscopio con objetivo de inmersión, el número de levaduras adheridas a 100 células epiteliales bucales.

Este mismo ensayo se repitió, para cada levadura 5 veces, en diferentes días. Los pasos del ensayo se resumen en el **Esquema Nº 1.**

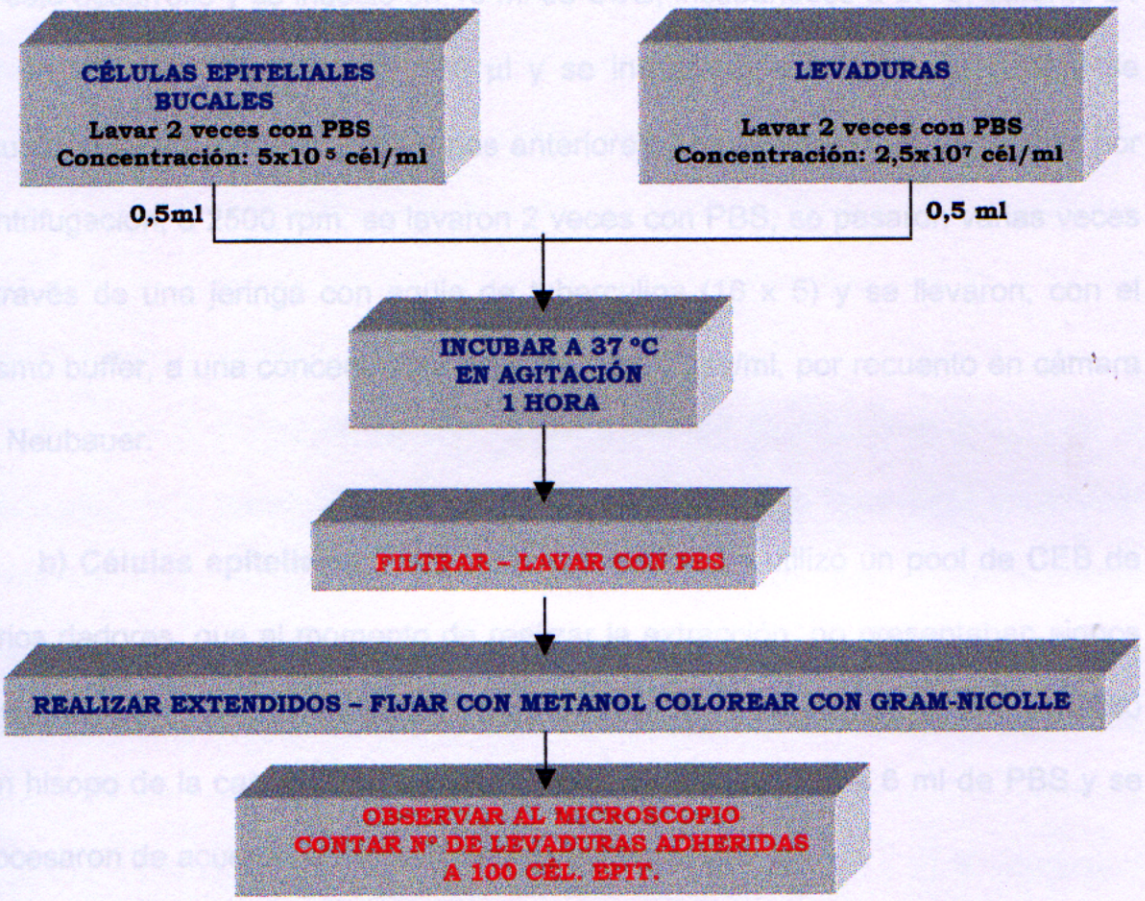
d) Análisis estadístico de los datos: los datos se obtuvieron a partir de un diseño experimental delineado a los efectos de comparar la adherencia de las 24 levaduras en estudio.

El diseño elegido correspondió al caso de un factor (las diferentes especies y cepas de ***Candida***, a 24 niveles) en bloques completamente aleatorizados (pool de células epiteliales de varios dadores). La variable en estudio fue el Nº de levaduras adheridas a 100 células epiteliales.

La falta de cumplimiento de los supuestos relativos a la distribución de los errores aleatorios, implicó la necesidad de recurrir a una alternativa no paramétrica. Se utilizó el test de Friedman y la técnica de comparación de Rangos Múltiples para detectar diferencias a un valor de significación del 5%.

MD

ESQUEMA Nº 1



II.2.2- EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL pH EN LA ADHERENCIA DE *Candida albicans*

II.2.2.1- ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS A DIFERENTES T° Y pH

a) Levaduras: Se utilizó la cepa de ***Candida albicans*** **Ca 787**, aislada a partir de una muestra de heces, que presentó un desarrollo mayor de 5000 colonias de levaduras/g. Esta cepa fue seleccionada entre un total de cinco cepas

de *C. albicans* por ser la más adherente en un ensayo preliminar. Para cada experimento, esta levadura fue repicada en medio ASG a partir de la solución stock conservada a -20°C y se incubó a 37°C durante 24hs. Se tomó una colonia de este desarrollo y se inoculó en 10 ml de CSG, incubándose a 37°C, durante 24 hs, en agitación. Se tomaron 100 µl y se inocularon en 10 ml de CSG y se incubaron en las mismas condiciones anteriores. Las levaduras se recogieron por centrifugación, a 2500 rpm, se lavaron 2 veces con PBS, se pasaron varias veces a través de una jeringa con aguja de tuberculina (16 x 5) y se llevaron, con el mismo buffer, a una concentración final de 1 x 10^7 lev/ml, por recuento en cámara de Neubauer.

b) Células epiteliales: Para cada experiencia se utilizó un pool de CEB de varios dadores, que al momento de realizar la extracción, no presentaban signos ni síntomas de candidiasis 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 procesaron de acuerdo al procedimiento del ítem **II.2.1, b.**

c) Ensayo de adherencia: se realizó a dos temperaturas, 28 y 37 °C, y tres valores de pH: 6; 7,2 y 8,4. Al combinar cada valor de T° con cada valor de pH, resultaron seis ensayos diferentes: pH= 6 y 28 °C; pH=6 y 37 °C; pH= 7,2 y 28° C; pH=7,2 y 37 °C; pH=8,4 y 28 °C y pH=8,4 y 37 °C.

Para los dos ensayos de adherencia a pH=6 se mezclaron 0,5 ml de la suspensión de la levadura (1 x 10^7 lev/ml) con 0,5 ml de la suspensión de las células epiteliales (5 x 10^5 cél/ml), (relación levaduras: células = 20:1) rápidamente se centrifugaron, descartándose el sobrenadante, y se agregó el mismo volumen

MB

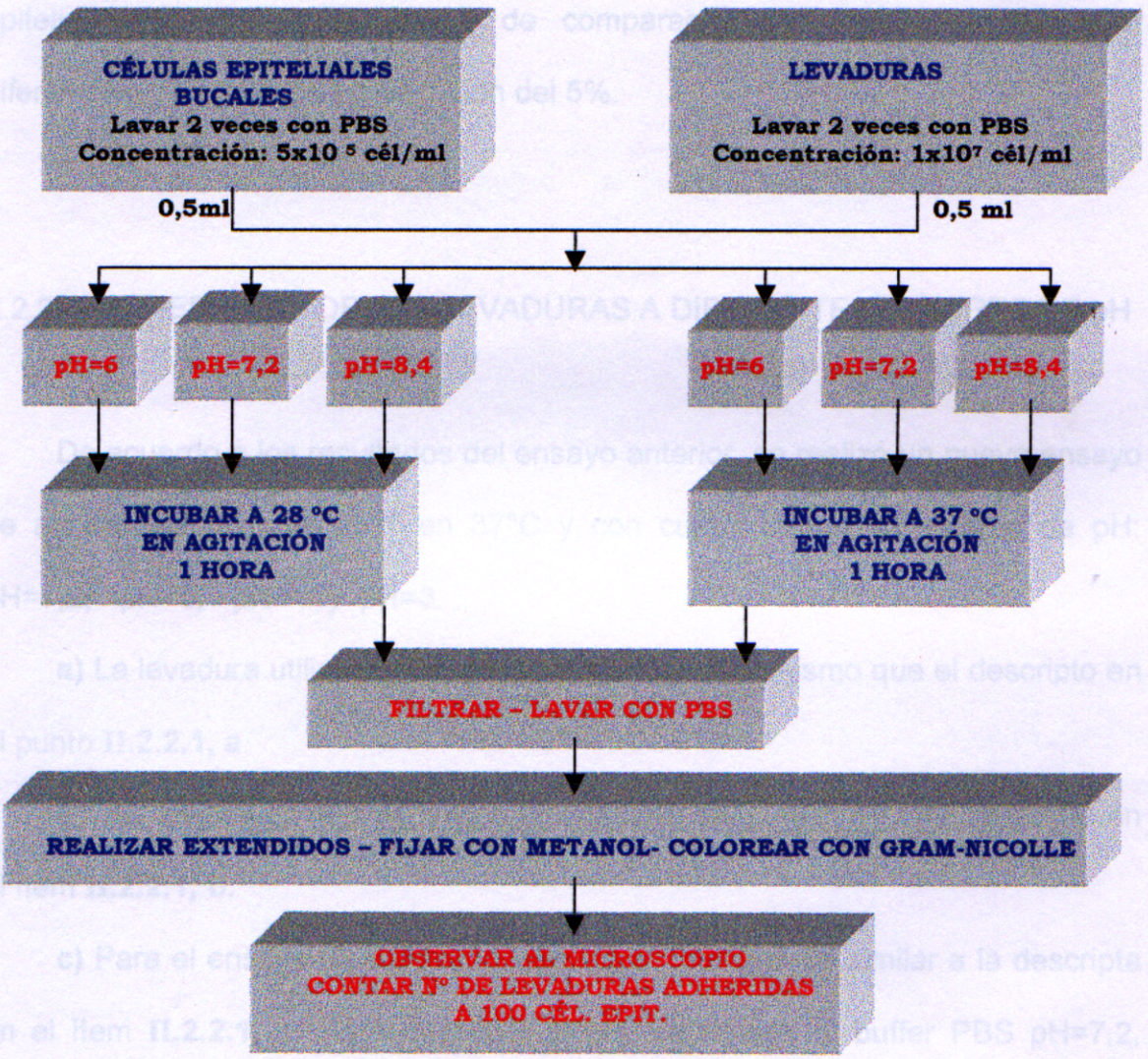
(1 ml) de buffer PBS pH=6. Este buffer se preparó a partir del buffer PBS pH=7,2 por el agregado de HCl (Cicarelli) 0,1 N hasta alcanzar el valor de pH=6 medido en pHímetro digital (Orion Research Digital Ionalyzer / 501). Se homogeneizó la suspensión en Vortex, y se transfirió a tubos de vidrio con tapa a rosca que se incubaron a 28 y 37 °C, durante 1 hora en agitación (120 rpm).

Para los dos ensayos de adherencia a pH= 7,2 (pH del buffer) se mezclaron 0,5 ml de la suspensión de la levadura con 0,5 ml de la suspensión de las células epiteliales, en tubos de vidrio con tapa a rosca y se incubaron a 28 y 37 °C, durante 1 hora en agitación (120 rpm).

Para los dos ensayos de adherencia a pH=8,4 se mezclaron 0,5 ml de la suspensión de la levadura con 0,5 ml de la suspensión de las células epiteliales, rápidamente se centrifugaron, se descartó el sobrenadante, y se agregó el mismo volumen (1 ml) de buffer PBS a pH=8,4. Este buffer se preparó a partir del buffer PBS pH=7,2 por el agregado de NaOH (Cicarelli) 0,1 N hasta alcanzar el valor de pH=8,4, medido en pHímetro digital. La suspensión se homogeneizó en Vortex, y se pasó a tubos de vidrio con tapa a rosca y se incubaron a 28 y 37 °C, durante 1 hora en agitación (120 rpm).

Luego, cada una de las seis suspensiones de células y levaduras, incubadas a diferentes pH y T°, se filtraron a través de papel de filtro Whattman N° 41, se fijaron en portaobjetos, se colorearon con Gram-Nicolle, y se contaron las levaduras adheridas a 100 células epiteliales. Los pasos del ensayo se resumen en el **Esquema N° 2**. Este mismo procedimiento se repitió 7 veces en diferentes días.

ESQUEMA Nº 2



c) Análisis estadístico de los datos: Los datos del ensayo de adherencia fueron comparados mediante análisis de la variancia (ANOVA), previo ensayo de los supuestos correspondientes (distribución normal de los errores aleatorios e igualdad de variancias). El diseño experimental elegido para este estudio

correspondió al caso de dos factores fijos cruzados (pH y temperatura) en bloques completos aleatorizados (pool de células epiteliales de varios dadores). El factor pH fue estudiado a tres niveles: 6; 7,2 y 8,4 y la temperatura a dos niveles: 28 °C y 37 °C. La variable en estudio fue el N° de levaduras adheridas/100 células epiteliales. Se utilizó la técnica de comparación de Tukey para detectar diferencias a un nivel de significación del 5%.

II.2.2.2- ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS A DIFERENTES VALORES DE pH

De acuerdo a los resultados del ensayo anterior, se realizó un nuevo ensayo de adherencia, fijando la T° en 37°C y con cuatro diferentes valores de pH: pH=7,2, pH=5, pH=4 y pH=3.

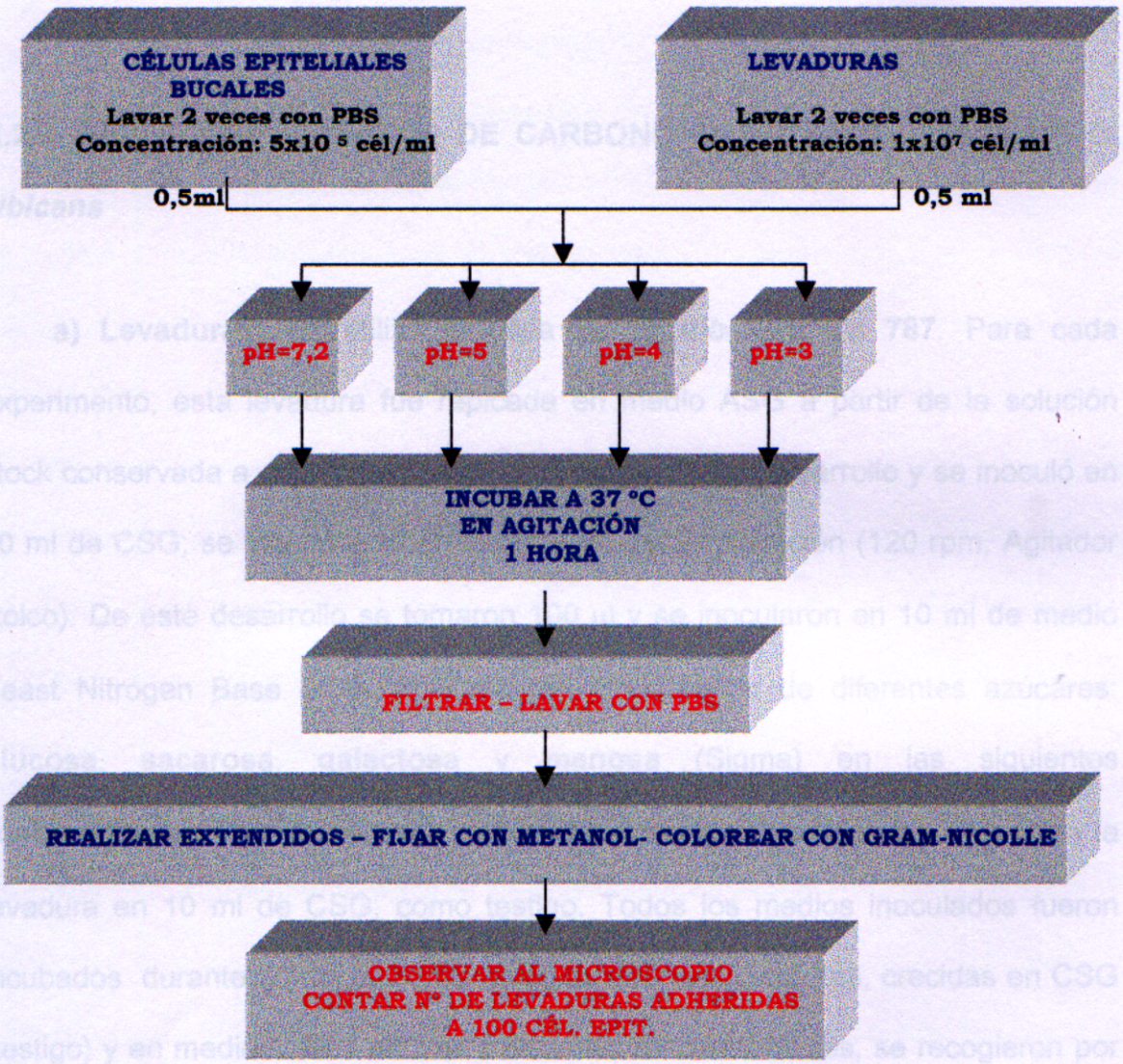
a) La levadura utilizada y su procesamiento fue el mismo que el descripto en el punto **II.2.2.1, a**.

b) Las células epiteliales fueron procesadas de la misma forma descripta en el ítem **II.2.2.1, b.**

c) Para el ensayo de adherencia se siguió una técnica similar a la descripta en el ítem **II.2.2.1, c**. Para modificar el pH, se agregó al buffer PBS pH=7,2, diferentes volúmenes de HCl 0,1 N, hasta conseguir valores de pH=5, 4 y 3, medidos con pHímetro digital.

Este mismo procedimiento, que se resume en el **Esquema N° 3**, se repitió 8 veces en diferentes días.

ESQUEMA Nº 3



d) Análisis estadístico de los datos: Los datos del ensayo de adherencia para diferentes pH fueron analizados por ANOVA, previo ensayo de los supuestos correspondientes El diseño experimental elegido para este estudio correspondió al caso de un factor (pH) en bloques completos aleatorizados (pool de células epiteliales de varios dadores). El factor pH fue estudiado a cuatro niveles: 3; 4; 5 y 7,2. La variable en estudio fue el Nº de levaduras adheridas a 100 células

epiteliales. Se utilizó la técnica de comparación de Tukey para detectar diferencias a un nivel de significación del 5%.

II.2.3- EFECTO DE HIDRATOS DE CARBONO EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

a) Levaduras: Se utilizó la cepa de ***C. albicans*** **Ca 787**. Para cada experimento, esta levadura fue repicada en medio ASG a partir de la solución stock conservada a -20°C. Se tomó una colonia de este desarrollo y se inoculó en 10 ml de CSG; se incubó a 37°C, durante 24 hs, en agitación (120 rpm, Agitador Rolco). De este desarrollo se tomaron 100 µl y se inocularon en 10 ml de medio Yeast Nitrogen Base (YNB, DIFCO) con el agregado de diferentes azúcares: **glucosa**, **sacarosa**, **galactosa** y **manosa** (Sigma) en las siguientes concentraciones finales: **50, 200 y 500 mM**; además, se inocularon 100 µl de la levadura en 10 ml de CSG, como testigo. Todos los medios inoculados fueron incubados durante 24 hs a 37 °C en agitación. Las levaduras, crecidas en CSG (testigo) y en medio YNB + azúcar a distintas concentraciones, se recogieron por centrifugación a 2500 rpm, se lavaron 2 veces con buffer PBS, se pasaron varias veces a través de una jeringa con aguja de tuberculina (16 x 5) y se llevaron, con el mismo buffer, a una concentración final de 2,5 x 10^7 lev/ml, por recuento en cámara de Neubauer.

b) Células epiteliales: Se utilizaron CEB de varios dadores que no presentaban signos ni síntomas de candidiasis bucal. Se transfirieron a 6 ml de

buffer PBS, se lavaron 2 veces y se resuspendieron en el mismo buffer hasta una concentración final de 5 x 10^5 cél/ml por recuento en cámara de Neubauer.

c) Ensayo de adherencia: Fue realizado en forma independiente para cada levadura crecida en los diferentes azúcares a distintas concentraciones.

Glucosa: se siguió el mismo esquema del ítem II.2.1 (Esquema N° 1), que se repitió simultáneamente (con el mismo pool de células epiteliales) para el testigo (levadura crecida en CSG) y para la levadura crecida en: YNB+glucosa 50mM; YNB+glucosa 200mM y YNB+glucosa 500 mM. El mismo ensayo se repitió 4 veces en diferentes días.

Galactosa: se siguió el mismo esquema del ítem II.2.1 (Esquema N° 1), que se repitió simultáneamente para el testigo (levadura crecida en CSG) y para la levadura crecida en: YNB+galactosa 50mM; YNB+galactosa 200mM y YNB+galactosa 500 mM. El mismo ensayo se repitió 4 veces en diferentes días.

Sacarosa: se siguió el mismo esquema del ítem II.2.1 (Esquema N° 1), que se repitió simultáneamente para el testigo (levadura crecida en CSG) y para la levadura crecida en: YNB+sacarosa 50mM; YNB+sacarosa 200mM y YNB+sacarosa 500 mM. El mismo ensayo se repitió 4 veces en diferentes días.

Manosa: se siguió el mismo esquema del ítem II.2.1 (Esquema N° 1), que se repitió simultáneamente para el testigo (levadura crecida en CSG) y para la levadura crecida en: YNB+manosa 50mM; YNB+manosa 200mM y YNB+manosa 500 mM. El mismo ensayo se repitió 4 veces en diferentes días.

d) Análisis estadístico de los datos: Los datos del ensayo de adherencia realizado para cada azúcar fueron analizados por ANOVA, previo ensayo de los supuestos correspondientes. El diseño experimental elegido, para cada ensayo,

correspondió al caso de un factor (concentraciones de glucosa, galactosa, sacarosa o manosa) en bloques completos aleatorizados (pool de células epiteliales de varios dadores). El factor concentración para cada azúcar fue estudiado a cuatro niveles: testigo (levaduras crecidas en CSG) y tres concentraciones del azúcar: 50, 200, y 500 mM. La variable en estudio fue el Nº de levaduras adheridas/100 células epiteliales. Se utilizó la técnica de comparación de Tukey para detectar diferencias a un nivel de significación del 5%.

II.2.4- EFECTO DE LA FILAMENTIZACIÓN EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

a) Levaduras: Se utilizó la cepa de ***C. albicans*** **Ca 787** y la cepa de colección ***C. albicans*** **CECT 1394** (ítem **II.2.1.a)**. Para cada experimento, ambas levaduras fueron repicadas en medio ASG a partir de la respectiva solución stock conservadas a -20°C y procesadas de la siguiente manera: una colonia de cada desarrollo se inoculó en 10 ml de CSG y se incubó a 37°C, durante 24 hs, en agitación. De este desarrollo se tomaron 100 µl, se repicaron en 10 ml de CSG y el cultivo se incubó over-night a 37°C en agitación. Las levaduras se recogieron por centrifugación a 2500 rpm, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en el mismo buffer hasta obtener una concentración final de 2,5 x 10^7 lev/ml.

Filamentización: Para estimular la filamentización de las levaduras se utilizó el Medio 199 (SIGMA). Se tomaron dos alícuotas de 0,5 ml de las suspensiones de levaduras ya contadas, se centrifugaron y cada una se resuspendió en 2 ml de

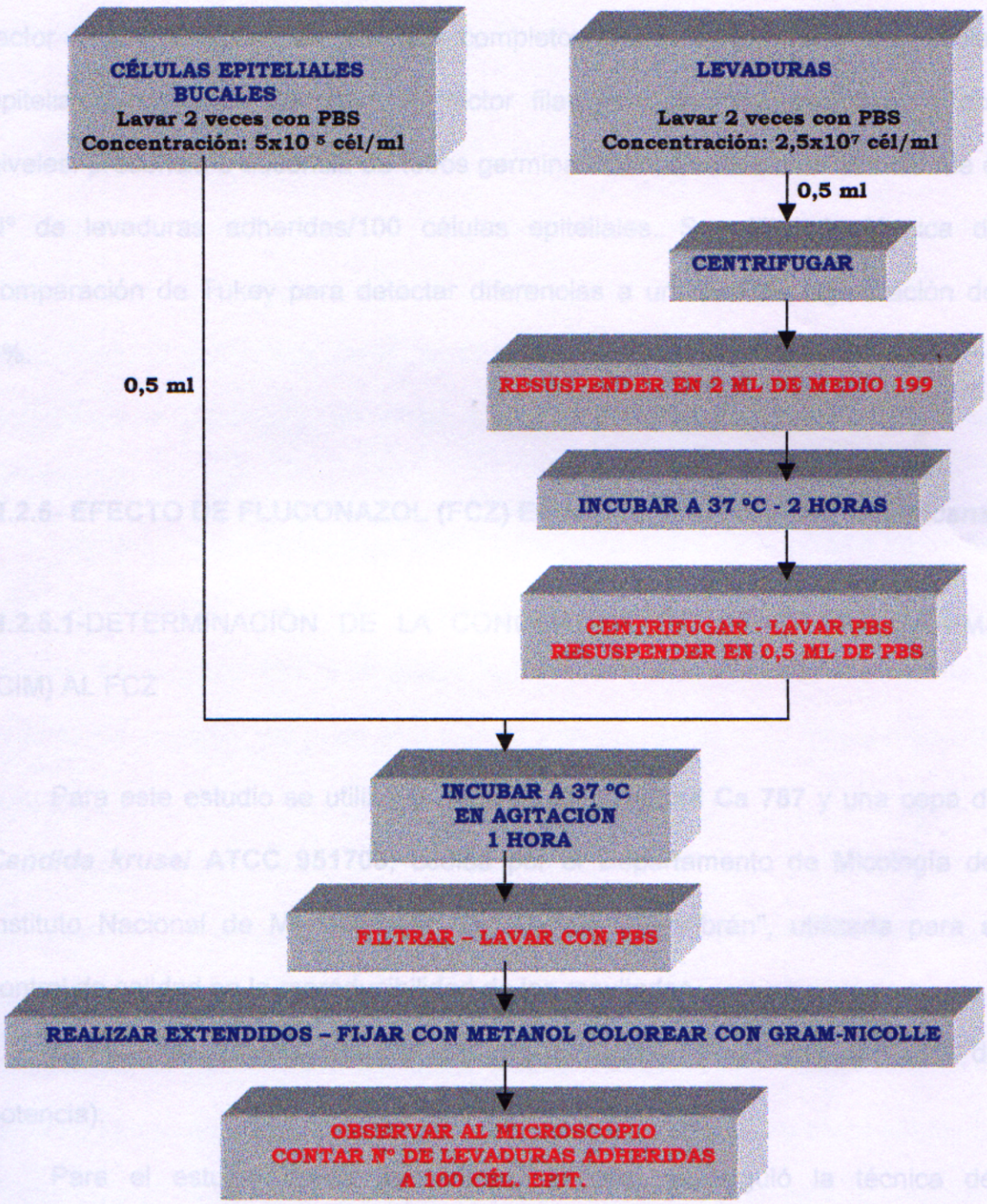
Medio 199. Una de las suspensiones se mantuvo a T° ambiente y la otra se llevó a 37°C durante 2 hs. Al cabo de ese tiempo se observó, en el 70-80 % de las levaduras incubadas a 37°C, la formación de tubos germinativos, pero no en las levaduras conservadas a 28°C. Se centrifugaron ambas suspensiones, se descartó el sobrenadante, se lavaron dos veces con PBS, para eliminar el Medio 199, se volvieron a contar y se llevó a volumen final hasta obtener una concentración final de 2,5 x 10^7 lev/ml.

b) Células epiteliales: Se utilizaron CEB, de varios dadores que no presentaban signos ni síntomas de candidiasis bucal, procesadas como se describió en el ítem **II.2.1, b.**

c) Ensayo de adherencia: Se enfrentaron 0,5 ml de la suspensión de levaduras (medio 199 a 28°C) con 0,5 ml de la suspensión de CEB y, por otro lado, 0,5 ml de la suspensión de levaduras filamentizadas (medio 199 a 37°C) con igual volumen de la suspensión de CEB. Luego se siguió la técnica descripta en el punto **II.2.1, c.** Este ensayo se repitió 7 veces en diferentes días.

La metodología para el ensayo de adherencia de las levaduras **Ca 787** y **Ca CECT 1394** con tubo germinativo (Medio 199 a 37°C) se resume en el **esquema N° 4** (el mismo esquema se repitió para las levaduras conservadas en el Medio 199 a 28 °C):

ESQUEMA Nº 4


CÉLULAS EPITELIALES BUCALES
Lavar 2 veces con PBS
Concentración: 5x10 5 cél/ml
LEVADURAS
Lavar 2 veces con PBS
Concentración: 2,5x10⁷ cél/ml
0,5 ml
CENTRIFUGAR
RESUSPENDER EN 2 ML DE MEDIO 199
0,5 ml
INCUBAR A 37 °C - 2 HORAS
CENTRIFUGAR - LAVAR PBS
RESUSPENDER EN 0,5 ML DE PBS
INCUBAR A 37 °C
EN AGITACIÓN
1 HORA
FILTRAR – LAVAR CON PBS
REALIZAR EXTENDIDOS – FIJAR CON METANOL COLOREAR CON GRAM-NICOLLE
OBSERVAR AL MICROSCOPIO
CONTAR Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS
A 100 CÉL. EPIT.

d) Análisis estadístico de los datos: Los datos del ensayo de adherencia fueron analizados por ANOVA, previo ensayo de los supuestos correspondientes. El diseño experimental elegido para este estudio correspondió al caso de un factor (filamentización) en bloques completos aleatorizados (pool de células epiteliales de varios dadores). El factor filamentización fue estudiado a dos niveles: presencia o ausencia de tubos germinativos. La variable en estudio fue el Nº de levaduras adheridas/100 células epiteliales. Se utilizó la técnica de comparación de Tukey para detectar diferencias a un nivel de significación del 5%.

II.2.5- EFECTO DE FLUCONAZOL (FCZ) EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

II.2.5.1-DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) AL FCZ

Para este estudio se utilizó la cepa de ***C. albicans* Ca 787** y una cepa de ***Candida krusei* ATCC 951705**, cedida por el Departamento de Micología del Instituto Nacional de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbrán", utilizada para el control de calidad en la reproducibilidad de los resultados.

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

Para el estudio de la sensibilidad *in vitro*, se siguió la técnica del macrométodo de referencia en medio líquido, estandarizado por el Subcomité en pruebas de sensibilidad del "National Comitee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) (115).

Solución stock del antifúngico: se preparó una solución stock de FCZ en agua de 6,0 mg/ml. A partir de esta solución madre, se realizaron 11 diluciones seriadas al medio, en agua. Cada una de estas soluciones fue nuevamente diluida 1:20 en agua. Después del agregado del inóculo de la levadura, las concentraciones finales de trabajo fueron 11 diluciones al medio partiendo de 100 mg/ml.

Medio de cultivo: se utilizó RPMI 1640 10X (Sigma) tamponado con buffer MOPS (ácido morfopropilen sulfónico, Sigma) 1.65 M adicionado con $NaHCO_3$ (Mallinkrodt) (2 g/l). A este medio se le agregó glucosa (Sigma) al 18% a fin de incrementar el desarrollo. Se ajustó a pH= 7 con NaOH (Cicarelli) 1N, y se esterilizó por filtración.

Inóculo: las levaduras fueron repicadas 24 hs antes de la prueba en medio ASG. Se tomaron 2-3 colonias de este desarrollo, se resuspendieron en 5 ml de solución fisiológica estéril y se ajustó la turbidez a la de un estándar 0,5 Mac Farland. Se tomaron 100 µl de este inóculo y se agregaron a 20 ml del medio de cultivo.

Prueba de sensibilidad: se utilizaron 12 tubos de urea de vidrio estériles, los cuales fueron cargados con 500 µl de las 11 diluciones seriadas del FCZ y 1000 µl del inóculo preparado y diluido en el medio de cultivo. Además se sembró un tubo con 500 µl de agua sin droga y se le agregó 1000 µl del inóculo de la levadura con el medio de cultivo, como tubo control de 100% de crecimiento. Se incubaron a 37 ºC durante 48 hs. La lectura se realizó visualmente y se consideró la CIM como la concentración de droga del tubo que presentó igual turbidez a una dilución 1:5 del tubo control de crecimiento (concentración de FCZ que produce una inhibición del 80% del crecimiento).

II.2.5.2- PRIMER ENSAYO DE ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS TRATADAS CON FCZ

a) Levaduras: se utilizó la levadura Ca 787, para la cual se determinó una CIM para FCZ de 0,8 μg/ml. Se probó el efecto de tres concentraciones subinhibitorias de FCZ: 0,5 μg/ml, 0,05 μg/ml y 0,005 μg/ml.

Para cada experimento, esta levadura fue repicada en medio ASG (a partir de la solución stock conservada a -20°C) y se incubó a 37 °C durante 24 hs. Se tomó una colonia, se inoculó en 10 ml de CSG y se incubó a 37°C, durante 24 hs, en agitación. De este desarrollo en medio líquido se tomaron 100 μl y se sembraron en:

a-20 ml de caldo Sabouraud glucosa (se utilizó como testigo).

b-20 ml de caldo Sb + FCZ en concentración final 0,5 μg/ml.

c-20 ml de caldo Sb + FCZ en concentración final 0,05 μg/ml.

d-20 ml de caldo Sb + FCZ en concentración final 0,005 μg/ml.

Estos cultivos se incubaron a 37°C durante 24 hs en agitación. Luego, las levaduras se recogieron por centrifugación, a 2500 rpm, se lavaron 2 veces con PBS, pH= 7,2; se pasaron varias veces a través de una jeringa con aguja de tuberculina (16 x 5) y se llevaron con el mismo buffer, a una concentración final de $2,5 \times 10^7$ lev/ml, por recuento en cámara de Neubauer.

Para estudiar el efecto del antifúngico sobre la capacidad de filamentización de ***C. albicans*** y a su vez, si este efecto sobre la filamentización 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 hs a 37°C. Las suspensiones se

centrifugaron, se lavaron 2 veces con PBS, se volvieron a contar y se llevaron a volumen final, hasta obtener una concentración de 2,5 x 10^7 lev/ml.

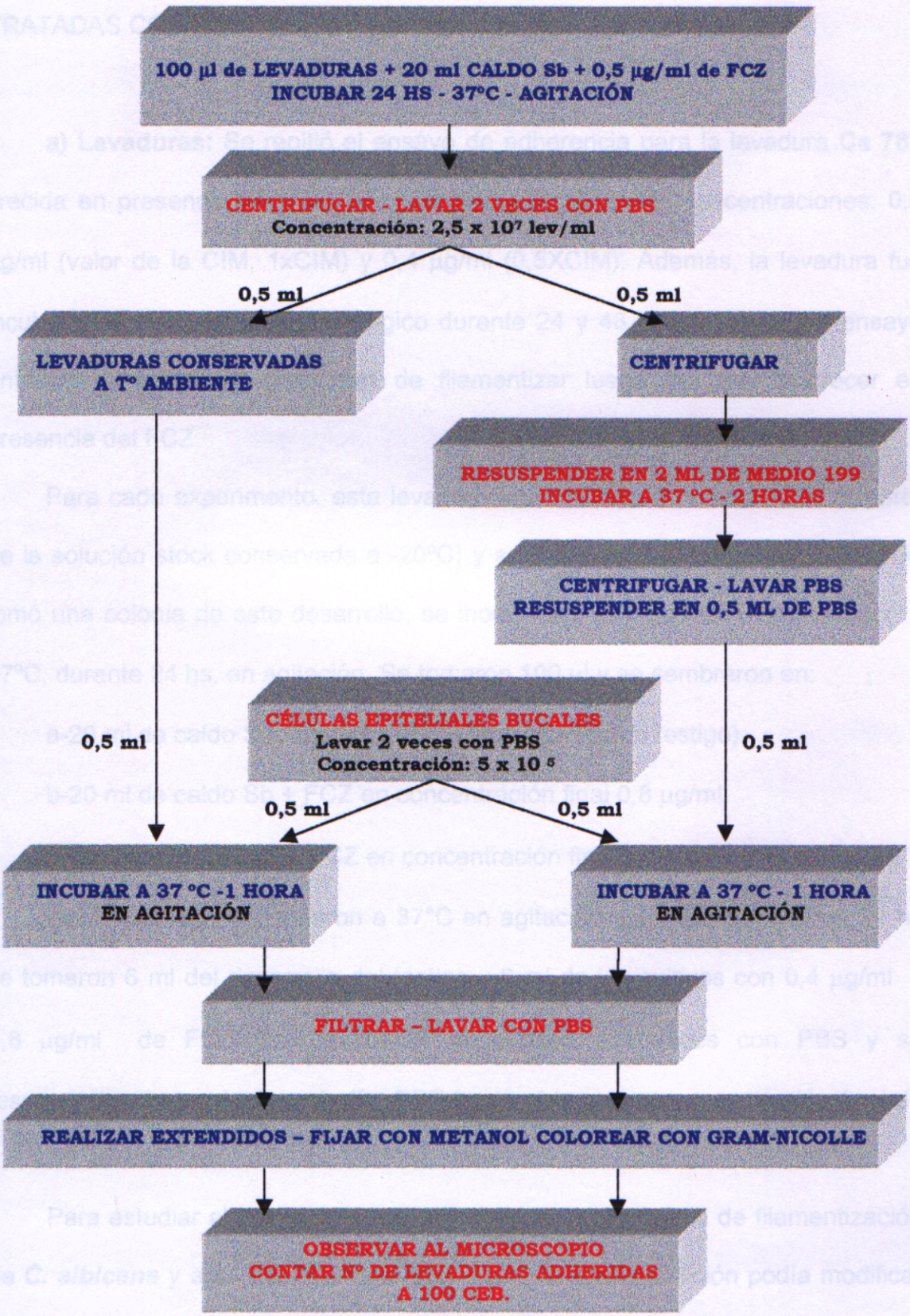
b) Células epiteliales: se utilizaron CEB de varios dadores, que se procesaron de la misma forma que en el **ítem II.2.1, b**.

c) Ensayo de adherencia: El siguiente ensayo se realizó para el grupo testigo y para las levaduras tratadas con 0,5, 0,05 y 0,005 µg/ml de FCZ: se enfrentaron 0,5 ml de la suspensión de levaduras con 0,5 ml de la suspensión de CEB y por otro lado, 0,5 ml de la suspensión de levaduras filamentizadas (medio 199 a 37°C) con igual volumen de la suspensión de CEB. Luego se siguió la técnica descripta en el punto **II.2.1, c.** Este ensayo se repitió 6 veces en diferentes días.

La metodología para el ensayo de adherencia de las levaduras tratadas con 0,5 µg/ml de FCZ se resume en el **esquema N° 5** (el mismo esquema se repite para las levaduras tratadas con 0,05 y 0,005 µg/ml de FCZ y el grupo control).

d) Análisis estadístico de los datos: Los datos del ensayo de adherencia fueron analizados por ANOVA, previo ensayo de los supuestos correspondientes. El diseño experimental elegido para este estudio correspondió al caso de dos factores fijos cruzados (antifúngico y filamentización) en bloques completos aleatorizados (pool de células epiteliales de varios dadores). El factor antifúngico fue estudiado a 4 niveles: ausencia del FCZ (grupo testigo) y las tres concentraciones subinhibitorias de FCZ: 0,5, 0,05 y 0,005 µg/ml y la filamentización a dos niveles: presencia o ausencia de tubos germinativos. La variable en estudio fue el N° de levaduras adheridas/100 células epiteliales. Se utilizó la técnica de comparación de Tukey para detectar diferencias a un nivel de significación del 5%.

ESQUEMA Nº 5


100 µl de LEVADURAS + 20 ml CALDO Sb + 0,5 µg/ml de FCZ
INCUBAR 24 HS - 37°C - AGITACIÓN
CENTRIFUGAR - LAVAR 2 VECES CON PBS
Concentración: 2,5 x 10⁷ lev/ml
0,5 ml
0,5 ml
LEVADURAS CONSERVADAS A T° AMBIENTE
CENTRIFUGAR
RESUSPENDER EN 2 ML DE MEDIO 199
INCUBAR A 37 °C - 2 HORAS
CENTRIFUGAR - LAVAR PBS
RESUSPENDER EN 0,5 ML DE PBS
CÉLULAS EPITELIALES BUCALES
Lavar 2 veces con PBS
Concentración: 5 x 10 ⁵
0,5 ml
0,5 ml
0,5 ml
0,5 ml
INCUBAR A 37 °C -1 HORA EN AGITACIÓN
INCUBAR A 37 °C - 1 HORA EN AGITACIÓN
FILTRAR – LAVAR CON PBS
REALIZAR EXTENDIDOS – FIJAR CON METANOL COLOREAR CON GRAM-NICOLLE
OBSERVAR AL MICROSCOPIO
CONTAR N° DE LEVADURAS ADHERIDAS
A 100 CEB.

II.2.5.3- SEGUNDO ENSAYO DE ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS TRATADAS CON FCZ

a) Levaduras: Se repitió el ensayo de adherencia para la levadura **Ca 787** crecida en presencia de FCZ, en este caso utilizando dos concentraciones: 0,8 µg/ml (valor de la CIM, 1xCIM) y 0,4 µg/ml (0,5XCIM). Además, la levadura fue incubada en presencia del antifúngico durante 24 y 48 hs y como en el ensayo anterior, se probó su capacidad de filamentizar luego de hacerla crecer en presencia del FCZ.

Para cada experimento, esta levadura fue repicada en medio ASG (a partir de la solución stock conservada a -20°C) y se incubó a 37 °C durante 24 hs. Se tomó una colonia de este desarrollo, se inoculó en 10 ml de CSG y se incubó a 37°C, durante 24 hs, en agitación. Se tomaron 100 µl y se sembraron en:

a-20 ml de caldo Sabouraud glucosa (se utilizó como testigo).

b-20 ml de caldo Sb + FCZ en concentración final 0,8 µg/ml.

c- 20 ml de caldo Sb + FCZ en concentración final 0,4 µg/ml.

Estos cultivos se incubaron a 37°C en agitación durante 48 hs. A las 24 hs se tomaron 6 ml del desarrollo del testigo y 6 ml de los cultivos con 0,4 µg/ml y 0,8 µg/ml de FCZ. Las levaduras se lavaron dos 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, si este efecto sobre la filamentización 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 hs a 37°C. Las suspensiones se centrifugaron, se lavaron 2 veces con PBS, se volvieron a contar las levaduras y se llevaron a volumen final, hasta obtener una concentración de $2,5 \times 10^7$ lev/ml.

El mismo procedimiento se repitió para las levaduras incubadas durante 48 hs.

b) Células epiteliales: se utilizaron CEB de varios dadores, que se procesaron de la misma forma que en el ítem **II.2.1, b.**

c) Ensayo de adherencia: El siguiente ensayo se realizó para el grupo testigo y para las levaduras tratadas con 0,4 y 0,8 µg/ml de FCZ a las 24 y a las 48 hs: se enfrentaron 0,5 ml de la suspensión de levaduras con 0,5 ml de la suspensión de CEB y por otro lado, 0,5 ml de la suspensión de levaduras filamentizadas (medio 199 a 37°C) con igual volumen de la suspensión de CEB. Luego se siguió la técnica descripta en el punto **II.2.1, c.** Este ensayo se repitió 4 veces en diferentes días.

La metodología para el ensayo de adherencia de las levaduras del grupo control y las tratadas con 0,4 µg/ml y 0,8 µg/ml de FCZ, durante 24 y 48 hs es similar al descripto en el **esquema N° 5.**

d) Análisis estadístico de los datos: Los datos del ensayo de adherencia fueron analizados por ANOVA, previo ensayo de los supuestos correspondientes. 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 dadores). El factor antifúngico fue estudiado a tres niveles: ausencia de FCZ (grupo testigo) y las dos

concentraciones de FCZ: 0,4 y 0,8 µg/ml; la filamentización, a dos niveles: presencia o ausencia de tubos germinativos y el tiempo de incubación, a dos niveles: 24 y 48 hs. La variable en estudio fue el N° de levaduras adheridas/100 células epiteliales. Se utilizó la técnica de comparación de Tukey para detectar diferencias a un nivel de significación del 5%.

II.2.6- EFECTO DE OTROS MICROORGANISMOS EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

II.2.6.1- EFECTO DE LA PRESENCIA DE LACTOBACILOS EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*.

a) Levaduras: Se utilizó la cepa de *C. albicans* **Ca 787.** Para cada experimento las levaduras fueron repicadas en medio ASG a partir de la solución stock conservada a -20°C y se procesaron de acuerdo al procedimiento del ítem **II.2.1 a).**

b) Bacterias: se utilizaron cepas de ***Lactobacillus spp*** aisladas de la "Leche Bio" (Sancor), que contiene dos especies: ***Lactobacillus casei*** y ***L. acidophillus.*** Para el aislamiento de los mismos se utilizó el medio de Agar-Rogosa (Merck) (Ver Apéndice I) y fueron conservados en una suspensión de leche (ver Apéndice I) a -20 °C.

Para cada experimento, las bacterias fueron repicadas en medio Agar-Rogosa a partir de la solución stock y se incubaron a 37°C durante 24hs. Se tomaron 3-4 colonias de este desarrollo, se lavaron con PBS y se resuspendieron

MB

en el mismo buffer hasta un opacidad similar a la escala 0,5 de Mc Farland (≅ 1,5 x 10^8 bacterias / ml).

c) Células epiteliales: Para cada experiencia se utilizó un pool de CEB de varios dadores, que al momento de realizar la extracción, no presentaban signos ni síntomas de infección 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 procesaron de acuerdo al protocolo del ítem **II.2.1, b.**

d) Ensayo de adherencia: Para estudiar el efecto de la presencia de bacterias sobre la adherencia de la cepa de ***C. albicans* Ca 787**, se realizaron dos ensayos simultáneos:

1- Se enfrentaron 0,5 ml de la suspensión de las levaduras con 0,5 ml de la suspensión de las CEB, de acuerdo al procedimiento del ítem **II.2.1. c), Esquema Nº1** (Grupo control).

2- Se enfrentaron 0,5 ml de la suspensión de levaduras con 0,5 ml de la suspensión de bacterias. La suspensión resultante (1 ml) se centrifugó a 2000 rpm durante 5´. Se retiraron 0,5 ml del sobrenadante (PBS) para obtener la misma concentración final de levaduras y bacterias que en el grupo control y se enfrentaron con 0,5 ml de la CEB. Luego se siguió la técnica descripta en el punto **II.2.1, c,** de acuerdo al **Esquema Nº 6.**

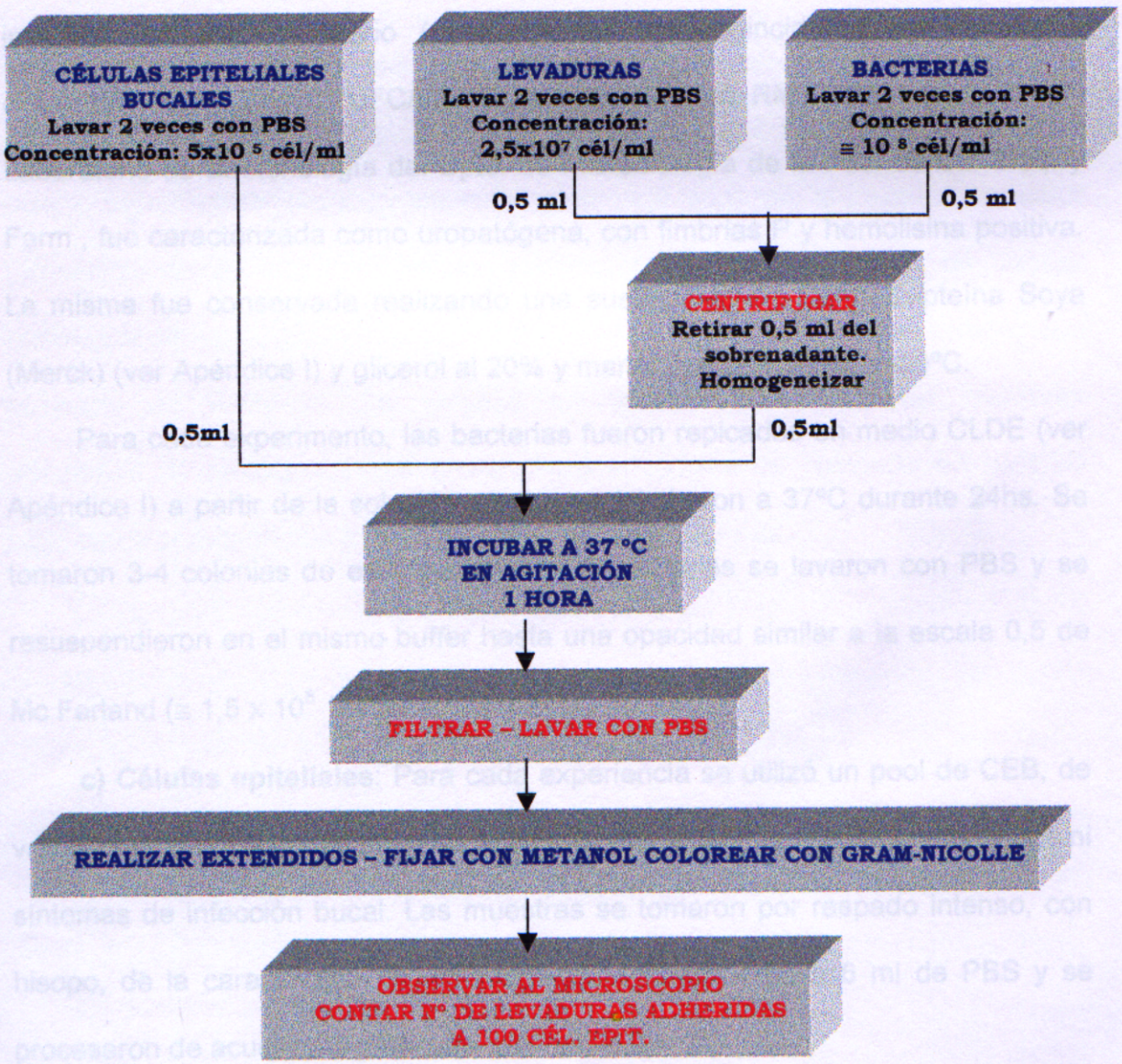
Ambos ensayos se repitieron 5 veces en diferentes días.

e) Análisis estadístico de los datos: Los datos del ensayo de adherencia fueron analizados por ANOVA, previo ensayo de los supuestos correspondientes. El diseño experimental elegido para este estudio correspondió al caso de un factor (presencia de bacterias) en bloques completos aleatorizados (pool de

H9

células epiteliales de varios dadores). El factor fue estudiado a dos niveles: presencia o ausencia de bacterias. La variable en estudio fue el Nº de levaduras adheridas/100 células epiteliales. Se utilizó la técnica de comparación de LSD para detectar diferencias a un nivel de significación del 5%.

ESQUEMA Nº 6



II.2.6.2- EFECTO DE LA PRESENCIA DE ENTEROBACTERIAS EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

a) Levaduras: Se utilizó la cepa de ***C. albicans* Ca 787.** Para cada experimento las levaduras fueron repicadas en medio ASG a partir de la solución stock conservada a -20°C y se procesaron de acuerdo al procedimiento del ítem **II.2.1 a).**

b) Bacterias: se utilizó una cepa de ***Escherichia coli*** aislada de un paciente con infección del tracto urinario (con sintomatología coincidente, leucocituria y desarrollo mayor de 10^5 UFC/ml). Esta cepa, ***E. coli* RM 2608,** cedida por el Laboratorio de Bacteriología del Dpto. de Microbiología de la Fac. de Cs. Bioq. y Farm., fue caracterizada como uropatógena, con fimbrias P y hemolisina positiva. La misma fue conservada realizando una suspensión en Caldo Tripteína Soya (Merck) (ver Apéndice I) y glicerol al 20% y mantenida en freezer a -20°C.

Para cada experimento, las bacterias fueron repicadas en medio CLDE (ver Apéndice I) a partir de la solución stock y se incubaron a 37°C durante 24hs. Se tomaron 3-4 colonias de este desarrollo, las bacterias se lavaron con PBS y se resuspendieron en el mismo buffer hasta una opacidad similar a la escala 0,5 de Mc Farland ($\cong 1,5 \times 10^8$ bacterias / ml).

c) Células epiteliales: Para cada experiencia se utilizó un pool de CEB, de varios dadores que al momento de realizar la extracción, no presentaban signos ni síntomas de infección 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 procesaron de acuerdo al protocolo del ítem **II.2.1, b.**

d) Ensayo de adherencia: Para estudiar el efecto de la presencia de ***E. coli*** sobre la adherencia de la cepa de ***C. albicans*** **Ca 787**, se realizaron dos ensayos simultáneos (similar a los realizados para Lactobacilos en el punto **d), ítem II.2.6.1**):

1) CEB + levaduras (grupo control), de acuerdo al **Esquema N° 1**.
2) CEB + levaduras + bacterias, siguiendo el **Esquema N° 6**

Ambos ensayos se repitieron 5 veces en diferentes días.

e) Análisis estadístico de los datos: Los datos del ensayo de adherencia fueron analizados por ANOVA, previo ensayo de los supuestos correspondientes. El diseño experimental elegido para este estudio correspondió al caso de un factor (presencia de ***E. coli***) en bloques completos aleatorizados (pool de células epiteliales de varios dadores). El factor fue estudiado a dos niveles: presencia o ausencia de bacterias. La variable en estudio fue el N° de levaduras adheridas/100 células epiteliales. Se utilizó la técnica de comparación de LSD para detectar diferencias a un nivel de significación del 5%.

MB

II.3- ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA* EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

II.3.1- MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

Para el estudio de la colonización y diseminación de levaduras del género ***Candida***, se utilizó un modelo experimental de ratones infantes (116). Los ratones adultos son resistentes a la infección salvo que sean tratados con dietas hiperglúcidas (117), antibióticos, corticoides y/o drogas immunosupresoras (97, 118).

Se usaron ratones albinos de la línea Rockland, endocriados, de 4-5 días de vida, que fueron provistos por el Criadero de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR.

II.3.2- METODOLOGÍA

Levaduras: para el estudio de la colonización y diseminación en ratones, fueron utilizadas algunas de las levaduras aisladas del TGH, con las cuales previamente se habían realizado estudios de adherencia *in vitro* **(Item II.2.1)**. De acuerdo a los resultados obtenidos, para estudiar el comportamiento *in vivo*, en su capacidad de colonización y de diseminación, se seleccionaron las siguientes cepas de ***C. albicans*** y de ***Candida spp***. con diferentes niveles de adherencia:

a) - *C. albicans* Ca 333, por ser la cepa más adherente, *in vitro*.

- ***C. albicans*** **Ca 787**, por tener un a adherencia intermedia, dentro de las cepas de ***C. albicans*** y porque con esta levadura se realizaron otros estudios, *in vitro* (efecto de la filamentización, del crecimiento en medios con diferentes azúcares, del FCZ y de la presencia de bacterias sobre la adherencia).

- ***C. albicans*** **Ca 485**, por ser una de las cepas de ***C. albicans*** que menos adhiere.

- ***C. albicans*** **CECT 1394**, por ser una cepa de Colección.

- ***C. glabrata*** **Cg 751**.
- ***C. krusei*** **Ck 615**.
- ***C. lusitaniae*** **Clu 670**.
- ***C. parapsilosis*** **Cp 345**.
- ***C. tropicalis*** **Ct 508**

} Por ser especies de ***Candida spp*** de interés clínico.

b) ***C. albicans*** **Ca 787**, filamentizada

c) ***C. albicans*** **Ca 787**, crecida en medio YNB + sacarosa 500 mM

Preparación del inóculo: todas las levaduras del **punto a)**, previo a cada inoculación, fueron repicadas en medio ASG a partir de la solución stock conservada a -20°C e incubadas a 37°C durante 24hs. Se tomó una colonia, se inoculó en 10 ml de CSG y se incubó a 37°C, durante 24 hs, en agitación. Se tomaron 200 µl de este desarrollo, se sembraron en 25 ml de CSG y se incubaron en las mismas condiciones anteriores. Las levaduras se recogieron por centrifugación a 2500 rpm, se lavaron 2 veces con PBS, pH= 7,2, se pasaron

varias veces a través de una jeringa con aguja de tuberculina, 25 g x 5/8 (0,5 x 16,0 mm), para romper los agregados de levaduras y se llevaron, con el mismo buffer, a una concentración final de 5 x 10^9 lev/ml, por recuento en cámara de Neubauer.

La cepa ***C. albicans*** Ca 787 del **ítem b)**, fue procesada de igual forma que en el punto anterior. Luego del recuento, se tomaron 500 µl, se resuspendieron en 30 ml de Medio 199 y se incubaron a 37°C durante 2 horas, para promover la filamentización de las levaduras. Al cabo de ese tiempo la suspensión se centrifugó a 2500 rpm durante 10', las levaduras se lavaron dos veces con PBS para eliminar el medio 199 , se volvieron a contar y se llevaron a volumen final, hasta obtener una concentración de 5 x 10^9 lev/ml por recuento en cámara de Neubauer.

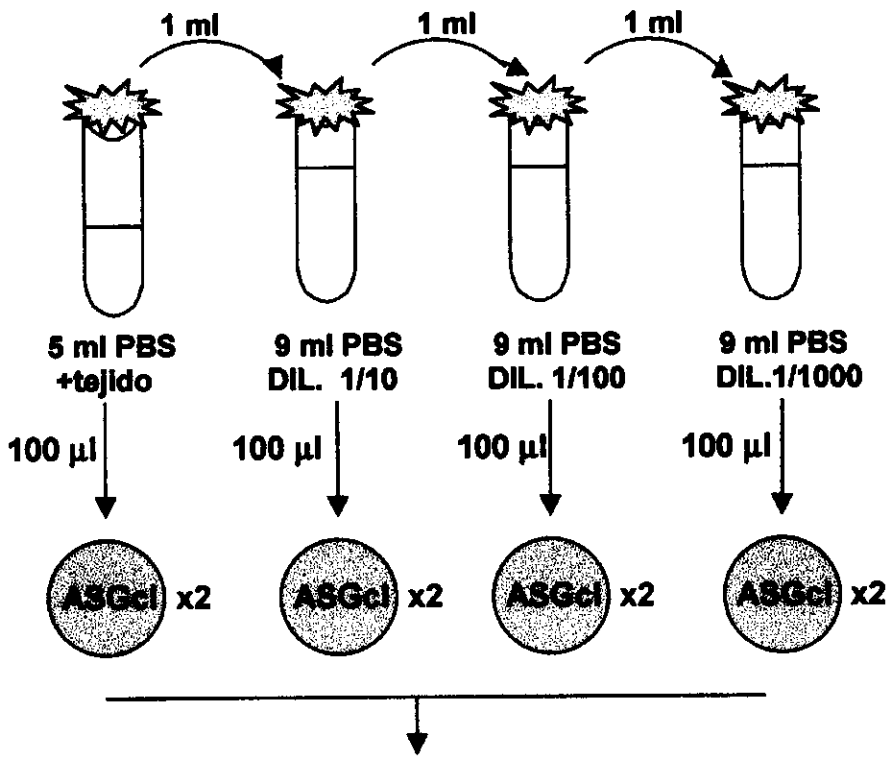
La cepa Ca 787 del **punto c)**, fue repicada en medio ASG a partir de la solución stock conservada a -20°C e incubada a 37°C durante 24hs. Se tomó una colonia, se inoculó en 10 ml de CSG y se incubó a 37°C, durante 24 hs, en agitación. Se tomaron 200 µl de este desarrollo, se sembraron en 30 ml del medio YNB + sacarosa 500 mM y se incubaron en las mismas condiciones anteriores. Se recogieron por centrifugación a 2500 rpm, se lavaron 2 veces con PBS (pH= 7,2), se pasaron varias veces a través de una jeringa con aguja de tuberculina, 25 g x 5/8 (0,5 x 16 mm), para romper los agregados de levaduras y se llevaron, con el mismo buffer, a una concentración final de 5 x 10^9 lev/ml, por recuento en cámara de Neubauer.

MD

Inoculación de los animales: para cada una de las levaduras especificadas en el **ítem II.3.2**, se utilizaron 5 lotes de 12 ratones cada uno, de 4-5 días de vida, con un peso de 3 a 4,5 g. Previo a la inoculación, fueron separados de su madre durante 3 a 4 horas y mantenidos a 37° C. Este período de ayuno favoreció el contacto de las levaduras con la mucosa del tracto gastrointestinal (TGI) de los ratones. A cada ratón se le suministró por vía oral, con tip estéril, 20 µl de la suspensión de las levaduras (1 x 10^8 levaduras) obtenidas de acuerdo **al punto II.3.2**. Luego de la inoculación, los animales fueron devueltos a sus respectivas madres. Uno de los animales de cada lote no fue inoculado con la suspensión de las levaduras (se le suministró 20 µl de PBS) y se utilizó como control negativo.

Determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) de levaduras en tejidos de ratón: a las 3 horas se sacrificó 1 de las crías y en condiciones de esterilidad, se procedió a la disección del animal. Se extrajeron en el siguiente orden: ambos riñones, bazo, hígado, estómago e intestino. Todos los órganos se colocaron en placas de Petri estériles y se pesaron en balanza digital (Sartorius Basic Digital). El estómago e intestino completos se lavaron con abundante PBS (con 3 cambios del buffer), para eliminar los restos de alimentos no digeridos y los microorganismos no adheridos. Luego, cada uno de los tejidos se homogeneizó en 5 ml de PBS (**Esquema N° 7**) y a partir de esta suspensión se realizaron 3 diluciones seriadas al décimo (1 ml de la suspensión en 9 ml de PBS). Se sembraron, para cada órgano, 100 µl de la 1° suspensión y 100 µl de cada una de las diluciones realizadas en placas de ASGcl, por duplicado, y se incubaron a 28°C.

ESQUEMA N° 7



INCUBAR 3-4 DÍAS A 28 °C

A los 3-4 días, en las placas donde se observó el desarrollo de levaduras se realizó el recuento de colonias y los resultados se expresaron como el promedio (de las diferentes diluciones) de UFC por gramo de tejido. Las colonias aisladas fueron sembradas en medio de AHM para corroborar, a través de la micromorfología, que se trataba de la misma especie inoculada.

Esta misma metodología se siguió con los ratones inoculados sólo con PBS, para descartar la presencia de levaduras de la flora indígena en el TGI del animal.

Los ratones restantes de cada lote, fueron sacrificados a distintos tiempos: 24 y 48 hs, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 semanas, posteriores a la inoculación, para todas

las cepas de ***C. albicans.*** Para las cepas de ***Candida spp*** a las 24 y 48 hs, 1, 2, 3 y 4 semanas. En todos los casos se llevó a cabo el mismo esquema para el aislamiento y recuento de las UFC de las levaduras (**Esquema Nº 7**).

II.3.3- ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

Para el estudio histopatológico de los tejidos de los ratones, los diferentes órganos (riñón, bazo, hígado, estómago e intestino) luego de la disección fueron rápidamente colocados en una solución de formaldehído al 10 % (Cicarelli). Los cortes fueron coloreados con Hematoxilina-Eosina y Gomori-Grocott.

Estos estudios se realizaron con las levaduras ***C. albicans*** **Ca 333, Ca 787** y ***Ca lusitaniae*** **Clu 670.**

Los cortes histológicos de riñón, bazo e hígado se realizaron a las 3, 24 y 48 horas.

Los cortes histológicos de estómago e intestino se realizaron a las 3, 24 y 48 horas, 1º y 2º semanas.

III- RESULTADOS

III.1- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS

III.1.1- DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE UFC E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS EN MATERIA FECAL

En un período de 20 meses se procesaron 138 muestras de materia fecal. Un 52,89 % (73 muestras) de las mismas fueron positivas: 45,65% para levaduras del género ***Candida*** (63 muestras) y 7,24% (10 muestras) para ***Geotrichum sp***. De las 63 muestras con ***Candida***, 33 (52,38 %) correspondieron a ***Candida albicans*** y 30 (47,62%) a cepas de ***Candida spp***. Del total de las 63 cepas se seleccionaron 12 cepas de ***C. albicans*** (52,1%) y 11 de ***Candida spp*** (47,9%) que presentaron los mayores desarrollos de UFC/ g de materia fecal. La identificación y el número de UFC/g de estas 23 cepas se muestran en la **Tabla Nº 1**. El mayor porcentaje de aislamientos correspondió a ***C. albicans*** (52,1%), seguida por ***C. glabrata*** (8,7%), ***C. krusei*** (8,7%), ***C. parapsilosis*** (8,7%) y ***C. tropicalis*** (8,7%). Otras especies fueron: ***C. colliculosa, C. kefyr y C. lusitaniae*** (4,36% c/u).

TABLA Nº 1: LEVADURAS AISLADAS DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL

Género y especie	Nº de aislamiento	Nº de UFC/g de materia fecal	
1-***Candida albicans*** (Robin) Berkhout (1923)	Ca 030	2.000	
2- ***C. albicans***	Ca 144	20.000	
3- ***C. albicans***	Ca 192	34.000	
4- ***C. albicans***	Ca 235	20.000	
5- ***C. albicans***	Ca 333	17.250	
6- ***C. albicans***	Ca 411	16.900	**52,1 %**
7- ***C. albicans***	Ca 454	30.000	
8- ***C. albicans***	Ca 485	17.350	
9- ***C. albicans***	Ca 614	17.000	
10- ***C. albicans***	Ca 745	13.000	
11- ***C. albicans***	Ca 787	18.100	
12- ***C. albicans***	Ca 966	17.300	
13- ***C. glabrata*** (Anderson) Meyer and Yarrow (1978)	Cg 548	4.400	**8,7 %**
14- ***C. glabrata***	Cg 751	25.000	
15- ***C. krusei*** (Castellani) Berkhout (1923)	Ck 204	20.000	**8,7 %**
16- ***C. krusei***	Ck 615	10.000	
17- ***C. parapsilosis*** (Ashford) Langeron & Talice (1959)	Cp 345	7.600	**8,7 %**
18- ***C. parapsilosis***	Cp 984	20.000	
19- ***C. tropicalis*** (Castellani) Berkhout (1923)	Ct 295	2.760	**8,7 %**
20- ***C. tropicalis***	Ct 508	20.000	
21- ***C. colliculosa*** (Hartmann) Meyer et Yarrow (1903)	Cc 121	20.000	
22- ***C. kefyr*** (Beijerinck) Van Uden et Buckley (1970)	Cke 946	1.600	**13,1 %** **(4,36% c/u)**
23- ***C. lusitaniae*** van Uden et do Carmo-Sousa (1959)	Cl 670	12.500	

III.2- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS, *IN VITRO*

III.2.1- ADHERENCIA DE LAS DIFERENTES CEPAS DE *Candida*

Los valores de adherencia a CEB de las diferentes levaduras figuran en la **Tabla Nº 2 y 3** donde se consignan el número de levaduras adheridas a 100 células epiteliales. Se realizaron cinco repeticiones del ensayo en las mismas condiciones, en diferentes días.

TABLA Nº 2: NÚMERO DE LEVADURAS ADHERIDAS A CEB PARA DIFERENTES CEPAS DE ***C. albicans***

N° DE LEVADURAS ADHERIDAS / 100 CEB													
LEV.	**Ca CECT 1394**	**Ca 030**	**Ca 144**	**Ca 192**	**Ca 235**	**Ca 333**	**Ca 411**	**Ca 454**	**Ca 485**	**Ca 614**	**Ca 745**	**Ca 787**	**Ca 966**
1	271	515	544	233	347	438	302	148	283	255	298	637	467
2	373	200	496	240	173	391	253	420	428	431	565	120	405
3	284	372	299	551	412	562	381	360	322	381	510	264	275
4	193	190	442	195	353	622	155	158	263	369	417	218	275
5	333	219	532	238	281	541	502	376	212	250	648	484	320
X	**290.8**	**299.2**	**462,6**	**291,4**	**313.2**	**510,8**	**318,6**	**292,4**	**301.6**	**337.2**	**487,6**	**344,6**	**348.4**

Referencias: Ca: *Candida albicans;* **1, 2, 3, 4, 5**: Ensayos de adherencia realizados en diferentes días. **X**: valores promedio.

TABLA Nº 3: NÚMERO DE LEVADURAS ADHERIDAS A CEB CON OTRAS ESPECIES DE ***Candida***.

N° DE LEVADURAS ADHERIDAS / 100 CEB											
LEV.	**Cc 121**	**Cg 548**	**Cg 751**	**Cke 946**	**Ck 204**	**Ck 615**	**Cl 670**	**Cp 345**	**Cp 984**	**Ct 295**	**Ct 508**
1	64	44	103	200	83	53	60	202	160	170	179
2	69	35	69	59	39	39	70	314	155	220	239
3	166	40	209	34	41	43	74	233	239	442	221
4	100	57	58	74	68	26	85	189	215	171	329
5	93	64	150	101	43	38	87	440	342	209	329
X	**98,4**	**48,0**	**117,8**	**93.6**	**54.8**	**39.8**	**75.2**	**275.6**	**222,2**	**242,4**	**259,4**

Referencias: Cc: *C. colliculosa;* **Cg:** *C. glabrata*; **Cke**: *C. kefyr*; **Ck**: C. krusei; **Cl**: *C. lusitaniae*; **Cp**: *C. parapsilosis*, **Ct:** *C. tropicalis*.

1, 2, 3, 4, 5: : Ensayos de adherencia realizados en diferentes días. **X**: valores promedio.

En la **Tabla Nº 4** se expresan los valores promedio de levaduras adheridas/100 CEB y los correspondientes desvíos standard.

TABLA Nº 4: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS A CEB, PARA DIFERENTES ESPECIES DE ***Candida***.

Nº de aislamiento	Género y especie	Nº levaduras adheridas/100 CEB (DS)
1- Ca 333	***C. albicans***	510,80 (42,16) * **a**
2- Ca 745	***C. albicans***	487,60 (60,47) * **a**
3- Ca 144	***C. albicans***	462,60 (44,58) * **a**
4- Ca 966	***C. albicans***	348,40 (37,98) a b
5- Ca 787	***C. albicans***	344,60 (94,31) a b
6- Ca 614	***C. albicans***	337,20 (36,11) a b
7- Ca 411	***C. albicans***	318,60 (58,68) a b
8- Ca 235	***C. albicans***	313,20 (40,73) a b
9- Ca 485	***C. albicans***	301,60 (36,23) a b
10- Ca 030	***C. albicans***	299,20 (63,27) a b
11- Ca 454	***C. albicans***	292,40 (57,77) a b
12- Ca 192	***C. albicans***	291,40 (65,42) a b
13- Cp 345	***C. parapsilosis***	275,60 (46,49) a b
14- Ct 508	***C. tropicalis***	259,40 (33,58) a b
15- Ct 295	***C. tropicalis***	242,40 (50,89) a b
16- Cp 984	***C. parapsilosis***	222,20 (33,96) a b
17- Cg 751	***C. glabrata***	117,80 (27,87) a b
18- Cc 121	***C. colliculosa***	98,40 (18,23) a b
19- Cke 946	***C. kefyr***	93,60 (28,73) a b
20- Cl 670	***C. lusitaniae***	75,20 (4,97) * **b**
21- Ck 204	***C. krusei***	54,80 (8,80) * **b**
22- Cg 548	***C. glabrata***	48,00 (5,41) * **b**
23- Ck 615	***C. krusei***	39,80 (4,35) * **b**
24- Ca CECT 1394	***C. albicans***	290,80 (30,44) a b

Referencias: DS: desvío standard; *: diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los valores de adherencia de las cepas de ***Candida*; a y b**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparación de Rangos Múltiples, luego de aplicar el test de Friedman, a un nivel de significación del 5%.

Como resultado de la aplicación del test de Friedman, se encontró que existe una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) entre la adherencia de las diferentes especies de ***Candida***. La aplicación de la Técnica de Rangos Múltiples permitió detectar que la adherencia de las cepas ***C. albicans*** **Ca 144**, **Ca 333** y **Ca 745** a CEB fue significativamente mayor que la adherencia de las cepas ***C. glabrata*** **Cg 548**; ***C. krusei*** **Ck 204** y **Ck 615**; y ***C. lusitaniae*** **Clu 670. (Gráfico N°1)**

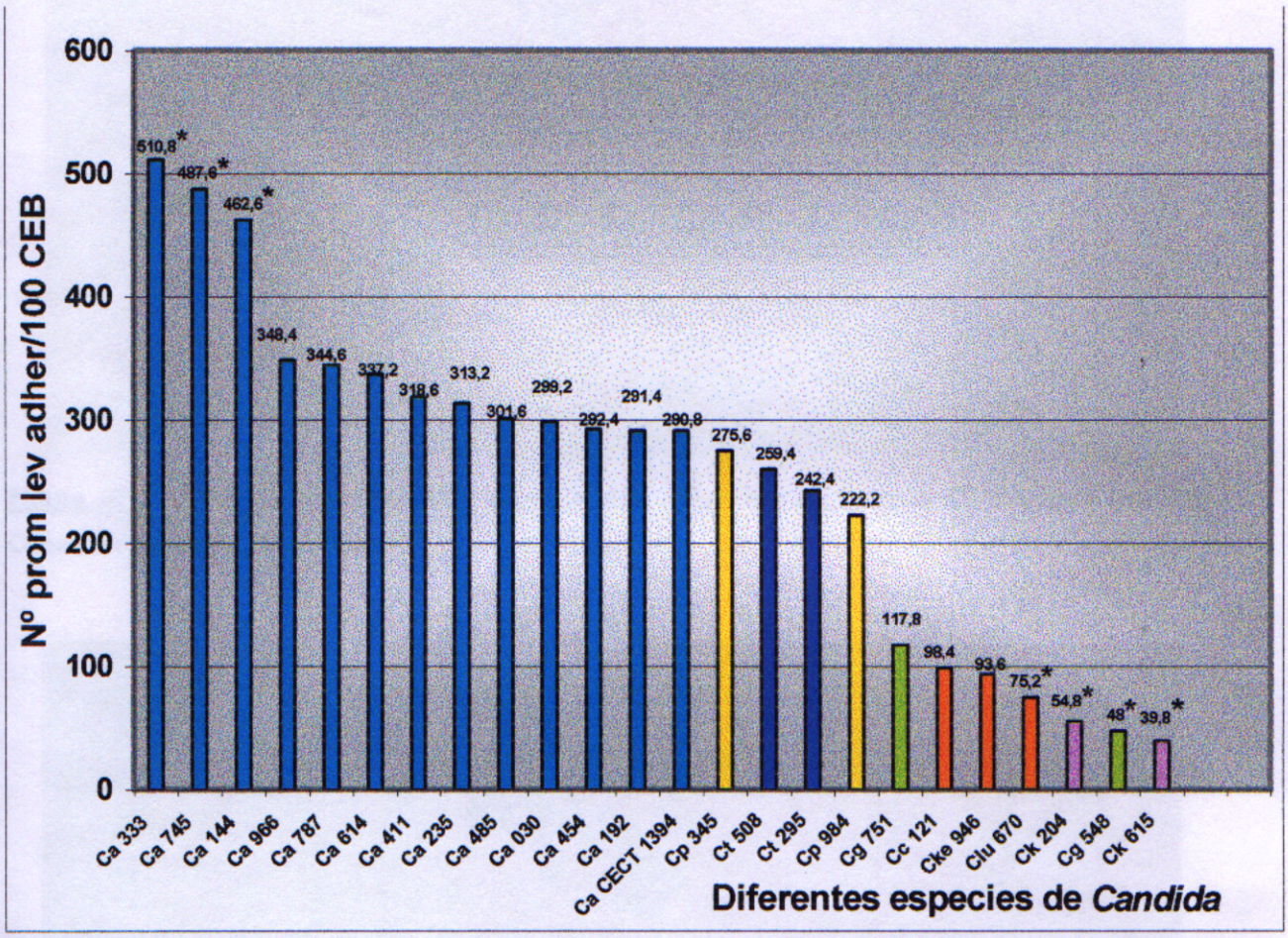
No se encontraron diferencias significativas entre los valores de adherencia de las diferentes cepas de ***C. albicans*** estudiadas. Estos valores variaron entre 510,8 para la cepa **Ca 333 (Tabla N° 4, Figura N° 1 y 2)**, que es la levadura que más adhiere; 344,60, para la cepa de **Ca 787** con una capacidad de adherencia intermedia **(Tabla N° 4, Figura N° 3)** y 290,8 que fue el menor valor hallado con la cepa de colección **Ca CECT 1394 (Tabla N° 4)**.

Las especies de ***Candida no albicans***, como ***C. parapsilosis*** **(Cp 345** y **Cp 984)** y ***C. tropicalis*** **(Ct 295** y **Ct 508)** mostraron capacidad de adherencia semejante y aunque resultó ser menor que la observada para todas las cepas de ***C. albicans,*** esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

El resto de las ***Candida spp*** mostraron valores muy bajos de adherencia. Para ***C. glabrata*** **Cg 751 (Tabla N° 4, Figura N° 4)** fue de 117,8 mientras que para ***C. krusei*** **Ck 615 (Tabla N° 4, Figura N°5)** se encontró el menor valor de adherencia: 39,8.

C. krusei **Ck 615** demostró ser casi 13 veces menos adherente que la cepa de ***C. albicans*** **Ca 333**.

GRÁFICO Nº 1: VALORES DE ADHERENCIA DE DIFERENTES LEVADURAS DEL GÉNERO ***Candida*** A CEB



Referencias:

- Cepas de ***Candida albicans***
- Cepas de ***C. parapsilosis***
- Cepas de ***C. tropicalis***
- Cepas de ***C. glabrata***
- Cepas de ***C. krusei***
- Otras especies de ***Candida***

* : diferencias estadísticamente significativas (p<0,001).

MB

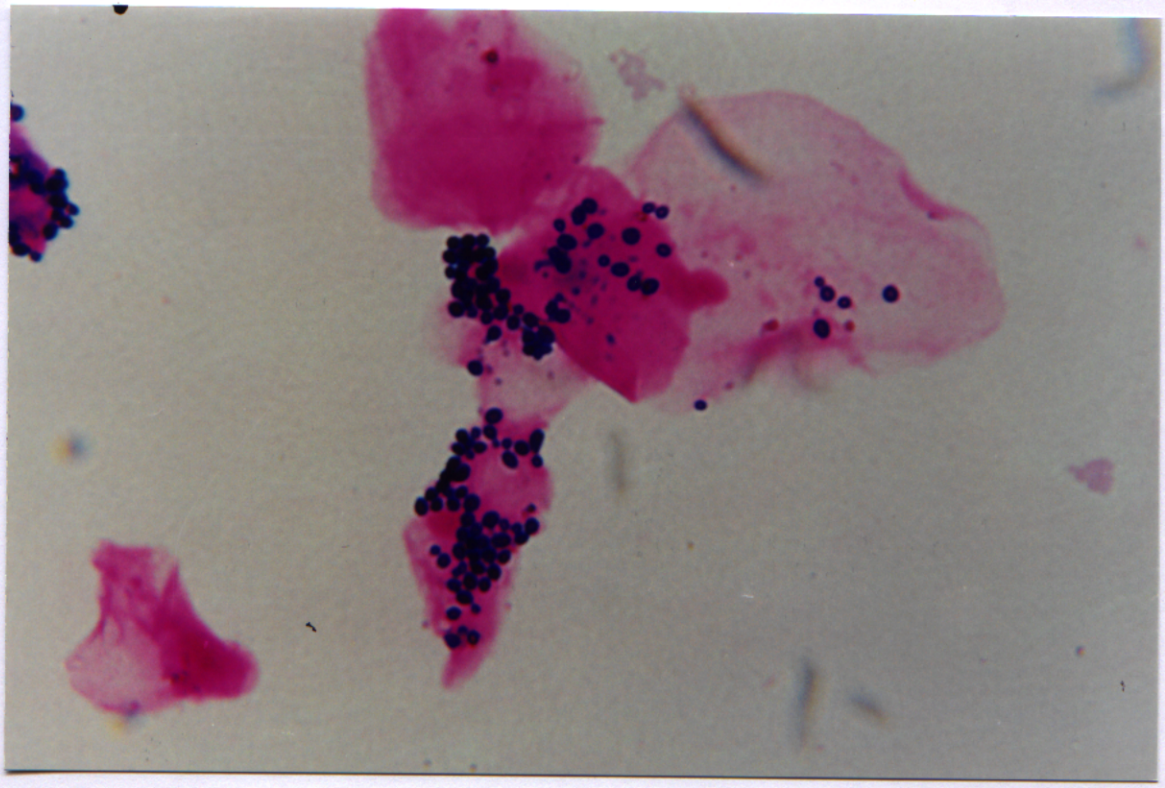


Figura Nº 1: CEB con gran cantidad de levaduras adheridas de la cepa ***C. albicans*** **Ca 333**. Coloración Gram-Nicolle, 400X.

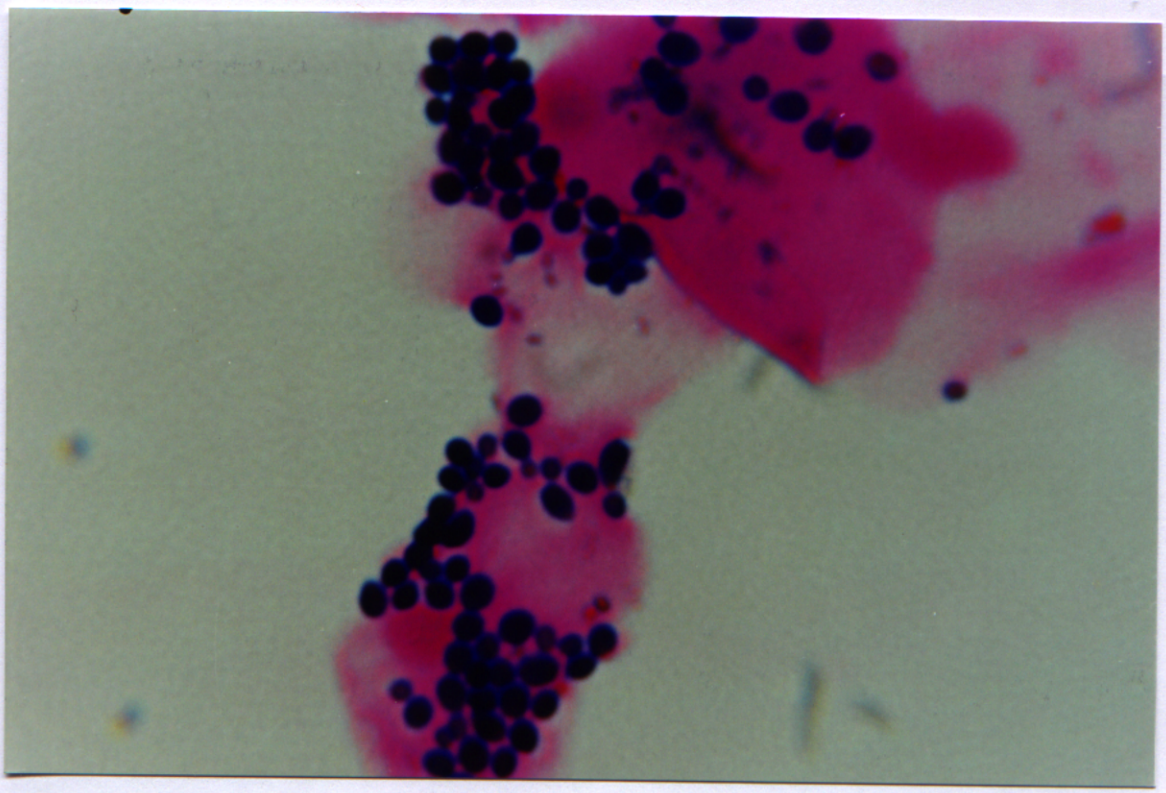


Figura Nº 2: CEB con gran cantidad de levaduras adheridas de la cepa ***C. albicans*** **Ca 333**. Coloración Gram-Nicolle, 1000X.

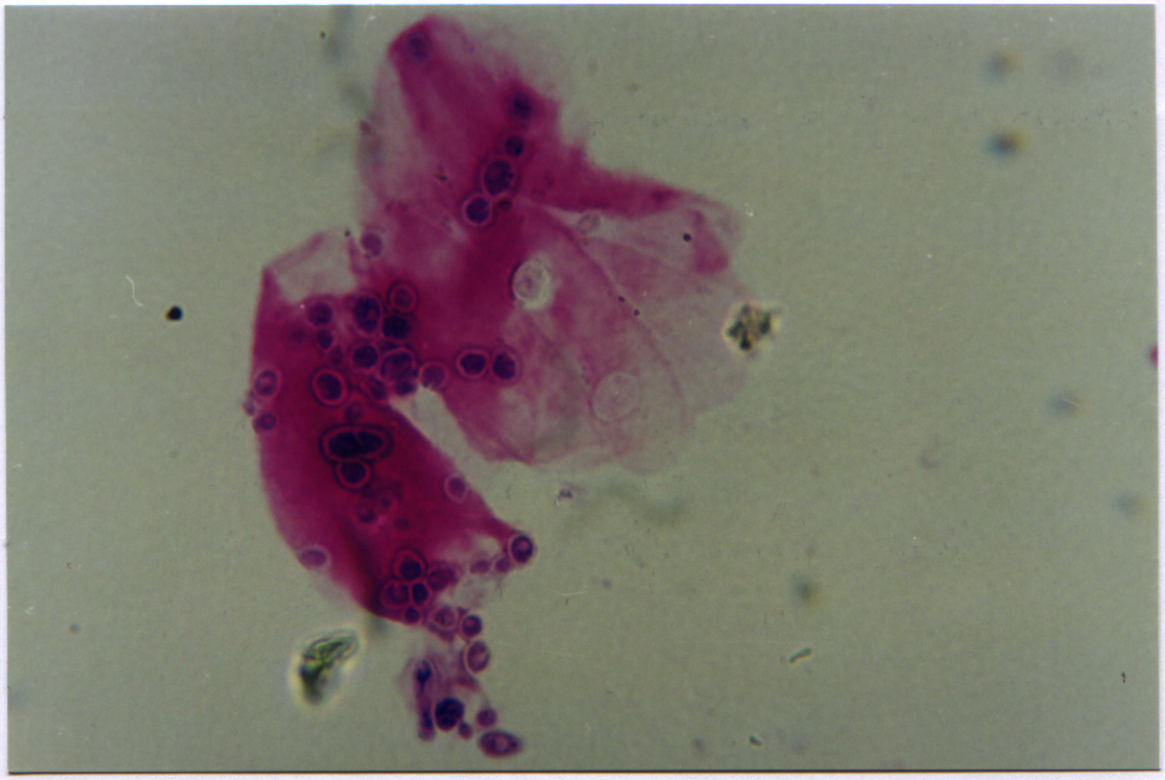


Figura Nº 3: CEB con regular cantidad de levaduras adheridas de la cepa ***C. albicans*** **Ca 787**. Coloración Gram-Nicolle, 1000X.

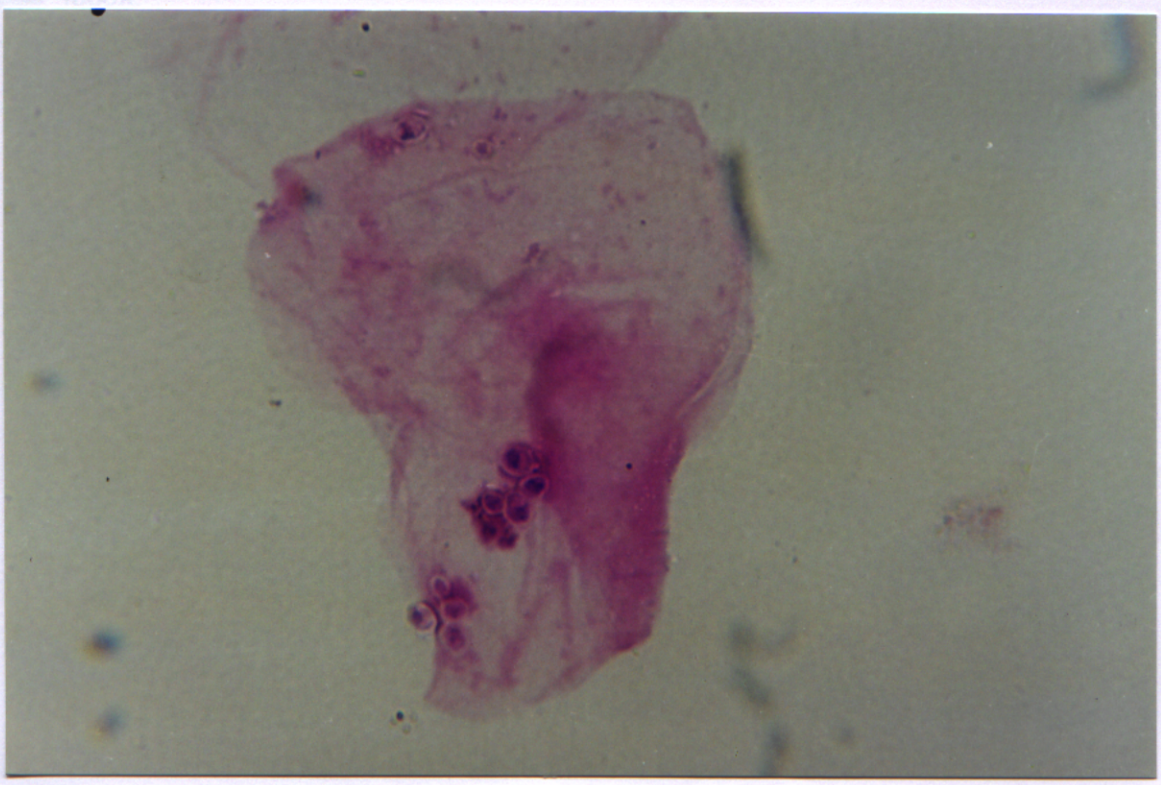


Figura Nº 4: CEB con escasa cantidad de levaduras adheridas de la cepa ***C. glabrata*** **Cg 751**. Coloración Gram-Nicolle, 1000X.

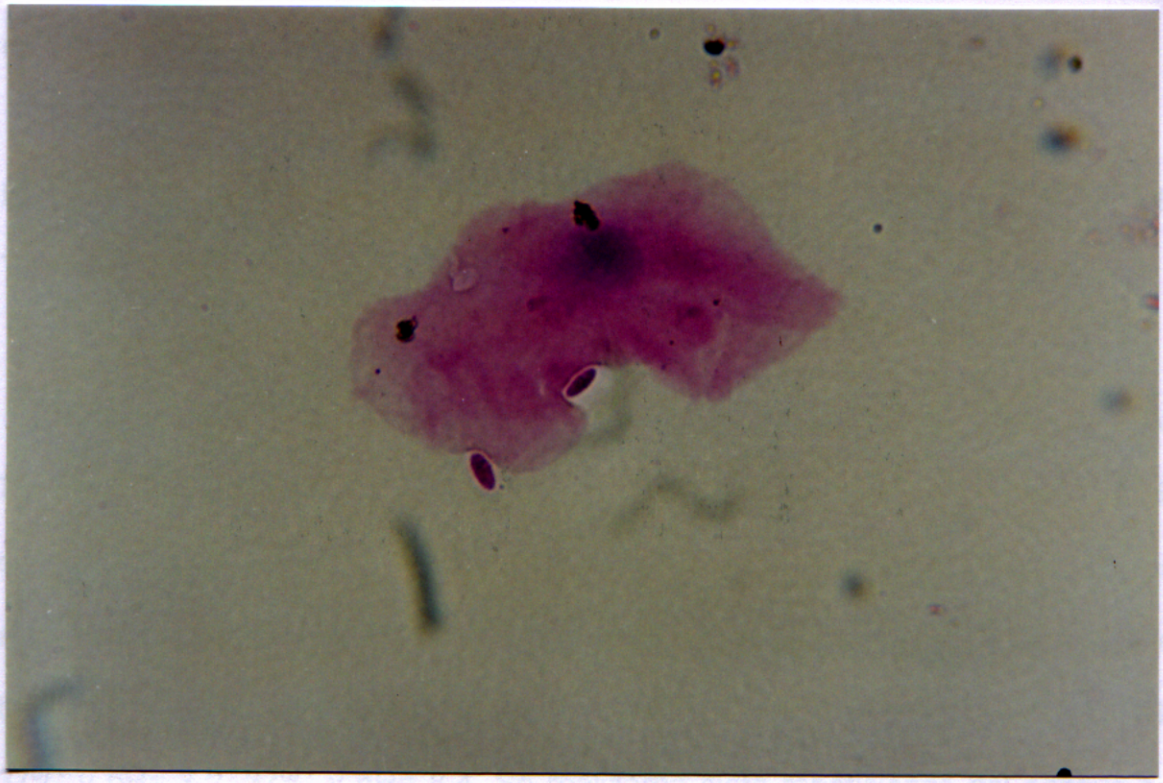


Figura Nº 5: CEB con aisladas levaduras adheridas de la cepa ***C. krusei* Ck 615**. Coloración Gram-Nicolle, 1000X.

TABLA Nº 5: ADHERENCIA DE LEVADURAS A DIFERENTES VALORES DE TEMPERATURA Y pH.

N° de levaduras adheridas/ 100 CEB			
pH / T°	6	7.2	8.4
28°C	91	183	170
	76	37	179
	92	120	149
	198	205	52
	143	73	34
	141	114	32
	110	48	124
X	**121,5**	**111,4**	**105,7**
37°C	74	133	201
	74	146	20
	91	144	165
	143	112	144
	103	122	166
	113	150	55
	55	96	84
X	**93,2**	**129,0**	**119,2**

Referencias: CEB: células epiteliales bucales; **X** = Valores promedio de 7 determinaciones realizadas en diferentes días.

TABLA Nº 6: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS A DIFERENTES VALORES DE T° Y pH.

Condiciones de T° y pH del ensayo de adherencia	Nº promedio de lev. Adh./100 CEB ± DS
28 °C y pH=6,0	121,5 ± 15 *
28 °C y pH=7,2	111,4 ± 24 *
28 °C y pH=8,4	105,7 ± 24 *
37 °C y pH=6,0	93,2 ± 11 *
37 °C y pH=7,2	129,0 ± 7 *
37 °C y pH=8,4	119,2 ± 25 *

Referencias: **CEB**: células epiteliales bucales; *: No se detectaron diferencias significativas entre los valores de levaduras adheridas a diferentes T° y pH.

TABLA Nº 5: ADHERENCIA DE LEVADURAS A DIFERENTES VALORES DE TEMPERATURA Y pH.

	N° de levaduras adheridas/ 100 CEB		
pH / T°	6	7.2	8.4
28°C	91	183	170
	76	37	179
	92	120	149
	198	205	52
	143	73	34
	141	114	32
	110	48	124
X	**121,5**	**111,4**	**105,7**
37°C	74	133	201
	74	146	20
	91	144	165
	143	112	144
	103	122	166
	113	150	55
	55	96	84
X	**93,2**	**129,0**	**119,2**

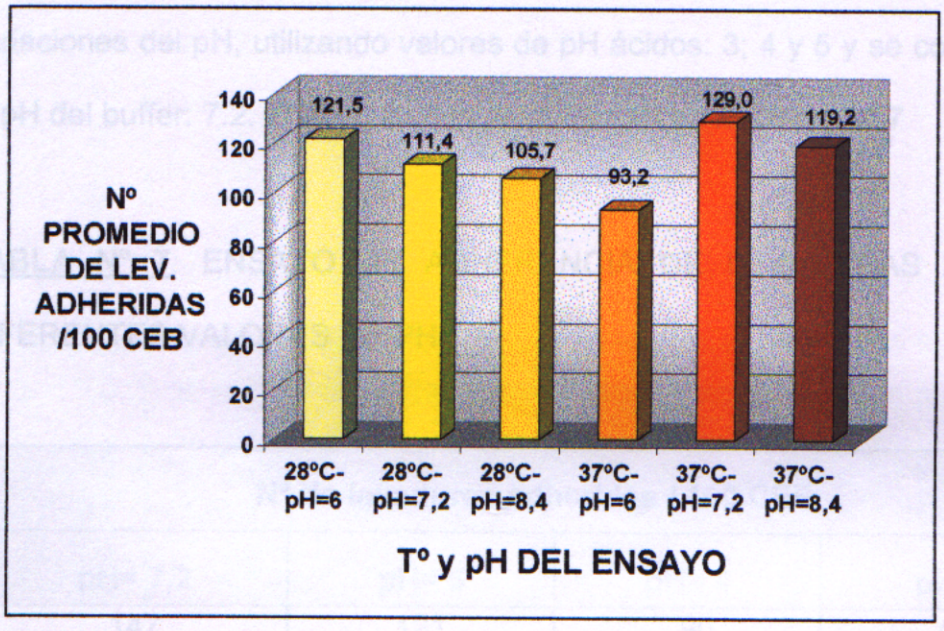
Referencias: CEB: células epiteliales bucales; **X** = Valores promedio de 7 determinaciones realizadas en diferentes días.

TABLA Nº 6: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS A DIFERENTES VALORES DE T° Y pH.

Condiciones de T° y pH del ensayo de adherencia	Nº promedio de lev. Adh./100 CEB ± DS
28 °C y pH=6,0	121,5 ± 15 *
28 °C y pH=7,2	111,4 ± 24 *
28 °C y pH=8,4	105,7 ± 24 *
37 °C y pH=6,0	93,2 ± 11 *
37 °C y pH=7,2	129,0 ± 7 *
37 °C y pH=8,4	119,2 ± 25 *

Referencias: **CEB**: células epiteliales bucales; *: No se detectaron diferencias significativas entre los valores de levaduras adheridas a diferentes T° y pH.

GRÁFICO Nº2: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS A CEB A DIFERENTES VALORES DE Tº Y pH.



Como resultado del ANOVA, no se encontraron variaciones significativas en la capacidad de adherencia de ***C. albicans*** a CEB a los valores estudiados de pH, así como tampoco se detectaron diferencias significativas en los valores de adherencia de ***C. albicans*** a 28 y 37°C.

No se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días. No se detectaron interacciones significativas.

No obstante, a pH:7,2 y 37°C hubo un ligero incremento de la adherencia con respecto a la observada a la misma temperatura con los otros valores de pH (6 y 8.4).

III.2.2.2- ADHERENCIA DE LEVADURAS A DIFERENTES VALORES DE pH

De acuerdo a estos resultados, en un 2° ensayo de adherencia se fijó la T° en 37°C (T° que tiene importancia desde el punto de vista clínico) y se realizaron variaciones del pH, utilizando valores de pH ácidos: 3; 4 y 5 y se compararon con el pH del buffer: 7.2. Los resultados se muestran en la **Tabla N° 7**

TABLA N° 7: ENSAYO DE ADHERENCIA DE LEVADURAS A 37°C Y A DIFERENTES VALORES DE PH.

N° de levaduras adheridas / 100 CEB			
pH= 7,2	**pH= 5**	**pH= 4**	**pH=3**
147	121	90	45
156	86	105	62
212	152	101	46
63	13	21	13
107	14	15	5
89	46	38	41
170	122	136	28
41	23	2	8
X=123,1	**X=72,1**	**X= 63,5**	**X=31,0**

Referencias: X: valores promedio de 8 determinaciones realizadas en diferentes días.

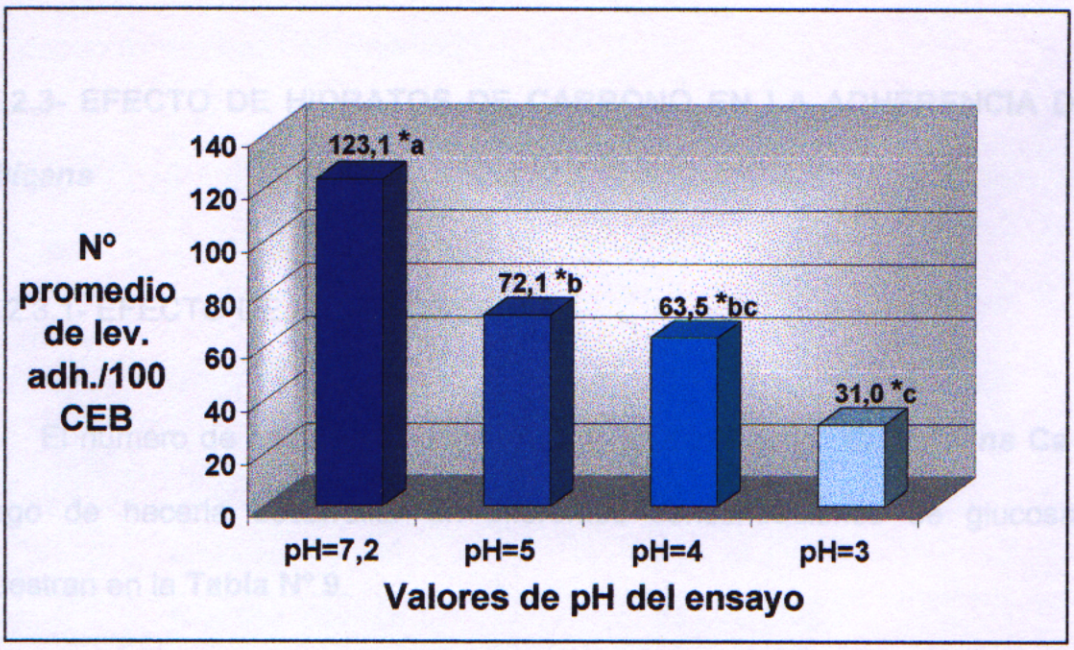
Los valores promedio obtenidos muestran una disminución de la adherencia de ***C. albicans*** a medida que disminuye el pH **(Tabla N° 8)**.

TABLA Nº 8: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS A DIFERENTES VALORES DE pH.

Valores de pH del ensayo de adherencia	Nº promedio de lev. Adh./100 CEB ± DS	
pH=7,2	123,1 ± 20	* a
pH=5,0	72,1 ± 19	* b
pH=4,0	63,5 ± 17	* b c
pH=3,0	31,0 ± 7	* c

Referencias: *: diferencias significativas entre los valores de adherencia a diferentes pH ($p < 0,001$). **a, b, c**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones Múltiples de Tukey (a un nivel de significación del 5%).

GRÁFICO Nº 3: EFECTO DEL pH EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans***.



Referencias: *: diferencias significativas entre los valores de adherencia a diferentes pH ($p< 0,001$). **a, b, c**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones Múltiples de Tukey (a un nivel de significación del 5%).

Como resultado del ANOVA, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de adherencia de ***C. albicans*** a los diferentes valores de pH estudiados ($p<0.0001$). También se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días ($p<0.0001$).

Para detectar los valores de pH en los que hubo diferencias, se utilizó la técnica de comparaciones múltiples de Tukey, la que nos permitió determinar que a pH=7.2 se encontraron valores significativamente mayores del número de levaduras adheridas que a pH: 3; 4 y 5. Entre pH=4 y pH=5, no se hallaron diferencias mientras que a pH=3, el número de levaduras adheridas fue significativamente menor que para estos valores de pH **(Gráfico Nº 3).**

III.2.3- EFECTO DE HIDRATOS DE CARBONO EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

III.2.3.1- EFECTO DE LA GLUCOSA

El número de levaduras adheridas a CEB de la cepa ***C. albicans* Ca 787,** luego de hacerla desarrollar en diferentes concentraciones de glucosa, se muestran en la **Tabla Nº 9.**

TABLA Nº 9: EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans***.

Nº de Levaduras Adheridas / 100 CEB				
Medio de Cultivo	**Testigo (CSG)**	**YNB + glucosa 50 mM**	**YNB + glucosa 200mM**	**YNB + glucosa 500 mM**
1	536	807	841	737
2	445	673	646	725
3	701	647	531	488
4	345	326	350	468
X	**506,75**	**613,25**	**592,0**	**604,5**

Referencias: CEB: células epiteliales bucales; **CSG**: caldo Sabouraud glucosa; **YNB**: medio Yeast Nitrogen Base; **1, 2, 3, 4**: repeticiones de los ensayos de adherencia en diferentes días; **x:** valores promedio.

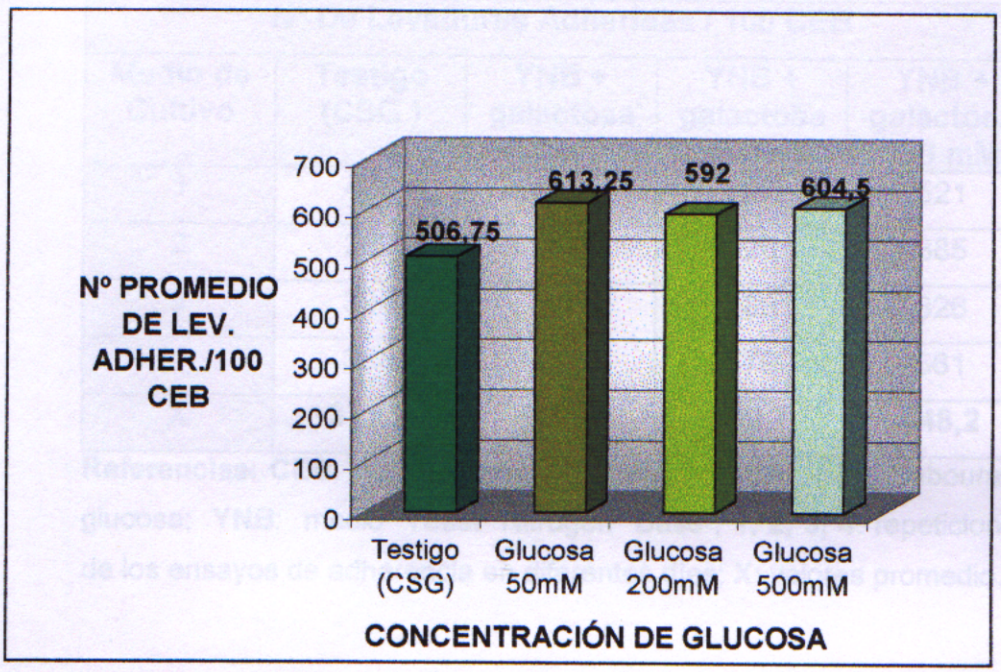
En la **Tabla Nº 10** se muestran los valores promedio con los correspondientes desvíos standard.

TABLA Nº 10: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA.

Composición del medio de cultivo	Nº promedio de lev. Adher./100 CEB ± DS
Testigo (CSG)	**506,75 ± 65,5 ***
Glucosa 50 mM	**613,25 ± 88,3 ***
Glucosa 200mM	**592,00 ± 89,2 ***
Glucosa 500mM	**604,50± 63,4 ***

Referencias: * No se detectaron diferencias significativas entre los valores de adherencia para las distintas concentraciones de glucosa del medio de cultivo y el testigo.

GRÁFICO Nº 5: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS A CEB PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA.



Como resultado del ANOVA, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de adherencia de ***C. albicans*** crecida en diferentes concentraciones de glucosa. Sin embargo, los valores promedio de adherencia para las tres concentraciones de glucosa son ligeramente mayores que para el testigo. **(Gráfico Nº 5)**

Se detectaron diferencias levemente significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días ($p<0.1$).

III.2.3.2- EFECTO DE LA GALACTOSA

El Nº de levaduras adheridas a CEB de la cepa ***C. albicans*** **Ca 787,** luego de hacerla desarrollar en diferentes concentraciones de galactosa, se muestran en la **Tabla Nº 11.**

TABLA Nº 11: EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GALACTOSA EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans.***

N° De Levaduras Adheridas / 100 CEB				
Medio de Cultivo	**Testigo (CSG)**	**YNB + galactosa 50 mM**	**YNB + galactosa 200mM**	**YNB + galactosa 500 mM**
1	434	618	727	521
2	280	407	428	385
3	390	596	689	326
4	385	663	679	561
X	**372,2**	**571,0**	**630,7**	**448,2**

Referencias: **CEB**: células epiteliales bucales; **CSG**: caldo Sabouraud glucosa; **YNB**: medio Yeast Nitrogen Base ; **1, 2, 3, 4**: repeticiones de los ensayos de adherencia en diferentes días; **X**: valores promedio.

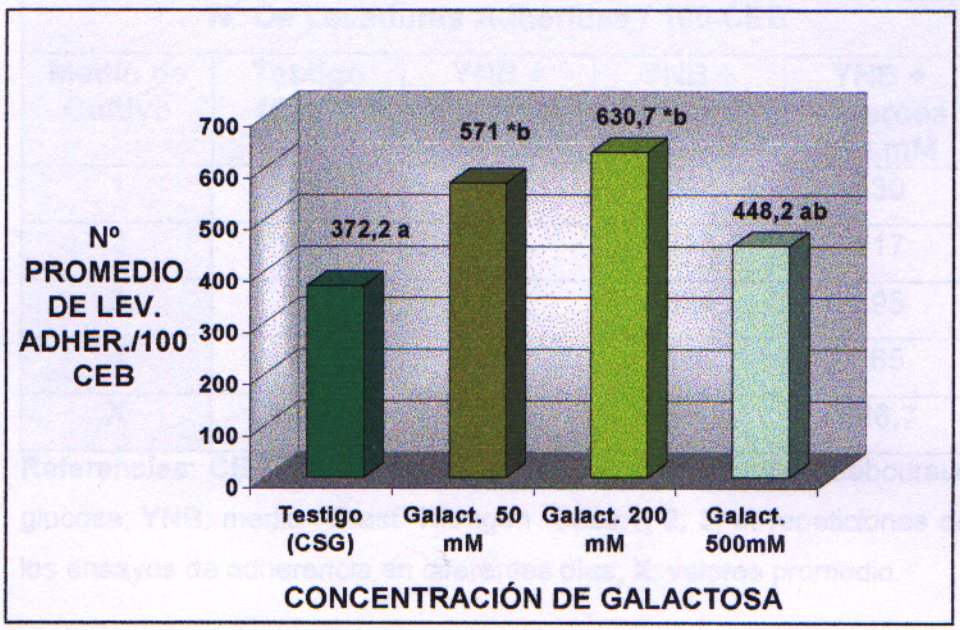
En la **Tabla Nº 12** se muestran los valores promedio con los correspondientes desvíos standard.

TABLA Nº 12: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GALACTOSA.

Composición del medio de cultivo	Nº promedio de lev. Adher./100 CEB ± DS
Testigo (CSG)	372,2 ± 33 * **a**
Galactosa 50 mM	571,0 ± 56 * **b**
Galactosa 200mM	630,7 ± 68 * **b**
Galactosa 500mM	448,2 ± 55 **ab**

Referencias: *: se detectaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los valores de adherencia del testigo y para las concentraciones de galactosa 50 y 200 mM; **a y b**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de Tukey (nivel de significación: 5%).

GRÁFICO Nº 6: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS A CEB PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GALACTOSA.



Como resultado del ANOVA, se observó que la adherencia de ***C. albicans* Ca 787** crecida en concentraciones de galactosa 50 y 200 mM fue significativamente mayor que la adherencia de la misma cepa crecida en CSG (testigo) ($p < 0,01$). Para la levadura crecida en galactosa 500 mM la adherencia resultó mayor que para el testigo aunque esta diferencia no fue significativa. **(Gráfico Nº 6)**

También se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días ($p < 0.01$).

III.2.3.3- EFECTO DE LA SACAROSA

El Nº de levaduras adheridas a CEB de la cepa ***C. albicans* Ca 787,** luego de hacerla desarrollar en diferentes concentraciones de sacarosa, se muestran en la **Tabla Nº 13**.

TABLA Nº 13: EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans.***

N° De Levaduras Adheridas / 100 CEB				
Medio de Cultivo	**Testigo (CSG)**	**YNB + sacarosa 50 mM**	**YNB + sacarosa 200mM**	**YNB + sacarosa 500 mM**
1	168	717	797	830
2	309	763	613	717
3	148	662	634	595
4	179	242	316	365
X	**201,0**	**596,0**	**590,0**	**626,7**

Referencias: **CEB**: células epiteliales bucales; **CSG**: caldo Sabouraud glucosa; **YNB**: medio Yeast Nitrogen Base.**1, 2, 3, 4**: repeticiones de los ensayos de adherencia en diferentes días; **X**: valores promedio.

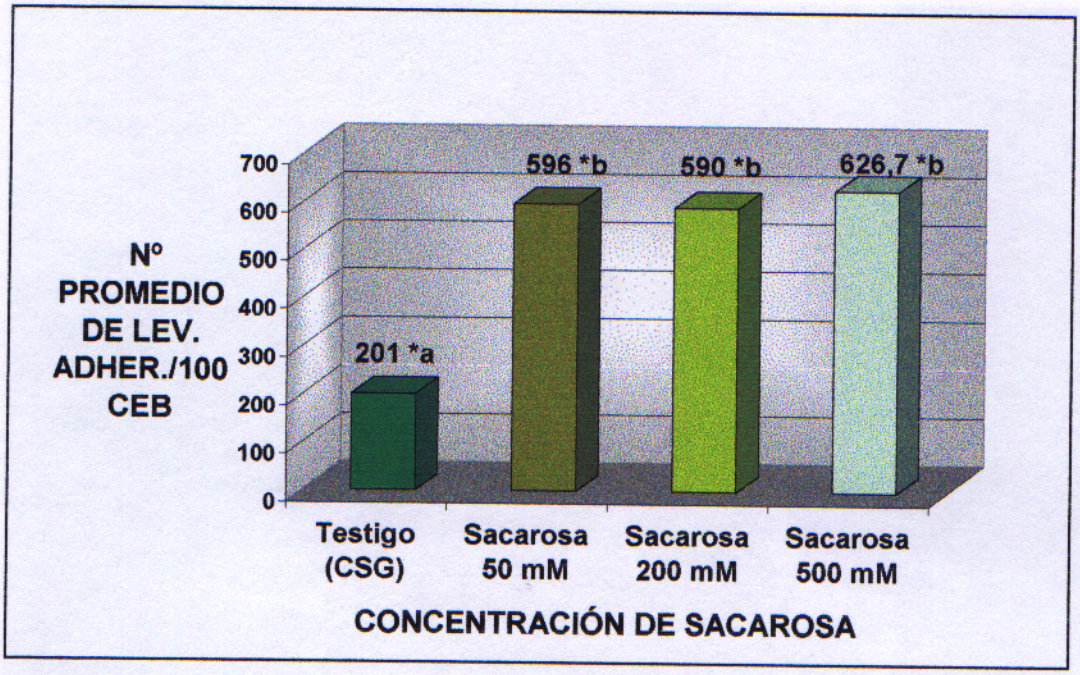
En la **tabla Nº 14** se muestran los valores promedio con los correspondientes desvíos standard.

TABLA Nº 14: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA.

Composición del medio de cultivo	Nº promedio de lev. Adher./100 CEB ± SD
Testigo (CSG)	201,0 ± 36 * **a**
Sacarosa 50 mM	596,0 ± 119 * **b**
Sacarosa 200mM	590,0 ± 100 * **b**
Sacarosa 500mM	626,7 ± 99 * **b**

Referencias: *: se detectaron diferencias significativas ($p<0,01$) entre los valores de adherencia para las 3 concentraciones de sacarosa y el testigo; **a** y **b**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de Tukey (nivel significación: 5%).

GRÁFICO Nº 7: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS A CEB PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA.



Como resultado del ANOVA, se observó que la adherencia de ***C. albicans* Ca 787** crecida en concentraciones de sacarosa 50, 200 y 500 mM fue significativamente mayor que la adherencia de la misma cepa crecida en CSG (testigo) ($p < 0,01$). **(Gráfico Nº 7)**

También se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días ($p < 0.01$).

Se pudo observar en el extendido teñido con Gram-Nicolle, que las levaduras de la cepa ***C. albicans* Ca 787,** luego de desarrollar en el medio YNB + sacarosa 500 mM, presentaron un tamaño mayor que las levaduras de la misma cepa crecidas en CSG **(Figura Nº 6)**

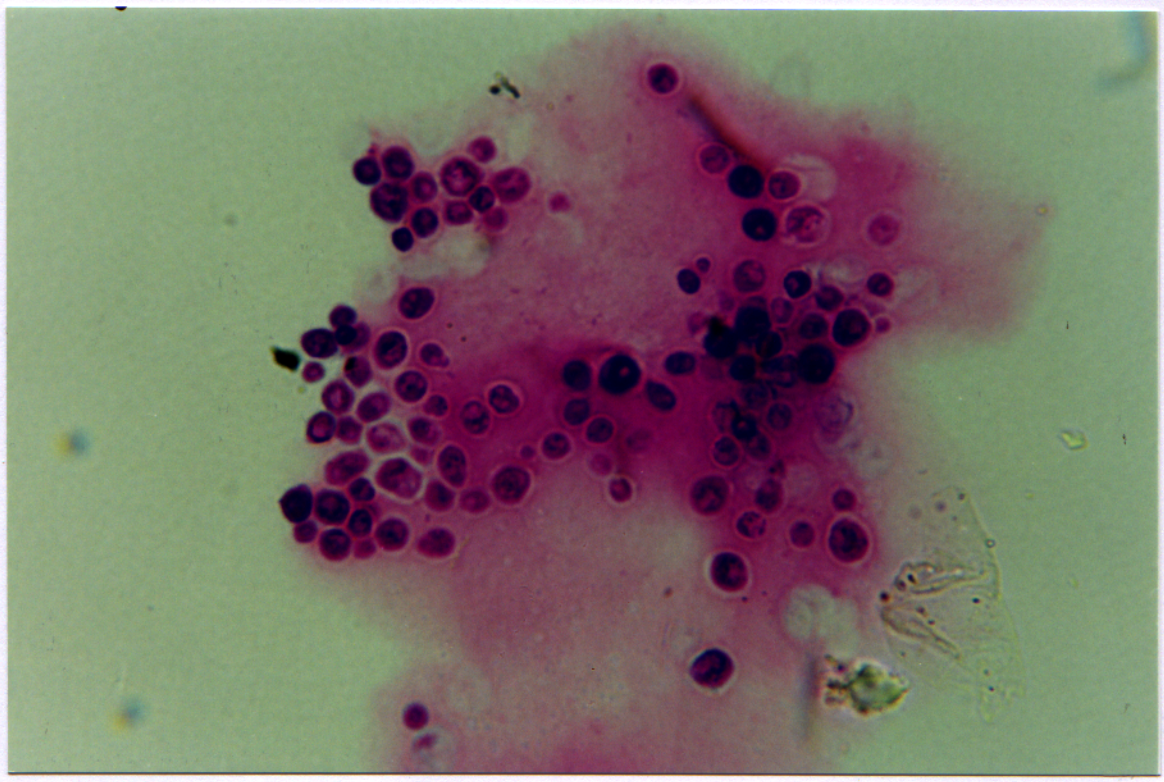


Figura Nº 6: CEB con abundantes levaduras adheridas de la cepa ***C. albicans*** **Ca 787, crecidas enYNB+sacarosa 500 mM**. Se puede observar un aumento en el tamaño de las levaduras. Coloración de Gram-Nicolle, 1000X.

III.2.3.4- EFECTO DE LA MANOSA

El Nº de levaduras adheridas a CEB de la cepa ***C. albicans*** **Ca 787,** luego de hacerla desarrollar en diferentes concentraciones de manosa se muestran en la **Tabla Nº 15**.

TABLA Nº 15: EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MANOSA EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans***.

N° De Levaduras Adheridas / 100 CEB				
Medio de Cultivo	**Testigo (CSG)**	**YNB + manosa 50 mM**	**YNB + manosa 200mM**	**YNB + manosa 500 mM**
1	125	293	308	566
2	221	317	230	369
3	175	341	202	264
4	143	205	216	218
X	**166,0**	**289,0**	**239,0**	**354,2**

Referencias: **CEB**: células epiteliales bucales; **CSG**: caldo Sabouraud glucosa; **YNB**: medio Yeast Nitrogen Base; **1, 2, 3, 4**: repeticiones de los ensayos de adherencia en diferentes días; **X**: valores promedio.

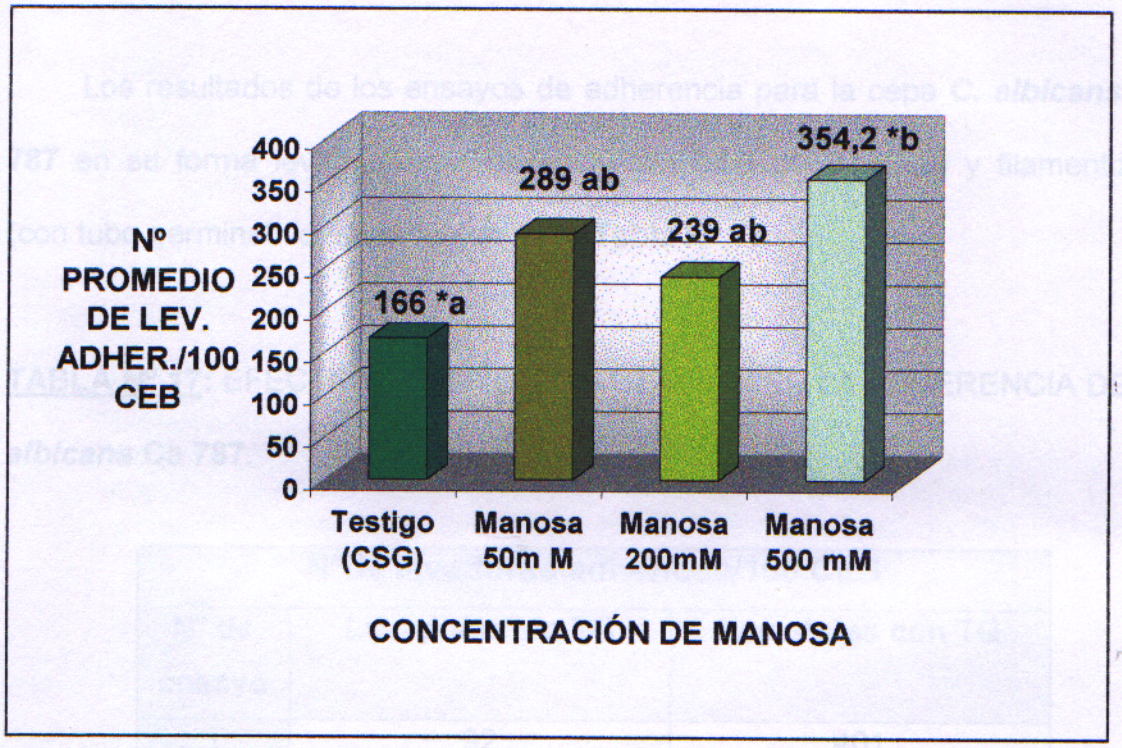
En la **Tabla Nº 16** se muestran los valores promedio con los correspondientes desvíos standard.

TABLA Nº 16: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MANOSA.

Composición del medio de cultivo	Nº promedio de lev. Adher./100 CEB ± DS
Testigo (CSG)	166,0 ± 21 * **a**
Manosa 50 mM	289,0 ± 30 **a b**
Manosa 200mM	239,0 ± 24 **a b**
Manosa 500mM	354,2 ± 77 * **b**

Referencias: * : se detectaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre el valor de adherencia para la concentración de manosa 500 mM y el testigo; **a** y **b:** grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de Tukey (nivel de significación: 5%).

GRÁFICO Nº 8: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS A CEB PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MANOSA.



Como resultado del ANOVA, se observó que la adherencia de ***C. albicans* Ca 787** crecida en una concentración de manosa 500 mM fue significativamente mayor que la adherencia de la misma cepa crecida en CSG (testigo) ($p < 0,05$). **(Gráfico Nº 8)**

No se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días.

III.2.4- EFECTO DE LA FILAMENTIZACIÓN EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

III.2.4.1- PARA LA CEPA *C. albicans* Ca 787

Los resultados de los ensayos de adherencia para la cepa ***C. albicans*** **Ca 787** en su forma levaduriforme (levadura sin tubo germinativo) y filamentizada (con tubo germinativo) se resumen en la **Tabla Nº 17.**

TABLA Nº 17: EFECTO DE LA FILAMENTIZACIÓN EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans*** **Ca 787**.

N°de levaduras adheridas/100 CEB		
Nº de ensayo	**Levaduras sin TG**	**Levaduras con TG**
1	92	401
2	259	916
3	218	795
4	378	668
5	134	590
6	91	500
7	146	380
X	**188,3**	**607,1**

Referencias: CEB: células epiteliales bucales; **TG**: tubo germinativo **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7:** repeticiones de los ensayos de adherencia en diferentes días; **X**: valores promedio.

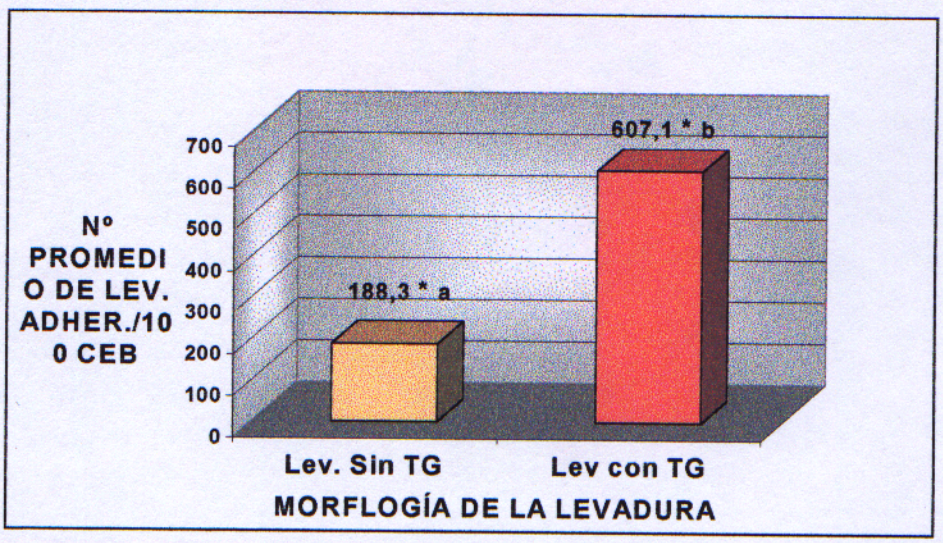
En la **Tabla Nº 18** se muestran los valores promedio con los correspondientes desvíos standard.

TABLA Nº 18: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA LAS DISTINTAS FORMAS DE ***C. albicans*** **Ca 787.**

Morfología de la levadura	Nº promedio de levaduras adheridas/100 CEB ± DS
Levaduras sin tubo germinativo	188,3 ± 52 * **a**
Levaduras con tubo germinativo	607,1 ± 100 * **b**

Referencias: * : Se detectaron diferencias significativas (p< 0,0001), entre la adherencia de las levaduras con y sin tubo germinativo; **a, b**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de Tukey (a un nivel de significación del 5%)

GRÁFICO Nº 9: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA LAS DISTINTAS FORMAS DE ***C. albicans*** **Ca 787**.



Referencias: TG: tubo germinativo; *a y *b: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de Tukey (a un nivel de significación del 5%)

Los valores promedio del Nº de levaduras adheridas **(Tabla Nº 18)** muestran que la adherencia para la levadura ***C. albicans*** **Ca 787** filamentizada fue notablemente mayor, comparada con la misma levadura no filamentizada. **(Gráfico Nº 9, Figura Nº 7)**

Como resultado del ANOVA, se encontró que esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) **(Gráfico Nº 9).**

No se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días.

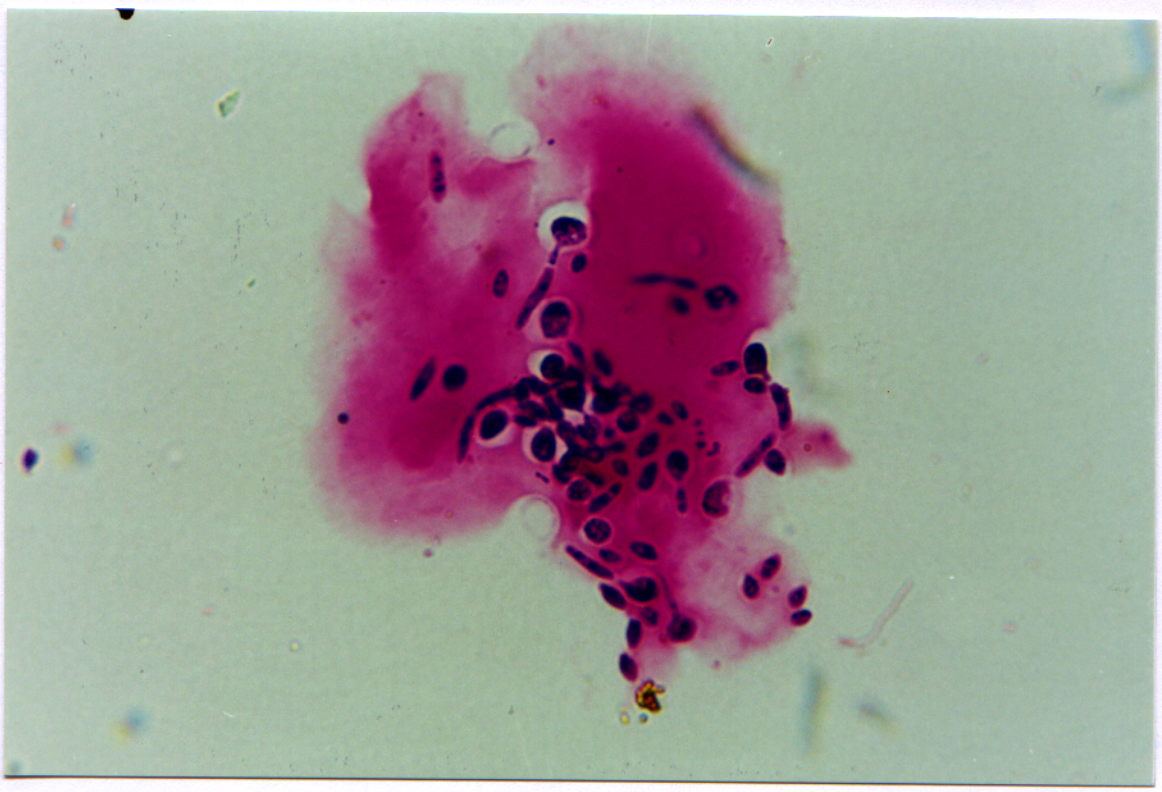


Figura Nº 7: Se observan gran cantidad de levaduras filamentizadas de la cepa ***C. albicans*** **Ca 787** adheridas a CEB. Coloración de Gram-Nicolle, 1000X.

III.2.4.2- PARA LA CEPA *C. albicans* CECT 1394

Los resultados de los ensayos de adherencia para la cepa ***C. albicans*** **CECT 1394** en su forma levaduriforme (sin tubo germinativo) y filamentizada (con tubo germinativo) se resumen en la **Tabla Nº 19**.

TABLA Nº 19: EFECTO DE LA FILAMENTIZACIÓN EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans*** **CECT 1394**

N°de levaduras adheridas/100 CEB		
Nº de ensayo	**Levaduras sin TG**	**Levaduras con TG**
1	193	592
2	267	422
3	227	411
4	103	388
5	186	506
6	249	497
7	210	754
X	**205,0**	**510,0**

Referencias: CEB: células epiteliales bucales; **TG**: tubo germinativo **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7:** repeticiones de los ensayos de adherencia en diferentes días; **X**: valores promedio.

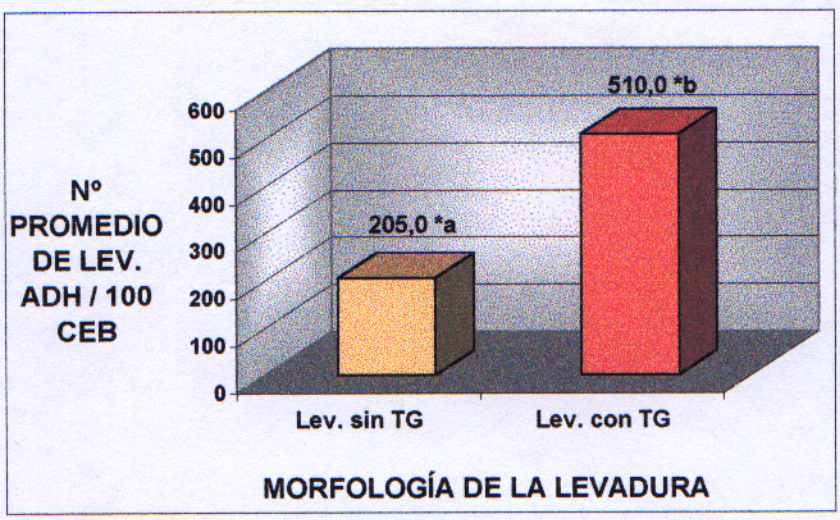
En la **tabla Nº 20** se muestran los valores promedio de adherencia con los correspondientes desvíos standard.

TABLA Nº 20: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA LAS DISTINTAS FORMAS DE ***C. albicans*** **CECT 1394.**

Morfología de la levadura	N° promedio de levaduras adheridas/100 CEB ± DS
Levaduras sin tubo germinativo	205,0 ± 20,2 * **a**
Levaduras con tubo germinativo	510,0 ± 48,5 * **b**

Referencias: *: Se detectaron diferencias significativas ($p<0,001$) entre la adherencia de las levaduras de la cepa **Ca CECT 1394** con y sin tubo germinativo; **a** y **b**: grupos estadísticamente diferentes (técnica de comparaciones múltiples de Tukey a un nivel de significación del 5%).

GRÁFICO Nº 10: PROMEDIO DEL Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA LAS DISTINTAS FORMAS DE ***C. albicans*** **CECT 1394**



Referencias: TG: tubo germinativo; *a y *b: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de Tukey (a un nivel de significación del 5%)

Los valores promedio del Nº de levaduras adheridas **(Tabla Nº 20)** muestran que la adherencia fue notablemente mayor para la levadura filamentizada. **(Gráfico Nº 10)**

Como resultado del ANOVA, se observó un aumento estadísticamente significativo de la adherencia de ***C. albicans*** en su forma filamentizada respecto de la forma levaduriforme ($p < 0,001$) **(Gráfico Nº 10, Figura Nº 8).**

No se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días.

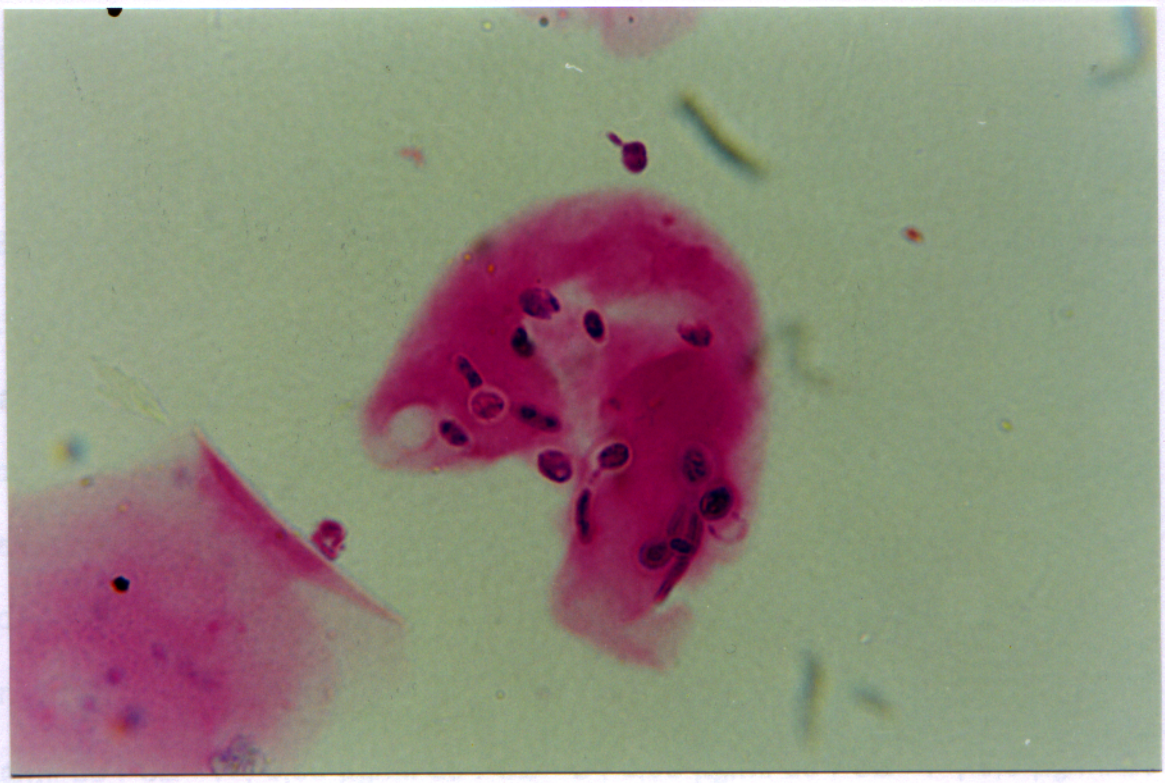


Figura Nº 8: Se observan gran cantidad de levaduras filamentizadas de la cepa ***C. albicans*** **Ca CECT 1394** adheridas a CEB. Coloración de Gram-Nicolle, 1000X.

III.2.5- EFECTO DEL FLUCONAZOL (FCZ) EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

III.2.5.1-DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) AL FCZ

La CIM, determinada por la técnica del macrométodo estandarizado según el NCCLS fue, para la cepa ***C. albicans* Ca 787,** de 0,8 μg/ml y para la cepa de ***C. krusei* ATCC 951705** (cepa testigo), de 25 μg/ml (para esta cepa el valor de referencia de la CIM = 16-64 μg/ml).

III.2.5.2- PRIMER ENSAYO DE ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS TRATADAS CON FCZ

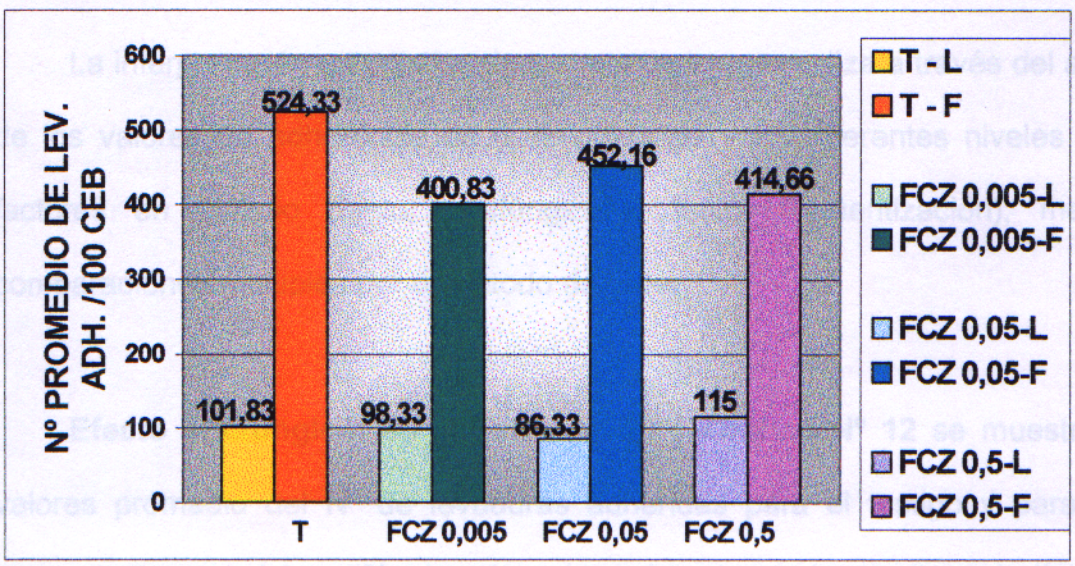
Los resultados de los ensayos de adherencia de la cepa de ***C. albicans* Ca 787** sometida al efecto de tres concentraciones subinhibitorias de FCZ (0,5 μg/ml, 0,05 μg/ml y 0,005 μg/ml) y luego filamentizada en medio 199 se resumen en la **Tabla Nº 21** y **Gráfico Nº 11**. En la tabla se muestran los valores correspondientes al número de levaduras adheridas a 100 CEB para el testigo (levadura crecida en medio CSG sin FCZ) en su forma L (levadura) y F (levadura con tubo germinativo) y para distintas combinaciones del tratamiento con el antifúngico y las diferentes formas de la levadura: 0,005 μg/ml de FCZ - L ; 0,005 μg/ml de FCZ - F ; 0,05 μg/ml de FCZ - L ; 0,05 μg/ml de FCZ - F ; 0,5 μg/ml de FCZ - L y 0,5 μg/ml de FCZ - L. Se realizaron seis repeticiones del ensayo en las mismas condiciones , en diferentes días.

TABLA Nº 21: EFECTO DEL FCZ Y LA FILAMENTIZACIÓN EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans*** **Ca 787**

Nº DE LEVADURAS ADHERIDAS / 100 CEB								
	TESTIGO (CSG)		FLUCONAZOL 0,005 µg/ml		FLUCONAZOL 0, 05 µg/ml		FLUCONAZOL 0,5 µg/ml	
ENSAYO	L	F	L	F	L	F	L	F
1	172	654	142	284	106	363	109	224
2	159	699	95	236	99	382	144	326
3	49	582	46	755	77	399	213	603
4	39	349	65	309	158	545	129	398
5	136	472	140	423	33	572	29	684
6	56	390	102	398	45	452	66	253
X	**101,83**	**524,33**	**98,33**	**400,83**	**86,33**	**452,16**	**115,00**	**414,66**

Referencias: ; **1, 2, 3, 4, 5, 6:** repeticiones de los ensayos de adherencia en diferentes días; **L:** forma levaduriforme; **F**: forma filamentizada ; **X:** valores promedio.

GRÁFICO Nº 11: EFECTO DEL FCZ Y LA FILAMENTIZACIÓN EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans*** **Ca 787.**



Referencias: T: Testigo; **FCZ**: fluconazol; **L**: forma levaduriforme; **F**: levadura con formación de tubo germinativo; **0,005; 0,05; 0,5**: cc en µg/ml de FCZ.

La **TABLA Nº 22** muestra los valores de adherencia relativa de las levaduras tratadas con FCZ con respecto al testigo, para la forma levaduriforme y filamentizada.

TABLA Nº 22: EFECTO DEL FCZ Y LA FILAMENTIZACIÓN EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans*** **Ca 787.**

	ADHERENCIA RELATIVA (PROMEDIO LEV. ADH./100 CEB)	
TRATAMIENTO	**L**	**F**
TESTIGO	1,00 (101,83)	1,00 (524,33)
0,005 µg/ml FCZ	0,97 (98,33)	0,76 (400,83)
0,05 µg/ml FCZ	0,85 (86,33)	0,86 (452,16)
0,5 µg/ml FCZ	1,13 (115,0)	0,79 (414,0)

Referencias: T: Testigo; **FCZ**: fluconazol; **L**: forma levaduriforme; **F**: levadura filamentizada (con formación de tubo germinativo).

La interpretación estadística de los resultados se realiza a través del análisis de los valores de adherencia de la levadura para los diferentes niveles de los factores en estudio (factor antifúngico y factor filamentización), mediante comparaciones múltiples por el método de Tukey.

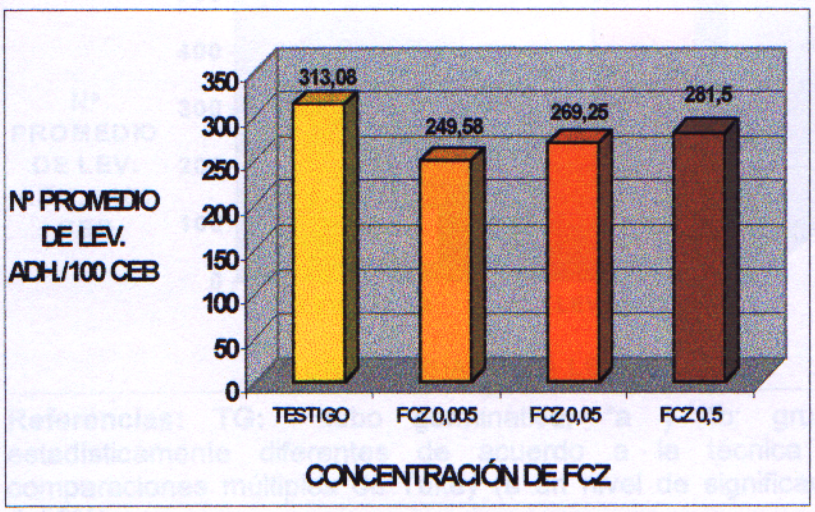
Efecto antifúngico: en la **Tabla Nº 23** y **Gráfico Nº 12** se muestran los valores promedio del Nº de levaduras adheridas para el testigo y para las 3 concentraciones del antifúngico (consideradas para el estudio estadístico en conjunto tanto la forma levaduriforme como la filamentizada de la levadura).

TABLA Nº 23: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FLUCONAZOL.

Tratamiento con antifúngico	Nº promedio de lev. adh./100 CEB ± DS	
TESTIGO (CSG)	313,08 ± 70,49	*
FLUCONAZOL 0,005 µg/ml	249,58 ± 58,85	*
FLUCONAZOL 0,05 µg/ml	269,25 ± 58,42	*
FLUCONAZOL 0,5 µg/ml	281,50 ± 71,39	*

Referencias: CSG: caldo Sabouraud glucosa; *: no se detectaron diferencias significativas entre la adherencia de las levaduras tratadas y no tratadas con FCZ, de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de Tukey (a un nivel de significación del 5%).

GRÁFICO Nº 12: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FCZ.



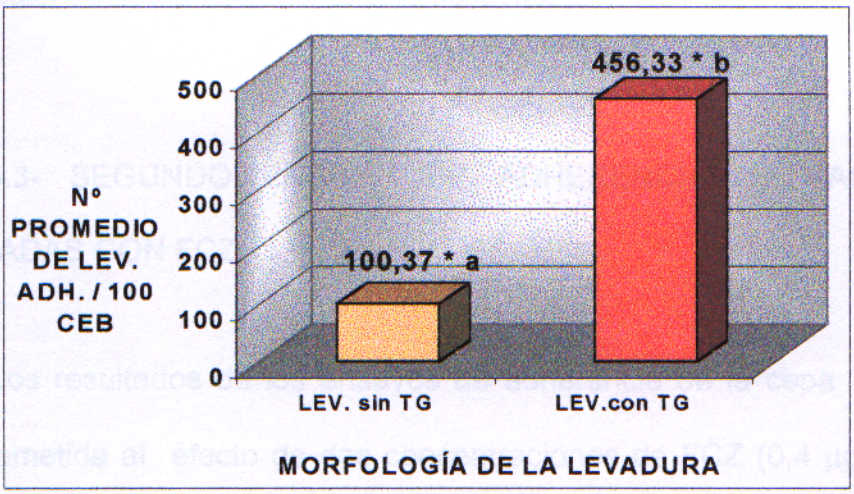
Efecto filamentización: en la **Tabla Nº 24** y **Gráfico Nº 13** se muestran los valores promedios del Nº de levaduras adheridas para la forma levaduriforme y para la forma filamentizada (consideradas para el estudio estadístico en conjunto tanto las levaduras del testigo como las tratadas con FCZ).

TABLA Nº 24: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA LAS DIFERENTES FORMAS DE LA CEPA. ***C. albicans*** **Ca 787**.

Morfología de la levadura	Nº promedio de lev. Adh./100 CEB ± DS
Levadura sin tubo germinativo	100,37 ± 10.34 * **a**
Levadura con tubo germinativo	456,33 ± 35,16 * **b**

Referencias: *: se detectaron diferencias significativas ($p<0,0001$) entre los valores de adherencia de las levaduras con y sin tubo germinativo; **a** y **b**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de Tukey (a un nivel de significación del 5%).

GRÁFICO Nº 13: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA LAS DIFERENTES FORMAS DE LA CEPA ***C. albicans*** **Ca 787**.



Referencias: TG: tubo germinativo; *a y *b: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de Tukey (a un nivel de significación del 5%)

Resultado del ANOVA: **Efecto del FCZ**: no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de adherencia de la cepa de ***C. albicans*** **Ca 787** crecida en CSG (testigo) y de las levaduras tratadas con diferentes concentraciones de FCZ (consideradas en conjunto la forma

levaduriforme y la forma filamentizada) (**Tabla Nº 23** y **Gráfico Nº 12**). Sin embargo, se observó una ligera disminución en la adherencia de las levaduras tratadas con las tres concentraciones de FCZ (esta disminución es más marcada para la forma filamentizada que para la forma levaduriforme de la levadura **(Tabla Nº 22** y **Gráfico Nº 11).**

Efecto de la filamentización: Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de adherencia de ***C. albicans*** en su forma filamentizada respecto de la forma levaduriforme, aún para las levaduras tratadas con FCZ ($p < 0,001$) **(Tabla Nº 24, Gráficos Nº 11 y 13).**

No se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días. Tampoco se observaron interacciones estadísticamente significativas.

III.2.5.3- SEGUNDO ENSAYO DE ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS TRATADAS CON FCZ

Los resultados de los ensayos de adherencia de la cepa ***C. albicans*** **Ca 787** sometida al efecto de dos concentraciones de FCZ (0,4 μg/ml y 0,8 μg/ml) durante 24 y 48 hs y luego filamentizadas en medio 199 se resumen en la **Tabla Nº 25 y Gráfico Nº 14**. En dicha tabla se muestran los valores correspondientes al Nº de levaduras adheridas a 100 CEB, para:

1) el testigo (levadura crecida en medio CSG sin FCZ) en su forma L (levadura) y F (levadura con tubo germinativo), a las 24 y 48 hs.

2) las distintas combinaciones del tratamiento con el antifúngico, el tiempo de incubación y la morfología de la levadura:

- 0,4 µg/ml de FCZ - 24 hs - L (forma levaduriforme) y F (forma filamentizada);
- 0,4 µg/ml de FCZ - 48 hs - L y F;
- 0,8 µg/ml de FCZ - 24 hs - L y F;
- 0,8 µg/ml de FCZ - 48 hs - L y F;

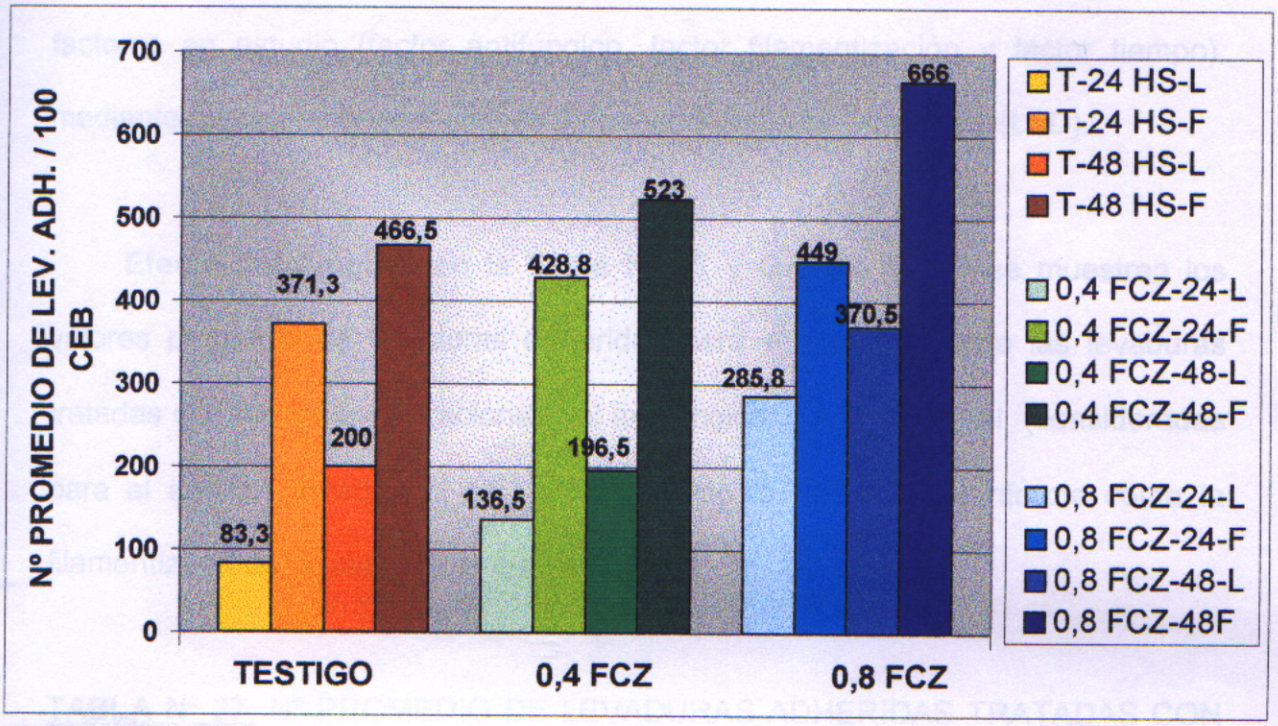
Se realizaron cuatro repeticiones del ensayo en las mismas condiciones , en diferentes días.

TABLA Nº 25: EFECTO DEL FLUCONAZOL, EL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y LA FILAMENTIZACIÓN EN LA ADHERENCIA DE ***Candida albicans*** **Ca 787.**

N° DE LEVADURAS ADHERIDAS / 100 CEB												
	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
X	**83,3**	**371,3**	**200,0**	**466,5**	**136,5**	**428,8**	**196,5**	**523,0**	**285,8**	**449,0**	**370,5**	**666,0**

Referencias: **CEB:** células epiteliales bucales; **FCZ**: fluconazol **24, 48 hs**: tiempo de incubación de las levaduras; **L**: forma levaduriforme; **F**: levadura con tubo germinativo; **1, 2, 3, 4:** repeticiones de los ensayos de adherencia en diferentes días; **x:** valores promedio.

GRÁFICO Nº 14: EFECTO DEL FCZ, EL TIEMPO Y LA FILAMENTIZACIÓN EN LA ADHERENCIA DE ***Candida albicans* Ca 787**



Referencias: CEB: células epiteliales bucales **T:** Testigo; **FCZ**: fluconazol ; **0,4, 0,8** : cc en µg/ml de FCZ; **24, 48 hs**: tiempo de incubación de las levaduras; **L**: forma levaduriforme; **F**: levadura con tubo germinativo.

La **TABLA Nº 26** muestra los valores de adherencia relativa de las levaduras tratadas con diferentes concentraciones de FCZ con respecto al testigo, para la forma levaduriforme y filamentizada, a las 24 y 48 hs.

TABLA Nº 26: EFECTO DEL FLUCONAZOL, EL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y LA FILAMENTIZACIÓN EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans* Ca 787.**

	ADHERENCIA RELATIVA (PROMEDIO LEV ADH./100 CEB)			
TRATAMIENTO	**L - 24 hs**	**L - 48 hs**	**F - 24 hs**	**F - 48 hs**
TESTIGO	1,00 (83,3)	1,00 (200,0)	1,00 (371,3)	1,00 (466,5)
0,4 µg/ml FCZ	1,64 (136,5)	0,98 (196,5)	1,15 (428,8)	1,12 (523,0)
0,8 µg/ml FCZ	3,42 (285,8)	1,85 (370,5)	1,21 (449,0)	1,42 (666,0)

Referencias: CEB: células epiteliales bucales; **FCZ**: fluconazol **24, 48 hs**: tiempo de incubación de las levaduras; **L**: forma levaduriforme; **F**: levadura con tubo germinativo.

La interpretación estadística de los resultados se realiza a través del análisis de los valores de adherencia de la levadura para los diferentes niveles de los factores en estudio (factor antifúngico, factor filamentización y factor tiempo), mediante comparaciones múltiples de Least Significant Difference (LSD).

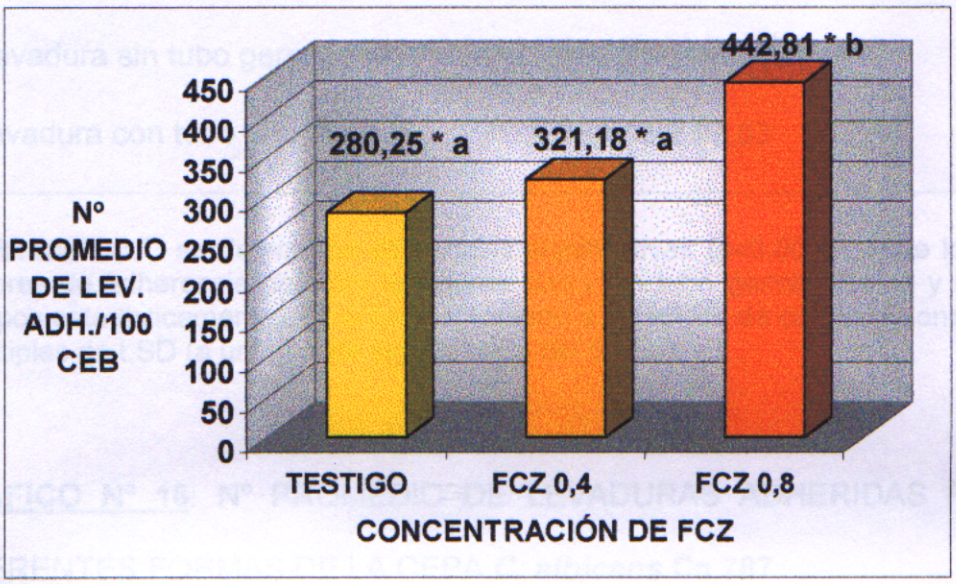
Efecto antifúngico: en la **Tabla Nº 27** y **Gráfico Nº 15** se muestran los valores promedio de levaduras adheridas para el testigo y para las levaduras tratadas con las 2 concentraciones del antifúngico: 0,8 y 0,4 μg/ml (consideradas para el análisis estadístico en conjunto, tanto la forma levaduriforme como la filamentizada de la levadura, a las 24 y 48 hs).

TABLA Nº 27: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FLUCONAZOL.

Tratamiento con antifúngico	Nº promedio de lev. adh./100 CEB ± DS	
TESTIGO (CSG)	280,25 ± 41,26	* a
FLUCONAZOL 0,4 μg/ml	321,18 ± 52,94	* a
FLUCONAZOL 0,8 μg/ml	442,81 ± 64,91	* b

Referencias: *: se detectaron diferencias significativas entre la adherencia de las levaduras tratadas con 0,8 μg/ml y las levaduras no tratadas (testigo) o tratadas con 0,4 μg/ml FCZ ($p<0,05$); **a** y **b**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de LSD (a un nivel de significación del 5%).

GRÁFICO Nº 15: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FLUCONAZOL.



Referencias: * **a, b**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de LSD (a un nivel de significación del 5%).

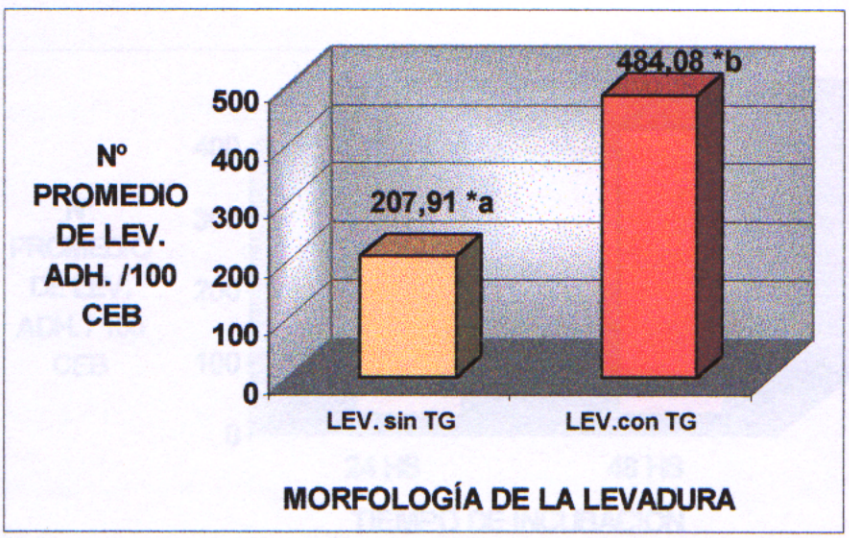
Efecto filamentización: en la **Tabla Nº 28** y **Gráfico Nº 16** se muestran los valores promedio de levaduras adheridas para la forma levaduriforme y filamentizada (consideradas para el análisis estadístico, tanto las levaduras del grupo testigo como las tratadas con FCZ, a las 24 y 48 hs).

TABLA Nº 28: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA LAS DIFERENTES FORMAS DE LA CEPA ***C. albicans*** **Ca 787**.

Morfología de la levadura	Nº promedio de lev. adh./100 CEB ± DS
Levadura sin tubo germinativo	207,91 ± 33,54 * **a**
Levadura con tubo germinativo	484,08 ± 37,83 * **b**

Referencias: *: se detectaron diferencias significativas ($p<0,0001$) entre los valores de adherencia para las levaduras con y sin tubo germinativo; **a** y **b**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de LSD (a un nivel de significación del 5%).

GRÁFICO Nº 16: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA LAS DIFERENTES FORMAS DE LA CEPA ***C. albicans*** **Ca 787**.



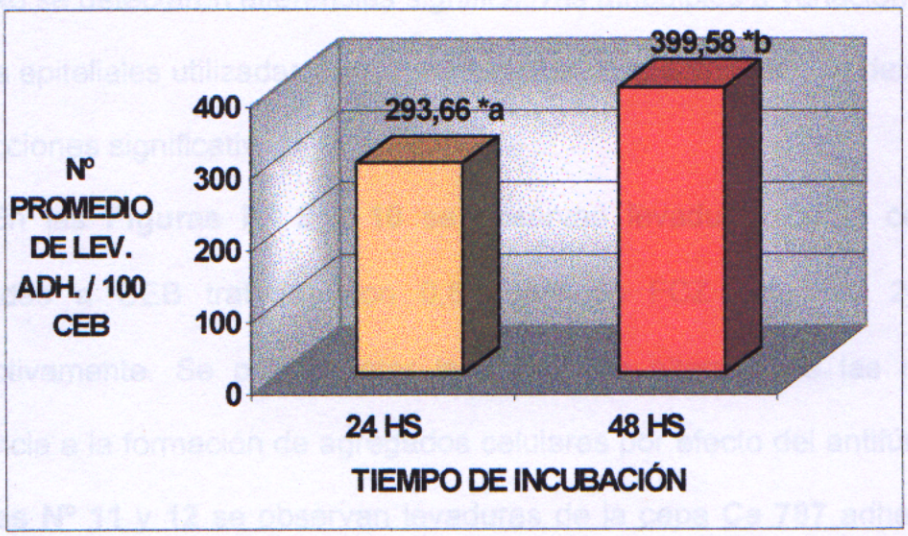
Efecto tiempo: en la **Tabla Nº 29** y **Gráfico Nº 17** se muestran los valores promedio de levaduras adheridas a las 24 y 48 hs (consideradas para el análisis estadístico, tanto las levaduras del grupo testigo como las tratadas con FCZ, en su forma levaduriforme y filamentizada)

TABLA Nº 29: EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN EN LA ADHERENCIA DE LA CEPA ***C. albicans*** **Ca 787**.

Tiempo de incubación de Las levaduras.	Nº promedio de lev. adh./100 CEB ± DS
24 horas	292,42 ± 38,88 * **a**
48 horas	399,58 ± 48,50 * **b**

Referencias: *: se detectaron diferencias significativas (p<0,05) entre los valores de adherencia de las levaduras incubadas durante 24 y 48 hs; **a, b**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de LSD.

GRÁFICO Nº 17: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN DE ***C. albicans*** **Ca 787**.



Resultado del ANOVA:

Efecto del FCZ: se observó un aumento estadísticamente significativo de los valores de adherencia de ***C. albicans*** **Ca 787** tratada con 0,8 μg/ml de FCZ

($p < 0,05$) con respecto a las levaduras no tratadas con FCZ (consideradas en conjunto la forma levaduriforme y la forma filamentizada, a las 24 y 48 hs) **(Tabla Nº 27, Gráficos Nº 14 y 15, Figuras Nº 9 y 10).**

Efecto de la filamentización: Se observó un aumento estadísticamente significativo de los valores de adherencia de ***C. albicans*** en su forma filamentizada respecto de la forma levaduriforme ($p < 0,001$) (consideradas tanto las levaduras del grupo testigo como las tratadas con FCZ, a las 24 y 48 hs). **(Tabla Nº 28, Gráficos Nº 14 y 16).**

Efecto tiempo: Se detectó un aumento estadísticamente significativo de los valores de adherencia de ***C. albicans*** incubada durante 48 hs respecto a la adherencia de las levaduras incubadas durante 24 hs. ($p< 0,05$) (consideradas tanto las levaduras del grupo testigo como las tratadas con FCZ, en su forma levaduriforme y filamentizada) **(Tabla Nº 29, Gráficos Nº 14 y 17).**

No se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días, como tampoco se detectaron interacciones significativas.

En las **Figuras Nº 9** y **10** se observan levaduras de la cepa **Ca 787** adheridas a CEB tratadas con 0,8 µg/ml de FCZ durante 24 y 48 hs, respectivamente. Se puede notar la morfología alterada de las mismas y la tendencia a la formación de agregados celulares por efecto del antifúngico. En las **Figuras Nº 11** y **12** se observan levaduras de la cepa **Ca 787** adheridas a CEB luego de ser tratadas con 0,8 µg/ml de FCZ durante 24 y 48 hs, respectivamente, y filamentizadas en medio 199 durante 2 hs. Se puede observar la formación de incipientes tubos germinativos en aisladas levaduras.

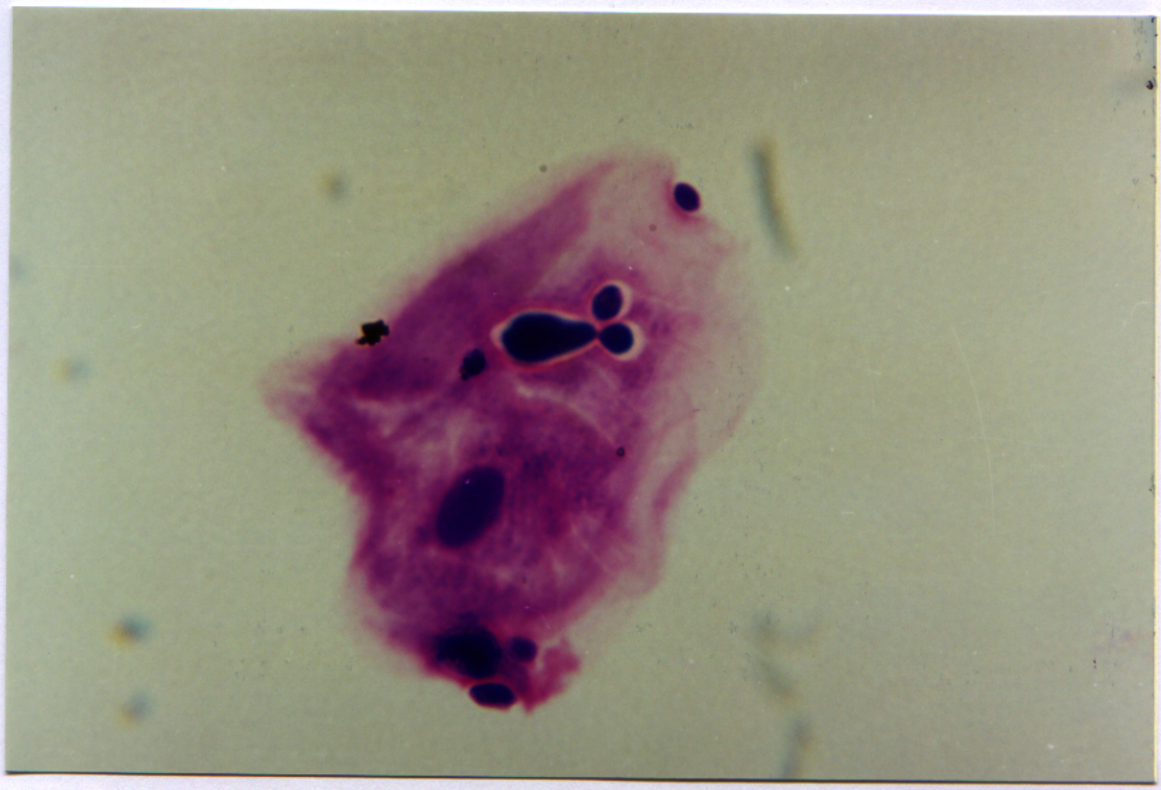


Figura Nº 9: CEB con levaduras adheridas de la cepa ***C. albicans*** **Ca 787**, tratadas con 0,8 µg/ml de FCZ, a las 24 hs. Se puede observar la morfología alterada de las levaduras. Gram-Nicolle. 1000X

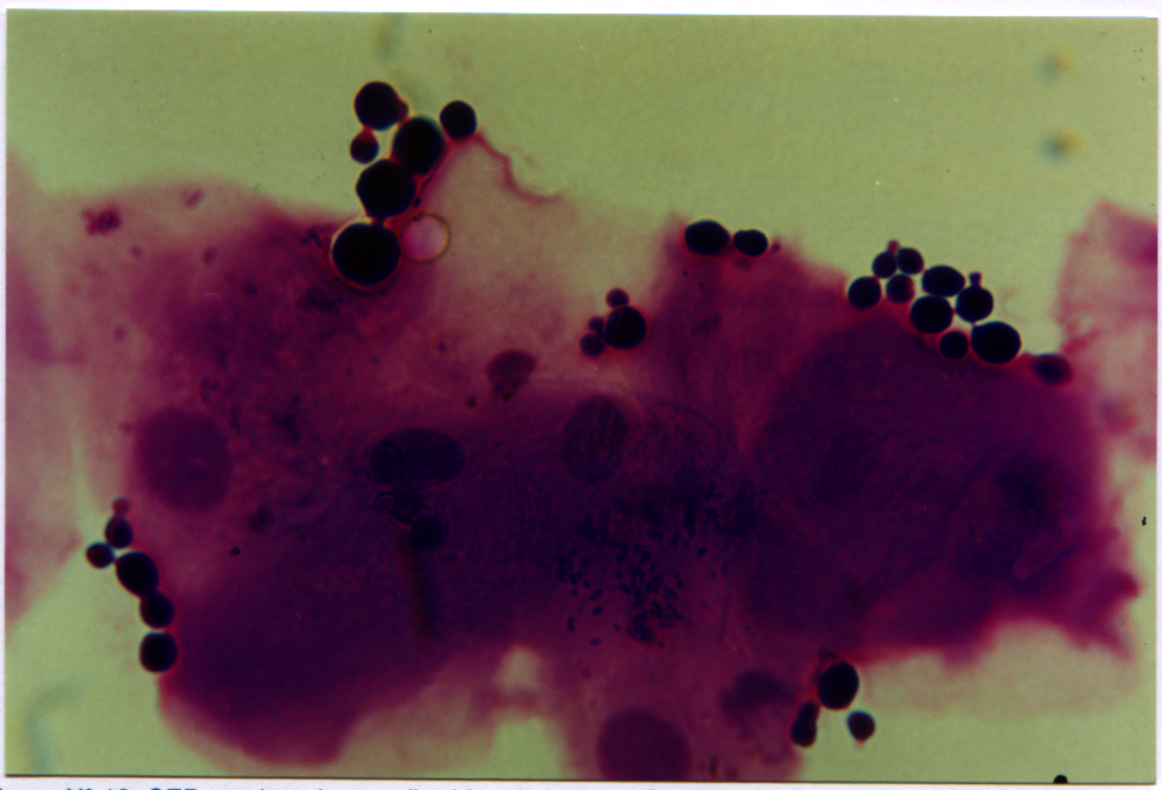


Figura Nº 10: CEB con levaduras adheridas de la cepa ***C. albicans*** **Ca 787**, tratadas con 0,8 µg/ml de FCZ, a las 48 hs. Se puede observar la morfología alterada de las levaduras y la formación de agregados celulares. Gram-Nicolle 1000X

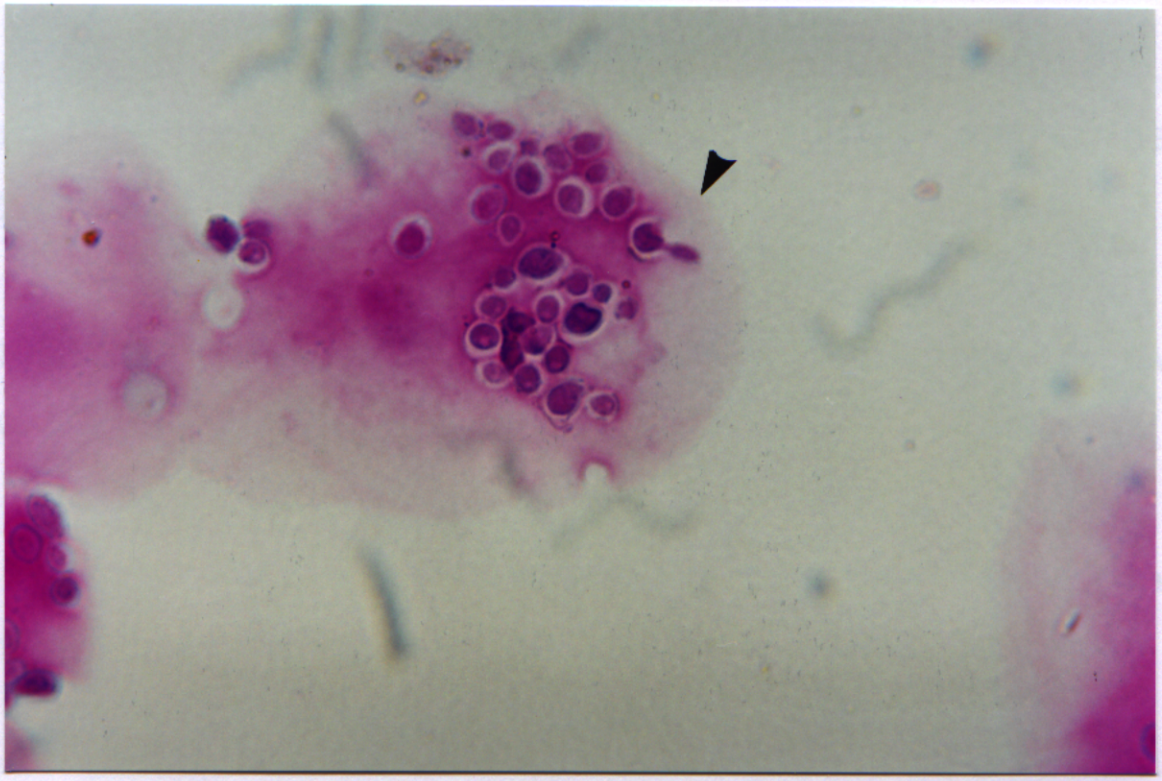


Figura Nº 11: CEB con levaduras adheridas de ***C. albicans*** **Ca 787**, tratadas con 0,8 µg/ml de FCZ durante 24 hs y filamentizadas. Se puede observar la morfología alterada de las levaduras y la formación de incipientes tubos germinativos en aisladas levaduras (flecha).Gram-Nicolle. 1000X

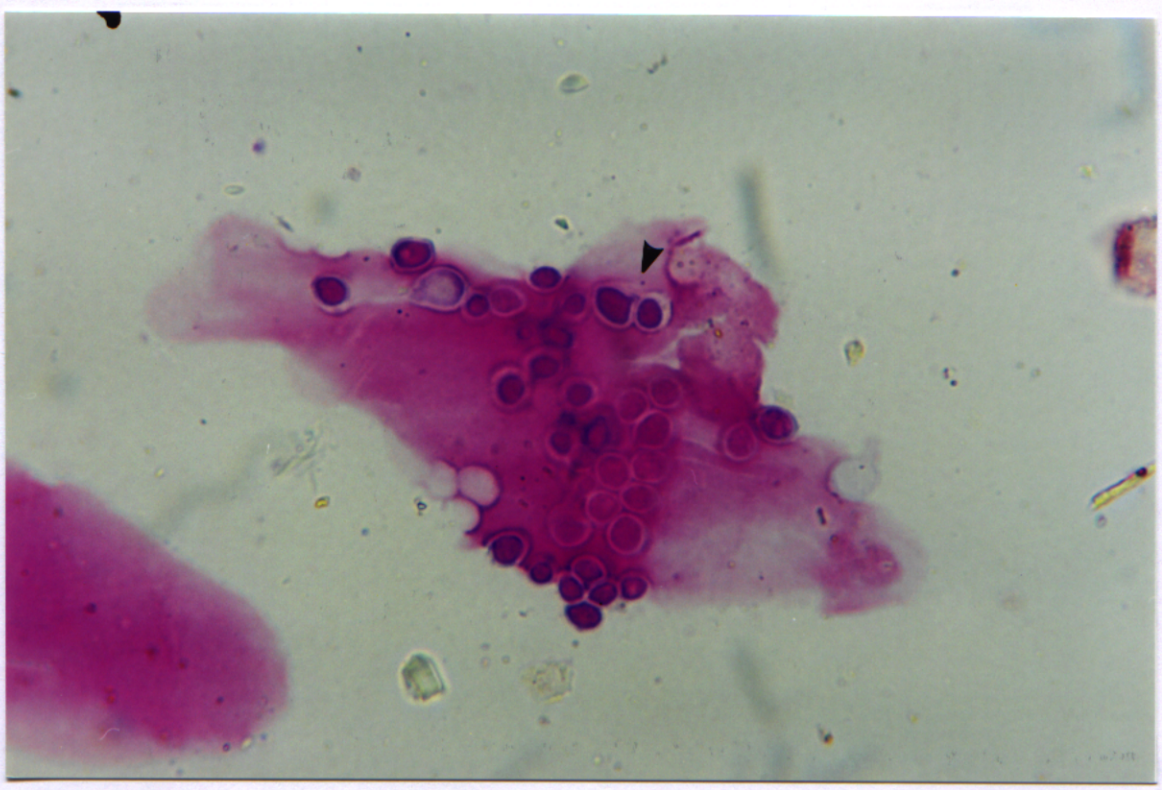


Figura Nº 12: CEB con levaduras adheridas de ***C. albicans*** **Ca 787**, tratadas con 0,8 µg/ml de FCZ durante 48 hs y filamentizadas. Se puede observar la morfología alterada de las levaduras y la formación de incipientes tubos germinativos en aisladas levaduras (flecha).Gram-Nicolle. 1000X

III.2.6- EFECTO DE OTROS MICROORGANISMOS EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

III.2.6.1- EFECTO DE LA PRESENCIA DE LACTOBACILOS EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans* Ca 787

Los resultados de los ensayos de adherencia de la cepa de ***C. albicans*** **Ca 787** en presencia de ***Lactobacillus spp*** se resumen en la **Tabla Nº 30**.

TABLA Nº 30: EFECTO DE LA PRESENCIA DE LACTOBACILOS EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans*** **Ca 787**.

N° de levaduras adheridas/100 CEB		
Nº de ensayo	**Levaduras + CEB**	**Lev. + lactobacilos + CEB**
1	189	142
2	148	130
3	298	274
4	227	225
5	179	165
X	**208,20**	**187,20**

Referencias: CEB: células epiteliales bucales; **1, 2, 3, 4, 5:** repeticiones de los ensayos de adherencia en diferentes días; **X**: valores promedio.

En la **tabla Nº 31** se muestran los valores promedio con los correspondientes desvíos standard.

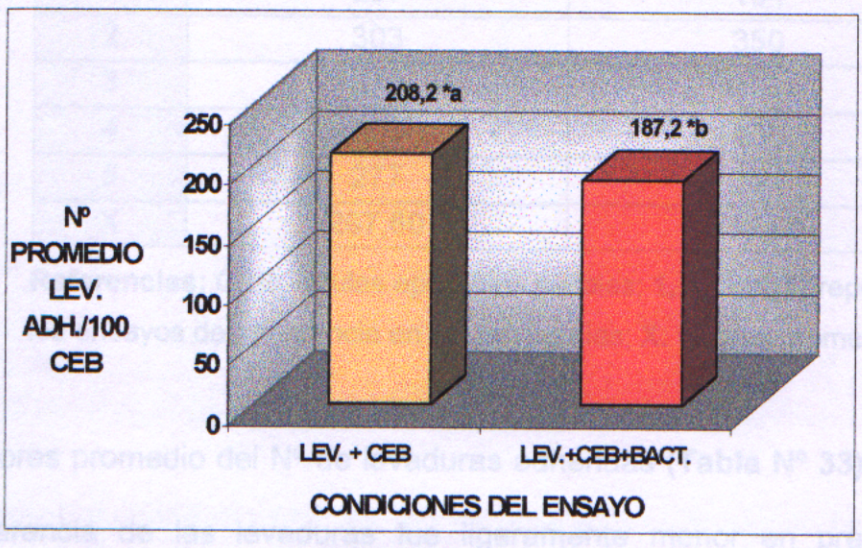
TABLA Nº 31: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS ADHERIDAS PARA ***C. albicans*** **Ca 787** EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LACTOBACILOS.

Condiciones del ensayo	Nº promedio de levaduras adheridas/100 CEB ± DS
Levaduras + CEB	208,20 ± 25,75 * **a**
Levaduras + Lactobacilos + CEB	187,20 ± 27,17 * **b**

Referencias: *: Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$), entre la adherencia de las levaduras en ausencia y presencia de bacterias; **a** y **b**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de LSD (a un nivel de significación del 5%).

Los valores promedio del Nº de levaduras adheridas muestran que la adherencia de las levaduras a CEB fue menor en presencia de las cepas de lactobacilos **(Tabla Nº 31** y **Gráfico Nº 18).**

GRÁFICO Nº 18: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS DE LA CEPA **Ca 787** ADHERIDAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LACTOBACILOS.



Referencias: *: Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$), **a** y **b**: grupos estadísticamente diferentes de acuerdo a la técnica de comparaciones múltiples de LSD (a un nivel de significación del 5%).

Como resultado del ANOVA, se observó una disminución estadísticamente significativa en los valores de adherencia de ***C. albicans*** en presencia de Lactobacilos con respecto al control ($p< 0,05$) **(Gráfico Nº 18).**

Se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días ($p< 0,001$).

III.2.6.2- EFECTO DE LA PRESENCIA DE ENTEROBACTERIAS EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans* Ca 787

Los resultados de los ensayos de adherencia de la cepa **Ca 787** a CEB en presencia de ***Escherichia coli*** **RM 2608** se resumen en la **Tabla Nº 32**.

TABLA Nº 32: EFECTO DE LA PRESENCIA DE ***Escherichia coli*** **RM 2608** EN LA ADHERENCIA DE ***C. albicans*** **Ca 787.**

N°de levaduras adheridas/100 CEB		
Nº de ensayo	**Levaduras + CEB**	**Levaduras + *E. Coli* + CEB**
1	237	194
2	303	350
3	370	353
4	151	135
5	277	251
X	**267,60**	**256,60**

Referencias: CEB: células epiteliales bucales; **1, 2, 3, 4, 5:** repeticiones de los ensayos de adherencia en diferentes días; **X**: valores promedio.

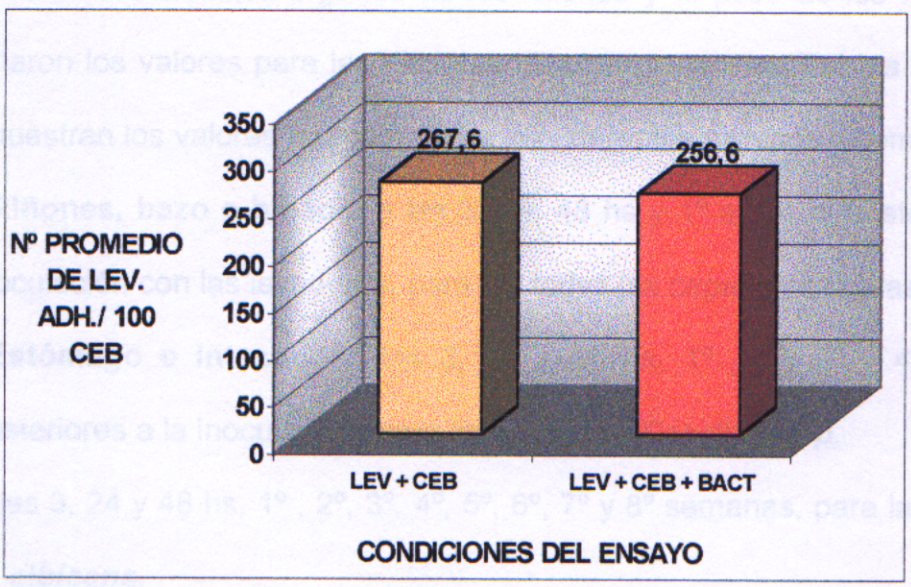
Los valores promedio del Nº de levaduras adheridas **(Tabla Nº 33)** muestran que la adherencia de las levaduras fue ligeramente menor en presencia de las bacterias. **(Gráfico Nº 19).**

TABLA Nº 33: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS DE ***C. albicans*** **Ca 787** ADHERIDAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ***E. coli*** **RM 2608.**

Condiciones del ensayo	N° promedio de levaduras adheridas/100 CEB ± DS
Levaduras + CEB	267,60 ± 36,30 *
Levaduras + *E. coli* + CEB	256,60 ± 42,87 *

Referencias: *: No se detectaron diferencias significativas, entre la adherencia de las levaduras a CEB en presencia y ausencia de ***E. Coli.***

GRÁFICO Nº 19: Nº PROMEDIO DE LEVADURAS DE LA CEPA **Ca 787** ADHERIDAS A CEB EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ***E. coli***. **RM 2608**



Como resultado del ANOVA, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de adherencia de ***C. albicans*** en presencia y ausencia de ***E. Coli*** **(Gráfico Nº 19).**

Se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días ($p < 0,01$).

III.3- ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA* EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

III.3.1- DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE UFC DE LEVADURAS EN LOS TEJIDOS DE RATÓN

Los valores del Nº de UFC de levaduras por gramo de tejido para las diferentes cepas, fueron calculados en base al número de las levaduras aisladas del cultivo de los distintos órganos de los ratones y el peso de los mismos. Se promediaron los valores para las distintas diluciones y en las **Tablas Nº 34** a **Nº 44** se muestran los valores promedio para los diferentes órganos y tiempos:

- **Riñones, bazo e hígado**, a las 3, 24, 48 hs y 1º semana posteriores a la inoculación con las levaduras, para las todas las cepas estudiadas.
- **Estómago e intestino** a las 3, 24 y 48 hs, 1º , 2º, 3º y 4º semanas posteriores a la inoculación, para las cepas de ***Candida spp***.

A las 3, 24 y 48 hs, 1º , 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º y 8º semanas, para las cepas de ***C. albicans.***

Todos los cultivos de tejidos realizados con los órganos de los ratones sin inocular (controles), fueron negativos.

En los casos en que se aislaron colonias, éstas fueron blanquecinas, de aspecto cremoso, pertenecientes a una única especie de levadura (corroborado con la micromorfología en AHM).

En algunos casos y a partir de la 3° semana, aparecieron, en los cultivos pertenecientes a estómago e intestino, abundantes colonias muy pequeñas, de una levadura identificada como ***Candida pintolopessii*** var. ***pintolopesii*** **[(Van Uden) Meyer et Yarrow, 1952]** que es una levadura que comúnmente forma parte de la flora normal de los ratones y que por el tamaño de las colonias se pudieron diferenciar de la levadura inoculada (**Figuras N° 13 y N° 14**).

En la **Figura N° 13** se muestran las colonias de levaduras aisladas en medio ASGcl a partir del cultivo del estómago e intestino de los ratones, inoculados con la cepa de **Ca 333**, a la 6° semana post-inoculación (1° dilución). En la misma se observan las colonias con las características descriptas anteriormente y una gran cantidad de colonias pequeñas de ***C. pintolopesii***.

En la **Figura N° 14** se muestra el aislamiento de colonias de levaduras de la cepa de ***C. albicans*** **Ca 787** en medio ASGcl a partir del estómago de los ratones (1° y 2° diluciones) a la 3° semana post-inoculación, donde también se observa la aparición de colonias de ***C. pintolopesii***..

En las **Figuras 15** y **16**, se muestran los aislamientos de colonias de levaduras de las cepas ***C. lusitaniae*** **CI 671** y ***C. tropicalis*** **Ct 508**, respectivamente, correspondientes al cultivo de intestino a las 3 hs post-inoculación (1° a 4° dilución).

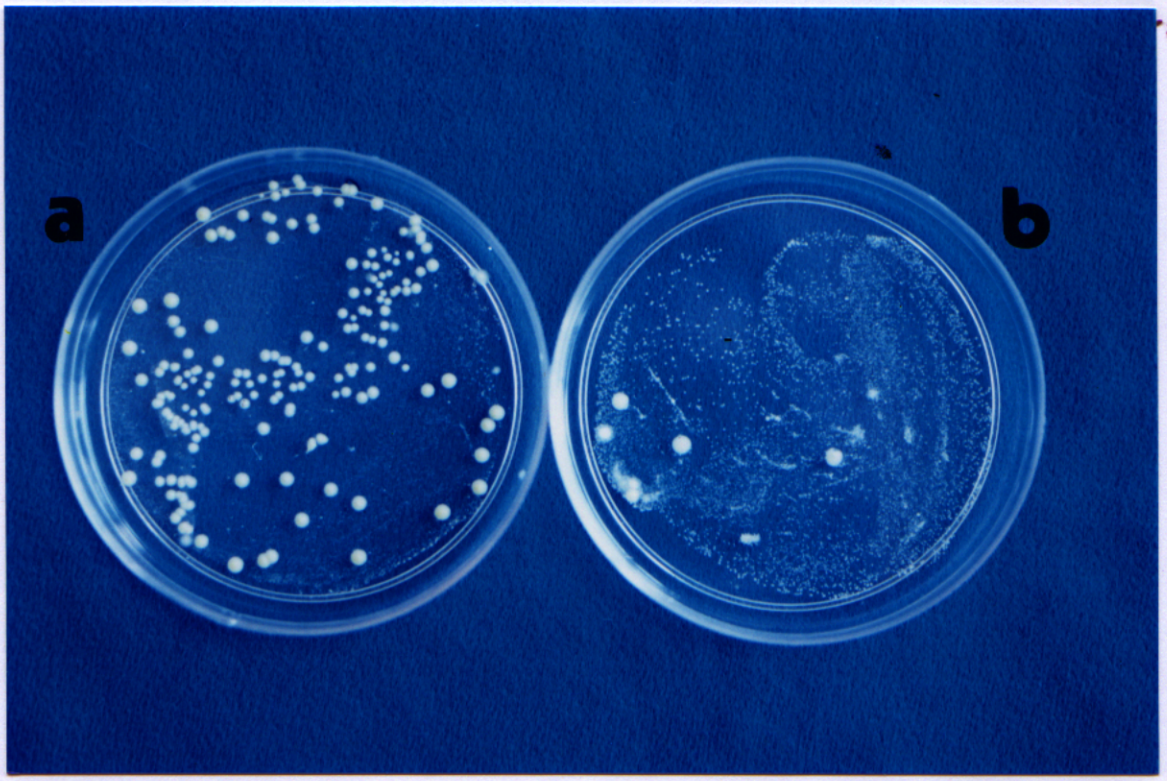


Figura Nº 13: **a)** Colonias de levaduras en ASGcl aisladas de estómago de ratón inoculado con la cepa **Ca 333** (6º semana post-inoculación, 1º dilución). **b)** Ídem para intestino de ratón. En ambas placas se observó el desarrollo de ***C. pintolopesii*** (colonias pequeñas).

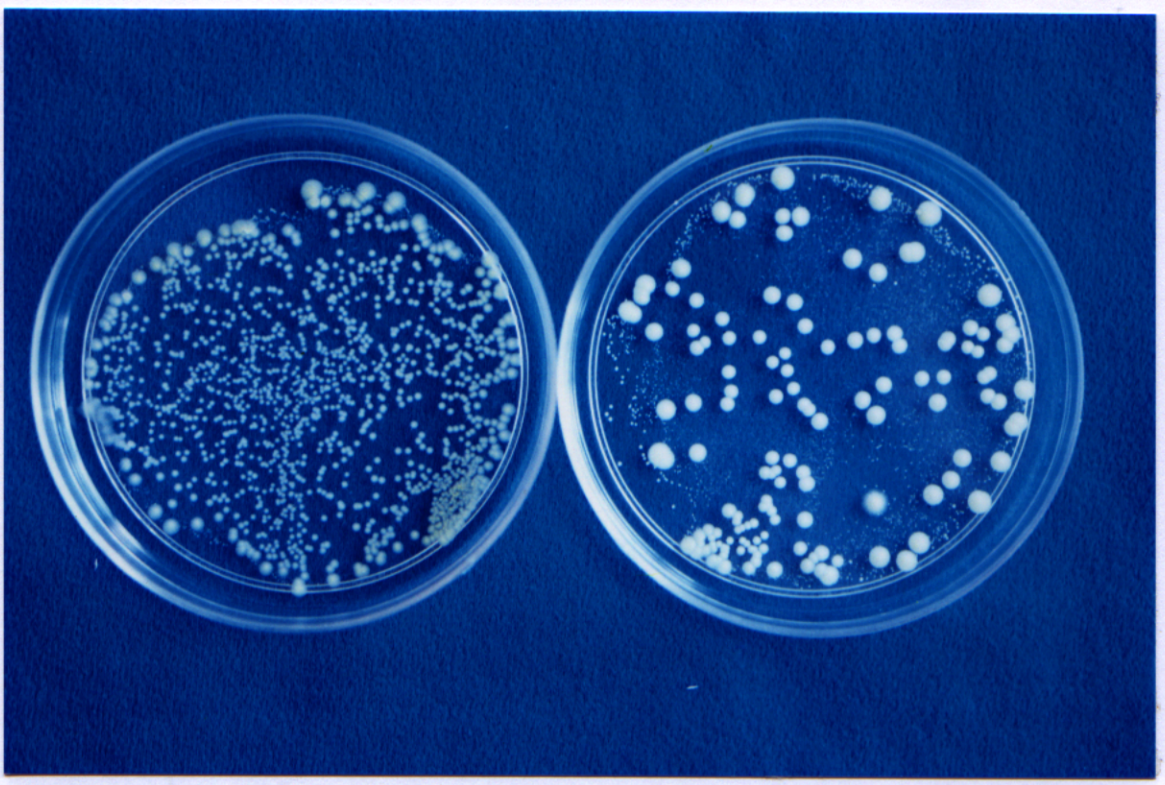


Figura Nº 14: Colonias de levaduras de la cepa de ***C. albicans*** **Ca 787** en ASGcl aisladas de estómago de ratón (3º semana post-inoculación, 1º y 2º dilución). En ambas placas se observó el desarrollo de ***C. pintolopesii*** (colonias pequeñas).

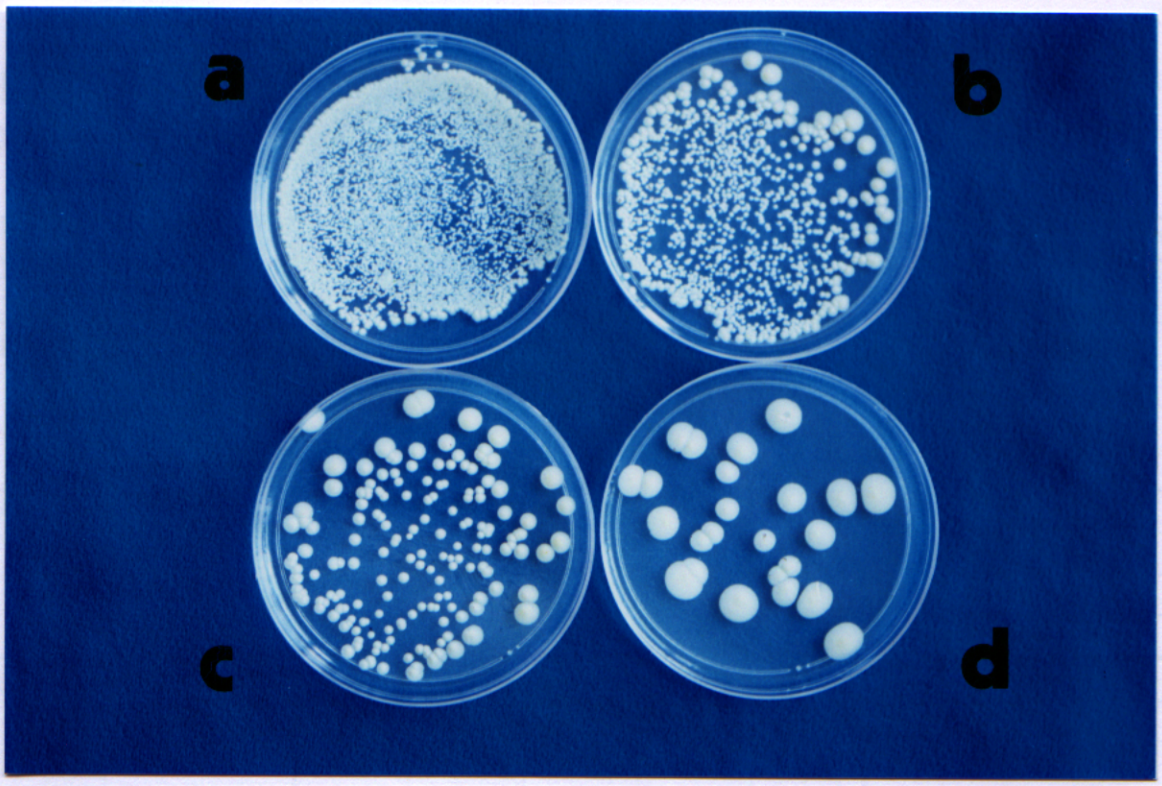


Figura Nº 15: colonias de levaduras en ASGcl de la cepa ***C. lusitaniae*** **Cl 671** correspondientes al cultivo de intestino a las 3 hs post-inoculación. **a, b, c, d**: 1º a 4º dilución.

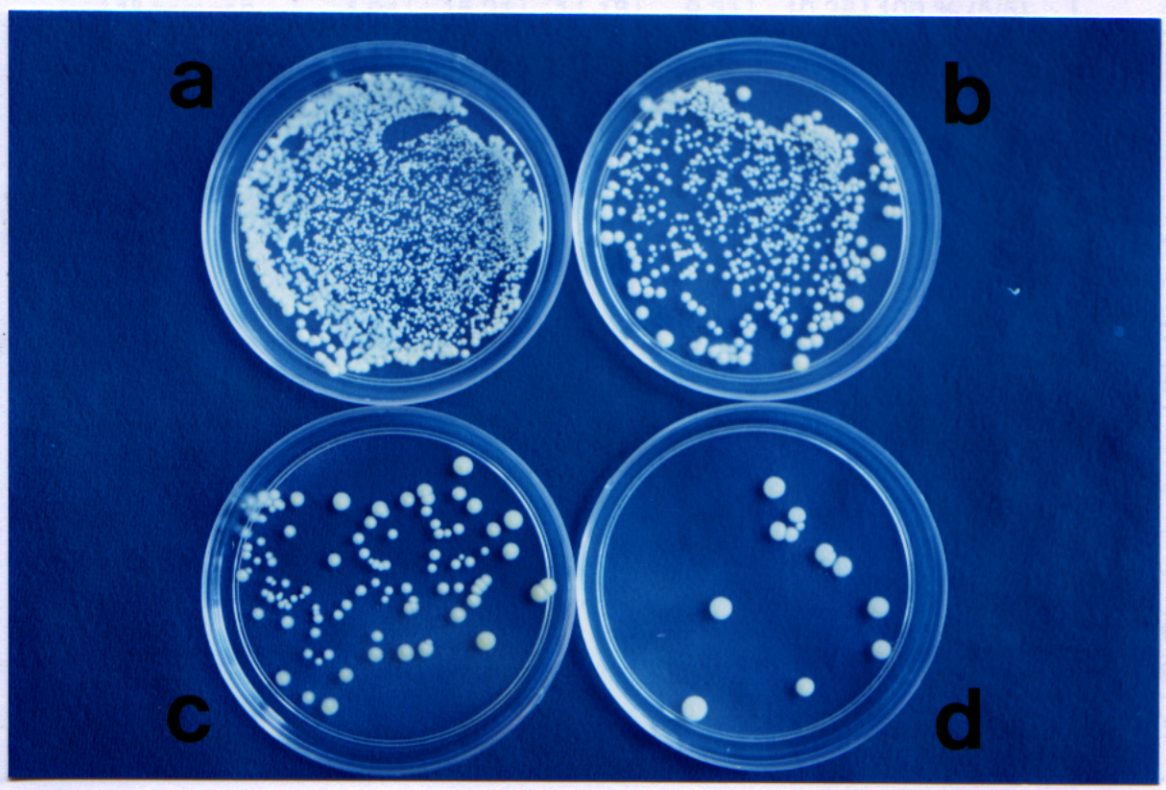


Figura Nº 16: colonias de levaduras en ASGcl de la cepa ***C. tropicalis*** **Ct 508** correspondientes al cultivo de intestino a las 3 hs post-inoculación. **a, b, c, d**: 1º a 4º dilución.

TABLA Nº 34: NÚMERO DE UFC/G EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON LA CEPA ***Candida albicans*** **Ca 333**.

Organo	Tiempo Post-inoculación	R1 UFC/g x10^4	R2 UFC/g x10^4	R3 UFC/g x10^4	R4 UFC/g x10^4	R5 UFC/g x10^4	Porcentaje muestras (+)	Promedio UFC/g . x10^4
Riñón	3 hs	0,32	ND	ND	0,43	ND	40 % (2/5)	**0,41**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	0,092	20 % (1/5)	**0,019**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1° semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Bazo	3 hs	0,25	ND	ND	ND	0,98	40 % (2/5)	**0,25**
	24 hs	ND	ND	0,33	0,25	ND	40 % (2/5)	**0,12**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1° semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Hígado	3 hs	0,15	ND	ND	0,19	0,28	60 % (3/5)	**0,13**
	24 hs	ND	0,04	0,25	ND	ND	40 % (2/5)	**0,06**
	48 hs	ND	ND	0,19	ND	ND	20 % (1/5)	**0,04**
	1° semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Estómago	3 hs	6,91	3,61	4,81	5,83	4,02	100% (5/5)	**5,04**
	24 hs	0,34	4,91	2,55	1,99	0,87	100 % (5/5)	**2,13**
	48 hs	5,66	4,18	6,23	2,41	7,21	100 % (5/5)	**5,15**
	1° semana	4,94	15,21	11,18	9,31	10,28	100 % (5/5)	**10,18**
	2° semana	1,98	3,03	4,50	6,33	3,07	100 % (5/5)	**3,78**
	3° semana	* 9,08	* 3,01	7,80	11,3	4,45	100 % (5/5)	**7,13**
	4° semana	8,36	9,86	6,30	* 5,40	2,31	100 % (5/5)	**6,45**
	5° semana	0,55	* 0,65	1,10	* 0,88	1,12	100 % (5/5)	**0,86**
	6° semana	* 0,57	* 0,89	0,76	0,09	0,23	100 % (5/5)	**0,51**
	7° semana	0,07	* ND	0,10	* ND	0,03	60 % (3/5)	**0,04**
	8° semana	ND	* ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Intestino	3 hs	5.747,0	8.654,2	6.683,2	4.323,1	5.424,9	100 % (5/5)	**6.166,5**
	24 hs	68,92	255,61	155,31	107,22	175,25	100 % (5/5)	**152,46**
	48 hs	13,51	10,70	9,98	4,99	9,13	100 % (5/5)	**9,66**
	1° semana	8,30	1,43	5,25	2,04	6,72	100 % (5/5)	**4,75**
	2° semana	1,20	0,87	1,60	1,09	0,87	100 % (5/5)	**1,13**
	3° semana	* 0,31	* 0,09	0,26	0,62	0,10	100 % (5/5)	**0,27**
	4° semana	0,12	* 0,03	0,08	* 0,07	0,06	100 % (5/5)	**0,07**
	5° semana	0,014	* 0,046	0,031	* 0,021	0,007	100 % (5/5)	**0,024**
	6° semana	*0,0053	* 0,012	0,0022	0,002	0,001	100 % (5/5)	**0,017**
	7° semana	0,0012	* ND	0,0010	* ND	ND	40 % (2/5)	**0,0004**
	8° semana	ND	* ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**

Referencias: **R1, R2, R3, R4, R5**: diferentes lotes de ratones inoculados por vía oral con la cepa de ***C albicans*** **Ca 333. ND:** no hubo desarrollo de colonias. *: Desarrollo de ***C. pintolopesii.***

TABLA Nº 35: NÚMERO DE UFC/G EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON LA CEPA ***Candida albicans*** **Ca 787**.

Organo	Tiempo Post-inoculación	R1 UFC/g x10^4	R2 UFC/g x10^4	R3 UFC/g x10^4	R4 UFC/g x10^4	R5 UFC/g x10^4	Porcentaje muestras (+)	Prom. UFC/g órgano x10^4
Riñón	3 hs	ND	1,08	4,59	1,79	ND	60 % (3/5)	**1,49**
	24 hs	7,30	ND	ND	ND	ND	20 % (1/5)	**1,46**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Bazo	3 hs	ND	2,14	14,01	1,54	ND	60 % (3/5)	**3,54**
	24 hs	25,81	1,26	ND	ND	ND	40 % (2/5)	**5,41**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Hígado	3 hs	ND	O,612	2,18	1,38	0,98	80 (4/5)	**1,03**
	24 hs	4,25	0,18	3,22	ND	ND	60 % (3/5)	**1,52**
	48 hs	ND	ND	0,194	ND	ND	20 % (1/5)	**0,04**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Estómago	3 hs	4,18	22,50	6,97	31,32	43,11	100% (5/5)	**21,61**
	24 hs	34,83	14,22	7,70	18,17	23,91	100 % (5/5)	**19,76**
	48 hs	14,53	5,22	1,30	4,96	2,42	100 % (5/5)	**5,68**
	1º semana	19,20	6,75	9,21	5,93	4,06	100 % (5/5)	**9.03**
	2º semana	30,89	9,23	21,94	4,62	8,01	100 % (5/5)	**14,94**
	3º semana	27,41	5,07	* 11,16	4,17	* 7,70	100 % (5/5)	**11,10**
	4º semana	10,25	3,34	* 5,25	2,05	6,53	100 % (5/5)	**5,48**
	5º semana	6,31	2,71	4,50	1,90	* 4,46	100 % (5/5)	**3,97**
	6º semana	* 4,17	2,02	* 3,87	1,55	2,95	100 % (5/5)	**2,91**
	7º semana	0,87	0,099	* 0,56	0,083	0,34	100 % (5/5)	**0,39**
	8º semana	0,0075	ND	* 0,002	ND	0,0031	60 % (3/5)	**0,0025**
Intestino	3 hs	1.038,0	788,2	1.398,5	1.314,2	714,1	100 % (5/5)	**1.050,6**
	24 hs	78,15	137,1	112,4	54,2	37,5	100 % (5/5)	**83,87**
	48 hs	5,12	24,20	13,48	2,43	2,52	100 % (5/5)	**9,55**
	1º semana	4,65	20,15	16,34	4,5	6,23	100 % (5/5)	**10,37**
	2º semana	3,87	13,81	11,03	1,38	4,53	100 % (5/5)	**6.92**
	3º semana	0,315	1,82	* 0,42	0,13	* 0,55	100 % (5/5)	**0.65**
	4º semana	0,29	0,77	* 0,37	0,11	0,28	100 % (5/5)	**0.36**
	5º semana	0,10	0,25	0,098	0,055	* 0,135	100 % (5/5)	**0,13**
	6º semana	* 0,025	0,135	* 0,061	0,020	0,018	100 % (5/5)	**0.05**
	7º semana	ND	0,036	* 0,010	ND	0,014	60 % (3/5)	**0,012**
	8º semana	ND	0,0011	* ND	ND	0,0053	40 % (2/5)	**0,0013**

Referencias: R1, R2, R3, R4, R5: diferentes lotes de ratones inoculados por vía oral con la cepa ***C. albicans*** **Ca 787. ND:** no hubo desarrollo de colonias. *: Desarrollo de ***C. pintolopesii.***

TABLA Nº 36: NÚMERO DE UFC/G EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON LA CEPA ***Candida albicans*** **Ca 485.**

Órgano	Tiempo Post-inoculación	R1 UFC/g x 10^4	R2 UFC/g x 10^4	R3 UFC/g x 10^4	R4 UFC/g x 10^4	R5 UFC/g x $10^4$5	% Porcentaje muestras (+)	Prom. UFC/g órgano x 10^4
Riñones	3 hs	0,092	ND	ND	ND	0,20	40% (2/5)	**0,058**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
Bazo	3 hs	0,031	0,11	0,23	ND	ND	60% (3/5)	**0,092**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
Hígado	3 hs	0,32	ND	0,12	0,10	0,097	80% (4/5)	**0,13**
	24 hs	ND	ND	ND	0,06	ND	20% (1/5)	**0,012**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (075)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
Estómago	3 hs	2,71	13,9	9,2	5,31	6,24	100% (5/5)	**7,47**
	24 hs	0,22	0,11	0,56	1,13	0,79	100% (5/5)	**0,56**
	48 hs	0,099	0,38	0,12	0,68	0,45	100% (5/5)	**0,35**
	1º semana	0,19	1,33	0,28	1,01	0,72	100% (5/5)	**0,71**
	2º semana	1,19	1,41	1,33	2,12	1,03	100% (5/5)	**1,42**
	3º semana	11,08	* 7,62	12,20	5,40	8,33	100% (5/5)	**8,93**
	4º semana	6,23	* 3,85	7,01	2,77	* 5,45	100% (5/5)	**5,06**
	5º semana	2,10	0,98	3,36	1,08	* 2,97	100% (5/5)	**2,10**
	6º semana	0,071	0,14	0,075	0,081	* 0,062	100% (5/5)	**0,086**
	7º semana	ND	ND	0,020	0,0032	0,0051	60% (3/5)	**0,0056**
	8º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
Intestino	3 hs	4.232,8	403,55	1.588,2	2.103,2	1.031,0	100% (5/5)	**1.871,75**
	24 hs	8,25	11,74	12,02	14,04	9,25	100% (5/5)	**11,06**
	48 hs	0,99	6,4	3,09	4,41	2,12	100% (5/5)	**3,40**
	1º semana	0,45	0,087	0,74	0,33	0,48	100% (5/5)	**0,42**
	2º semana	0,028	0,37	0,081	0,098	0,15	100% (5/5)	**0,14**
	3º semana	0,21	* 0,35	1,45	0,99	1,10	100% (5/5)	**0,82**
	4º semana	0,96	* 0,08	0,84	0,37	* 0,13	100% (5/5)	**0,47**
	5º semana	0,13	0,1	0,092	0,084	* 0,025	100% (5/5)	**0,086**
	6º semana	0,034	ND	0,021	0,030	* 0,011	80% (4/5)	**0,0192**
	7º semana	ND	ND	ND	0,007	0,0046	40% (2/5)	**0,0023**
	8º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**

Referencias: R1, R2, R3, R4, R5: diferentes lotes de ratones inoculados por vía oral con la cepa ***C. albicans*** **Ca 485. ND:** no hubo desarrollo de colonias. *: Desarrollo de ***C. pintolopesii.***

TABLA Nº 37: NÚMERO DE UFC/G EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON LA CEPA ***Candida albicans*** **CECT 1394.**

Órgano	Tiempo Post-inoculación	R1 UFC/g x 10^4	R2 UFC/g x 10^4	R3 UFC/g x 10^4	R4 UFC/g x 10^4	R5 UFC/g x $10^4$5	% Porcentaje muestras (+)	Prom. UFC/g órgano (x 10^4)
Riñones	3 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
Bazo	3 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
Hígado	3 hs	0,29	1,12	ND	0,88	ND	60% (3/5)	**0,49**
	24 hs	ND	0,64	ND	ND	ND	20% (1/5)	**0,13**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	**ND**
Estómago	3 hs	3,93	8,26	10,3	5,23	7,01	100% (5/5)	**7,99**
	24 hs	0,88	4,96	3,89	1,75	2,33	100% (5/5)	**2,76**
	48 hs	0,26	1,54	0,98	0,61	0,35	100% (5/5)	**0,94**
	1º semana	5,94	9,66	5,22	7,02	4,47	100% (5/5)	**6,46**
	2º semana	0,14	3,21	1,51	1,10	0,86	100% (5/5)	**1,36**
	3º semana	* 2,83	0,79	1,10	0,73	1,20	100% (5/5)	**1,33**
	4º semana	* 0,075	0,10	0,20	0,051	0,32	100% (5/5)	**0,15**
	5º semana	* 0,031	0,050	0,022	0,027	* 0,013	100% (5/5)	**0,029**
	6º semana	*0,0025	ND	ND	0,0016	* ND	40% (2/5)	**0,0008**
	7º semana	ND	ND	ND	ND	* ND	0% (0/5)	**ND**
	8º semana	ND	ND	ND	ND	* ND	0% (0/5)	**ND**
Intestino	3 hs	5.950,4	6.435,3	8.155,4	5.024,2	3.953,3	100% (5/5)	**5.903,72**
	24 hs	0,51	1,96	2,02	3,42	2,75	100% (5/5)	**2,13**
	48 hs	0,17	0,32	0,27	0,35	0,41	100% (5/5)	**0,30**
	1º semana	1,07	3,79	1,35	2,00	1,89	100% (5/5)	**2,02**
	2º semana	0,83	0,98	0,56	0,71	0,68	100% (5/5)	**0,75**
	3º semana	* 0,27	0,13	0,09	0,19	0,23	100% (5/5)	**0,16**
	4º semana	* 0,11	0,029	0,039	0,12	0,089	100% (5/5)	**0,077**
	5º semana	* 0,071	ND	0,023	0,082	* 0,025	80% (4/5)	**0,040**
	6º semana	* 0,006	ND	ND	0,002	* ND	40% (2/5)	**0,0016**
	7º semana	ND	ND	ND	ND	* ND	0% (0/5)	**ND**
	8º semana	ND	ND	ND	ND	* ND	0% (0/5)	**ND**

Referencias: R1, R2, R3, R4, R5: diferentes lotes de ratones inoculados por vía oral con la cepa ***C. albicans*** **CECT 1394. ND:** no hubo desarrollo de colonias. *: Desarrollo de ***C. pintolopesii.***

MB

TABLA Nº 38: NÚMERO UFC/G EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON LA CEPA ***Candida glabrata*** **Cg 751.**

Organo	Tiempo Post-inoculación	R1 UFC/g x 10^4	R2 UFC/g x 10^4	R3 UFC/g x 10^4	R4 UFC/g x 10^4	R5 UFC/g x 10^4	Porcentaje muestras (+)	Prom. UFC/g órgano x 10^4
Riñón	3 hs	ND	7,59	ND	1,55	ND	40 % (2/5)	**1,83**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Bazo	3 hs	ND	4,66	ND	ND	2,30	40 % (2/5)	**1,39**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Hígado	3 hs	0,13	0,96	0,75	ND	1,12	80 % (4/5)	**0,59**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Estómago	3 hs	4,64	3,61	5,20	10,63	2,76	100 % (5/5)	**5,34**
	24 hs	0,70	0,61	0,83	1,02	0,15	100 % (5/5)	**0,66**
	48 hs	0,26	0,18	0,091	0,17	0,082	100 % (5/5)	**0,16**
	1º semana	1,46	ND	ND	1,43	0,95	60 % (3/5)	**0,77**
	2º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	3º semana	* ND	ND	ND	ND	* ND	0 % (0/5)	**ND**
	4º semana	* ND	ND	ND	ND	* ND	0 % (0/5)	**ND**
Intestino	3 hs	2.376,5	2.552,4	4.327,1	2.824,3	1.883,7	100 % (5/5)	**2.792,8**
	24 hs	0,14	0,14	0,43	0,28	0,11	100 % (5/5)	**0,22**
	48 hs	0,42	0,19	0,15	0,76	0,09	100 % (5/5)	**0,32**
	1º semana	0,13	ND	ND	0,081	ND	40 % (2/5)	**0,042**
	2º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	3º semana	* ND	ND	ND	ND	* ND	0 % (0/5)	**ND**
	4º semana	* ND	ND	ND	ND	* ND	0 % (0/5)	**ND**

Referencias: R1, R2, R3, R4, R5: diferentes lotes de ratones inoculados por vía oral con la cepa ***C. glabrata*****, Cg 751. ND:** no hubo desarrollo de colonias. *: Desarrollo de ***C. pintolopesii.***

TABLA Nº 39: NÚMERO DE UFC/G EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON LA CEPA ***Candida krusei*** **Ck 615.**

Organo	Tiempo Post-inoculación	R1 UFC/g x 10^4	R2 UFC/g X 10^4	R3 UFC/g x 10^4	R4 UFC/g x 10^4	R5 UFC/g x 10^4	Porcentaje muestras (+)	Prom. UFC/g órgano x 10^4
Riñón	3 hs	0,62	ND	ND	1,21	ND	40 % (2/5)	**0,37**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Bazo	3 hs	0,58	ND	ND	1,98	ND	40 % (2/5)	**0,51**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Hígado	3 hs	0,19	ND	0,34	0,75	0,24	80 % (4/5)	**0,32**
	24 hs	0,07	ND	ND	ND	ND	20 % (1/5)	**0,014**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Estómago	3 hs	93,61	24,78	27,04	64,21	85,63	100 % (5/5)	**59,05**
	24 hs	0,073	0,023	0,289	0,155	0,12	100 % (5/5)	**0,13**
	48 hs	ND	ND	0,20	0,10	ND	40 % (2/5)	**0,06**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	2º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	3º semana	* ND	* ND	ND	* ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	4º semana	* ND	ND	ND	* ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Intestino	3 hs	140,8	40,06	353,01	254,33	75,32	100 % (5/5)	**172,70**
	24 hs	0,48	0,35	0,675	1,78	1,98	100 % (5/5)	**1,05**
	48 hs	6,16	ND	0,27	1,12	0,42	80 % (4/5)	**1,59**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	2º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	3º semana	* ND	* ND	ND	* ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	4º semana	* ND	* ND	ND	* ND	ND	0 % (0/5)	**ND**

Referencias: R1, R2, R3, R4, R5: diferentes lotes de ratones inoculados por vía oral con la cepa ***C. krusei*** **Ck 615.** **ND:** no hubo desarrollo de colonias. *: Desarrollo de ***C. pintolopesii.***

TABLA Nº 40: NÚMERO DE UFC/G EN ÓRGANOS DE RATONES INOCULADOS CON LA CEPA ***Candida lusitaniae*** **CI 670**.

Organo	Tiempo Post-inoculación	R1 UFC x10^4	R2 UFC x10^4	R3 UFC x10^4	R4 UFC x10^4	R5 UFC x10^4	Porcentaje muestras (+)	Prom. UFC/g órgano x10^4
Riñón	3 hs	2,64	0,61	0,49	ND	ND	60 % (3/5)	**0,75**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Bazo	3 hs	0,41	ND	0,62	ND	ND	40 % (2/5)	**0,21**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Hígado	3 hs	0,97	ND	0,19	ND	ND	40 % (2/5)	**0,23**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Estómago	3 hs	2,12	10,44	5,16	3,30	4,55	100% (5/5)	**5,11**
	24 hs	0,59	3,77	0,29	1,09	2,04	100 % (5/5)	**7,78**
	48 hs	2,03	2,32	0,12	0,15	1,75	100 % (5/5)	**1,27**
	1º semana	0,53	ND	ND	ND	ND	20 % (1/5)	**0,106**
	2º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	3º semana	ND	ND	* ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	4º semana	ND	* ND	* ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Intestino	3 hs	1.980,3	6.549,1	5.203,5	1.541,4	2.724,1	100 % (5/5)	**3.599,68**
	24 hs	80,92	74,33	33,92	57,85	63,01	100 % (5/5)	**62,00**
	48 hs	22,34	11,25	3,3	1,78	5,88	100 % (5/5)	**8,91**
	1º semana	0,87	ND	ND	0,95	ND	40 % (2/5)	**0,36**
	2º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	3º semana	ND	ND	* ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	4º semana	ND	* ND	* ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**

Referencias: **R1, R2, R3, R4, R5**: diferentes lotes de ratones inoculados por vía oral con la cepa ***C. lusitaniae*** **CI 670. ND:** no hubo desarrollo de colonias. *: Desarrollo de ***C. pintolopesii.***

TABLA Nº 41: NÚMERO DE UFC/G EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON LA CEPA ***Candida parapsilosis*** **Cp 345**.

Organo	Tiempo Post-inoculación	R1 UFC x10^4	R2 UFC x10^4	R3 UFC x10^4	R4 UFC x10^4	R5 UFC x10^4	Porcentaje muestras (+)	Prom. UFC/g órgano x10^4
Riñón	3 hs	ND	0,28	ND	0,35	ND	40 % (2/5)	**0,13**
	24 hs	0,67	ND	ND	ND	ND	20 % (1/5)	**0,13**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Bazo	3 hs	3,4	2,15	ND	1,03	ND	60 % (3/5)	**1,31**
	24 hs	1,63	ND	ND	ND	ND	20 % (1/5)	**0,32**
	48 hs	0,17	ND	ND	ND	ND	20 % (1/5)	**0,034**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Hígado	3 hs	0,49	0,11	0,33	0,13	ND	80 % (4/5)	**0,21**
	24 hs	0,17	0,055	ND	ND	ND	40 % (2/5)	**0,045**
	48 hs	0,075	0,019	ND	ND	ND	40 % (2/5)	**0,019**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Estómago	3 hs	28,57	25,51	30,01	18,93	24,25	100% (5/5)	**25,45**
	24 hs	2,50	9,27	3,88	5,40	6,69	100 % (5/5)	**5,55**
	48 hs	1,03	12,9	4,30	3,34	5,24	100 % (5/5)	**5,36**
	1º semana	0,42	0,22	0,75	0,35	1,02	100 % (5/5)	**0,552**
	2º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	3º semana	* ND	ND	ND	* ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	4º semana	ND	ND	ND	* ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Intestino	3 hs	1.084,6	5.716,9	3.225,8	2.024,1	997,0	100 % (5/5)	**2.609,68**
	24 hs	10,6	85,8	25,30	47,04	38,70	100 % (5/5)	**41,49**
	48 hs	0,76	4,57	3,24	6,01	1,80	100 % (5/5)	**3,27**
	1º semana	ND	0,36	0,51	0,62	ND	60 % (3/5)	**0,29**
	2º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	3º semana	* ND	ND	ND	* ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	4º semana	ND	ND	ND	* ND	ND	0 % (0/5)	**ND**

Referencias: **R1, R2, R3, R4, R5**: diferentes lotes de ratones inoculados por vía oral con la cepa ***C. parapsilosis*** **Cp 345. ND:** no hubo desarrollo de colonias. *: Desarrollo de ***C. pintolopesii.***

TABLA Nº 42: NÚMERO DE UFC/G EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON LA CEPA ***Candida tropicalis*** **Ct 508**.

Organo	Tiempo Post-inoculación	R1 UFC x10^4	R2 UFC x10^4	R3 UFC x10^4	R4 UFC x10^4	R5 UFC x10^4	Porcentaje muestras (+)	Prom. UFC/g órgano x10^4
Riñón	3 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (3/5)	**ND**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Bazo	3 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Hígado	3 hs	0,19	ND	ND	ND	0,63	40 % (2/5)	**0,16**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Estómago	3 hs	47,52	33,33	23,41	28,00	20,42	100% (5/5)	**30,54**
	24 hs	0,69	0,81	0,22	0,63	0,17	100 % (5/5)	**0,50**
	48 hs	0,021	0,046	0,083	0,025	0,071	100 % (5/5)	**0,049**
	1º semana	2,69	0,81	ND	ND	0,97	60 % (3/5)	**0,089**
	2º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (5/5)	**ND**
	3º semana	* ND	* ND	ND	* ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	4º semana	* ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Intestino	3 hs	588,90	590,84	136,02	105,32	388,02	100 % (5/5)	**361,82**
	24 hs	17,65	2,46	11,13	2,99	9,71	100 % (5/5)	**8,79**
	48 hs	3,44	1,35	0,75	2,15	1,87	100 % (5/5)	**1,91**
	1º semana	5,7	0,97	1,79	ND	2,43	80 % (4/5)	**2,17**
	2º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	3º semana	* ND	* ND	ND	* ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	4º semana	* ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**

Referencias: **R1, R2, R3, R4, R5**: diferentes lotes de ratones inoculados por vía oral con la cepa ***C. tropicalis*** **Ct 508. ND:** no hubo desarrollo de colonias. *: Desarrollo de ***C. pintolopesii.***

TABLA Nº 43: NÚMERO DE UFC/G EN ÓRGANOS DE RATONES INOCULADOS CON LA CEPA ***C. albicans*** **Ca 787, filamentizada.**

Órgano	Tiempo Post-infección	Rf1 UFC/g x 10^4	Rf2 UFC/g x 10^4	Rf3 UFC/g x 10^4	Rf4 UFC/g x 10^4	Rf5 UFC/g x 10^45	% Porcentaje muestras (+)	Prom. UFC/g órgano (x 10^4)
Riñones	3 hs	5,08	0,212	1,06	ND	ND	60% (3/5)	1,27
	24 hs	1,65	3,24	ND	ND	ND	40% (2/5)	0,978
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	ND
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	ND
Bazo	3 hs	4,55	ND	0,72	3,2	ND	60% (3/5)	1,69
	24 hs	0,39	4,6	ND	ND	ND	0% (0/5)	1,00
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	ND
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	ND
Hígado	3 hs	0,36	2,70	0,62	1,43	0,31	100% (5/5)	1,10
	24 hs	0,27	ND	ND	0,09	ND	40% (2/5)	0,072
	48 hs	0,01	3,4	ND	ND	0,19	60% (3/5)	0,72
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0% (0/5)	ND
Estómago	3 hs	4,60	6,13	2,75	5,63	8,60	100% (5/5)	5,54
	24 hs	2,90	3,12	1,10	2,25	3,84	100% (5/5)	2,64
	48 hs	4,06	1,20	0,09	0,33	0,22	100% (5/5)	1,18
	1º semana	10,85	18,54	10,13	5,60	11,86	100% (5/5)	11,39
	2º semana	26,51	7,64	9,87	8,5	3,99	100% (5/5)	13,30
	3º semana	* 4,80	6,26	10,60	7,58	* 5,79	100% (5/5)	7,00
	4º semana	3,08	3,53	9,89	6,33	* 6,89	100% (5/5)	5,94
	5º semana	3,95	3,02	7,02	4,82	* 5,23	100% (5/5)	4,80
	6º semana	2,88	2,96	5,43	4,17	* 9,80	100% (5/5)	5,05
	7º semana	1.06	0,99	1,02	0,55	* 0,97	100% (5/5)	0,92
	8º semana	0,0081	0,0011	ND	0,0057	* ND	60% (3/5)	0,0029
Intestino	3 hs	1.671,4	2.242,0	2.950,9	1.505,3	4.451,5	100% (5/5)	2.564,20
	24 hs	52,2	10,66	25,2	21,47	113,0	100% (5/5)	44,50
	48 hs	0,78	0,61	0,54	0,76	1,55	100% (5/5)	0,85
	1º semana	4,18	5,67	2,58	7,95	5,9	100% (5/5)	5,25
	2º semana	4,35	4,02	4,6	2,68	4,21	100% (5/5)	3,91
	3º semana	* 0,11	2,19	0,30	0,24	* 0,14	100% (5/5)	0,71
	4º semana	* 0,26	0,48	0,10	0,24	* 0,042	100% (5/5)	0,22
	5º semana	0,21	0,39	0,11	0,20	* 0,15	100% (5/5)	0,21
	6º semana	0,16	0,20	0,09	0,25	* 0,35	100% (5/5)	0,21
	7º semana	0,025	0,0066	0,0085	0,0099	* 0,013	100% (5/5)	0,013
	8º semana	0,0012	0,0013	ND	ND	ND	40% (2/5)	0,0005

Referencias: **Rf1, Rf2, Rf3, Rf4, Rf5**: diferentes lotes de ratones inoculados por vía oral con la cepa ***C. albicans*** **Ca 787, filamentizada. ND:** no hubo desarrollo de colonias. *: Desarrollo de ***C. pintolopesii.***

TABLA Nº 44: RECUENTO DE UFC/G EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON LA CEPA ***C. albicans*** **Ca 787**, CRECIDA EN MEDIO **YNB+SACAROSA 500 mM**.

Órgano	Tiempo Post-inoculación	R1 UFC/g x10⁴	R2 UFC/g x10⁴	R3 UFC/g x10⁴	R4 UFC/g x10⁴	R5 UFC/g x10⁴	Porcentaje muestras (+)	Prom. UFC/g órgano x10⁴
Riñón	3 hs	0,123	ND	ND	0,42	ND	40 % (2/5)	**0,11**
	24 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Bazo	3 hs	3,85	ND	2,21	ND	1,03	60 % (3/5)	**2,36**
	24 hs	ND	0,18	0,32	ND	ND	40 % (2/5)	**0,10**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Hígado	3 hs	0,38	ND	2,10	0,75	1,65	80 % (4/5)	**0,98**
	24 hs	0,16	2,81	0,25	ND	ND	60 % (3/5)	**0,64**
	48 hs	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
	1º semana	ND	ND	ND	ND	ND	0 % (0/5)	**ND**
Estómago	3 hs	20,52	56,04	30,20	43,15	33,40	100% (5/5)	**36,66**
	24 hs	4,21	12,97	7,40	5,62	8,23	100 % (5/5)	**7,69**
	48 hs	7,16	4,16	5,20	3,24	5,05	100 % (5/5)	**4,96**
	1º semana	12,62	14,80	10,81	15,01	16,60	100 % (5/5)	**13,99**
	2º semana	18,25	4,96	11,04	14,01	9,83	100 % (5/5)	**11,62**
	3º semana	10,06	* 7,82	12,91	* 9,23	12,80	100 % (5/5)	**10,56**
	4º semana	7.22	2,85	6,50	* 3,20	4,47	100 % (5/5)	**4,85**
	5º semana	5,40	4,26	3,21	* 1,15	3,02	100 % (5/5)	**3,41**
	6º semana	0,09	0,50	0,21	* 0,089	0,31	100 % (5/5)	**0,24**
	7º semana	0,075	0,085	0,091	0,020	0,069	100 % (5/5)	**0,052**
	8º semana	ND	0,0023	ND	0,0013	0,0035	60 % (3/5)	**0,0014**
Intestino	3 hs	9.030,8	6.987,1	7.234,2	8.076,1	5.327,4	100 % (5/5)	**7.331,13**
	24 hs	111,84	62,25	77,24	93,40	101,80	100 % (5/5)	**89,31**
	48 hs	28,28	12,36	23,11	18,35	15,98	100 % (5/5)	**19,62**
	1º semana	37,48	23,99	25,20	28,02	35,04	100 % (5/5)	**29,95**
	2º semana	2,17	1,70	3,18	4,39	1,98	100 % (5/5)	**2,68**
	3º semana	0,18	* 0,13	0,89	* 0,45	0,35	100 % (5/5)	**0,40**
	4º semana	0,11	0,039	0,13	* 0,10	0,17	100 % (5/5)	**0,11**
	5º semana	0,083	0,065	0,088	* 0,071	0,012	100 % (5/5)	**0,064**
	6º semana	0,062	ND	0,035	* 0,025	0,084	80 % (4/5)	**0,041**
	7º semana	0,025	ND	0,0060	0,0074	0,0015	80 % (4/5)	**0,0079**
	8º semana	ND	ND	ND	0,0012	0,0022	40 % (2/5)	**0,0007**

Referencias: **R1, R2, R3, R4, R5**: diferentes lotes de ratones inoculados por vía oral con la cepa ***C. albicans*** **Ca 787, crecida en Sacarosa 500 mM. ND:** no hubo desarrollo de colonias. *: Desarrollo de ***C. pintolopesii.***

III.3.1.1- EVOLUCIÓN DE LA COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE LAS CEPAS DE *C. albicans*

La capacidad de colonización de las levaduras se midió a través de la persistencia de las mismas en el TGI de los ratones (estómago e intestino); la capacidad de diseminación, a través de la detección y persistencia de las mismas en los riñones, bazo e hígado de los ratones.

a) *C. albicans* Ca 333

De acuerdo a los resultados que figuran en la **Tabla Nº 34**, el **GRÁFICO Nº 20** muestra la evolución, a través del tiempo, de la diseminación y colonización de esta cepa en los diferentes órganos de los ratones.

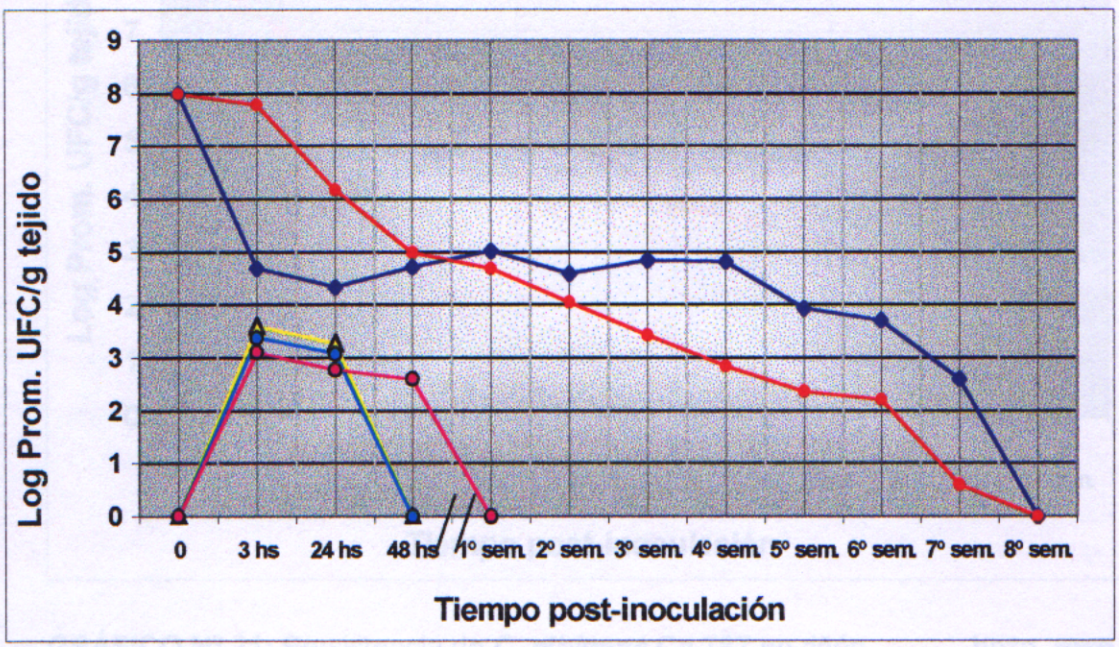


GRÁFICO Nº 20: Persistencia de ***C. albicans*** **Ca 333** en riñón ;bazo ,hígado , estómago e intestino de ratón. Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

La cepa de ***C. albicans*** **Ca 333**, se diseminó a riñón bazo e hígado y persistió en este último órgano hasta las 48 hs.

En estómago e intestino la levadura permaneció hasta la 6° semana, para el 100% de los animales inoculados, negativizándose a la 8° .

b) *C. albicans* Ca 787

De acuerdo a los resultados que figuran en la **Tabla N° 35**, el **GRÁFICO N° 21** muestra la evolución, a través del tiempo, de la diseminación y colonización de esta cepa en los diferentes órganos de los ratones.

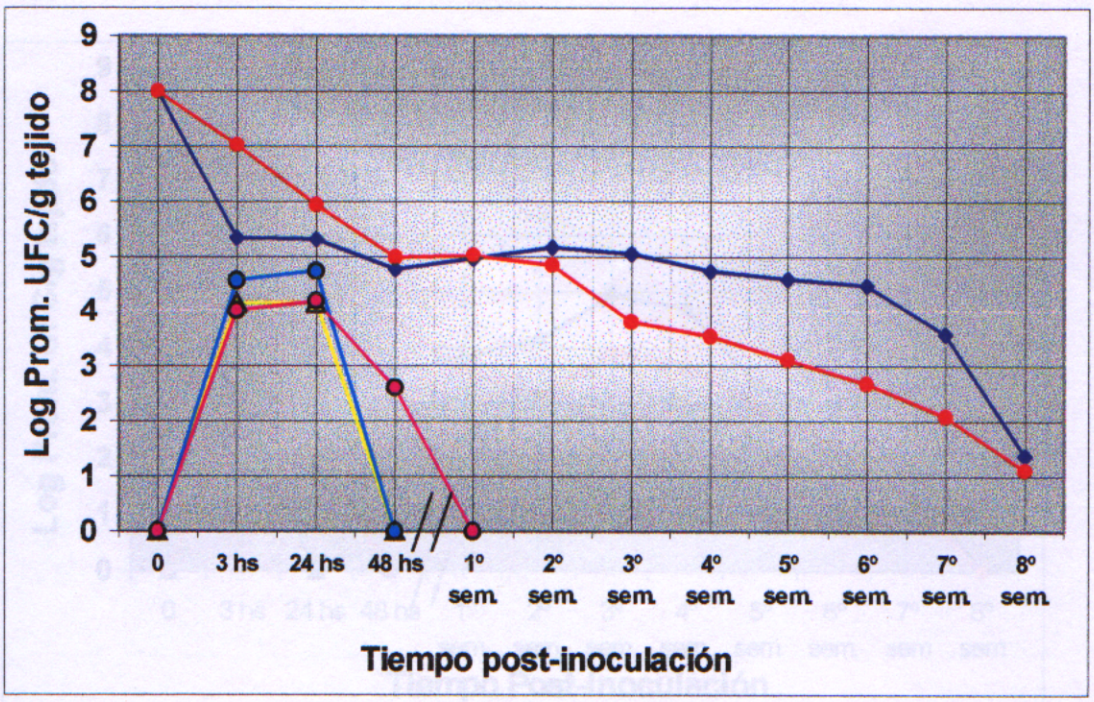


GRÁFICO N° 21: Persistencia de ***C. albicans*** **Ca 787** en riñón —— , bazo —— hígado —— , estómago —— e intestino —— de ratón. Cada punto representa el promedio de UFC/g de 5 ratones.

La cepa de ***C. albicans*** **Ca 787**, se diseminó a riñón, bazo e hígado y persistió en este último órgano hasta las 48 hs.

La permanencia de la cepa **Ca 787** en estómago e intestino fue de 7 y 6 semanas, respectivamente, para el 100% de los animales, y persistió hasta la 8° semana en ambos órganos.

c) *C. albicans* Ca 485

De acuerdo a los resultados que figuran en la **Tabla Nº 36**, el **GRÁFICO Nº 22** muestra la evolución, a través del tiempo, de la diseminación y colonización de esta cepa en los diferentes órganos de los ratones.

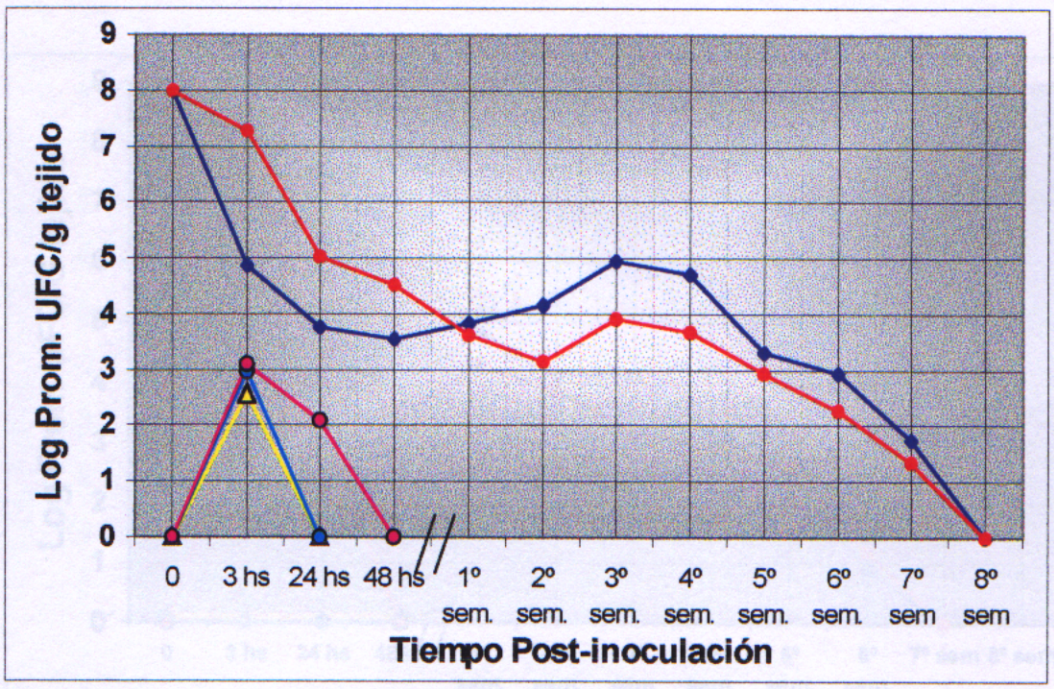


GRÁFICO Nº 22: Persistencia de ***C. albicans*** **Ca 485** en riñón ——, bazo —— hígado ——, estómago —— e intestino —— de ratón. Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

La cepa de ***C. albicans*** **Ca 485**, se diseminó a riñón, bazo e hígado y persistió en este último órgano hasta las 24 hs.

La permanencia de esta cepa en estómago e intestino fue de 6 y 5 semanas, respectivamente, para el 100% de los animales, y persistió hasta la 7º semana en ambos órganos.

d) *C. albicans* Ca CECT 1394

De acuerdo a los resultados que figuran en la **Tabla Nº 37**, el **GRÁFICO Nº 23** muestra la evolución, a través del tiempo, de la diseminación y colonización de esta cepa en los diferentes órganos de los ratones.

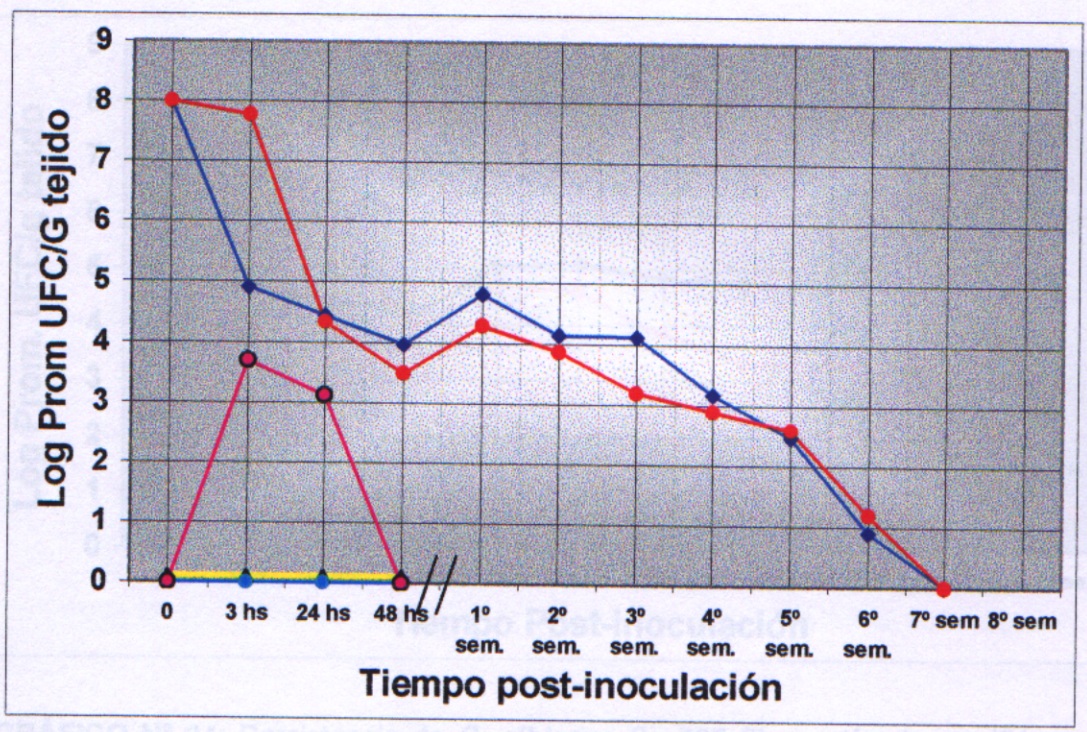


GRÁFICO Nº 23: Persistencia de ***C. albicans*** **Ca CECT 1394** en riñón —, bazo — hígado —, estómago — e intestino — de ratón. Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

La cepa de ***C. albicans* Ca CECT 1394**, se diseminó sólo a hígado y persistió en este órgano hasta las 24 hs.

En estómago e intestino, esta cepa permaneció 5 y 4 semanas, respectivamente, para el 100% de los animales, y persistió hasta la 6° semana para ambos órganos.

e) *C. albicans* Ca 787 filamentizada

De acuerdo a los resultados que figuran en la **Tabla N° 43**, el **GRÁFICO N° 24** muestra la evolución, a través del tiempo, de la diseminación y colonización de esta cepa en los diferentes órganos de los ratones.

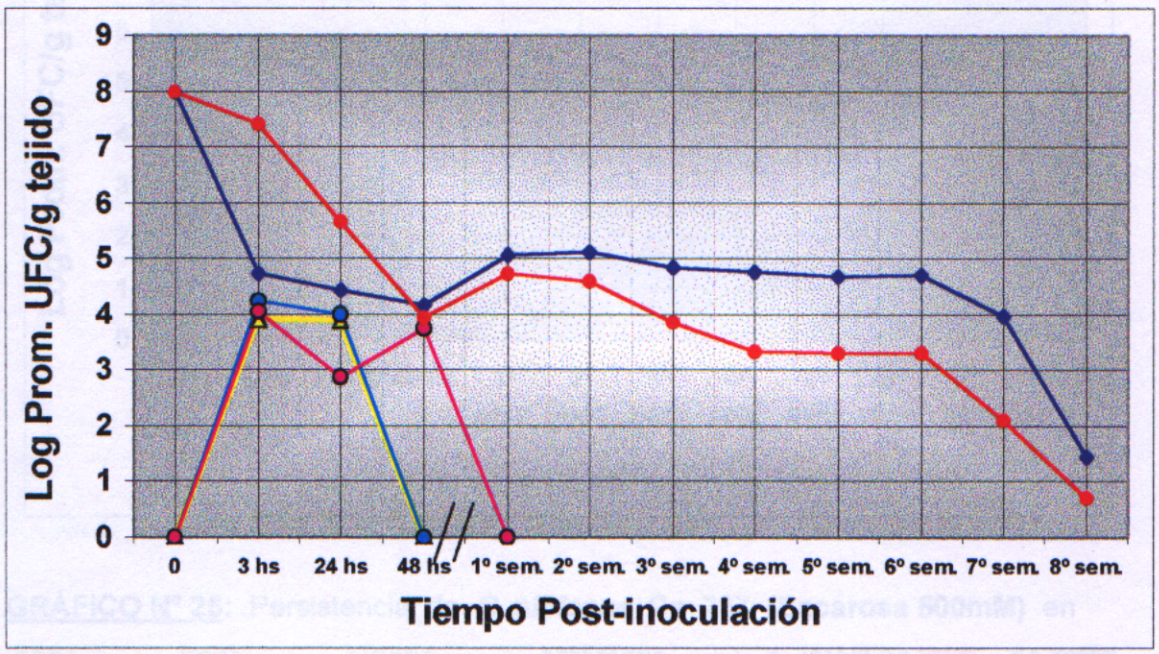


GRÁFICO N° 24: Persistencia de ***C. albicans* Ca 787 filamentizada** en riñón —, bazo —, hígado —, estómago — e intestino — de ratón. Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

La cepa de ***C. albicans* Ca 787 filamentizada**, se diseminó a riñón, bazo e hígado y persistió en este último órgano hasta las 48 hs.

La colonización del estómago e intestino se prolongó hasta la 7° semana para el 100% de los animales, y persistió hasta la 8° semana en ambos órganos.

f) *C. albicans* Ca 787, crecida en **sacarosa 500mM**

De acuerdo a los resultados que figuran en la **Tabla N° 44**, el **GRÁFICO N° 25** muestra la evolución, a través del tiempo, de la diseminación y colonización de esta cepa en los diferentes órganos de los ratones.

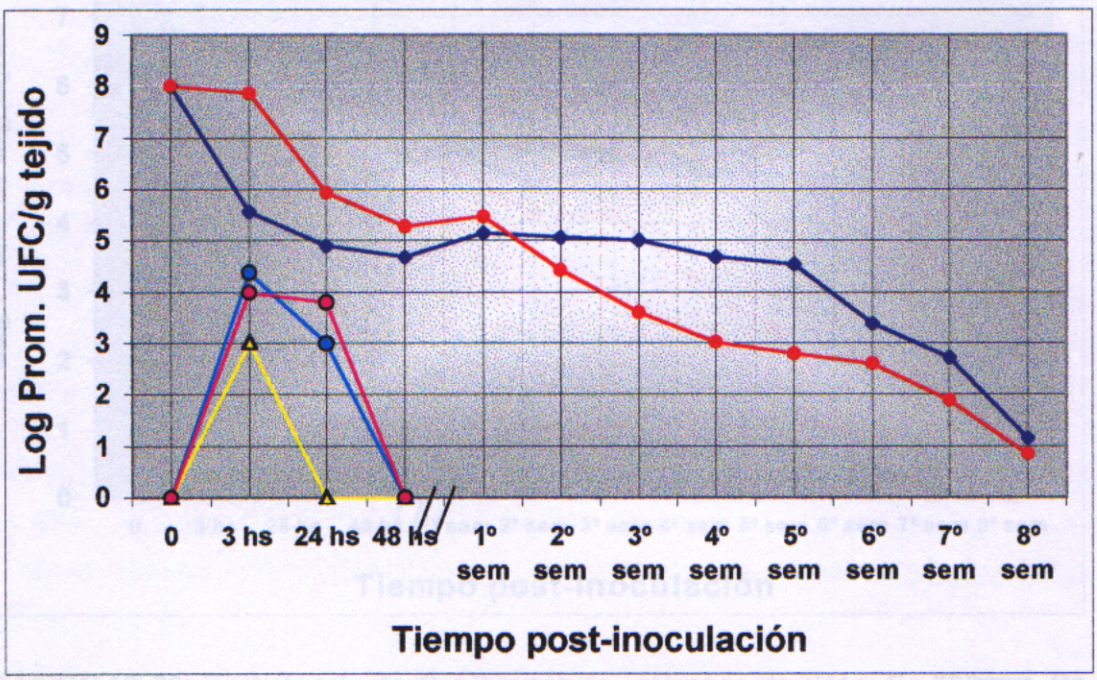


GRÁFICO N° 25: Persistencia de ***C. albicans* Ca 787 (Sacarosa 500mM)** en riñón —, bazo —, hígado —, estómago — e intestino — de ratón. Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

***C. albicans* Ca 787 crecida en 500mM de sacarosa**, se diseminó a riñón, bazo e hígado y persistió en los dos últimos órganos hasta las 24 hs.

La colonización en estómago e intestino persistió hasta la 7º y 5º semana, respectivamente, para el 100% de los animales y se prolongó en ambos órganos hasta la 8º semana.

El **GRÁFICO Nº 26** muestra la evolución, a través del tiempo, de la colonización de las distintas cepas de ***Candida albicans*** en estómago de ratones inoculados con una suspensión de 1 x 10^8 levaduras de dichas cepas.

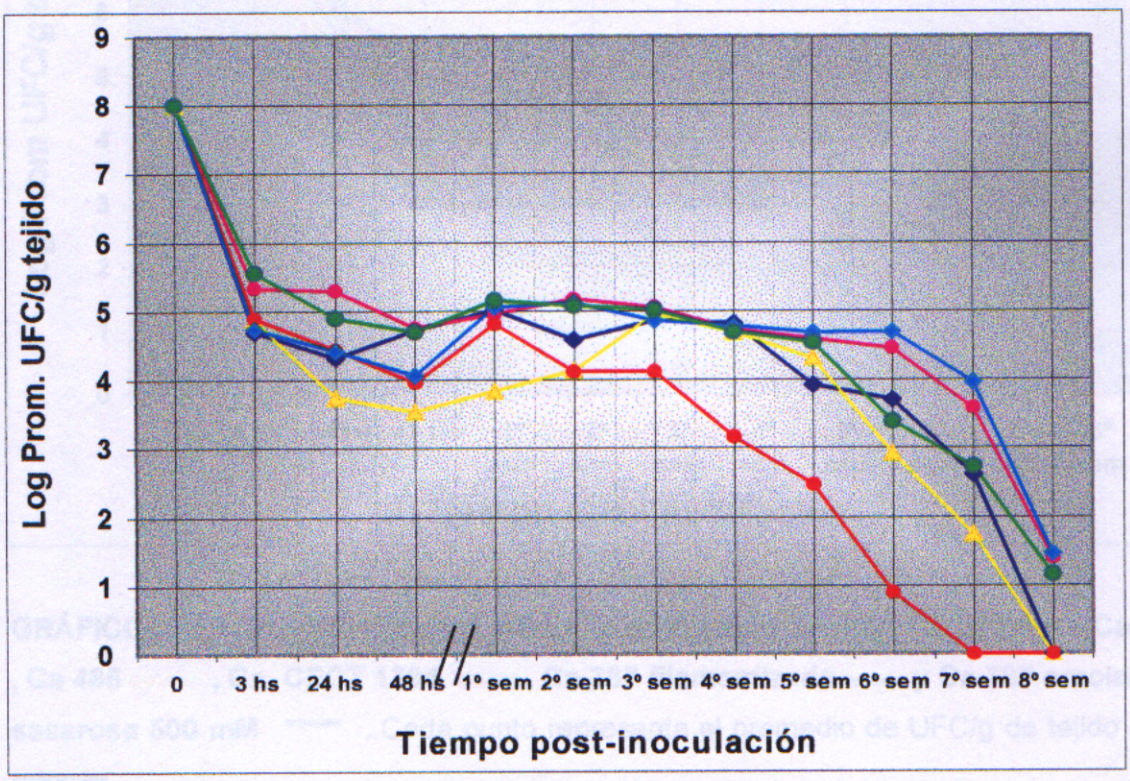


GRÁFICO Nº 26: Persistencia de ***C. albicans*** en estómago de ratón: **Ca 333** **Ca 787** , **Ca 485** , **Ca CECT 1394** , **Ca 787 filamentizada** y **Ca 787 crecida en sacarosa 500 mM** . Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de ratones.

Para todas las cepas de ***C. albicans*** inoculadas se observó una evolución similar de la colonización del estómago a través del tiempo.

El **GRÁFICO Nº 27** muestra la evolución, a través del tiempo, de la colonización de las distintas cepas de ***Candida albicans*** en intestino de ratones inoculados con una suspensión de 1 x 10^8 levaduras de dichas cepas.

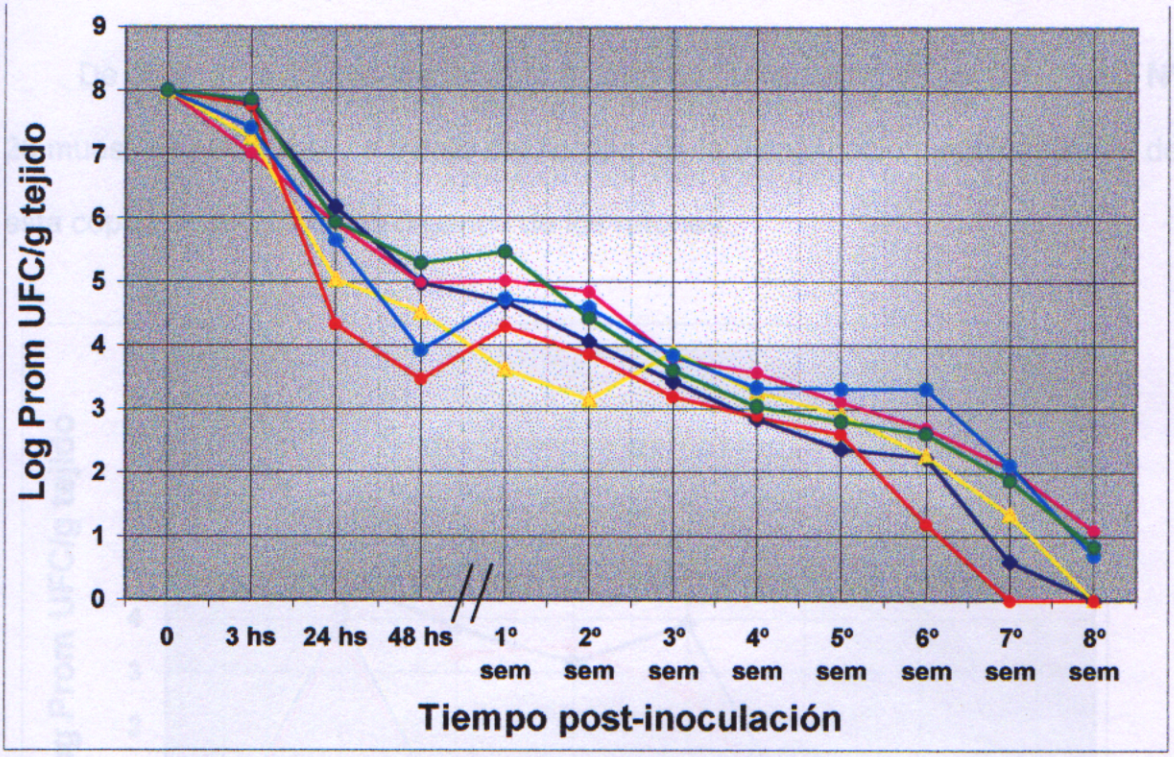


GRÁFICO Nº 27: Persistencia de ***C. albicans*** en intestino de ratón: **Ca 333** ——, **Ca 787** ——, **Ca 485** ——, **Ca CECT 1394** ——, **Ca 787 filamentizada** —— **y Ca 787 crecida en sacarosa 500 mM** ——. Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

Para todas las cepas de ***C. albicans*** inoculadas se observó una evolución similar de la colonización en intestino a través del tiempo.

III.3.1.2- EVOLUCIÓN DE LA COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE LAS CEPAS DE *Candida spp*

a) *C. glabrata* Cg 751

De acuerdo a los resultados que figuran en la **Tabla Nº 38**, el **GRÁFICO Nº 28** muestra la evolución, a través del tiempo, de la diseminación y colonización de esta cepa en los diferentes órganos de los ratones.

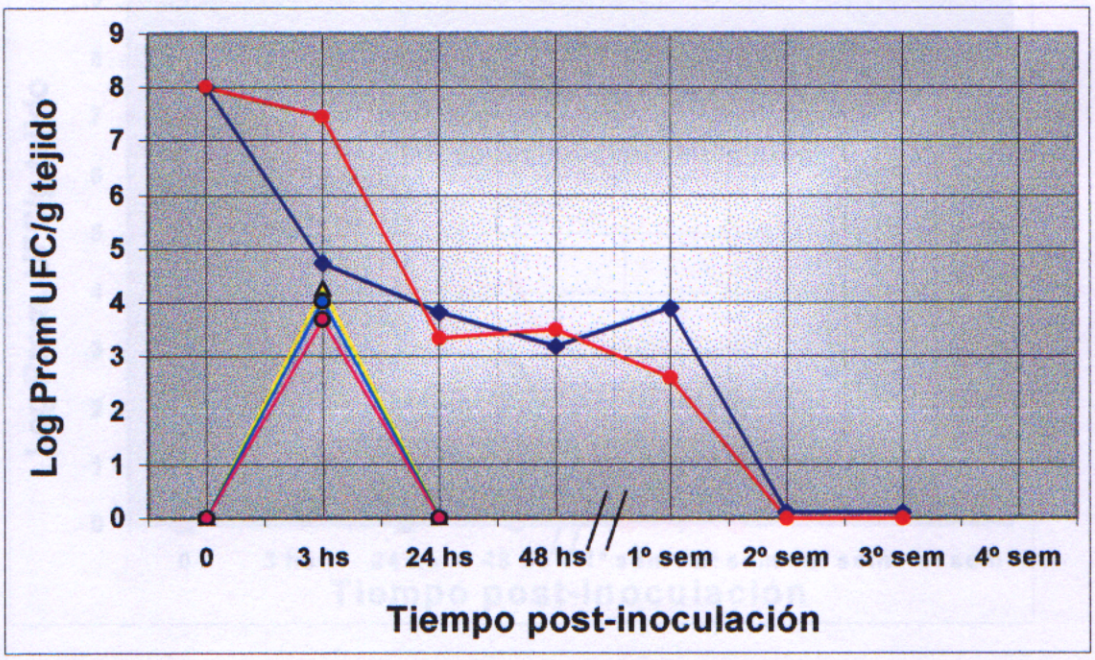


GRÁFICO Nº 28: Persistencia de ***C. glabrata*** **Cg 751** en riñón ——, bazo —— hígado ——, estómago —— e intestino —— de ratón. Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

La cepa de ***C. glabrata*** **Cg 751**, se diseminó a riñón, bazo e hígado y fue detectada en estos tejidos sólo hasta las 3 hs.

La permanencia en el TGI de los ratones (estómago e intestino) fue de 1 semana (hasta las 48 hs para el 100% de los animales), no registrándose ningún aislamiento a la 2° semana post-inoculación.

b) *C. krusei* Ck 615

De acuerdo a los resultados que figuran en la **Tabla N° 39**, el **GRÁFICO N° 29** muestra la evolución, a través del tiempo, de la diseminación y colonización de esta cepa en los diferentes órganos de los ratones.

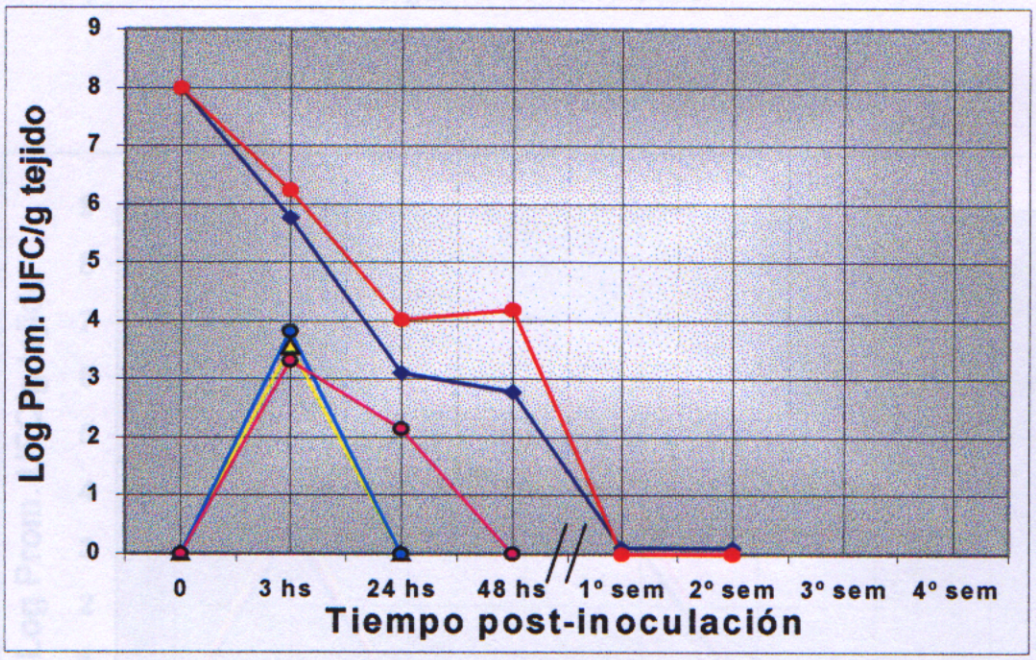


GRÁFICO N° 29: Persistencia de ***C. krusei* Ck 615** en riñón ——, bazo ——, hígado ——, estómago ——— e intestino ——— de ratón. Cada punto representa el promedio de UFC/ g de tejido de 5 ratones.

La cepa de ***C. krusei* Ck 615**, se diseminó a riñón, bazo e hígado y fue detectada en estos tejidos sólo hasta las 3 hs.

La permanencia en estómago e intestino fue de 24 hs para el 100% de los animales y de 48 hs, para el 40% de los animales en estómago y para el 80% de los animales en intestino, no registrándose ningún aislamiento a la 1° semana post-inoculación

c) *C. lusitaniae* CI 670

De acuerdo a los resultados que figuran en la **Tabla N° 40**, el **GRÁFICO N° 30** muestra la evolución, a través del tiempo, de la diseminación y colonización de esta cepa en los diferentes órganos de los ratones.

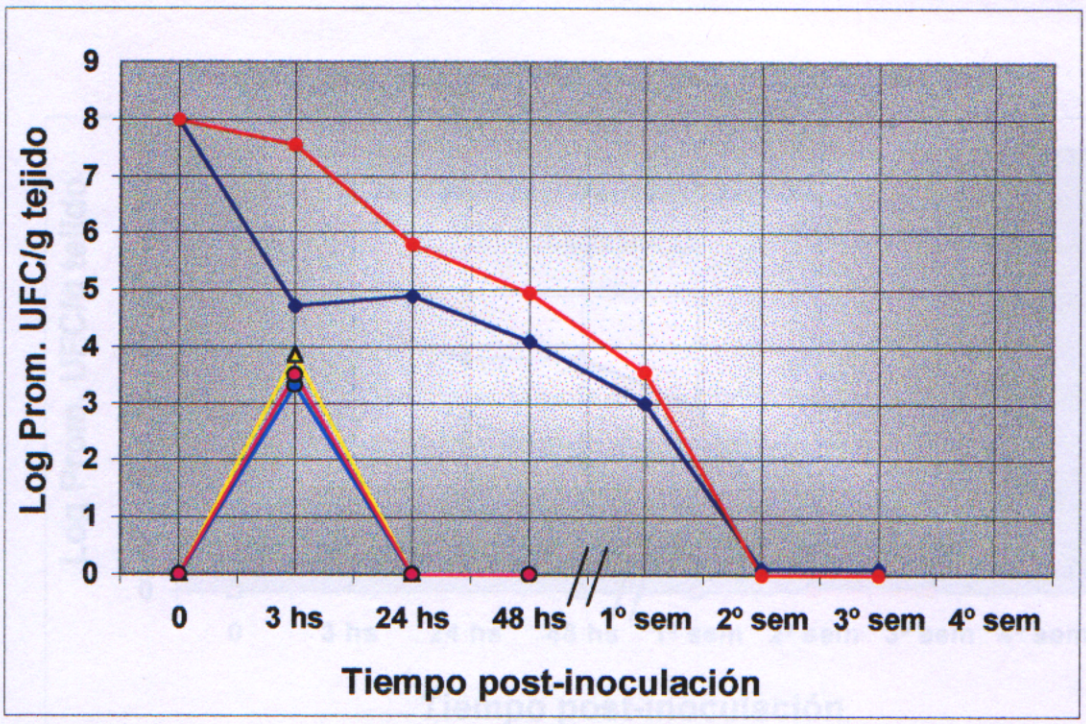


GRÁFICO N° 30: Persistencia de ***C. lusitaniae* CI 670** en riñón ——, bazo ——, hígado ——, estómago —— e intestino —— de ratón. Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

La cepa de ***C. lusitaniae* CI 670**, se diseminó a riñón, bazo e hígado y fue detectada en estos órganos solamente hasta las 3 hs.

La colonización del estómago e intestino se prolongó hasta la 1° semana, (hasta las 48 hs para el 100% de los animales) negativizándose a la 2° semana posterior a la inoculación.

d) *C. parapsilosis* Cp 345

De acuerdo a los resultados que figuran en la **Tabla N° 41**, el **GRÁFICO N° 31** muestra la evolución, a través del tiempo, de la diseminación y colonización de esta cepa en los diferentes órganos de los ratones.

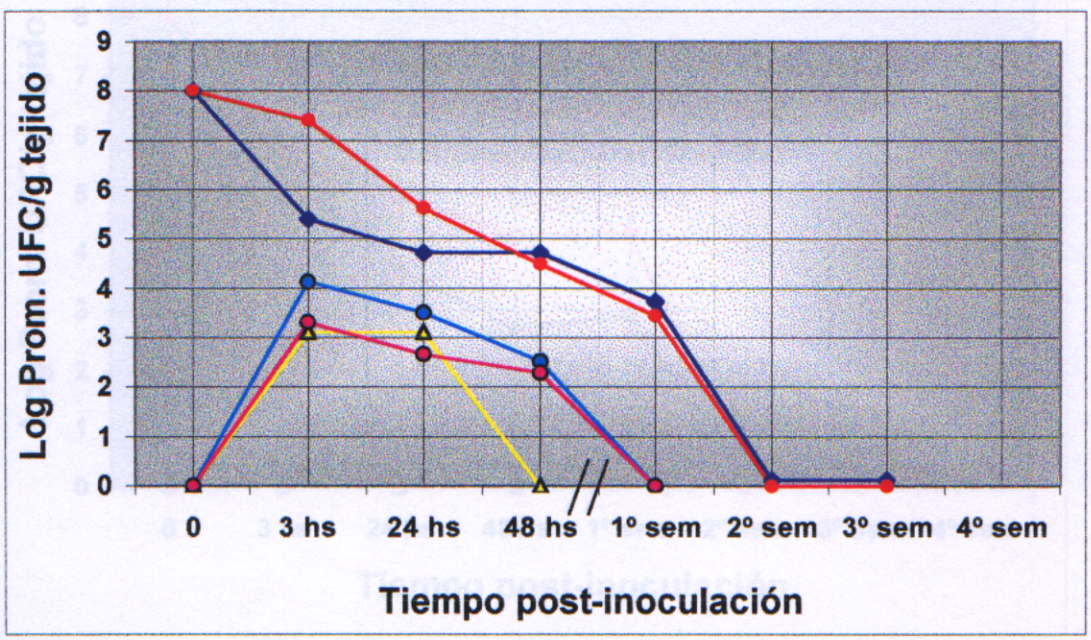


GRÁFICO N° 31: Persistencia de ***C. parapsilosis* Cp 345** en riñón ——, bazo ——, hígado ——, estómago —— e intestino —— de ratón. Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

La cepa de ***C. parapsilosis*** **Cp 345**, se diseminó a riñón, bazo e hígado y fue detectada en los dos últimos órganos hasta las 48 hs.

La permanencia en el TGI de los ratones fue de 1 semana (hasta las 48 hs para el 100% de los animales), no registrándose ningún aislamiento a la 2° semana post-inoculación.

e) *C. tropicalis* Ct 508

De acuerdo a los resultados que figuran en la **Tabla N° 42**, el **GRÁFICO N° 32** muestra la evolución, a través del tiempo, de la diseminación y colonización de esta cepa en los diferentes órganos de los ratones.

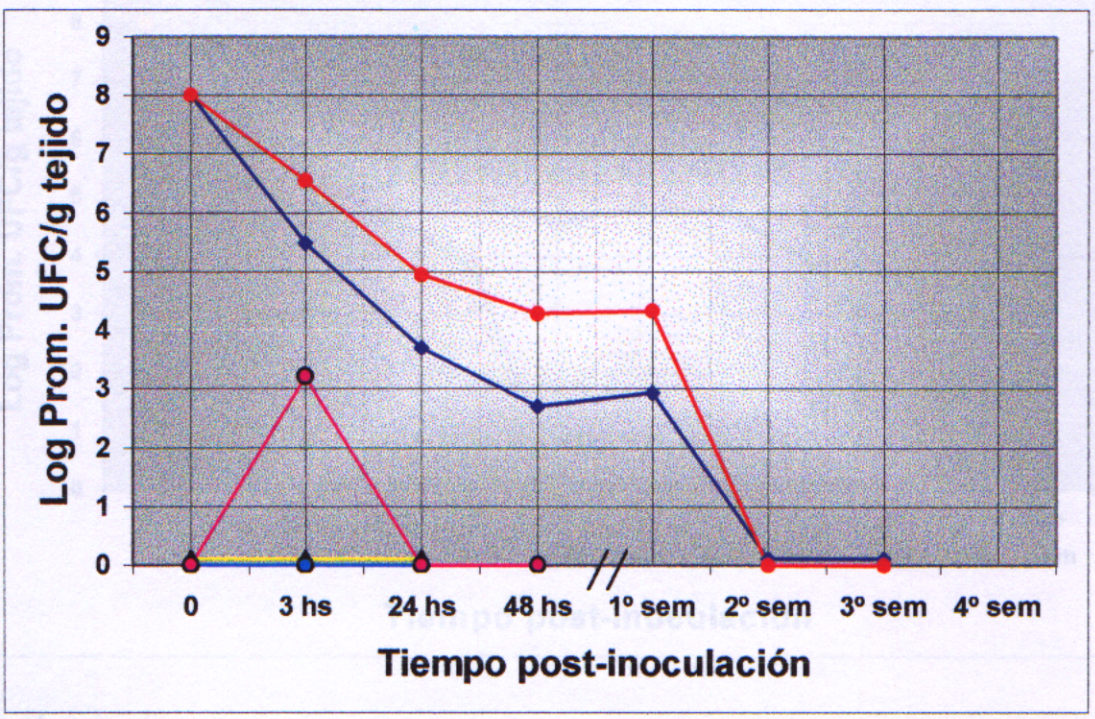


GRÁFICO N° 32: Persistencia de ***C. tropicalis*** **Ct 508** en riñón, bazo, hígado, estómago e intestino de ratón. Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

La cepa de ***C. tropicalis*** **Ct 508**, se diseminó sólo a hígado y fue detectada en este último órgano hasta las 3 hs.

Estómago e intestino fueron colonizados hasta la 1° semana (hasta las 48 hs para el 100% de los animales), no registrándose ningún aislamiento a la 2° semana post-inoculación.

El **GRÁFICO N° 33** muestra la evolución, a través del tiempo, de la colonización de las distintas cepas de ***Candida spp*** y de las cepas de ***C. albicans*** **Ca 787 y Ca 333** en estómago de ratones inoculados con una suspensión de 1×10^8 levaduras de dichas cepas.

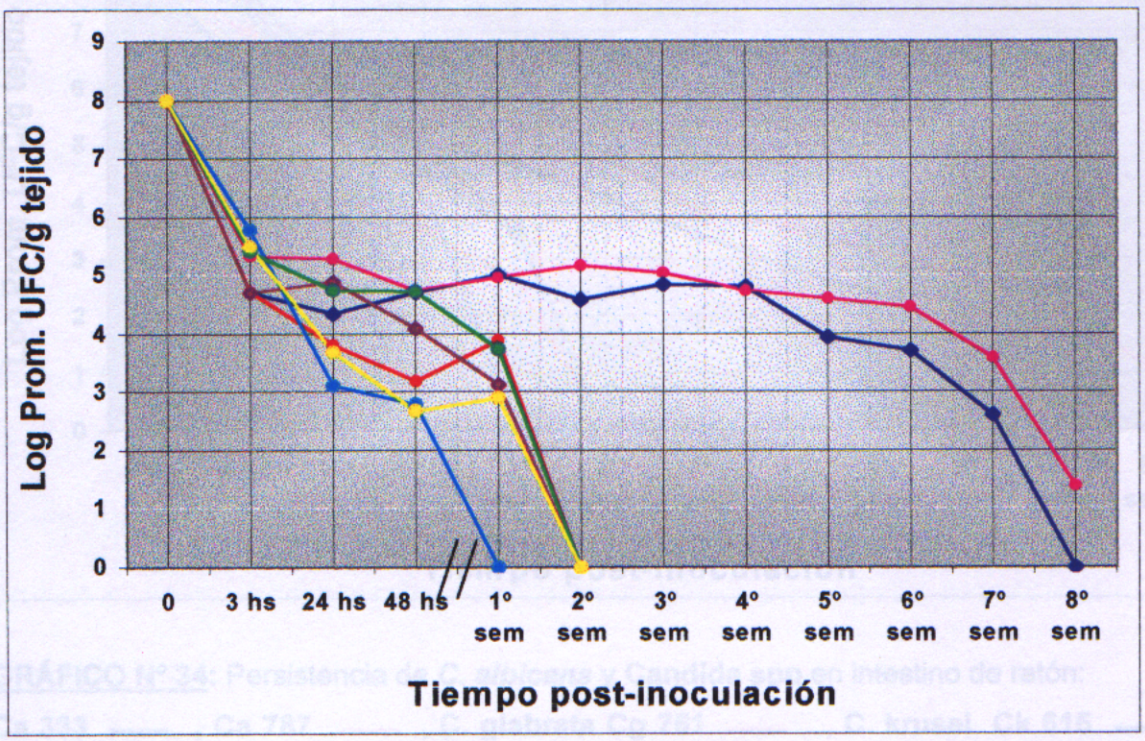


GRÁFICO N° 33: Persistencia de ***C. albicans*** **y Candida spp** en estómago de ratón: **Ca 333** , **Ca 787** , **C. glabrata Cg 751** , **C. krusei Ck 615** , **C. lusitaniae Cl 670** , **C. parapsilosis Cp 345** , **C. tropicalis Ct 508**

Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

Para todas las cepas de ***Candida spp*** estudiadas se observó una evolución similar de la colonización del estómago a través del tiempo, que difiere de la evolución de las cepas de ***C. albicans*** en el mismo órgano.

El **GRÁFICO Nº 34** muestra la evolución, a través del tiempo, de la colonización de las distintas cepas de ***Candida spp*** y de las cepas de ***C. albicans*** **Ca 333 y 787** en intestino de ratones inoculados con una suspensión de 1×10^8 levaduras de dichas cepas.

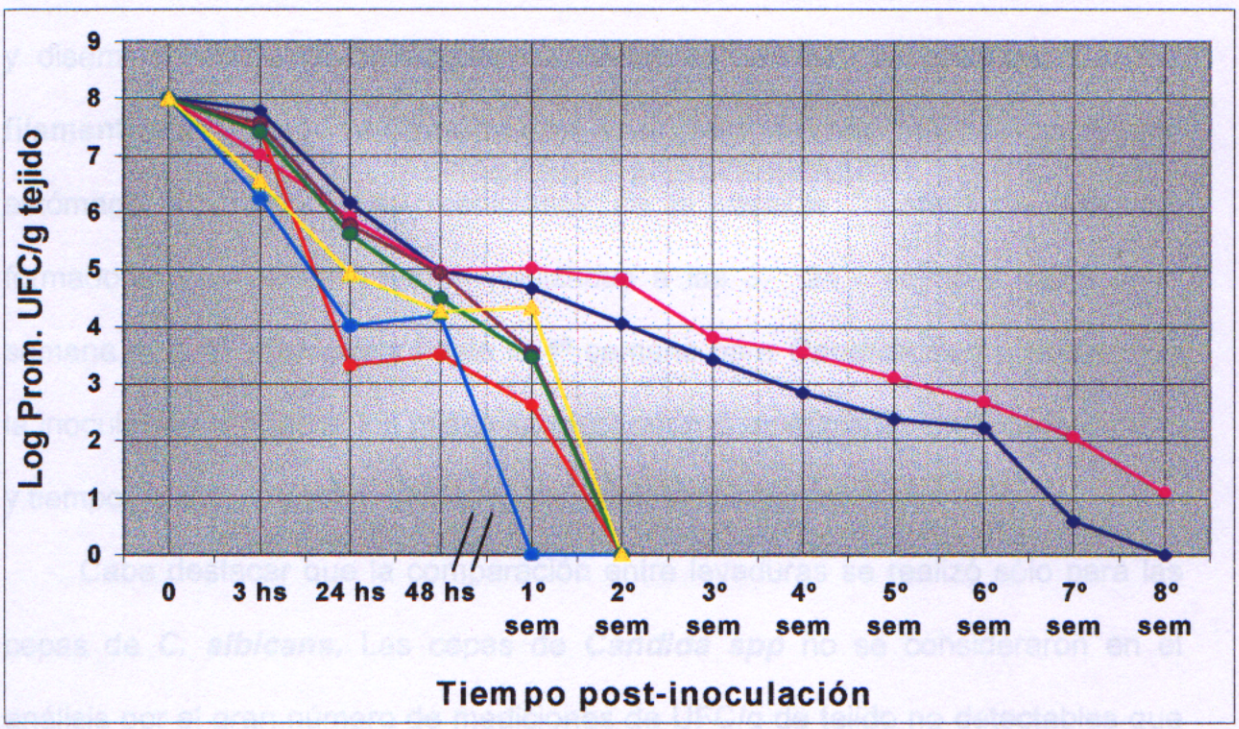


GRÁFICO Nº 34: Persistencia de ***C. albicans*** **y Candida spp** en intestino de ratón: **Ca 333** ——— , **Ca 787** ——— , **C. glabrata Cg 751** ——— , **C. krusei Ck 615** ——— ,**C. lusitaniae Cl 670** ——— , **C. parapsilosis Cp 345** ——— , **C. tropicalis Ct 508** ——— . Cada punto representa el promedio de UFC/g de tejido de 5 ratones.

En el transcurso de la 1° semana se produjo la desaparición de la cepa **Ck 615** del intestino y durante la 2° semana, ocurrió lo mismo para el resto de las cepas de ***Candida spp***.

Con las cepas de ***C. albicans* Ca 333 y 787** la colonización del intestino se prolongó hasta la 7° y 8° semanas, respectivamente.

III.3.2- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado con el objeto de comparar la colonización y diseminación de las levaduras: ***C. albicans* Ca 787, *C. albicans* Ca 787 filamentizada** y cepas de ***Candida spp***, en órganos de ratón: riñón, bazo, hígado estómago e intestino. Las mediciones de la variable "número de unidades formadoras de colonias" fueron realizadas a las 3, 24, 48 hs y hasta la 8° semana para ***C. albicans*** y hasta la 4° semana para ***Candida spp*** posteriores a la inoculación. En todos los casos se efectuaron 5 repeticiones para cada órgano y tiempo, realizadas sobre unidades experimentales homogéneas.

Cabe destacar que la comparación entre levaduras se realizó sólo para las cepas de ***C. albicans.*** Las cepas de ***Candida spp*** no se consideraron en el análisis por el gran número de mediciones de UFC/g de tejido no detectables que presentaron estas levaduras.

Asimismo, las comparaciones se llevaron a cabo para estómago e intestino dado que los demás órganos (riñón, bazo e hígado) presentaron en su mayoría mediciones con valores no detectables.

III.3.2.1-COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE UFC/G EN ESTÓMAGO

Para comparar el número de UFC/g en estómago a través de distintos tiempos, entre las levaduras ***C. albicans* Ca 787** y ***C. albicans* Ca 787 filamentizada**, se aplicó ANOVA para un diseño cruzado con 2 factores: **Levadura** (a dos niveles: **Ca 787** y **Ca 787 filamentizada**) y **Tiempo** (con 11 niveles: 3, 24, 48 hs., 1 a 8 semanas).

La variable respuesta fue el logaritmo neperiano (ln) del Nº de UFC/g (Para satisfacer los supuestos necesarios para aplicar ANOVA, la variable respuesta debió ser transformada mediante ln).

Del análisis efectuado se concluyó que existió interacción entre los factores **Levadura** y **Tiempo** ($p<0,0001$).

La interpretación se realizó a través de los distintos niveles de **Levadura** y **Tiempo** mediante comparaciones múltiples por el método de Scheffé.

Entre **levaduras**: para los tiempos 3, 24, y 48 hs, el ln del Nº de UFC/g, en promedio, fue significativamente mayor para la cepa **Ca 787** que para la misma cepa **Ca 787 filamentizada** ($p<0,005$). Para los demás tiempos no se obtuvieron diferencias significativas. **(Gráfico Nº 26)**

Entre **tiempos:**

a) Para **Ca 787**: se encontró que en promedio el ln del Nº de UFC/g fue a las 3 y 24 hs significativamente mayor que a la 6º semana ($p<0,05$) y que a las 7º y 8º semanas ($p<0,01$) **(Gráfico Nº 21).**

También a las 24 hs, en promedio, el ln del Nº de UFC/g fue significativamente mayor que a la 5º semana ($p<0,10$) **(Gráfico Nº 21).**

El ln del Nº de UFC/g fue significativamente mayor a las 48 hs, 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º y 7º semanas que a la 8º semana ($p<0,01$)) **(Gráfico Nº 21**.

b) Para **Ca 787 filamentizada** se encontró que en promedio, el ln del Nº de UFC/g fue significativamente mayor a las 3 hs que a las 24 y 48 hs ($p<0,05$); entre estos últimos no se detectaron diferencias significativas. **(Gráfico Nº 24)**

El ln del Nº de UFC/g fue significativamente mayor a la 1º, 2º, 3º, 4º, 5º y 6º semanas que a las 24 hs ($p<0,01$). **(Gráfico Nº 24)**

El ln del Nº de UFC/g fue significativamente mayor a la 1º, 2º y 3º semanas que a las 48 hs y a las 7º y 8ºsemanas ($p<0,01$); también a la 4º, 5º y 6º semanas fue mayor que a las 48 hs y 7º y 8º semanas ($p<0,05$). **(Gráfico Nº 24)**

El ln del Nº de UFC/g fue significativamente mayor a las 3, 24 y 48 hs, 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º y 7º semanas que a la 8º semana ($p<0,01$).

III.3.2.2-COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE UFC/G EN INTESTINO

Para comparar el Nº de UFC/g en intestino, a través de distintos tiempos, entre las levaduras **Ca 787** y **Ca 787 filamentizada**, no se pudo aplicar ANOVA por falta de cumplimiento de los supuestos y la imposibilidad de encontrar una transformación adecuada. Por este motivo se realizó el test no paramétrico de Kruskall-Wallis y se evaluaron las diferencias significativas mediante comparaciones múltiples para cada una de las levaduras:

a) Ca 787

Se detectaron diferencias significativas entre el N° de UFC/g para los distintos tiempos ($p<0.0001$).

El N° de UFC/g fue significativamente mayor a las 3 hs que a la 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 7 y 8° semanas ($p<0,05$); para las 24 hs que para la 4° semana ($p<0,10$); para las 24 hs que para 5°, 6°, 7° y 8° semanas ($p<0,05$). **(Gráfico N° 21)**

b) Ca 787 filamentizada

Se detectaron diferencias significativas entre el N° de UFC/g para los distintos tiempos ($p<0.0001$).

El N° de UFC/g fue significativamente mayor a las 3 hs que a la 3°, 4°, 5°, 6°, 7° y 8° semanas ($p<0,05$); para las 24 hs que para la 4°, 5°, 6°, 7° y 8° semanas ($p<0,05$). **(Gráfico N° 24)**

III.3.3- ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

Se examinaron cortes histológicos de riñón, bazo e hígado de los ratones realizados a las 3, 24, y 48 hs posteriores a la inoculación con la levadura ***C. albicans* Ca 333, Ca 787** y ***C. lusitaniae* CI 670,** teñidos con Hemotoxilina-Eosina y Gomori-Grocott.

Se pudo comprobar la diseminación de estas levaduras en los órganos antes mencionados a partir de su aislamiento en dichos órganos (**Tablas N° 34, 35 y**

40), pero no se observó para estas cepas, en los diferentes tiempos estudiados, la presencia de levaduras en los cortes histológicos de estos tejidos.

Se analizaron cortes histológicos de estómago e intestino realizados a las 3, 24, y 48 hs, 1 y 2° semana posteriores a la inoculación con las mismas levaduras y teñidos con Hemotoxilina-Eosina y Gomori-Grocott.

Para ***C. lusitaniae*** **CI 670,** sólo se observaron escasas levaduras en la luz de estos órganos a las 3 y 24 hs. Para los tiempos restantes, las observaciones fueron negativas.

Para ***C. albicans*** **Ca 333 (Figuras N° 17 y 18) y Ca 787** a las 3 hs se observaron abundantes levaduras en la luz del estómago e intestino y algunas asociadas a las células de la mucosa de dichos órganos. La misma observación se realizó a las 24, 48 hs y 1° semana, aunque se notó una disminución de las levaduras en la luz de los órganos mencionados.

En la 2° semana post-inoculación, para ambas cepas se pudo observar, tanto en estómago como en intestino de los ratones, gran cantidad de levaduras asociadas a la mucosa. En las **Figuras N° 19 a 22** se pone de manifiesto la adherencia a las células del huésped de las levaduras de ***C. albicans*** **Ca 787,** que permanecieron asociadas a la mucosa del TGI de los ratones por un largo período de tiempo (hasta 8 semanas, corroborado a través de los cultivos).

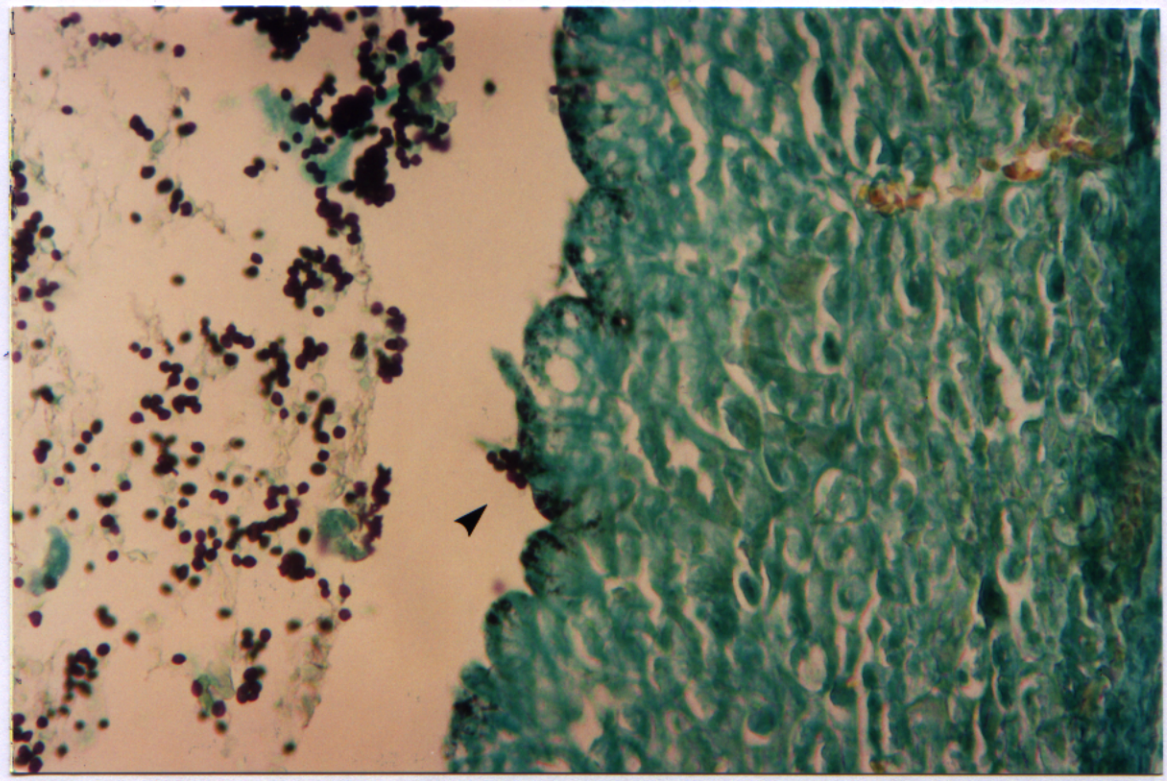


Figura Nº 17: Corte histológico de estómago de ratón inoculado con la cepa **Ca 333**, a las 3 hs post-inoculación, teñido con la coloración de Gomori-Grocott Se observan abundantes levaduras en la luz del estómago y algunas asociadas a las células de la mucosa (flecha) (400X).

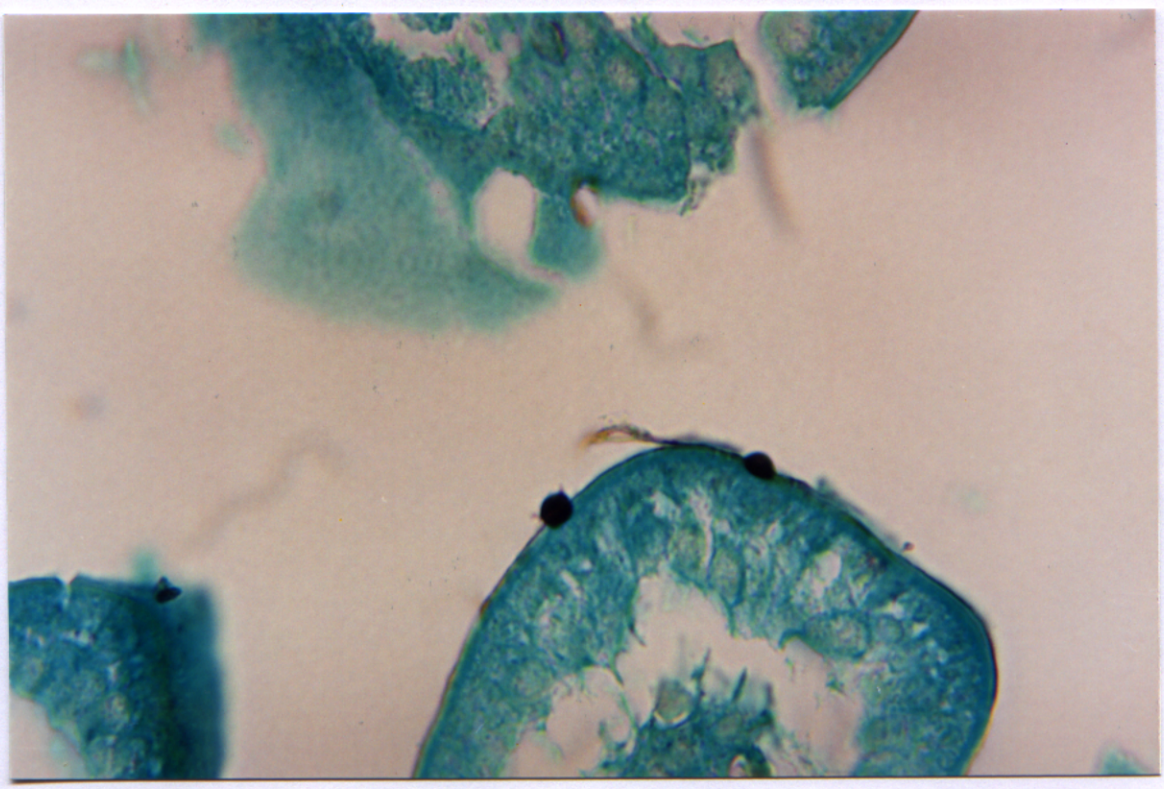


Figura Nº 18: Corte histológico de intestino de ratón inoculado con la cepa **Ca 333**, a las 3 hs post-inoculación, teñido con la coloración de Gomori-Grocott. Se observan las levaduras asociadas a las células de la mucosa intestinal (corte transversal de una vellosidad intestinal). (1000X).

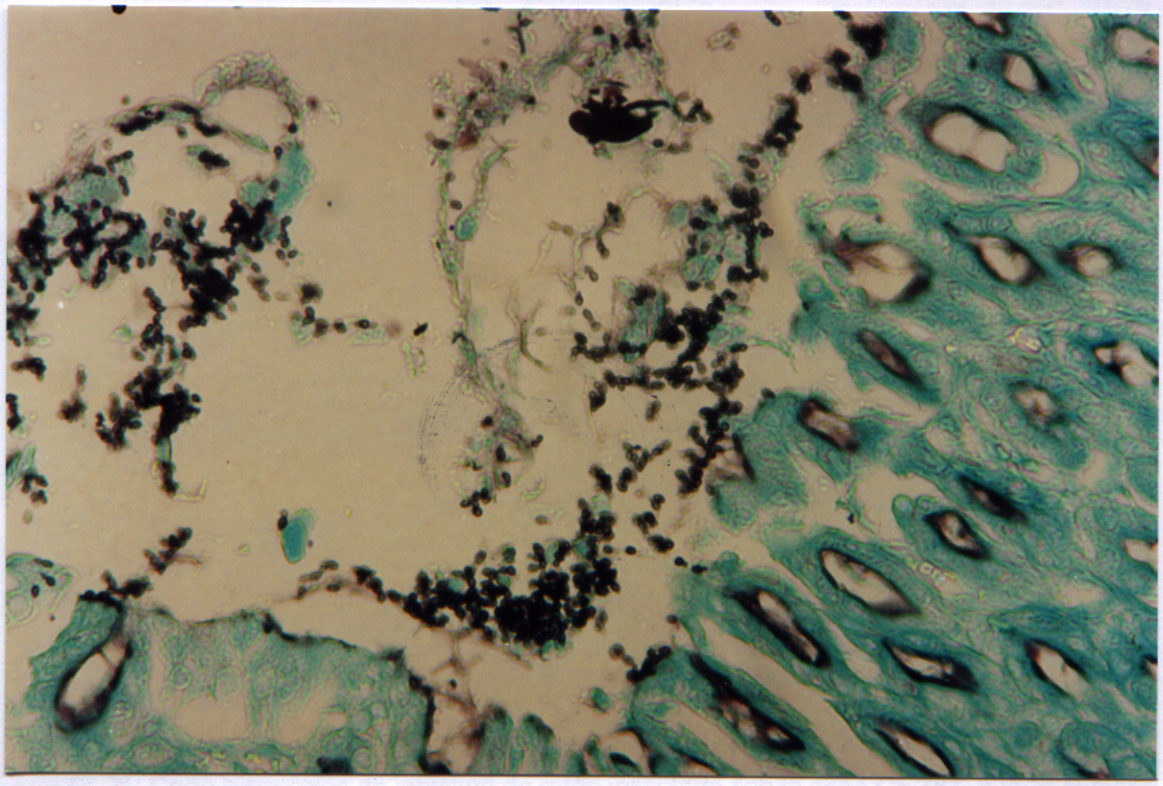


Figura Nº 19: Corte histológico de estómago de ratón inoculado con la cepa **Ca 787**, a la 2º semana post-inoculación, teñido con la coloración de Gomori-Grocott. Se observan levaduras en la luz del estómago y asociadas a las células de la mucosa (400X).

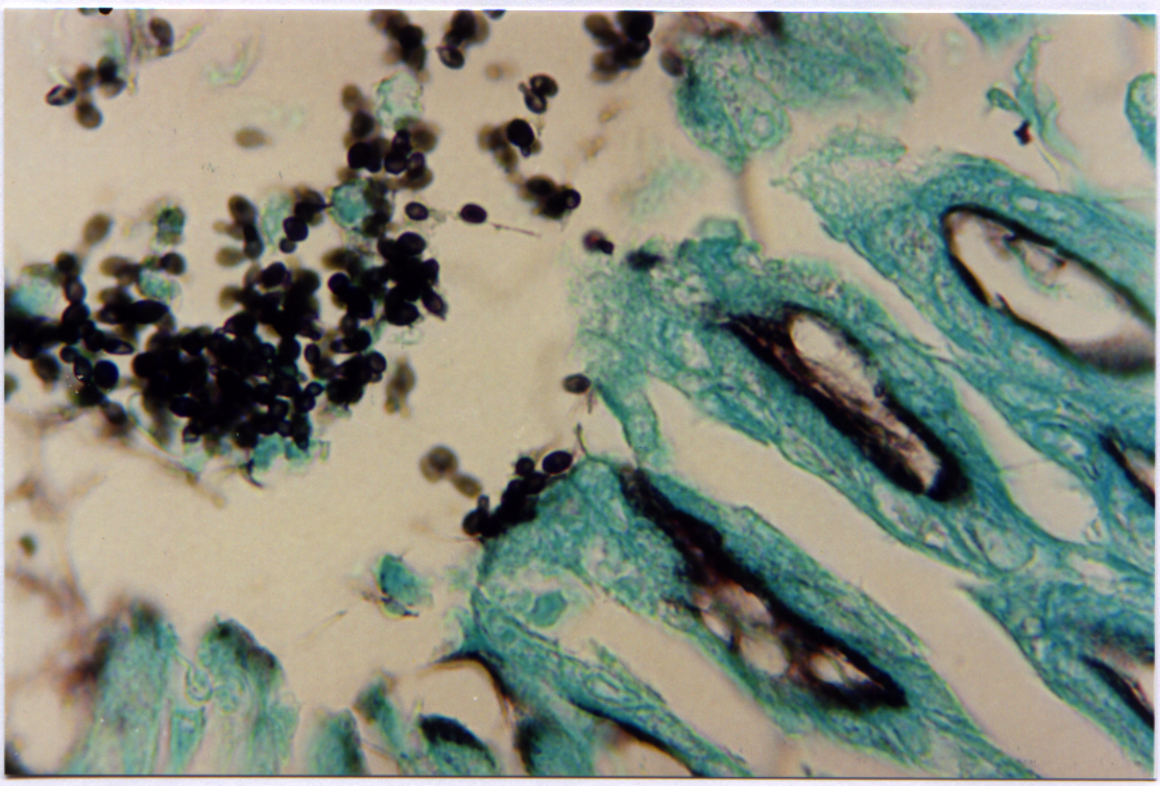


Figura Nº 20: Corte histológico de estómago de ratón inoculado con la cepa **Ca 787**, a la 2º semana post-inoculación, teñido con la coloración de Gomori-Grocott Se observan levaduras en la luz del estómago y asociadas a las células de la mucosa (flecha) (1000X).

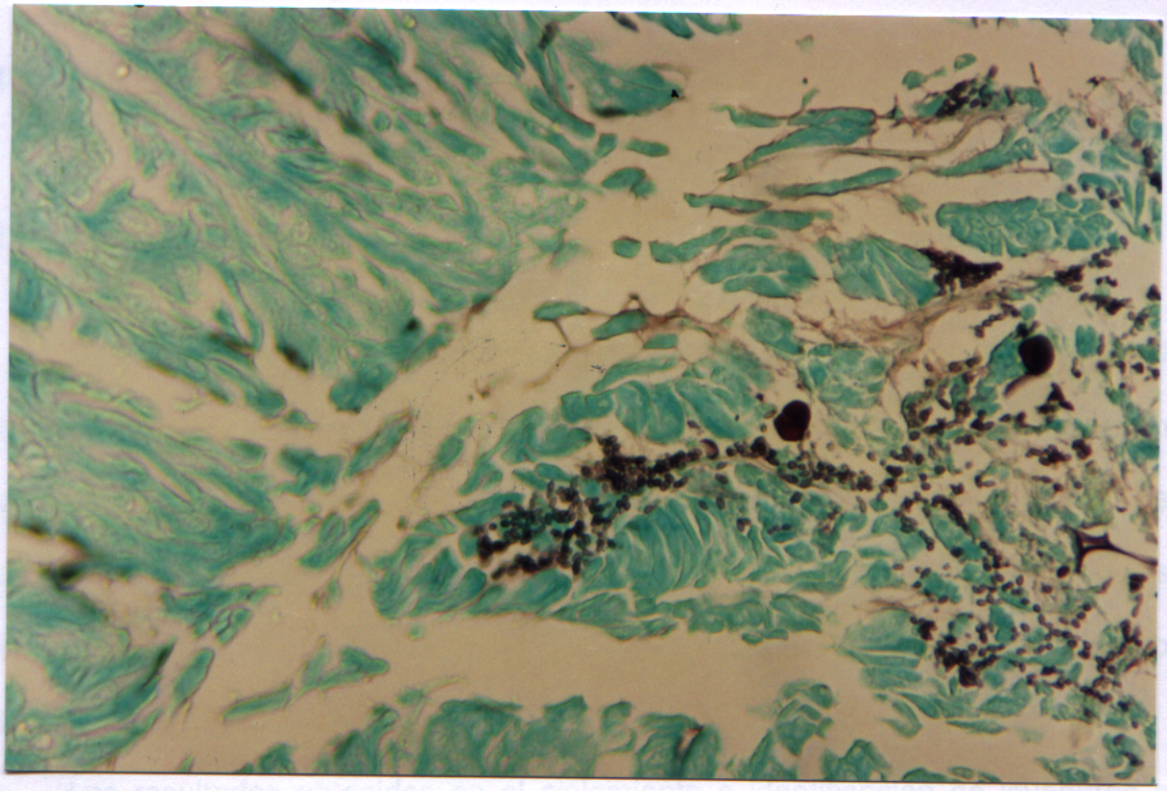


Figura Nº 21: Corte histológico de intestino de ratón inoculado con la cepa **Ca 787**, a la 2º semana post-inoculación, teñido con la coloración de Gomori-Grocott. Se observan gran cantidad de levaduras en la luz del intestino y asociadas a las células de las vellosidades intestinales (400X).

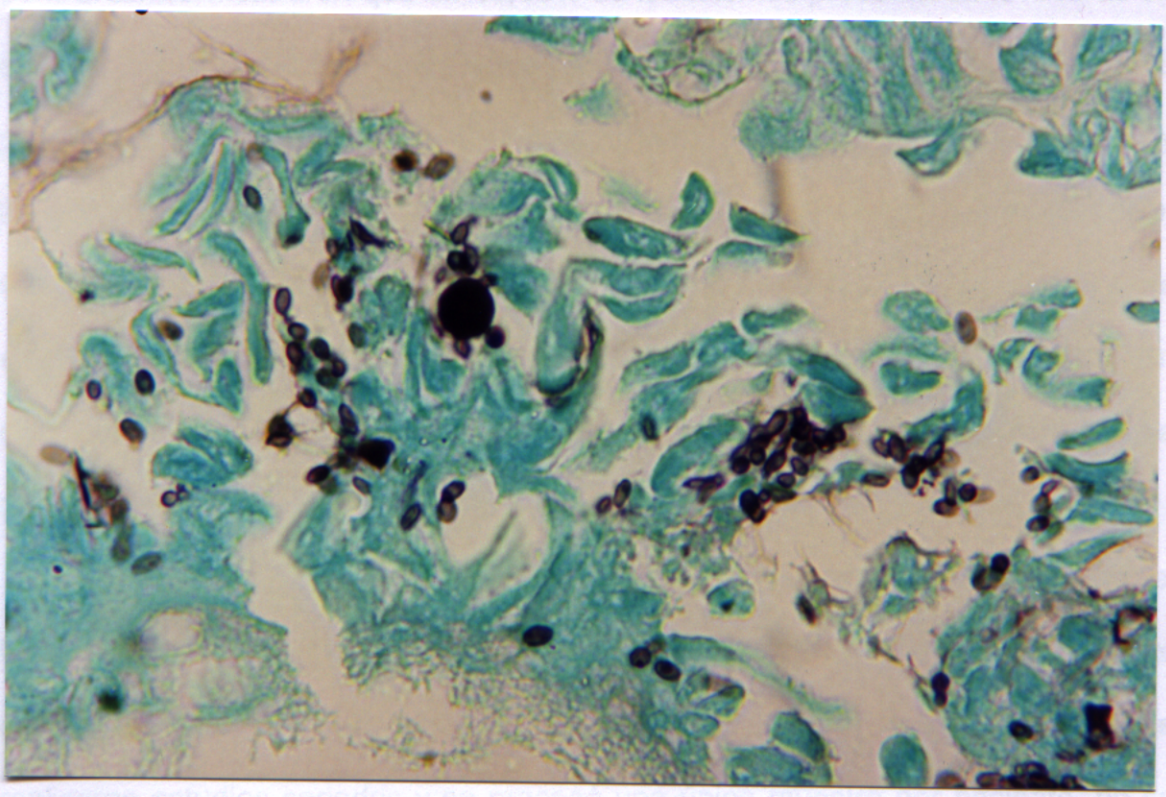


Figura Nº 22: Corte histológico de intestino de ratón a la 2º semana post-inoculación con la cepa **Ca 787**, teñido con Gomori-Grocott. Con mayor aumento, se observan gran cantidad de levaduras en la luz del intestino y asociadas a las células de las vellosidades intestinales (1000X).

IV-DISCUSIÓN

IV.1- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS

Las levaduras del género ***Candida*** colonizan la boca y el tracto gastrointestinal del ser humano, especialmente ***Candida albicans***. En condiciones normales, esta población está influida por otros microorganismos de la flora intestinal, que ejercen un control sobre la densidad de población de las levaduras, y por los alimentos, ya que la dieta afecta en gran medida el número total de microorganismos existentes.

Los resultados obtenidos en el aislamiento e identificación de levaduras a partir de muestras de heces de pacientes que concurrieron al Servicio Asistencial del CEREMIC mostraron que un 45,65% de los mismos presentaron levaduras en el TGI y que el 52,1% de las levaduras aisladas correspondieron a ***C. albicans***. El predominio de esta especie de ***Candida*** se demostró en un estudio anterior (4) y ha sido señalado por otros autores (2, 5). A excepción de ***Candida glabrata, Candida parapsilosis y Candida tropicalis,*** el resto de la especies, ***Candida colliculosa, Candida kefyr, Candida krusei*** y ***Candida lusitaniae***, no son aisladas con frecuencia del TGH y pueden ser consideradas como flora transitoria del mismo.

En la mayoría de las cepas seleccionadas para el estudio de adherencia, el Nº de UFC/g que desarrollaron en el material clínico fue mayor que el valor considerado como normal (hasta 5.000 UFC/g de heces). Debido a que no se realizaron estudios seriados y se procesó una única muestra por paciente, no se pudo corroborar si el elevado Nº de UFC/g representaba una colonización

permanente del TGH o una colonización transitoria influida por un desequilibrio de la flora bacteriana, por tratamiento del paciente con antibióticos, o por una dieta rica en frutas o hidratos de carbono.

Estas cepas, además, fueron biotipificadas por Tosello y col (119), utilizando 3 técnicas diferentes: sensibilidad al sistema killer, morfotipificación y crecimiento en sales de trifeniltetrazolium. La mayor variedad de cepas de ***C. albicans*** se detectó mediante la técnica del morfotipo y se encontraron 12 morfotipos diferentes, lo que demuestra una gran variabilidad fenotípica de las mismas. Los diferentes sustratos orgánicos incorporados con la dieta, actuarían como reservorio de las levaduras (2, 26), originando esa diversidad fenotípica.

IV.2- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE LAS LEVADURAS, *IN VITRO*

Se han utilizado diferentes técnicas para la determinación cuantitativa de la adherencia de levaduras, *in vitro*: **a)** método visual (45, 114, 120, 121, 122, 123), **b)** método radioisotópico (124, 125, 126), **c)** método immunoenzimático (ELISA) (127, 128), **d)** método de fluorescencia (129, 130).

El método radioisotópico, que utiliza las levaduras marcadas radiactivamente con [U-^{14}C] glucosa (124) es un método rápido y considerablemente menos laborioso que el método visual para medir la adherencia a diferentes superficies, *in vitro*. No obstante, durante el ensayo se puede liberar radioactividad de levaduras intactas o rotas que podría unirse o incorporarse a las células epiteliales, produciendo valores artificialmente elevados de la adherencia, como

los obtenidos por Sobel et al. (126), al utilizar este método para estudiar el efecto del ketoconazol en la adherencia de ***C. albicans***. Las levaduras contadas por microscopía, en presencia de concentraciones subinhibitorias del antifúngico, se encontraron formando grandes agregados celulares adheridos a las CEB provocando un aumento de radioactividad no representativo de la adherencia individual de cada levadura a las CEB.

Sandovsky-Losica desarrollaron el método de ELISA (127), utilizando anticuerpos anti-***Candida*** específicos marcados con una peroxidasa, que les permitió medir la adherencia de ***C. albicans*** a CEB. Este método, sensible y específico, también puede desarrollarse con otras células o líneas celulares (128) y procesar un gran número de muestras, pero no resuelve el problema de la medición de la adherencia ante la presencia de agregados o de "clumps" de las levaduras.

Los métodos de fluorescencia, utilizan la capacidad que poseen ciertas sustancias fluorogénicas para unirse a la pared de las levaduras. La fluorescencia es cuantificada automáticamente y constituye una medida de la adherencia de las levaduras a CEB (129) o a líneas celulares (130). El método es sensible pero más complejo ya que requiere equipamiento especializado

El método visual (que fue el elegido para realizar estos estudios de adherencia *in vitro*) desarrollado por Gibbons y Van Houte (131, 132) ha sido el más ampliamente utilizado por diversos grupos de investigadores y permitió trabajar con distintos tipos de células exfoliadas (120), células de cultivos tisulares (45, 122, 133), como también con materiales inertes (134, 135). Si bien este método puede resultar tedioso, tiene la ventaja de que permite diferenciar la unión levadura-célula de la unión levadura-levadura.

Las preparaciones de células epiteliales exfoliadas son relativamente fáciles de obtener y han sido ampliamente utilizadas en los estudios de adherencia *in vitro*, pero tienen algunas desventajas ya que consisten en una mezcla heterogénea de células viables y no viables observándose una variación considerable en el número de microorganismos adheridos de una célula a otra. También se detectaron variaciones en la adherencia en diferentes días, entre distintos donantes y diferentes sitos anatómicos (boca, vagina y tracto urinario) (120, 124, 136). Esta variabilidad reflejaría diferencias en el número o naturaleza de los receptores de las células mucosas para ***C. albicans,*** originadas en la viabilidad celular, el grado de keratinización, la presencia de secreciones del huésped, en factores nutricionales y factores hormonales (en las células vaginales) (39, 120).

Se han desarrollado técnicas de adherencia que utilizan poblaciones de células más uniformes como el cultivo de células de tejidos o líneas celulares. Sin embargo, un estudio realizado por Sobel et al. (133), en el que midieron comparativamente la capacidad de adherencia de ***C. albicans*** a células vaginales exfoliadas y cultivo de células vaginales, demostró una adherencia similar para ambos sistemas celulares. Estudios de microscopía electrónica de barrido de los cultivos celulares mostraron, igual que con las células exfoliadas, una distribución no uniforme de las levaduras adheridas, con disminución en las áreas de mitosis activa y aumento de adherencia en células maduras en proceso de descamación.

Para todos los ensayos de adherencia *in vitro*, se utilizaron células epiteliales bucales (CEB). Para minimizar las diferencias introducidas por la variabilidad diaria y de diferentes donantes de las células epiteliales, sobre el número de levaduras adheridas, se tomaron células de varios dadores y se repitieron los

ensayos en diferentes días en las mismas condiciones (con un mínimo de 4 repeticiones). Con este mismo fin, se utilizó un diseño estadístico en bloques completos aleatorizados (pool de células epiteliales de varios dadores en diferentes días). Además, se contaron las levaduras adheridas a un número elevado de CEB (100 CEB), para compensar la heterogeneidad en esta población celular.

En el 50 % de los ensayos de adherencia realizados, al estudiar el efecto de distintos factores sobre la adherencia de levaduras, se encontró que hubo variaciones atribuibles a las células epiteliales utilizadas en distintos días, coincidiendo con los datos de diferentes investigadores (120, 124, 136). Estos resultados convalidan el diseño estadístico utilizado en los ensayos de adherencia *in vitro*.

IV.2.1- ADHERENCIA DE LAS DIFERENTES CEPAS DE *Candida*

La adherencia de las especies de ***Candida*** a la superficie de las células del huésped se considera esencial para la expresión del potencial patogénico ya que es requerida para iniciar el proceso que lleva a la colonización y contribuiría a la persistencia del microorganismo dentro del huésped.

Las células epiteliales del tracto gastrointestinal poseen microorganismos adheridos que son constantemente eliminados por descamación y arrastre de las heces. 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 huésped conduciría, por presión selectiva, a la

eventual eliminación de un microorganismo que posee una menor capacidad de adherencia (39).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de adherencia de las diferentes especies de ***Candida*** aisladas del TGH se pudo observar una gran variación en la capacidad de las levaduras para interaccionar con las CEB, *in vitro*.

Del total de 24 cepas estudiadas, las 13 cepas de ***C. albicans*** presentaron los mayores valores de adherencia. Si bien se encontró variación entre estos valores para las diferentes cepas de ***C. albicans***, no tuvo significación estadística. Doce (12) de estas 13 cepas, fueron aisladas del TGH de pacientes (cepas salvajes) y presentaron valores de adherencia mayores que la cepa de ***C. albicans*** **Ca CECT 1394** proveniente de una Colección de Cultivos.

Las cepas de ***C. parapsilosis*** y ***C. tropicalis***, presentaron valores de adherencia intermedios entre las cepas de ***C. albicans*** (que son las que más adhieren) y el resto de las cepas de ***Candida spp*** (que son las que menos adhieren).

Las cepas de ***C. glabrata***, ***C. krusei***, ***C. kefyr***, ***C. lusitaniae*** y ***C. colliculosa*** presentaron valores muy bajos de adherencia. La diferencia entre las cepas de ***C. albicans*** que más adhieren y las cepas de ***C. krusei, C. glabrata*** y ***C. lusitaniae***, fue estadísticamente significativa (***C. krusei*** demostró casi 13 veces menor capacidad de adherencia que la cepa de ***C. albicans*** que más adhirió).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores. King et al. (124), encontraron que ***C. albicans*** adhirió en un número considerablemente mayor que otras especies. ***C. tropicalis*** mostró menor

adherencia que ***C. albicans*** pero mayor que otras especies (***C. parapsilosis, C. krusei, C. guillermondi, C. pseudotropicalis***).

Ollert et al. (45) utilizando un cultivo de keratinocitos humanos demostraron que la adherencia para las distintas especies estudiadas fue decreciendo en el siguiente orden: ***C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. glabrata, C. guillermondi.***

Samaranayake et al (137), comparando la adherencia de varias cepas de ***C. albicans*** y de ***C. krusei,*** observaron diferencias entre estas 2 especies. Además ***C. albicans*** mostró una afinidad 12 veces mayor por las CEB que ***C. krusei.***

Si bien ***C. lusitaniae y C. kefyr*** han sido asociadas con infecciones sistémicas y son consideradas levaduras patógenas emergentes (26, 138, 139), es poco lo que se sabe acerca de sus propiedades de virulencia. No hay referencias acerca de ***C. colliculosa*** como agente de infecciones diseminadas.

Estudios realizados a nivel molecular por Gil et al. (140) utilizando anticuerpos poli y monoclonales contra manoproteínas de la pared de ***C. albicans*** (principales moléculas involucradas en la adherencia a células epiteliales), demostraron que estos anticuerpos no reaccionaban con determinantes antigénicas de la pared celular de ***C. tropicalis*** y ***C. guillermondi***.

Heidenreich et al. (74) determinaron que ***C. albicans*** se unía a los fragmentos iC3b y C3d presentes en glóbulos rojos de carnero, mientras que ***C. tropicalis, C. parapsilosis*** y ***C. krusei*** no se unían a estos ligandos. Dos glicoproteínas de ***C. albicans*** (análogas a las integrinas de mamíferos, que reconocen la secuencia RGD), una de 55-60 kDa y otra de 165 kDa, serían responsables de la unión de esta levadura a C3d a iC3b, respectivamente. Este hecho tiene importancia clínica debido a que estas proteínas análogas a las

integrinas, presentes en la pared de ***C. albicans***, estarían involucradas en la adherencia de las levaduras a las células epiteliales y le permitirían a ***C. albicans*** (y no a cepas de ***Candida spp***) poder adherirse a células endoteliales del huésped a través de la unión de estas glicoproteínas a fragmentos iC3b, expresados en células endoteliales.

Los estudios sobre la adherencia *in vitro* de las distintas especies de ***Candida*** aisladas del TGH, nos muestran un rango decreciente de adherencia para ***C. albicans, C. tropicalis = C. parapsilosis, C. glabrata, C. colliculosa, C. kefyr, C. lusitaniae y C krusei.***

Estos resultados coinciden con la mayoría de los estudios clínicos sobre candidiasis sistémicas en donde ***C. albicans*** es la especie más frecuentemente aislada (46-60%), mientras que ***C. tropicalis, C. parapsilosis, C. glabrata*** y ***C. krusei***, le siguen en orden decreciente (22, 24, 25, 26).

IV.2.2- EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL pH EN LA ADHERENCIA DE *Candida albicans*

En la mayoría de los estudios de adherencia, las levaduras y las células epiteliales han sido incubadas en PBS, a un pH entre 7-7,3 y a una temperatura de 37° C (114, 120, 125, 133, 136, 137).

Otros autores han modificado las condiciones de los ensayos de adherencia en forma independiente, ya sea para el pH (124, 141, 142) o para la temperatura (45, 124).

Con el fin de lograr las condiciones óptimas de pH y T° para estudiar la adherencia de levaduras, se utilizaron 6 combinaciones de 3 valores de pH y 2

valores de T°. De acuerdo a los resultados, luego de realizar el correspondiente análisis estadístico, no hubo variaciones significativas en la capacidad de adherencia de ***C. albicans*** a las células epiteliales en las condiciones estudiadas: pH= 6 y 28 °C; pH=6 y 37 °C; pH= 7,2 y 28° C; pH=7,2 y 37 °C; pH=8,4 y 28 °C y pH=8,4 y 37 °C.

No obstante, a pH=7,2 y 37°C se observó un ligero incremento de los valores de adherencia para ***C. albicans*** con respecto a los hallados con los restantes valores de pH y T°.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ollert et al (45) quienes observaron la máxima adherencia de ***C. albicans*** a un cultivo de keratinocitos a una temperatura de incubación de 37°C, siendo menor a 22° y a 4°C (la adherencia a 4°C fue el 20% de la observada a 37°C). King et al. (124), al estudiar la adherencia de ***C. albicans*** a células epiteliales vaginales, a 4, 22 y 37° C, obtuvieron resultados similares.

Luego de definir las condiciones óptimas de trabajo, se realizaron ensayos de adherencia a 3 valores de pH: pH=3; pH=4 y pH=5 y se compararon con el pH del buffer (=7.2). Estos valores de pH ácido se encuentran con frecuencia en el canal vaginal cuando se producen infecciones por ***Candida***.

La adherencia de ***C. albicans*** resultó ser a pH=7,2 significativamente mayor que a pH= 3, 4 y 5. A pH= 5 la afinidad de ***C albicans*** por las CEB disminuyó al 58,5 %, a pH=4 al 51,5 % y a pH=3 al 25% con respecto al control (pH= 7,2). Además a pH=3 la adherencia decreció al 50 % con respecto a los otros valores de pH (pH=4 y 5).

King et al. (124), trabajando a 37°C, determinaron que la máxima adherencia de ***C. albicans*** a células epiteliales vaginales (CEV) se producía a pH= 7,3 y

disminuía a valores de pH más bajos (pH=4 y 6) y más altos (pH=8 y 10), mientras que Persi et al. (142) encontraron que algunas cepas de ***C. albicans*** aumentaban su afinidad por las CEV al disminuir el pH, cuando eran incubadas en atmósfera de CO_2 al 5-10%.

Los resultados obtenidos nos muestran que la interacción levadura-célula epitelial, *in vitro*, se produce en condiciones óptimas a un pH cercano a 7 y a una T° de 37°C. La adherencia de las levaduras disminuye en forma importante a valores de pH por debajo de 6. No obstante, en pacientes que presentan una patología de base donde se modifica el pH, como en la acidosis diabética, o en el embarazo, donde se observa una disminución del pH vaginal, se producen infecciones por levaduras del género ***Candida*** mostrando la complejidad de la patogénesis de estas micosis oportunistas.

IV.2.3- EFECTO DE HIDRATOS DE CARBONO EN LA ADHERENCIA DE *Candida albicans*

La pared celular de ***C. albicans*** está compuesta en un 70-90 % por hidratos de carbono (manoproteínas (20%-30%), β-1,3-D-glucan (25%-35%), β-1,6-D-glucan (35%-45%) y quitina (0,6%-2,7%), además de proteínas y lípidos (63); estos componentes estarían estructurados en varias capas, de acuerdo a observaciones realizadas con microscopía electrónica.

La arquitectura de la pared celular incluye, en la parte más externa de la célula, una capa fibrilar. La cantidad del material fibrilar producido depende del medio de cultivo y de la concentración de azúcares, incrementándose con el

tiempo de cultivo. Este material fibrilar jugaría un importante rol en la adherencia. El componente mayoritario de esta capa fibrilar es una glicoproteína de 66 kDa compuesta por un 80%-85% de carbohidrato (principalmente D-manosa) y 10%-15% de proteína. Estas fibras de manoproteína actuarían como adhesinas, mediando la unión de ***C. albicans*** a las células epiteliales (143).

Una gran variedad de medios han sido utilizados en estudios de adherencia de levaduras y como la composición de los medios de cultivo afectan la estructura de la pared celular, este hecho se ve reflejado en la variación de los valores de adherencia presentados por diferentes investigadores.

Al comparar la capacidad de adherencia de la cepa ***C. albicans* Ca 787,** crecida en un medio definido (YNB) con el agregado de diferentes azúcares: glucosa, galactosa, sacarosa y manosa, en 3 concentraciones finales: 50, 200 y 500 mM, con la adherencia de la misma levadura crecida en CSG (medio que contiene glucosa al 4%), se encontró que tanto la concentración como el tipo de azúcar utilizado, tienen efecto en la adherencia de esta cepa a CEB.

Para la glucosa, si bien se comprobó un leve aumento de la adherencia para las 3 concentraciones utilizadas, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En el caso de la galactosa, la capacidad de adherencia de la levadura crecida en 50 y 200 mM es significativamente mayor que para el testigo, mientras que para la concentración 500 mM el aumento no es tan marcado.

Con la sacarosa, se obtuvieron los mayores valores de adherencia de la cepa ***C. albicans* Ca 787**, y la levadura crecida en las 3 concentraciones de sacarosa fue significativamente más adherente que la levadura crecida en CSG.

En el caso de la manosa, para las concentraciones 50 y 200 mM hubo un leve incremento de la adherencia, y para la concentración 500 mM se observó un aumento estadísticamente significativo de la adherencia con respecto al testigo.

Estos resultados indican que la adherencia de ***C. albicans*** a CEB, se incrementó con concentraciones crecientes de estos azúcares incorporados en el medio de cultivo donde desarrolló la levadura.

McCourtie et al (144, 145) , Enache et al. (146) y Calderone et al. (147) observaron que ciertas cepas de ***C. albicans*** tenían la facultad de aumentar su capacidad de adherencia en respuesta a un aumento en la concentración del azúcar del medio de cultivo (particularmente con galactosa) mientras que para otras cepas de ***C. albicans***, el crecimiento en las condiciones antes mencionadas, tenía poco efecto o ninguno en su capacidad de adherencia. Estos autores, por microscopía electrónica, pudieron determinar que el aumento de adherencia observado para galactosa 500mM, se debía a la formación de una capa fibrilar adicional en la superficie de la pared celular de la levadura, responsable de los fenómenos de adherencia. La habilidad de las levaduras para modificar la composición de la superficie celular sería ventajoso para estos microorganismos y un factor de virulencia importante.

Además, la sacarosa y la galactosa son azúcares comunes de la dieta, mientras que la galactosa es producida en la boca por degradación de la lactosa por acción de bacterias de la flora local. El hecho de que estos azúcares puedan promover un aumento en la adherencia de las levaduras a células epiteliales, explicaría que una dieta rica en carbohidratos puede favorecer el desarrollo o persistencia de una candidiasis oral y que altos niveles de glucógeno en la vagina de pacientes diabéticas o embarazadas (que puede ser convertido en glucosa por

enzimas del tejido o por bacterias de la flora local) favorecería el desarrollo o persistencia de una candidiasis vaginal

IV.2.4- EFECTO DE LA FILAMENTIZACIÓN EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans, IN VITRO*

La formación de hifas 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 mayor resistencia a la fagocitosis (12, 37), mientras que la forma levaduriforme se asocia a una colonización no patológica de ***Candida***.

La conversión a la forma filamentosa ocurre por la germinación de las blastoconidias y es dependiente de factores ambientales y culturales.

Para estudiar comparativamente la capacidad de adherencia de las levaduras en su forma filamentizada (con tubos germinativos, TG) y levaduriforme, se utilizó el Medio 199 (que es un medio de cultivo de tejidos que promueve la formación de TG) y una T° de incubación de 37 °C, durante 2 hs. En estas condiciones aproximadamente el 75-80 % de las levaduras habían emitido TG (**Figura N° 7**).

Se estudió el efecto de la filamentización sobre la adherencia a CEB, para dos cepas de ***C. albicans*** : **Ca 787** y **Ca CECT 1394.** Para ambas levaduras, los valores de adherencia observados para la forma filamentizada fueron significativamente mayores que para la forma levaduriforme. Este aumento fue más marcado para la cepa salvaje, **Ca 787** (la adherencia fue 3,22 veces mayor)

(**Figura Nº 7**), que para la cepa de colección, **Ca CECT 1394** (la adherencia fue 2,48 veces mayor) (**Figura Nº 8**).

Otros investigadores 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 (58), en CEB, Sobel et al (141), en CEV, Samaranayake et al. (59), en células HeLa y células epiteliales renales embrionarias humanas y Lyman et al (148) en tejido de vejiga. En el mismo sentido, Diez-Oreja et al. (149), 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 candidiasis sistémica en ratones.

Esta observaciones confirman que las propiedades adhesivas de los tubos germinativos estarían relacionadas a una pérdida o degradación de las moléculas de la pared celular (150) y al movimiento o reorganización de moléculas preexistentes (151), que resultaría en la exposición de un mayor número de sitios de unión (152, 153), es decir, un aumento en la expresión de las adhesinas de ***Candida*** durante la germinación.

Bujdáková et al. (154), demostraron que una proteína análoga a la integrina que une iC3b, presente en la pared de ***C. albicans*** e implicada en la adherencia de ***Candida*** a las células epiteliales y endoteliales, era más abundante en los tubos germinativos que en la fase levaduriforme de ***C. albicans***.

Las proteínas hidrofóbicas en la superficie celular de ***C. albicans*** están involucradas en la capacidad del microorganismo para adherirse a superficies epiteliales y endoteliales (84, 85), a proteínas de la MEC (86) y a dispositivos plásticos (49). El hecho de que los componentes hidrofóbicos son más

abundantes en los extractos de tubos germinativos que en los de levaduras (64, 155), refuerza la diferencia en la adherencia de las dos formas de ***C. albicans***.

Bouchana y col. (80) detectaron la presencia de receptores para laminina en los tubos germinativos de ***C. albicans***. Estos receptores son manoproteínas localizadas en la capa fibrilar más externa de la pared celular del tubo germinativo y son diferentes de las adhesinas para laminina que posee la forma levaduriforme. La presencia de receptores diferentes para laminina expresados selectivamente para la forma levaduriforme y para los tubos germinativos, también justifica el comportamiento biológico disímil en cuanto a la adherencia a los tejidos del huésped, de estas dos formas de ***C. albicans.***

IV.2.5- EFECTO DEL FLUCONAZOL (FCZ) EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

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 (156). 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 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 (157).

La disminución del ergosterol y la acumulación de esteroles 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 (157).

El Fluconazol (FCZ) es un antifúngico de amplio espectro que actúa frente a una gran variedad de levaduras (excepto ***Candida krusei***, que presenta resistencia a esta droga) y hongos filamentosos (su uso no está indicado para Aspergilosis y Zigomicosis) (158). Los tratamientos con FCZ presentan muy pocos efectos colaterales adversos. Se utiliza en infecciones superficiales, mucocutáneas, sistémicas y como profilaxis en inmunosuprimidos, principalmente pacientes HIV (+) y neutropénicos.

Los ATF son suministrados en concentraciones mayores que la concentración inhibitoria mínima (CIM) durante el tratamiento de una Candidiasis. En el curso de la terapia, concentraciones sub-inhibitorias están presentes intermitentemente en los tejidos, generalmente en el intervalo entre dos dosis, que podrían interferir en el proceso de adherencia de las levaduras a las células epiteliales.

Rex et al. (159) definieron los puntos de corte para el fluconazol y consideraron el desarrollo de levaduras con CIMs $\leq$ 8 μg/ml como sensibles, aislamientos con CIMs $\geq$ 64 μg/ml como resistentes y con valores intermedios como sensibles dosis dependiente. De acuerdo a estos valores la cepa *C.*

***albicans* Ca 787** con una CIM=0,8 µg/ml, se puede considerar como sensible al FCZ.

En el primer ensayo se estudió la adherencia de la cepa ***C. albicans* Ca 787** luego de ser tratada con 3 concentraciones subinhibitorias de FCZ y se analizó el efecto del ATF sobre la filamentización y sobre la capacidad de adherencia de las formas levaduriforme y filamentizada.

Efecto del FCZ: Los resultados obtenidos mostraron que el FCZ en las concentraciones estudiadas no afectó la adherencia de las levaduras a CEB (consideradas en conjunto la forma levaduriforme y la forma filamentosa). Sin embargo, se observó una ligera disminución (no significativa) de la adherencia para las levaduras tratadas con las tres concentraciones de FCZ (**Tabla N° 23** y **Gráfico N° 12).**

Al analizar el efecto del FCZ para la forma levaduriforme, se comprobó que las levaduras tratadas con 0,5 µg/ml de FCZ resultaron levemente más adherentes (diferencia estadísticamente no significativa) que las levaduras no tratadas, utilizadas como testigo (**Gráfico N° 11, Tabla N° 22**).

Al estudiar el efecto del FCZ para la forma filamentizada, se comprobó que las levaduras tratadas con las 3 concentraciones del ATF, mostraron leve disminución (estadísticamente no significativa) de la adherencia, respecto del testigo (levaduras no tratadas y filamentizadas) (**Gráfico N° 11, Tabla N° 22**).

El ATF afectó más a la forma filamentizada (produjo una leve disminución de la adherencia relativa) que a la forma levaduriforme (no modificó la capacidad de adherencia relativa) de la cepa **Ca 787** (**Tabla N° 22**).

Efecto de la filamentización: Al comparar la capacidad de adherencia de las levaduras filamentizadas en medio 199 con respecto a la adherencia de las

levaduras en su fase levaduriforme (consideradas en conjunto las levaduras tratadas y no tratadas con FCZ), se observó un aumento significativo de la adherencia de las levaduras filamentizadas con respecto a la forma levaduriforme **(Tabla N° 24, Gráficos N° 11 y 13)**. Estos resultados coinciden con los datos obtenidos en los estudios de adherencia y filamentización con las cepas **Ca 787** y **Ca CECT 1394 (Item IV.2.4).**

El aumento de la adherencia que se observa para las levaduras expuestas al FCZ e incubadas en medio 199 muestra que el ATF no impide la emisión de tubos germinativos, sin embargo, al microscopio se observó que los TG de las levaduras tratadas con FCZ eran más cortos y menos numerosos que los que se observaron en el caso de las levaduras filamentizadas y no tratadas con FCZ. Este hecho justificaría la leve disminución de la adherencia observada para las levaduras tratadas con FCZ y filamentizadas con respecto al testigo (levaduras no tratadas y filamentizadas) **(Tabla N° 22** y **Gráfico N° 11).**

En el segundo ensayo realizado, para profundizar el efecto del ATF sobre la cepa ***C. albicans* Ca 787,** se trataron las levaduras con 2 concentraciones de FCZ: 0,4 µg/ml (0,5 x CIM) y 0,8 µg/ml (1 x CIM). También, como en el ensayo anterior, se estudió la acción del FCZ sobre la capacidad de filamentización de las levaduras y la adherencia de las levaduras filamentizadas. Se agregó la variable tiempo y se sometió a las levaduras a la acción del FCZ durante 24 y 48 hs, con el fin de prolongar el efecto del ATF.

Efecto del FCZ: 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 (consideradas en conjunto la forma

levaduriforme y la forma filamentosa, a las 24 y 48 hs). (**Tabla Nº 27 y Gráfico Nº 14 y Nº 15**).

Al analizar el efecto del ATF para la fase levaduriforme y para la fase filamentizada por separado, se observó que el aumento relativo de la adherencia que produce el FCZ en una concentración de 0,8 μg/ml es menos marcado para la forma filamentizada que para la forma levaduriforme (**Tabla Nº 26**), debido a que el FCZ afecta la emisión de TG.

Efecto de la filamentización: Al comparar la capacidad de adherencia de las levaduras filamentizadas en medio 199 con la adherencia de las levaduras en su fase levaduriforme (consideradas en conjunto las levaduras tratadas y no tratadas con FCZ e incubadas durante 24 y 48 hs), se observó un aumento significativo de la adherencia de las levaduras en la forma filamentizada con respecto a la forma levaduriforme (**Tabla Nº 28, Gráficos Nº 14 y Nº 16**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio del efecto de la filamentización sobre la adherencia de las cepas **Ca 787** y **Ca CECT 1394 (Item IV.2.4)** y en el 1° ensayo de adherencia con FCZ.

Efecto del tiempo de incubación: Al analizar el efecto del tiempo de incubación sobre la adherencia de las levaduras, se detectó un aumento significativo en la capacidad de adherencia de las levaduras incubadas durante 48 hs respecto de las incubadas 24 hs (**Tabla Nº 29, Gráficos Nº 17**), para la forma levaduriforme y filamentizada y para las levaduras tratadas con las 2 concentraciones de FCZ (**Gráfico Nº 14**). King et al. (124) demostraron que la fase de crecimiento de las levaduras tenía una marcada influencia en la adherencia y que las levaduras en la fase estacionaria de desarrollo adherían en mayor número que las que estaban en su fase exponencial, aunque estos autores

no detectaron un aumento de la adherencia al aumentar el tiempo de crecimiento después de las 24 hs.

La acción del FCZ afecta más a la forma filamentizada que a la forma levaduriforme de ***C. albicans***. Lo mismo que en el 1° ensayo, el FCZ no inhibió la emisión de tubos germinativos, pero luego de 2 hs de incubación en medio 199 a 37°C, se observaron TG apenas incipientes y menos numerosos, en las levaduras tratadas con ambas concentraciones de FCZ (**Figuras N° 11 y 12**), que en las levaduras no tratadas (**Figura N° 7**). Estos resultados coinciden con los de Ghannoum et al. (43) quienes encontraron un retardo en la aparición de TG, luego de incubar levaduras de una cepa de ***C. albicans*** durante 24 hs con FCZ (en concentraciones 0,5 x MIC y 1 x MIC) y exponerlas luego en suero a 37°C. No obstante, estos autores observaron que pasadas las 2 hs de incubación, aproximadamente el 80% de las levaduras habían emitido TG, aún las expuestas a la mayor concentración de FCZ.

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 clumps o agregados celulares, adheridas a las CEB (**Figuras N° 9 y 10**).

De acuerdo a estas observaciones, el aumento de la adherencia para las levaduras de la cepa ***C. albicans*** **Ca 787** tratadas con 0,8 μg/ml de FCZ, se debería a la tendencia de las mismas a formar agregados celulares, difíciles de romper (126). Al mantenerse unidas, se adheriría todo el "clump" de levaduras lo que resultaría en un valor artificialmente aumentado de la adherencia de unas pocas levaduras. Las modificaciones que el FCZ podría ejercer, en forma

individual, sobre la capacidad de adherencia de cada levadura, quedarían enmascaradas por el fenómeno de co-agregación antes mencionado.

Sobel et al (126) al estudiar la acción del ketoconazol en la adherencia de ***C. albicans*** a 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 glicoproteínas 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 (o FCZ), no tendría un efecto marcado en la adherencia.

Islam et al. (160) 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 CIMs.

Bujdakova et al. (161) hallaron que el FCZ, en concentraciones subinhibitorias, producía una inhibición de la expresión de la proteína de ***Candida*** que une iC3b, pero concentraciones menores del ATF, provocaban un ligero aumento de la expresión de esta proteína en comparación con un control no tratado. La concentración del ATF influiría en la expresión de la proteína que une a iC3b produciendo un cambio en la adherencia y en la virulencia de la cepa.

Otros autores observaron que el FCZ producía una reducción en la adherencia de ***C. albicans***. Ellepola et al., 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 (162, 163). Braga et al. (164) observaron que el FCZ provocaba una reducción significativa de la adherencia de ***Candida*** a CEV mientras que Segal et al. (123) 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.

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, afectaron la formación de tubos germinativos, produjeron alteraciones en la morfología y aumentaron 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.

IV.2.6- EFECTO DE OTROS MICROORGANISMOS EN LA ADHERENCIA DE *C. albicans*

La flora normal del TGH es abundante y diversa. La acidez del estómago impide una colonización significativa en el huésped normal, aunque muchas especies pueden pasar a través del estómago y establecerse en el tracto intestinal inferior. La flora normal de la primera porción del intestino delgado es

escasa, compuesta por 10 a 10^3 bacterias / ml, principalmente **estreptococos, lactobacilos** y **levaduras**. En el íleon distal, el número de bacterias asciende a 10^6-10^7 bacterias /ml, encontrándose especies de la familia **Enterobacteriaceae** y ***Bacteroides***. La flora normal del intestino grueso del adulto consiste en especies anaerobias como ***Bacteroides, Clostridium, Bifidobacterium*** y otros, que superan en número a los aerobios, constituidos especialmente por ***Escherichia coli***, otras especies de la familia **Enterobacteriaceae**, **enterococos** y **estreptococos**. En la última porción del intestino grueso y en las heces, el número de bacterias puede llegar a alcanzar a 10^{11}-10^{12} bacterias / g constituyendo el 10-20 % de la masa fecal. (165)

Las terapias antimicrobianas producen la supresión temporaria de los componentes de la flora intestinal sensibles a ellas, siendo reemplazados por otros microorganismos resistentes, como las levaduras. Diferentes autores han comunicado la colonización y diseminación de levaduras del género ***Candida*** en animales de experimentación tratados con antibióticos, luego de suministrarles las levaduras por vía oral (3, 98, 118, 166, 167). Dado que el tratamiento con antibióticos predispone a los animales de experimentación a la colonización y subsecuente diseminación de ***Candida,*** Kennedy et al (3, 166) sugirieron que los microorganismos de la flora intestinal indígena suprimirían el sobredesarrollo de las levaduras en el intestino.

La adherencia de ***Candida*** a la superficie de las células del huésped serían esencial para iniciar el proceso que lleva a la colonización y como las bacterias de la flora intestinal tienden a inhibir este proceso, interferirían en los mecanismos de interacción célula-levadura.

Las bacterias pertenecientes a la familia **Enterobacteriaceae**, principalmente ***Escherichia coli,*** constituyen la flora facultativa predominante del intestino humano, especialmente en la porción media y distal del intestino delgado (165). Por su parte, los **lactobacilos** aerobios, son habitantes comunes de la cavidad oral, del TGH y del tracto genital femenino del ser humano (165), hábitats que frecuentemente albergan a ***Candida albicans***, como parte de la flora habitual (2, 5).

Para estudiar el efecto de diferentes bacterias sobre la adherencia de ***C. albicans*** a CEB, se utilizaron cepas de ***Lactobacillus spp*** y de ***E. Coli***.

Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de ***Lactobacillus spp*** disminuyeron significativamente la adherencia de ***C. albicans*** **Ca 787** a CEB, *in vitro* (**Tabla Nº 31 y Gráfico Nº 18**). Esta disminución fue del 10%, respecto de la adherencia de la misma cepa de levadura en ausencia de las bacterias. Sobel et al. (141) obtuvieron datos similares en el estudio de la adherencia de ***C. albicans*** a CEV. Estos autores señalaron que la preincubación de las células epiteliales con aislamientos vaginales de ***Lactobacillus spp*** producían una disminución significativa de la adherencia de las levaduras.

El estudio del efecto de la presencia de ***E. coli*** **RM 2608** en la adherencia de ***C. albicans*** **Ca 787,** permitió observar una disminución del 4 %, con respecto a la adherencia de esta misma cepa en ausencia de las bacterias, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (**Tabla Nº 33 y Gráfico Nº 19**).

E. coli es un microorganismo que ha sido frecuentemente utilizado con el fin de estudiar el efecto de la presencia de bacterias en la adherencia de ***C. albicans,*** con resultados variables (136, 168, 169, 170). Centeno et al (136), observaron un aumento en la adherencia de ***C. albicans*** a CEB en presencia de

E. coli con fimbrias tipo 1 (adhesinas manosa sensibles). Estas fimbrias localizadas en la superficie de las enterobacterias serían la razón de este incremento al facilitar la adherencia de ***C. albicans*** a la superficie de las células epiteliales. Makrides et al. (168) tuvieron resultados similares y atribuyeron el aumento en la adherencia de ***C. albicans*** a la presencia de fimbrias en las células bacterianas y receptores de manosa en la superficie de las levaduras y de las CEB.

Posteriormente, Nair et al observaron que ***C. albicans*** mostraba un leve aumento de la adherencia al material acrílico en presencia de ***E. coli***, siendo esta diferencia no significativa (169), pero trabajando con CEB, la misma cepa de ***E. coli*** producía una disminución significativa en la adherencia de ***C. albicans*** (170).

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la presencia de ***E. coli*** no produjo cambios en la adherencia de ***C. albicans*** a CEB. La cepa ***E. coli*** **RM 2608** utilizada poseía fimbrias P (manosa resistente), a diferencia de la cepa de ***E. coli*** utilizada por Centeno et al. (136) y Makrides et al (168), que tenía fimbrias tipo 1 (manosa sensible). Esta diferencia de adhesinas presentes en la cepa bacteriana utilizada, podría ser la causa del efecto disímil de ***E. Coli*** en la adherencia de ***C. albicans*** a CEB.

Los miembros de la flora intestinal indígena inhibirían la colonización de ***C. albicans*** en el TGH principalmente por dos mecanismos: a) disminuyendo la población de las levaduras en el intestino a través de factores antimicrobianos secretados, potenciales de óxido-reducción y competencia por los nutrientes disponibles (3) y b) inhibiendo la asociación de ***Candida*** a la mucosa del TGH (166).

Las cepas de lactobacilos inhibieron la adherencia de ***C. albicans*** a CEB, *in vitro,* confirmando lo que ocurre *in vivo* y podría esperarse que otras bacterias actúen en el mismo sentido, dada la gran variedad de especies de la flora indígena que habitan el TGH.

IV.3- ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA* EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

IV.3.1- MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

La candidiasis diseminada se ha convertido en un problema creciente en el huésped inmunocomprometido (19-26). El tracto gastrointestinal es la vía de entrada más común de ***Candida*** al organismo humano (101, 102, 112) y la colonización del intestino es un foco potencial de diseminación, principalmente si se producen alteraciones o cambios a nivel de la inmunidad de la mucosa (112).

Diferentes modelos experimentales se han desarrollado para estudiar los eventos en la colonización y diseminación de ***Candida albicans***, la mayoría de los mismos, bajo condiciones que simulan la predisposición de la mucosa gastrointestinal a la candidiasis. Estos modelos han utilizado ratones con síndromes de inmunodeficiencias inducidos por retrovirus (171) o immuno deficiencias genéticas en la inmunidad celular innata y/o inmunidad mediada por células (172), para estudiar la importancia de la respuesta inmune celular en la infección por ***C. albicans***. Otros modelos se han desarrollado con ratones

inmunocompetentes previamente colonizados con ***Candida*** a los que se les suministró antibióticos, corticoides y/o drogas inmunosupresoras para estudiar la secuencia de eventos que llevan a la candidiasis sistémica originada a partir del intestino (3, 33, 98, 118, 166, 167, 173).

Además de la utilización de ratones adultos, el modelo experimental de ratones infantes ha sido usado satisfactoriamente, en varias investigaciones sobre la interacción huésped-parásito (116, 174-176). Pope et al. (116) utilizando ratones de 5-6 días que fueron inoculados por vía intra-gástrica con una suspensión concentrada de ***C. albicans***, lograron la colonización y diseminación de las levaduras en los tejidos de los ratones, sin ninguna manipulación previa para inmunosuprimir al animal. La ventaja de este modelo experimental es la escasa flora microbiana presente en el TGI de estos animales, la que no alcanza a ejercer su efecto antagonista como para evitar que las levaduras puedan ocupar eficazmente los sitios de adherencia y colonización. Las levaduras de la flora indígena, como ***C. pintolopesii***, recién aparece en el TGI de los ratones, en el momento del destete (aproximadamente a la 3° semana de vida).

Un ecosistema microbiano es el complejo de microorganismos en un medio ambiente específico y los alrededores con los cuales los organismos están asociados conteniendo hábitats y nichos para los microbios. Estos hábitats o espacios físicos del sistema son normalmente ocupados por comunidades de microbios autóctonos o indígenas. Los microorganismos no indígenas pueden ser encontrados en el hábitat de algún sistema dado. Ellos no son característicos del hábitat y pueden estar presentes solamente en forma transitoria, ocupando el nicho que han dejado vacante sus habitantes autóctonos como consecuencia de la perturbación del sistema (117).

C. albicans es un microorganismo no autóctono del TGI de los ratones, pero puede ocupar los nichos que han dejado vacantes bacterias de la flora indígena, como sucede durante el tratamiento de los animales con antibióticos o hasta el establecimiento de la flora indígena, en el modelo experimental de los ratones infantes.

IV.3.2- ANÁLISIS DE LA COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE CEPAS DE *CANDIDA*

La colonización intestinal por levaduras del género ***Candida*** es un proceso muy complejo en el que participan múltiples factores, pero sin duda la capacidad de las levaduras para asociarse a la mucosa del TGI, sería de gran importancia ecológica, tanto en el proceso de colonización como para la diseminación de este patógeno oportunista.

El estudio comparativo de la adherencia de diferentes especies del género ***Candida*** a CEB *in vitro*, permitió establecer una jerarquía en los valores de adherencia, siendo máximo para cepas de ***C. albicans*** y mínimo para ***C. krusei***.

Posteriormente se inocularon cepas de ***C. albicans*** y de ***Candida spp.***, para analizar su comportamiento *in vivo*, en el modelo experimental de ratones infantes, con el fin de evaluar la importancia de la adherencia en el proceso de colonización y diseminación.

La capacidad de colonización de las levaduras se midió a través de la persistencia de las mismas en el TGI de los ratones (estómago e intestino). La capacidad de diseminación se midió a través de la detección y persistencia de las levaduras en los riñones, bazo e hígado de los ratones.

IV.3.2.1- COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE CEPAS DE *C. albicans*

Se utilizaron 4 cepas de ***C. albicans*** : **Ca 333, Ca 787, Ca 485 y Ca CECT 1394** y además la cepa **Ca 787** filamentizada y crecida en sacarosa 500mM.

Colonización del estómago:

Para todas las cepas de ***C. albicans*** estudiadas se observó una evolución similar de la colonización en estómago a través del tiempo (**Gráfico N° 26**). A las 3 hs se produjo una caída brusca en el N° promedio de UFC/g (la mayoría de las levaduras inoculadas pasan a intestino y unas pocas quedan retenidas en el estómago) mientras que a las 24 y 48 hs la disminución fue leve. En la 1° y 2° semanas post-inoculación se obtuvo el máximo valor en el N° promedio de UFC/g (salvo para la cepa **Ca 485** que se produjo a la 3° semana). A partir de la 3° semana comenzó un descenso paulatino del N° de levaduras en el estómago de los ratones.

La mayor diferencia en la capacidad de colonización de las diferentes cepas, se observó en el tiempo de persistencia de las levaduras en el estómago. Para la cepa de colección **Ca CECT 1394** fue de 6 semanas, para **Ca 485** y **Ca 333** de 7 semanas y para la cepa **Ca 787** (forma levaduriforme, filamentizada y crecida en sacarosa 500mM) las levaduras permanecieron más de 8 semanas.

La cepa **Ca CECT 1394** presentó los valores más bajos del N° promedio de UFC/g de tejido a partir de la 2° semana y fue la primera cepa que negativizó los cultivos, mientras que **Ca 787** persistió más tiempo en estómago y presentó los valores más altos del N° promedio de UFC/g de tejido.

En los estudios de adherencia *in vitro*, no se detectó una diferencia significativa para las distintas cepas de ***C. albicans***, si bien las cepas **Ca 485** y **Ca CECT 1394** presentaron valores de adherencia más bajos y a su vez, *in vivo*, mostraron una persistencia menor en estómago e intestino y valores más bajos del Nº promedio de UFC/g que las cepas **Ca 333** y **Ca 787,** para la mayoría de los tiempos analizados.

Como resultado del estudio estadístico, comparando los valores del Nº promedio de UFC/g a las 3, 24 y 48 hs, para las cepas **Ca 787** y **Ca 787 filamentizada**, se detectó una diferencia estadísticamente significativa y el Nº de UFC/g en el estómago fue mayor para la forma levaduriforme que para la filamentizada. Estos resultados no coinciden con los obtenidos *in vitro,* donde la forma filamentizada fue estadísticamente más adherente que la forma levaduriforme. Luego de las 48 hs no se detectaron diferencias significativas en el Nº de UFC/g y la evolución de la colonización fue muy similar para las formas levaduriforme y filamentizada de la cepa **Ca 787**. La inoculación en animales de experimentación con cepas de ***C. albicans*** filamentizadas no ha sido descripta en la literatura, por lo que esta discordancia en los resultados *in vitro* e *in vivo* requerirían un estudio más exhaustivo de los factores que intervendrían en la colonización de las levaduras filamentizadas en este modelo experimental, hasta las 48 hs posteriores a la inoculación.

Colonización del intestino:

Para todas las cepas de ***C. albicans*** se observó una evolución similar de la colonización en intestino a través del tiempo (**Gráfico Nº 27**): a las 3 hs se produjo una caída leve en el Nº de UFC; a las 24 y 48 hs el descenso fue más marcado

(sobre todo para las cepas **Ca 485** y **CECT 1394**). A la 1° semana post-inoculación, los valores aumentaron levemente (excepto para la cepa **Ca 485**, para la cual esta recuperación se notó hacia la 3° semana, lo mismo que para el estómago). A partir de la 2° semana, comenzó un descenso paulatino del N° promedio de UFC/g de levaduras en el intestino de los ratones.

La mayor diferencia entre la capacidad de colonización de las diferentes cepas, se observó en el tiempo de persistencia de las levaduras en intestino que, para la cepa **Ca CECT 1394** fue de 6 semanas, para las cepas **Ca 485** y **Ca 333** de 7 semanas y para la cepa **Ca 787** (forma levaduriforme, filamentizada y crecida en sacarosa 500mM) de 8 semanas (última semana estudiada). Además, esta última cepa, mostró los mayores valores promedio de UFC/g de tejido, para casi todos los tiempos post-inoculación estudiados. La cepa **Ca CECT 1394,** fue la que presentó valores más bajos de adherencia *in vitro*, y del N° promedio de UFC/ g de tejido *in vivo,* para la mayoría de los tiempos.

Diseminación de las cepas de *C. albicans:*

Todas las cepas estudiadas de ***C. albicans*** mostraron capacidad para diseminarse, a partir del TGI de los ratones, a riñón, hígado y/o bazo y el tiempo máximo de persistencia en dichos órganos fue de 48 hs.

Las cepas **Ca 333** y **Ca 787** se diseminaron a riñón, bazo e hígado a las 3 y 24 hs, y a las 48 hs solamente en hígado (**Gráficos N° 20 y 21**). Estas dos cepas mostraron igual capacidad de diseminación en el ratón, aunque los valores del N° promedio de UFC/g fueron mayores para **Ca 787** a las 3, 24 y 48 hs.

Para la cepa **Ca 787** filamentizada se obtuvieron los mismos resultados que para la forma levaduriforme (**Gráfico N° 24**). La levadura **Ca 787** crecida en sacarosa 500 mM, a las 3 hs se diseminó a riñón, bazo e hígado; a las 24 hs, persistió en los dos últimos y se negativizó en todos los órganos a las 48 hs posteriores a la inoculación.

La cepa **Ca 485** se diseminó a riñón, bazo e hígado, persistiendo sólo en este último a las 24 hs y se negativizó en todos los órganos a las 48 hs posteriores a la inoculación (Gráfico N° 22).

La cepa **Ca CECT 1394**, se diseminó solo a hígado a las 3 y 24 hs (Gráfico N° 23) y fue la cepa de ***C. albicans*** que mostró menor capacidad para diseminarse en los órganos de los ratones .

IV.3.2.2- COLONIZACIÓN Y DISEMINACIÓN DE CEPAS DE *Candida spp*

Se utilizaron 5 especies de ***Candida spp***: ***C. glabrata*** **Cg 751,** ***C. krusei*** **Ck 615,** ***C. lusitaniae*** **Cl 670,** ***C. parapsilosis*** **Cp 345** y ***C. tropicalis*** **Ct 508.**

Colonización del estómago:

La evolución de la colonización en estómago a través del tiempo fue levemente diferente para las distintas especies de ***Candida spp*** y marcadamente disímil de las cepas de ***C. albicans*** (**Gráfico N° 33**). Para todas las cepas de ***Candida spp*** se observó una acentuada disminución del N° de UFC/g a las 3 hs (la mayoría de las levaduras inoculadas pasan a intestino). Para algunas cepas, este descenso continuó a las 24 hs (**Cg 751, Ck 615** y **Ct 508**) mientras que para **Cp 345**, esta disminución fue más atenuada y se produjo un leve aumento del N°

de UFC/g para **Cl 670**. A las 48 hs, todas las cepas mostraron una disminución en el N° de UFC/g en estómago. Entre las 48 hs y la 1° semana, se produjo la desaparición de ***C. krusei*** **Ck 615** del estómago de los ratones, mientras que para **Cl 670** y **Cp 345** se observó una disminución del N° de UFC/g. **Cg 751** y **Ct 508**, mostraron un leve aumento de UFC/g a la 1° semana post-inoculación como también se produjo para **Ca 333 y 787**.

Entre la 1° y 2° semanas fueron eliminadas del estómago todas las cepas de ***Candida spp***, a diferencia de las cepas de ***C. albicans*** **Ca 333 y 787** para las cuales la colonización del estómago se prolongó hasta la 7° y 8° semanas, respectivamente.

Colonización del intestino:

La evolución de la colonización en intestino a través del tiempo fue levemente disímil para las distintas especies de ***Candida spp*** y marcadamente diferente de las cepas de ***C. albicans*** (**Gráfico N° 34**). A las 3 hs posteriores a la inoculación, se produjo una disminución leve del N° de UFC/g para las cepas, **Cg 751, Cl 670 y Cp 345** (igual que para las cepas de ***C. albicans*** **Ca 333** y **Ca 787)** y moderada para **Ck 615** y **Ct 508**. A las 24 hs continuó la reducción del N° de UFC/g para todas las cepas, siendo más acentuada para las cepas **Cg 751** y **Ck 615.** A las 48 hs, estas últimas mostraron una leve recuperación del N° de levaduras, mientras que para el resto de las cepas continuó la disminución del N° de UFC/g.

En el transcurso de la 1° semana se produjo la desaparición de **Ck 615** del intestino y durante la 2° semana, ocurrió lo mismo para el resto de las cepas de ***Candida spp***, a diferencia de ***C. albicans*** **Ca 333** y **787,** para las cuales la

colonización en el intestino se prolongó hasta la 7° y 8° semanas, respectivamente.

Diseminación de las cepas de *Candida spp:*

Todas las especies estudiadas de ***Candida spp*** mostraron capacidad para diseminarse a riñón, hígado y/o bazo a partir del TGI de los ratones y el tiempo máximo de persistencia en dichos tejidos fue de 24 hs, excepto para ***C. parapsilosis* Cp 345** que permaneció hasta las 48 hs.

Las cepas de ***C. glabrata* Cg 751** y ***C. lusitaniae* Cl 670** (**Gráficos N° 28 y 30**) se diseminaron a riñón, bazo e hígado solamente a las 3 hs y los valores del N° promedio de UFC/g fueron similares para ambas levaduras; a las 24 hs y a las 48 hs se negativizaron los cultivos en todos los órganos.

***C. krusei* Ck 615**, se diseminó a riñón, bazo e hígado a las 3 hs; a las 24 hs solo persistió en hígado y a las 48 hs se negativizaron los cultivos en todos los órganos (**Gráfico N° 29**).

C. tropicalis* Ct 508** fue la especie de ***Candida spp. que mostró menor capacidad de diseminación y solo se detectó en hígado a las 3 hs posteriores a la inoculación (**Gráfico N° 32**).

***C. parapsilosis* Cp 345**, por el contrario, fue la especie que mostró mayor capacidad de diseminación y persistencia en los tejidos; se detectó en bazo e hígado a las 3 hs, 24 y 48 hs y en riñón a las 3 y 24 hs (**Gráfico N° 31**). La permanencia en bazo fue mayor que para ***C. albicans* Ca 333** y **Ca 787,** aunque esta última cepa presentó valores más altos del N° de UFC/g para los 3 órganos analizados.

El estudio de la diseminación de las diferentes especies de ***Candida*** a partir del TGI de los ratones, permitió establecer que todas las especies utilizadas mostraron capacidad de atravesar la mucosa intestinal y diseminarse a los tejidos. Este proceso llamado persopción, ocurriría por una translocación de las levaduras a través de las células mucosas del intestino delgado (106, 107, 177, 178). Utilizando la vía linfática alcanzarían el torrente sanguíneo y el hígado sería el primer órgano que captaría las levaduras. Esta ruta de transmisión se confirmó por nuestros datos, ya que el hígado fue el órgano que presentó mayor número de cultivos positivos para las diferentes especies (y en algunos casos el único), con un mayor porcentaje de animales infectados (**Tablas N° 33 a 43**) y mayor persistencia de la infección, con respecto a los otros órganos. El bazo fue el 2° órgano más infectado y por último, los riñones.

Las levaduras fueron detectadas a las 3 hs posteriores a la inoculación pero Field et al. (174) determinaron que la persopción comenzaría alrededor de los 30 minutos de inoculadas las levaduras. El valor más alto del N° promedio de UFC/g de tejido se produjo a las 3 hs (salvo para ***C. albicans*** **Ca 787** que fue mayor a las 24 hs), este valor declinó a las 24 y 48 hs para negativizarse hacia la 1° semana posterior a la inoculación. ***C. albicans*** **Ca 333 y Ca 787** (en hígado) y ***C. parapsilosis*** **Cp 345** (en hígado y bazo), fueron las cepas que presentaron mayor persistencia en los tejidos (hasta las 48 hs). La eliminación de las levaduras de la circulación es realizada principalmente por el hígado, aunque también contribuyen bazo y riñones, especialmente por fagocitosis del sistema retículo endotelial (177), junto con otros mecanismos del sistema inmunológico (9).

Pope et al (116) y Field et al. (174) utilizando ratones de la línea CFW de 5-6 días y diferentes cepas de ***C. albicans***, informaron resultados similares

observando que el hígado fue el órgano con mayor porcentaje de cultivos positivos. También detectaron que las distintas cepas diferían en su capacidad para diseminarse a los tejidos, aunque para ellos el tiempo de permanencia en los distintos órganos se extendió hasta 1 semana. Al utilizar inóculos comparables, la causa de la mayor continuidad en los tejidos podría ser una mayor virulencia de las cepas utilizadas, aunque Guentzel et al (179) observaron que la persistencia de ***Candida*** en los tejidos variaba con la línea de ratones utilizada. Estos autores trabajaron con una línea de ratones CFW, mientras que nuestros estudios se realizaron con una línea de ratones Rockland.

La capacidad de adherencia de las levaduras *in vitro*, no mostró relación con la capacidad de las mismas para diseminarse, ya que las levaduras con menor adherencia (cepas de ***C. glabrata, C. krusei, C. lusitaniae***) lograron infectar los órganos de los ratones y dos de las cepas que mostraron mayor capacidad para diseminarse (***C. albicans* Ca 787** y ***C. parapsilosis* Cp 345**), no fueron las levaduras que presentaron mayor capacidad de adherencia. Además, la cepa de ***C. albicans* Ca 787** filamentizada y la cepa de ***C. albicans* Ca 787** crecida en sacarosa 500 mM, mostraron *in vitro*, mayor adherencia que sus respectivos testigos (forma levaduriforme y crecida en CSG), mientras que *in vivo*, la capacidad de ambas para diseminarse a los tejidos fue igual a la cepa testigo y la permanencia en los distintos órganos, similar.

Si bien la adherencia de ***Candida*** a la superficie de las células del TGI es requerida para iniciar el proceso que lleva a la colonización, no es suficiente para explicar la invasión a otros tejidos. Luego que se ha producido la unión de la levadura a las células del huésped, ***Candida*** necesita secretar enzimas para

poder penetrar en los tejidos más profundos. Las más importantes son las proteinasas y las fosfolipasas extracelulares, producidas por la mayoría de las cepas de ***C. albicans*** y algunas otras especies como ***C. tropicalis*** y ***C. parapsilosis*** (52-54). La secreción de aspartil proteinasas ha sido relacionada con la patogenicidad de las cepas que las producen (180, 181). Recientes estudios han demostrado que la actividad de proteinasa contribuye al daño tisular durante la infección por ***Candida*** en modelos experimentales (182, 183) y que genes de la familia SAP (secreted aspartyl proteinases) son expresados por ***C. albicans*** durante la colonización en seres humanos (52, 184). También la fosfolipasa ha sido implicada como un factor de virulencia en cepas de ***C. albicans*** (110).

Además de estudiar la capacidad de adherencia *in vitro* de estas 23 cepas de ***Candida*** aisladas del TGH, y con el fin de completar el perfil de virulencia de las mismas, Tosello et al. (185, 186) realizaron pruebas de screening para determinar la actividad de proteinasa (AP) y la actividad de fosfolipasa (AF) de las mismas. Los resultados obtenidos mostraron que todas las cepas de ***C. albicans*** (excepto **Ca 192**) poseían AP y AF. La AF se calculó a través del índice de Price, que es una medida semicuantitativa de la AF, de manera tal que algunas cepas presentaron valores altos de AF (++++, **Ca 333**), valores intermedios (+++ **Ca 144**, ++ **Ca 787**) y valores bajos (+, **Ca 485, Ca CECT 1394**).

De las cepas de ***Candida spp.***, solo ***C. parapsilosis*** **Cp 485 y Cp 984** y ***C. tropicalis*** **Ct 294** presentaron AF (+) y AP; ***C. tropicalis*** **Ct 508** y ***C glabrata*** **751,** solo AP. El resto de las cepas (***C. kefyr, C. krusei, C. lusitaniae, C. colliculosa***), no tuvieron AP ni AF.

Los estudios referidos a los distintos factores de patogenicidad de las levaduras *in vitro*, permitieron establecer una jerarquía en la capacidad potencial de estos microorganismos para infectar al huésped humano o animal. Así, de acuerdo a los resultados de los estudios de adherencia (**Tabla N° 4, Gráfico N° 1**), y la producción de proteinasas y fosfolipasas, las levaduras potencialmente más virulentas (de las inoculadas en ratones) se ubicarían en el siguiente orden, ***C. albicans*** **Ca 333, Ca 787, Ca 485=Ca CECT 1394,** ***C. parapsilosis*** **Cp 345,** ***C. tropicalis*** **Ct 508,** ***C. glabrata*** **Cg 751,** ***C lusitaniae*** **Cl 670,** ***C. krusei*** **Ck 615.** Sin embargo, este ordenamiento no coincide exactamente con los resultados obtenidos sobre la capacidad de diseminación de estas cepas en el modelo experimental de ratones infantes, para el cual se estableció la siguiente jerarquía: ***C. parapsilosis*** **Cp 345,** ***C. albicans*** **Ca 333= Ca 787, Ca 485=** ***C. krusei*** **615,** ***C. glabrata*** **=** ***C. lusitaniae*****, Ca CECT1394=***C. tropicalis*** **Ct 508**. Estos resultados obtenidos *in vivo* con animales de experimentación, no coinciden con los obtenidos *in vitro* y esta discordancia entre los resultados refleja la complejidad de las factores involucrados en la relación huésped-parásito.

Algunos investigadores postulan que el tamaño del inoculo tendría efecto sobre el mecanismo por el cual los microorganismos alcanzan el sistema circulatorio y habría un nivel mínimo de levaduras en el intestino, por encima del cual las mismas atravesarían rápidamente la barrera del TGI (112, 187, 188). Dado que las levaduras son eliminadas de los órganos dentro de cortos períodos de tiempo (177), debe ser necesario un pasaje constante de las mismas a través de la mucosa intestinal para que sean recuperadas en hígado y bazo, a las 48 hs posteriores a la inoculación, como ocurrió con ***C. albicans*** **Ca 333, Ca 787** y ***C. parapsilosis*** **Cp 345**. Si se considera como válida esta hipótesis, las levaduras

deberían mantener altos niveles constantes de células viables en el intestino, para permitir la diseminación que se observó a las 48 hs para estas cepas. Los resultados obtenidos, confirman esta teoría ya que las cepas **Ca 333, Ca 787 y Cp 345**, fueron las que mostraron valores más altos del promedio del Nº de UFC/g de tejido a las 24 y 48 hs (**Tablas Nº 34, 35 y 41; Gráfico Nº 34**). Melles et al (107) postularon que el proceso de translocación estaría favorecido en animales jóvenes para los cuales tanto la barrera mucosa como el sistema linfoideo asociado al intestino serían inmaduros. Alguna de estas teorías o ambas podrían justificar la diseminación observada para las cepas de ***Candida*** con limitado potencial patogénico.

A partir del estudio de la capacidad de colonización del TGI de los ratones por las diferentes especies de ***Candida***, se pudo establecer que existe una gran diferencia entre la capacidad de colonización de ***C. albicans*** (que fue de 8 semanas para la cepa **Ca 787**) con respecto al resto de las especies estudiadas (menos de 1 semana para ***C. krusei*** y de 2 para el resto de las especies de ***Candida spp***). Otros investigadores (178) lograron una persistencia de ***C. albicans*** hasta 60 y 120 días en el TGI utilizando ratones de las líneas CFW y C57BL/6, respectivamente (con la línea de ratones Rockland, la permanencia máxima fue de 8 semanas), por lo que el tiempo de colonización de las levaduras en el TGI varía con la línea de ratones utilizada.

Para cepas de ***C. albicans*** existe abundante información acerca de la colonización y diseminación en animales de experimentación (3, 98, 116, 118, 166, 167, 173, 174, 175, 176), pero pocas referencias acerca de la capacidad de colonización de otras especies de ***Candida*** (188). Kennedy et al. (188) inocularon

por vía oral ratones adultos (previamente tratados con antibióticos), con ***C. albicans, C. pseudotropicalis*** (actualmente ***C. kefyr***), ***C. parapsilosis, T. glabrata*** (actualmente ***C. glabrata) y C. tropicalis,*** y las recuperaron a las 48 hs de hígado, bazo y riñones en un 90%, 80%, 75%, 60% y 50% de los animales, respectivamente y de intestino, en el 100% de los ratones para todas las especies, con altos niveles de UFC. Estos resultados coinciden con nuestros datos acerca de los altos porcentajes de diseminación observados para ***C. albicans*** y ***C. parapsilosis*** y el bajo porcentaje para ***C. tropicalis***. Sin embargo, estos autores no estudiaron la evolución en un mayor período de tiempo de la colonización en el TGI de las diferentes especies de ***Candida***.

El seguimiento de la colonización de las levaduras en estómago, permitió observar que para ***C. albicans***, desde la 1° y hasta la 8° semana, los valores promedio del N° de UFC/g fueron mayores que para intestino. Cole et al (112) también consideraron a la mucosa gástrica como el sitio de mayor colonización del TGI por ***C. albicans***, ya que en los ratones la porción superior del estómago es una zona queratinizada y las levaduras tendrían gran afinidad por este tipo de células. En cambio, para la mayoría de las cepas de ***Candida spp***, los valores del N° de UFC/g fueron mayores para intestino que para estómago.

La disminución del N° de UFC/g de ***C. albicans*** en el TGI (estómago e intestino) a partir de la 3° semana coincidió con la aparición, en muchos casos, de la levadura de la flora indígena ***C. pintolopesii***, y a medida que aumentó esta levadura, declinó el número de animales positivos para ***C. albicans*** (se produce el desplazamiento de ***C. albicans*** que es flora transitoria, por una levadura de la flora autóctona) (117). Para ***Candida spp***, la desaparición de las levaduras del TGI se produjo antes que aparecieran las levaduras de la flora indígena.

La facultad de las levaduras para colonizar el TGI de los ratones mostró estar relacionada con su capacidad de adherencia. Todas las cepas de ***C. albicans***, con valores altos de adherencia, lograron permanecer en estómago e intestino por períodos ≥ a 6 semanas mientras que las cepas de ***Candida spp***, con valores bajos de adherencia, desaparecieron del TGI de los ratones antes o durante el transcurso de la 1° semana posterior a la inoculación. La capacidad de adherencia de las levaduras es un factor determinante en la colonización del TGI.

Una excepción a este hecho fueron las cepas de ***C parapsilosis*** **Cp 485** y ***C. tropicalis*** **Ct 508** con valores de adherencia *in vitro*, mayores que los obtenidos para el resto de las ***Candida spp.***, pero su permanencia en estómago e intestino fue menor de 2 semanas (similar a lo observado para el resto de las especies de ***Candida*** no-***albicans***).

Los resultados obtenidos, acerca de la limitada capacidad de colonización de cepas de ***Candida spp*** en el TGI de los ratones, son de gran importancia desde el punto de vista epidemiológico, ya que estas especies, por sus escasas propiedades adhesivas, tienen disminuida su capacidad de permanecer colonizando el TGI del huésped y esto limita las posibilidades de estos microorganismos para producir infecciones diseminadas de origen endógeno.

Kennedy et al (189) estudiaron los mecanismos de asociación de ***C. albicans*** a la mucosa intestinal de ratones tratados con antibióticos. Ellos determinaron que existirían al menos 5 mecanismos diferentes: directos: a) adherencia a las células epiteliales; b) adherencia al mucus (constituido por glicoproteínas y glicolípidos); indirectos: c) co-adherencia a levaduras adheridas al epitelio; d) co-adherencia a bacterias adheridas al epitelio y mecanismo no

adhesivo: d) atrapamiento de las levaduras por el mucus que recubre las células epiteliales.

En las **Figuras Nº 19 a 22** se pueden observar levaduras de la cepa **Ca 787** asociadas a la mucosa del TGI donde se ponen de manifiesto por lo menos 3 de los mecanismos antes mencionados: adherencia al mucus en la luz de estómago e intestino, adherencia directa a las células epiteliales y co-adherencia a levaduras adheridas al epitelio.

Existirían 3 pasos o etapas diferentes e interdependientes en la asociación y pasaje de ***Candida*** a través de la mucosa intestinal: contacto y adherencia a la superficie del mucus, penetración y atrapamiento en la capa mucosa y adherencia y penetración de las células epiteliales. En todos estos pasos están involucrados los mecanismos de interacción específicos adhesina-receptor [la interacción tipo lectina entre la fracción proteica de la manoproteína de ***Candida*** y el receptor glucosídico de la superficie de la célula huésped, sería el mecanismo más importante en la adherencia de ***Candida*** a células epiteliales (64)], y la modificación enzimática de la superficie epitelial (principalmente por acción de proteinasas y fosfolipasas secretadas por ***Candida***) o ambos mecanismos, para lograr la unión y penetración a la superficie celular mucosa por levaduras del género ***Candida***.

Históricamente, ***C. albicans*** fue la especie más frecuentemente aislada de infecciones fúngicas nosocomiales (78.3%), mientras que el resto de las especies de ***Candida* no-*albicans*** eran raramente recuperadas (17). Sin embargo, datos epidemiológicos más recientes, muestran un aumento en la frecuencia de las candidiasis diseminadas y un cambio en las especies responsables de las

mismas, con una disminución de ***C albicans*** y un incremento de las especies de ***Candida spp***, tales como ***C. tropicalis, C. glabrata, C. parapsilosis*** y ***C. krusei*** y menos frecuentemente ***C. lusitaniae, C. kefyr*** y otras (19-26). Muchas de estas especies tienen asociado un alto índice de mortalidad, similar al de ***C. albicans*** (23, 24, 190), y algunas son importantes por poseer o desarrollar resistencia a los agentes antifúngicos, como ***C. krusei*** y ***C. glabrata*** que son resistentes al fluconazol (20, 26, 191) y ***C. lusitaniae***, a la anfotericina B (20, 26).

A pesar de la importancia que estas especies emergentes han adquirido en los últimos años, muy poco se sabe acerca de la epidemiología de las infecciones nosocomiales producidas por estas levaduras (137, 191, 192, 193). Un conocimiento más profundo sobre la epidemiología de la colonización y diseminación de las ***Candida*** no-***albicans*** sería esencial para prevenir nuevos brotes de estas infecciones fúngicas nosocomiales.

La caracterización del ADN por técnicas moleculares de cepas de ***Candida*** que producían colonización e infección diseminada, permitió demostrar que las levaduras responsables de la infección, eran idénticas a las que se encontraban colonizando previamente la mucosa del TGH de los pacientes (99). Estos estudios apoyan la teoría de una adquisición endógena de gran parte de estas infecciones diseminadas, especialmente para ***C. albicans, C. tropicalis y C. glabrata***. En contraste a las funguemias causadas por estas especies, las producidas por ***C. parapsilosis*** están menos frecuentemente asociadas a colonización previa y más a la utilización de catéteres endovenosos (100, 192) que constituyen otro importante factor de riesgo para las candidemias en pacientes inmunocomprometidos (22, 194).

Tanto las especies de ***Candida***, como los porcentaje de las cepas ***de C. albicans y spp*** aisladas en este trabajo a partir del TGH, concuerdan con los datos obtenidos por otros autores (2, 4, 5). A diferencia de lo observado para las cepas de ***C. albicans,*** con altos niveles de adherencia y prolongada colonización del TGI, la mayoría de las cepas de ***Candida spp*** poseen muy baja capacidad de adherencia *in vitro* y de colonización del TGI de los ratones infantes, como lo demuestran los resultados obtenidos. Los estudios sobre colonización y diseminación de cepas de ***Candida spp*** en animales están poco desarrollados, y el modelo experimental empleado en este estudio sería de gran utilidad para profundizar los conocimientos acerca de los factores del huésped que predispondrían a una colonización prolongada de las diferentes especies de ***Candida no-albicans*** en el TGI de los ratones. La información obtenida podría contribuir a la prevención de las infecciones diseminadas de origen endógeno producidas por estos patógenos oportunistas.

V-CONCLUSIONES

1- El aislamiento de levaduras de heces humanas demostró que existe un predominio de ***C. albicans*** (52,38%) dentro de la flora fúngica que habita el TGH. Otras especies de ***Candida*** no ***albicans*** son menos frecuentes (47,62%): ***C. glabrata*** (8,7%), ***C. tropicalis*** (8,7%), ***C. parapsilosis*** (8,7%), ***C. krusei*** (8,7%), ***C. lusitaniae*** (4,36%), ***C. kefyr*** (4,36%) y ***C. colliculosa*** (4,36%).

2- El estudio de la capacidad de adherencia de diferentes especies y cepas del género ***Candida*** aisladas del TGH, permitió diferenciar tres grupos de levaduras de acuerdo al nivel de adherencia: a- Levaduras con elevada capacidad de adherencia a CE, formado por las distintas cepas de ***C. albicans***; b- Levaduras con capacidad intermedia para adherirse a CEB, constituida por las cepas de ***C. parapsilosis*** y ***C. tropicalis***, y c- Levaduras con muy baja capacidad de adherencia, formada por el resto de las cepas de ***Candida spp: C. glabrata, C. kefyr, C. krusei, C. lusitaniae, C. colliculosa***. La cepa de ***C. albicans*** CECT 1394, mostró menor capacidad de adherencia que las cepas salvajes de ***C. albicans*** (195-198).

3- El estudio del efecto del pH y la temperatura permitió determinar que la adherencia de ***C. albicans*** a CEB es óptima a pH=7 y 37 °C. A 28 °C no se modificó la capacidad de asociación de las levaduras a CEB pero disminuyó al utilizar valores de pH más bajos (199, 200).

4- La variación en la composición y concentración de los hidratos de carbono del medio de crecimiento de las levaduras modificó la capacidad de adherencia de ***C. albicans***, *in vitro*: concentraciones 50 y 200 mM de galactosa; 50, 200 y 500 mM de sacarosa y 500 mM de manosa, favorecieron la adherencia de ***C. albicans*** a CEB, con respecto a las levaduras crecidas en CSG (201, 202). La misma cepa de ***C. albicans*** crecida en sacarosa 500 mM no aumentó su capacidad de colonización y/o diseminación en el modelo experimental de ratones infantes.

5- El proceso de filamentización es un factor de virulencia importante en ***C. albicans***, que aumenta significativamente su adherencia *in vitro* (203). *In vivo,* la misma cepa de ***C. albicans*** filamentizada, no manifestó mayor capacidad de colonización y/o diseminación en el modelo experimental de ratones infantes.

6- El fluconazol, en concentraciones iguales o menores a su CIM, provocó cambios en la morfología de las levaduras y afectó la formación de tubos germinativos. Como consecuencia de las alteraciones estructurales mencionadas se produciría una modificación de la interacción de ***Candida*** con las células del huésped y una variación en la capacidad de adherencia de las levaduras expuestas a la acción del ATF (204).

7- La presencia de otros microorganismos puede modificar la asociación de ***Candida*** a las células epiteliales. La presencia de lactobacilos produjeron una disminución de la adherencia de ***C. albicans*** a CEB, *in vitro*, mientras que una cepa de ***E. coli*** uropatógena, no produjo ninguna modificación sobre al adherencia de esta levadura a CEB.

8- Las cepas de ***C. albicans*** persistieron hasta 8 semanas en el TGI de los ratones inoculados por vía oral con una suspensión de las levaduras. La elevada capacidad de adherencia de las cepas de ***C. albicans*** fue un factor esencial que favoreció la prolongada permanencia en el estómago e intestino de los mismos. La diferencia en los valores de adherencia para las cepas de ***C. albicans*** **Ca 787**, **Ca 333.** y **Ca 485**, no influyó en el tiempo de colonización. Sin embargo, la cepa de Colección **CECT 1394**, con menor capacidad de adherencia *in vitro*, permaneció por un período de tiempo más corto en el TGI de los ratones.

El escaso tiempo de persistencia de las cepas de ***Candida spp*** en estómago e intestino de los ratones estuvo en relación con su baja capacidad de adherencia, *in vitro*. La cepa de ***C. krusei***, con el valor más bajo de adherencia, fue la que permaneció menos tiempo en el TGI de los ratones. ***C. parapsilosis*** y ***C. tropicalis***, aún con valores intermedios de adherencia, mostraron un corto tiempo de colonización.

9- La capacidad de diseminación de las diferentes especies de ***Candida*** no dependió únicamente de los niveles de adherencia de las cepas dado que, tanto ***C. albicans,*** con valores elevados de adherencia, como ***Candida spp,*** con valores intermedios y bajos, se diseminaron a los diferentes tejidos de los ratones. Otros factores de patogenicidad, como la producción de proteinasas y fosfolipasas extracelulares, intervendrían en este proceso. El tamaño elevado del inóculo y la inmadurez inmunológica del animal, también favorecerían la diseminación de las levaduras con escaso potencial patogénico.

Conclusión general:

La adherencia es un complejo proceso de interacción entre las levaduras y las células del huésped, en el que están involucrados diferentes mecanismos y estructuras de la pared celular de ***Candida***. Es un primer paso indispensable en la secuencia de etapas que llevan a las levaduras a producir infección. Las diferentes especies de ***Candida*** muestran gran variabilidad para asociarse a las células del huésped, siendo la adherencia un factor que está estrechamente relacionado a su capacidad para colonizar el TGI de los ratones. La posibilidad de ***C. albicans*** de permanecer largo tiempo en el TGI, merced a su capacidad de adherencia a las células del huésped, le otorga la ventaja, sobre el resto de las especies de ***Candida* no *albicans***, de poder aprovechar, al ser un oportunista por excelencia, el deterioro de algunos de los mecanismos de defensa del huésped, para desencadenar una infección diseminada de origen endógeno.

Las diferentes especies de ***Candida spp***, por sus escasas propiedades adhesivas, tienen disminuida su capacidad para permanecer colonizando el TGI del huésped y esto limita las posibilidades de estos microorganismos para producir estas infecciones. El modelo experimental empleado sería de gran utilidad para profundizar los conocimientos acerca de los factores del huésped que predispondrían a una colonización prolongada (con el riesgo de una posterior diseminación) de las diferentes especies de ***Candida* no *albicans*** en el TGI de los ratones. La información obtenida podría contribuir a la prevención de las infecciones diseminadas de origen endógeno producidas por estos patógenos oportunistas.

Investigaciones futuras:

En el tiempo estipulado para la realización de esta Tesis se han cumplimentado los objetivos propuestos y a partir de los resultados obtenidos se han abierto otros temas de interés para seguir desarrollando, tales como:

1- Estudio de la acción del FCZ y otros antifúngicos sobre la adherencia *in vitro* de cepas de ***Candida albicans*** y otras especies del Género.
2- Estudio de los factores que intervienen en la colonización temprana de cepas de ***C. albicans*** en su forma filamentizada, en el modelo experimental de ratones infantes.
3- Utilización de este modelo experimental para evaluar la acción de antifúngicos de uso más frecuente y de nuevos compuestos, sobre la colonización y diseminación de las levaduras del género ***Candida***.
4- Estudio de los mecanismos de interacción adhesina-receptor que intervienen en la adherencia de las cepas de ***Candida spp*** más importantes desde el punto de vista clínico.
5- Aplicación de técnicas de biología molecular a la taxonomía de levaduras para realizar estudios epidemiológicos en las infecciones producidas por estos patógenos oportunistas.

VI- RESUMEN

En los últimos años se produjo un aumento significativo en la frecuencia de las candidiasis sistémicas, siendo muchas de estas micosis de origen endógeno, a partir de levaduras que colonizan el tracto gastrointestinal del hombre. La adherencia de ***Candida*** a la superficie de las células del huésped sería esencial para iniciar el proceso que lleva a la colonización.

Se estudiaron las modificaciones que ejercen diferentes factores sobre la capacidad de adherencia de las levaduras aisladas del tracto gastrointestinal humano (TGH), como también la importancia que el proceso de adherencia de estos microorganismos tiene en la colonización y diseminación de las levaduras en el huésped.

Se aislaron e identificaron 23 cepas de levaduras provenientes del TGH, a partir de muestras de heces obtenidas de pacientes que concurrieron al laboratorio de Análisis Clínicos del CEREMIC. El mayor porcentaje de aislamientos correspondió a ***C. albicans*** (52,1%), seguida por ***C. glabrata*** (8,7%), ***C. krusei*** (8,7%), ***C. parapsilosis*** (8,7%) y ***C. tropicalis*** (8,7%) y ***C. colliculosa, C. kefyr y C. lusitaniae*** (4,36% c/u).

Se determinó la capacidad de adherencia de las levaduras aisladas (y de una cepa de ***C. albicans*** proveniente de una Colección de Cultivos), a células epiteliales bucales (CEB) *in vitro*. Las cepas de ***C. albicans*** mostraron valores más altos de adherencia, ***C. parapsilosis*** y ***C. tropicalis*** valores intermedios y el resto de las cepas de ***Candida spp***, muy bajos valores de adherencia. Cepas de ***C. krusei C. kefyr y C. lusitaniae*** fueron significativamente menos adherentes ($p<0,001$) que algunas cepas de ***C. albicans.***

Se estudiaron las modificaciones que, sobre la capacidad de adherencia *in vitro*, ejercieron:

- La variación de la temperatura y el pH: se determinó que la adherencia de ***C. albicans*** a CEB es óptima a pH=7 y 37 ºC. A valores de pH más bajos (pH=5, 4 y 3) se produjo una disminución estadísticamente significativa ($p<0,001$) de la capacidad de asociación de las levaduras a CEB, mientras ésta no se modificó a 28 ºC.

- La variación en la composición y concentración de azúcares del medio de cultivo, modificó significativamente la capacidad de adherencia de ***C. albicans***, *in vitro*: galactosa (50 y 200 mM) ($p<0,01$), sacarosa (50, 200 y 500 mM) ($p<0,01$), y manosa (500 mM) ($p<0,05$), favorecieron la adherencia de ***C. albicans*** a CEB, con respecto a la adherencia de las levaduras crecidas en CSG.

- La emisión de tubos germinativos aumentó significativamente la adherencia de una cepa salvaje y una cepa de Colección de ***C. albicans*** a CEB *in vitro*, ($p<0,0001$).

- La acción del fluconazol en concentraciones iguales a su CIM, provocó cambios estructurales en la célula fúngica que se reflejaron en una disminución de la capacidad de filamentización de ***C. albicans*** y en un aumento de su capacidad de adherencia ($p(<0,05)$).

- La presencia de otros microorganismos como cepas de lactobacilos, disminuyeron significativamente la asociación de ***C. albicans*** a las células epiteliales ($p<0,05$) mientras que una cepa de ***E. coli*** uropatógena, no produjo ninguna modificación sobre la adherencia de esta levadura.

Se estudió la capacidad de **colonización** de levaduras del género ***Candida*** en un modelo experimental de ratones infantes, a través de la inoculación por vía

oral de diferentes cepas de ***C. albicans*** y ***Candida spp.*** Se pudo comprobar que la capacidad de adherencia de las levaduras está directamente relacionada a su permanencia en el estómago e intestino de los ratones. Las cepas de ***C. albicans,*** que son las que presentaron valores más altos de adherencia, permanecieron hasta 8 semanas en el TGI de los ratones, mientras que el escaso tiempo de permanencia de las cepas de ***Candida spp*** en estos tejidos (1 semana) estuvo en relación con sus bajos niveles de adherencia.

Se determinó la capacidad de **diseminación** de levaduras del género ***Candida*** en un modelo experimental de ratones infantes, a través de la inoculación por vía oral de diferentes cepas de ***C. albicans*** y ***Candida spp.*** Se pudo comprobar que la capacidad de diseminación de las diferentes especies de ***Candida,*** no dependió únicamente de los niveles de adherencia de las cepas, dado que tanto ***C. albicans***, con valores elevados de adherencia como ***Candida spp,*** con valores intermedios y bajos, se diseminaron a los diferentes tejidos de los ratones. Otros factores de patogenicidad, como la producción de proteinasas y fosfolipasas extracelulares, intervendrían en este proceso.

Las diferentes especies de levaduras mostraron gran variabilidad para asociarse a las células del huésped, siendo la adherencia un factor estrechamente relacionado con su capacidad para colonizar el TGI de los ratones. La posibilidad de ***C. albicans*** de permanecer largo tiempo en el TGI de los ratones, merced a su capacidad de adherencia a las células del huésped, aumenta sus posibilidades para producir una infección diseminada de origen endógeno. Por el contrario, las diferentes especies de ***Candida spp***, por sus escasas propiedades adhesivas, tienen limitada su capacidad de permanecer colonizando el TGI del huésped y esto disminuye las posibilidades de estos

microorganismos para producir infecciones diseminadas. El modelo experimental empleado sería de gran utilidad para profundizar los conocimientos acerca de los factores del huésped o de las levaduras, que predispondrían a una colonización prolongada de las diferentes especies de ***Candida spp*** en el TGI de los ratones. La información obtenida podría contribuir a la prevención de las infecciones de origen endógeno producidas por estos patógenos oportunistas.

VII- APÉNDICE I

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR SABOURAUD GLUCOSA (ASG) (DIFCO)

Neopeptona.....10 g
Glucosa.....40 g
Agar.....15 g
Agua destilada.....1000 cm^3

AGAR SABOURAUD CLOROMICETINA (ASGcl)

ASG (DIFCO).....1000 cm^3
Cloranfenicol 1% (Merck). .....100 cm^3

AGAR HARINA DE MAÍZ (AHM)

Harina de maíz amarillo.....40 g
Agar (DIFCO).....15 g
Agua destilada.....1000 cm^3

AGAR-ROGOSA (MERCK)

Peptona de caseína.....10 g
Extracto de levadura.....5 g
KPO_4H_2.....6 g
Citrato de amonio.....2g
Tween 80.....1g
Acetato de Sodio.....15 g

$MgSO_4$.....0,575 g
$FeSO_4$.....0,034 g
$MnSO_4$.....0,12 g
Agar.....15 g
Agua destilada.....1000 cm^3

CALDO SABOURAUD GLUCOSA (CSG)

Neopeptona (Britania).....10 g
Glucosa (Cicarelli).....40 g
Agua destilada.....1000 cm^3

CALDO TRIPTEÍNA SOYA (MERCK)

Peptona de caseína.....17 g
Peptona de harina soja.....3 g
Glucosa.....2,5 g
K_2PO_4H.....2,5 g
NaCl.....5 g
Agua destilada.....1000 cm^3

MEDIO DE CHRISTENSEN

KPO_4H_2 (Anedra).....1 g
NaCl (Merck).....2,5 g
Neopeptona (Britania).....0,5 g
Glucosa (Cicarelli).....1 g
Rojo fenol (Mallinckrodt).....0,006 g
Urea 20% (Anedra).....0,5 cm^3
Agar (DIFCO).....7,5 g
Agua destilada.....1000 cm^3

SOLUCIONES

BUFFER FOSFATO SALINO (PBS)

NaCl (Merck).....2,16 g

$Na_2PO_4H.7\ H_2O$ (Cicarelli).....4,23 g

KPO_4H_2 (Anedra).....1,2 g

Agua destilada.....1000 cm^3

GLICEROL -AGUA

Glicerol (Merck).....30 cm^3

Agua destilada.....1000 cm^3

VIII- BIBLIOGRAFÍA

1- Kurtzman C.P., Fell J.W. (1998). The Yeasts, a taxonomic study. Fourth edition. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 9-12, 454-570.

2- Rippon J.W. (1990). Micología Médica. Hongos y Actinomicetos patógenos. Tercera edición. Interamericana Mc Graw-Hill., México, 574-628.

3- Kennedy M.J., Volz P.A. (1985). Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonization and dissemination by *Candida albicans*. Sabouraudia: J Med Vet Mycol; 23: 265-273.

4- Magaró H.M., Biasoli M.S., Thomas C.G., Echenique C.G., Tosello M.E. y Bracalenti B.J C. (1993). Aspectos del ecosistema gastrointestinal humano y levaduras killer. Rev Iberoam Micol, 10: 47-50.

5- Kwong-Chung K.J., Bennet M.D. (1992). Medical Micology. Lea & Febiger. Philadelphia - London, 280-336.

6- Linares L.M., Marin C. (1978). Frecuency of yeasts of the genus *Candida* in human as pathogens and as part of normal flora. In, The black yeasts and the white yeasts. Proceedings of the IV International Conference on the Mycoses. Pan American Association, Washington Sci. Pub. Nº 356: 124-136.

7- Biasoli M.S., Magaró H.M., Bracalenti B.J.C. de (1989). "Sensibilidad al sistema killer de *Candida* no *albicans* aisladas de piel y faneras". Rev Argent Micol, 12: 5-8.

8- Biasoli M., Magaró H.M., Tosello M. E., Fernández L. (1994). Estudio de infecciones vaginales producidos por bacterias, hongos y parásitos. Obst Ginec Lat Americ; 52:339-346.

9- Senet, J.M. (1997). Risk factors and physiopathogy of candidiasis. Rev Iberoam Micol; 14:6-13

10- Spinillo A., Capuzzo E., Nicola S., Baltaro F., Ferrari A., Monaco A. (1995). The impact of oral contraception on vulvovaginitis candidiasis Contraception, 51; 293-297.

11- Reszel E., Mishra S., Mishra J., Mishra A., Pierson D.(1993). Stress, immunity and mucocutaneous candidiasis. J Osteopath Med; 7: 26-28.

12- Odds C. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. J Amer Acad Dermatol, 31: S2-S5.

13- Voss A., Kluytmans J.A., Koeleman J.G. (1996). Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in the five Dutch University Hospitals. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 15: 909-12.

14-Chakrabarti A., Ghosh A., Batra R., Kaushal A., Roy P., Singh H. (1996). Antifungal susceptibility pattern of non- albicans *Candida* species and distribution

of species isolated from candidemia cases over a 5 years old period. Indian J Med Res, 104: 171-76.

15- Chen Y.C., Chang S.C., Sun C.C., Yang L.S., Hsieh W.C., Luh K.T. (1997). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infecions at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. Infect Control Epidemiol, 18: 369-75.

16- Banerjee S.N., Emori T.G., Culver D.H. (1991). Secular trends in nosocomial primary bloodstreams infections in the United States., 1980-1990. Am J Med, 91: 86s-89s.

17- Beck-Sague C.M., Jarvis W.R. (1993). Secular trends in the epidemiology of fungal infecions in the United States, 1980-1990. J Infect Dis; 167: 1247-51.

18- Vargas S.L., Thompson L. (1997). Current status and future prospects for medical mycology in a developing country. Int J Infect Dis; 1:S2-S6.

19- Jarvis W.R. (1995). Epidemiology of nosocomial fungal infecions, with emphasis on *Candida* species. Clin Infect Dis; 20: 1526-30.

20- Trick W.E., Jarvis W.R. (1998). Epidemiology of nosocomial fungal infecions in the 1990s. Rev Iberam Micol, 15: 2-6.

21- Koll B., Brown A. (1993). The changing epidemiology of infections at cancer hospitals. Clin Infect Dis, 17: 322-28.

22- Rangel-Fausto M.S., Wiblin T., Blumberg H.M., Saiman L., Patterson J., Rinaldi M., Pfaller M., Edwards J.E., Jarvis W., Dawson J., Wenzel R.P. (1999). National Epidemiology of Mycoses Survey (NEMIS): Variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. Clin Infect Dis; 29: 253-58.

23- Pfaller MA. (1994). Epidemiology and control of fungal infections. Clin Infect Dis; 19: S8-S13.

24- Meunier F., Aoun M., Bitar N. (1992). Candidemia in immunocompromised patients. Clin Infect Dis; 14: S120-S125.

25- Wingard J.R. (1995). Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis; 20: 115-25.

26- Hazen K.C (1995). New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rew; 8: 462- 78.

27- Bernhardt H., Wellmer A., Zimmermann K., Knoke N. (1995). Growth of *Candida albicans* in the normal and altered faecal flora in the model of continuous flow culture. Mycoses, 38: 265-70.

28- Nohmi T., Abe S., Tansho S., Yamaguchi H. (1994). Suppression of anti-*Candida* activity of murine and human neutrophils by glucocorticoids. Microbiol Immuno, 38: 977-82.

29- Heindenreich S., Kubis T., Schmidt M., Fegeler W. (1994). Glucocorticoid-induced alterations of monocyte defense mechanisms against *Candida albicans*. Cell immunol, 157: 320-27.

30- Deslauriers N., Coulombe C., Carre B., Goulet J.P. (1995). Topical application of a corticosteroid destabilizes the host-parasite relationship in an experimental model of the oral carrier state of *Candida albicans*. FEMS Immunol Med Microbiol, 11: 45-55.

31- Denning D.W. (1991). Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal infections in the immunocompromised host. J Antimicrob Chemother; 28: 1-16.

32- Ueta E., Osaki T., Yoneda K., Yamamoto T., Umazume N. (1994). Influence of inductive chemoradiotherapy on salivary plymorphonuclear leukocyte (SPMN) functions in oral cancer. J Oral Pathol Med, 23: 418-22.

33- Sandovskylosica H., Barrnea L., Segal E. (1992). Fatal systemic candidiasis of gastrointestinal origin- an experimental model in mice compromised by anti-cancer treatment. J Med Vet Micol, 30: 219-31.

34- Rantala A., Niinikoski J., Lehtonen O.P. (1993). Early *Candida* isolations in febrile patients after abdominal surgery. Scand J Infect Dis, 25. 479-85.

35- Raad I., Bodey G. (1992). Infectious complications of indwelling vascular catheters. Clin Infect Dis, 15: 197-210.

36- Meyers J. (1990). Fungal infections in bone marrow transplant patients. Semin Oncol, 17: 10-13.

37- Cutler J.E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. Ann Rev Microbiol, 45: 187-218.

38- Calderone R. A. (1994). Molecular pathogenesis of fungal infections. Trends Microbiol, 2: 461-63.

39- Douglas J.L. (1987). Adhesion to surfaces. En: Rose A.H. and Harrison J.S. The Yeasts, vol 2: Yeasts and the Environment, 2nd ed. Pag. 239-280.

40- Critchley I.A., Douglas L.J. (1985). Differential adhesion of pathogenic *Candida* species to epithelial and inert surfaces. FEMS Microbiol Lett 28: 199-203.

41- Fukayama M., Calderone R.A. (1991). Adherence of cell surface mutants of *Candida albicans* to buccal epithelial cells and analysis of the cell surface proteins of the mutants. Infect Immun, 59: 1341-45.

42- Robert R., Nail S., Marot-Leblond A., Cottin J., Miegeville M., Quenouillere S., Mahaza C., Senet M. (2000). Adherence of Platelets to Candida species in vivo. Infect Immun; 68: 570-76.

43- Ghannoum M.A., Filler S.G., Ibrahim A.S., Fu Y., Edwards J.E.Jr. (1992). Modulation of interactions of *Candida albicans* and endothelial cells by fluconazol and amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother, 36: 2239-44.

44- Klotz S.A. (1992). Fungal adherence to the vascular compartment: a critical step in the pathogenesis of disseminatted candidiasis. Clin Infect Dis 14:340-47.

45- Ollert M.W., Söhnchen R., Korting H.C., Ollert U., Bräutigam S., Bräutigam W. (1993). Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. Infect Immun; 61:4560-68.

46- Diamond R.D. (1993). Interactions of phagocytic cells with *Candida* and other opportunistic fungi. Arch Med Res, 24: 361-69.

47- Klotz S.A. (1987). The adherence of *Candida* yeasts to human and bovine vascular endothelium and subendothelial extracellular matrix. FEMS Microbiol Lett, 48:201-05.

48- Klotz S.A., Smith R.L. (1991). A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. J Infect Dis, 163: 604-10.

49- Tronchin G., Bouchara J.P., Robert R., Senet J.M. (1988). Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrilar adhesins. Infect Immun, 56: 1987-1993.

50- Hawser S.P., Douglas S.J. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother,39: 2128-31.

51- White T.C., Miyasaki S.H., Agabian N. (1993). Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. J Bacteriol, 175: 6126-33.

52- Schaller M., Hube B., Ollert M.W., Schafer W.,Borg-von Zepelin M. Thoma-Greber E., Korting H.C. (1999). In vivo expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patientes. J Invest Dermatol 112: 383-86.

53- Odds F.C (1994).*Candida* species and virulence. ASM News, 60: 313-18.

54- Ross I.K., De Bernardis F., Emerson G.W., Cassone A., Sullivan P.A. (1990). The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-defience mutant. J Gen Microbiol, 136:687-94.

55- De Bernardis F., Agatensi L., Ross I.K., Emerson G.W., Lorenzini R., Sullivan P.A. (1990). Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. J Infect Dis, 161: 1276-83.

56- Sobel J.D., Muller G., Buckley H.R. (1984). Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of *Candida* vaginitis. Infect Immun, 44: 576-80.

57- Sherwood J., Gow N.A.R., Gooday G.W., Gregory D.W., Marshall D. (1992). Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. J Med Vet Mycol, 30: 461-70.

58- Kimura L.H. and Pearsall N.H. (1980). Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun, 28: 464-68.

59- Samaranayake L.P., MacFarlane T.W. (1982). Factors affecting the *in vitro* adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin. Arch Oral Biol, 27: 869-73.

60- Soll D.R. (1992). High-frecuency switching in *Candida albicans*. Clin Microbiol Rew, 5: 183-203.

61- Slutsky, B., Staebell M., Anderson J., Risen L., Pfaller M., Sobel D.R. (1987). White-opaque transition: a second high-frecuency switching system in *Candida albicans*. J Bacteriol, 169: 189-97.

62- Soll D.R., Galsask R., Schimd J., Hanna C., Mac K., Morrow B. (1991). Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida spp* carried in different anatomical locations of the same healthy women. J Clin Microbiol, 29: 1702-10.

63- Sullivan P.A:, Yin C.A., Molloy C., Templeton M. D., Shepherd M.G. (1983). An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation. Can J Microbiol, 29: 1514-25.

64- Chaffin W.L., López-Ribot J.L, Casanova M., Gozalbo M., Martínez J.P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function and expression. Microbiol Mol Biol Rev, 62: 130-80.

65- Poulain D., Tronchin G., Dubremetz J.F., Biguet J. (1978). Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: study of its constitutives layers by the use of a cytochemical technique revealing polysaccharides. Ann Microbiol (Inst. Pasteur) 129: 140-53.

66- YU L., Lee K.K., Seth H.B., Ens K. (1994). Fimbria-mediated adherence of *Candida albicans* to glycosphingolipid receptors on human buccal epithelial cells. Infect Immun, 62: 2843-48.

67- Miyakawa Y., Kuribayashi T., Kagaya K., Suzuki M., Fukazawa Y. (1992). Role of specific determinants in manan of *Candida albicans* serotpe A in adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun, 60: 2493-99.

68- Molloy C., Sheperd M.G., Sullivan P.A. (1989). Identification of envelope proteins of *Candida albicans* by vectorial iodination. Microbios, 57: 73-83.

69- Critchley I.A., Douglas L.J. (1987). Role of glycosides as epithelial cells receptors for *Candida albicans*. J Gen Microbiol, 133: 637-43.

70- Cameron B.J., Douglas L.J. (1996). Blood group glycolipids as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. Infect Immun, 64: 891-96.

71- Yu L., Lee K.K., Ens K., Doig P.C., Carpenter M.R., Staddon W., Hodges R.S., Paranchych W., Irvin R.T. (1994). Partial characterization of a *Candida albicans* fimbrial adhesin. Infect Immun, 62: 2834-42.

72- Klotz S.A., Smith R.L. (1991) A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. J Infect Dis, 163: 604-10.

73- Casanova M., López-Ribot J.L., Monteagudo C., Llombart-Bosch A., Santandreu R., Martinez J.P. (1992). Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*. Infect Immun, 60: 4221-29.

74- Heidenreich F., Dierich M.P. (1985). *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. Infect. Immun, 50: 598-600.

75- Kanbe T., Li R.K., Wadworth E., Calderone R. A., Cutler J. E. (1991). Evidence for expression of the C3d receptor of *Candida albicans* in vitro and in vivo obtained by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. Infect Immun, 59: 1832-38.

76- Brooimans R.A., Van der Ark A.A.J., Buurman W.A., Van Es L.A., Daha M.R. (1990). Differential regulation of complement factor H and C3 production in human umbilical vein endothelial cells by IFN-γ and IL-1. J Immunol, 144: 3835-40.

77- Klotz S.A., Maca R.D. (1988). Endothelial cell contraction increases *Candida* adherence to exposed extracellullar matrix. Infect Immun, 56: 2495-98.

78- Klotz S.A., Hein R.C., Smith R.L., Rouse J.B. (1994). The fibronectin adhesin of *Candida albicans*. Infect Immun, 62: 4679-81.

79- Penn C., Klotz S.A. (1994). Binding of plasma fibronectin to *Candida albicans* occurs through the cell binding domain. Microb Pathog, 17: 387-93.

80- Bouchana J.P., Tronchin G., Annaix V., Robert R., Senet J-M (1990). Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. Infect Immun, 58: 48-54.

81- López-Ribot J.L., Casanova M., Monteagudo C., Sepulveda P., Martinez J.P. (1994). Evidence for the presence of a high-affinity lamnin receptor-like molecule on the surface of *Candida albicans* yeast cells. Infect Immun, 62: 742-46.

82- López-Ribot J.L., Chaffin W.L. (1994). Binding of the extracellular matrix component entactin to *Candida albicans*. Infect Immun, 62: 4564-71.

83- Klotz S.A., Rutten M.J., Smith R.L., Babcock S.R., Cunningham M.D. (1993). Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependant surface glicoproteins. Microb Pathog 14: 133-47.

84- Ener B., Douglas J.L. (1992). Correlation between cell-surface hydrophobicity of *Candida albicans* and adhesion to buccal epithelial cells. FEMS Microbiol Lett 128: 95-100.

85- Hazen K.C. (1989). Participation of cell surface hiddrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. Infect Immun; 57: 1894-1900.

86- Masouka J., Wu G.Q., Glee P.M., Hazen K.C. (1999). Inhibitioin of *Candida albicans* attachment to extracellular matrix by antibodies which recognize hydrophobic cell wall proteins. FEMS Immunol Med Microbiol; 24 :421-29.

87- Braun P.C. (1994). Surface hydrophobicity enhance corticosterone incorporation in *Candida albicans*. Infect Immun; 62: 4087-90.

88- Hazen K.C., Hazen B.W. (1993). Surface hydrophobic and hydrophilic protein alterations in *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett 107:83-88.

89- Jiménez-Lucho V., Ginsburg V., Krivan H.C. (1990). *Cryptoccocus neoformans, Candida albicans,* and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Galβ1-4Glcβ1-4Cer), a possible adhesion receptor for yeast. Infect Immun; 58: 2085-90.

90- Hawser S. (1996). Adhesion of different *Candida spp.* to plastic: XTT forazan determinations. J Med Vet Mycol, 34: 149-52.

91- Kalya A.V., Ahearn D.G. (1995). Increased resistance to antifungal antibiotics of *Candida spp* adhered to silicone. J Ind Microbiol, 14: 451-55.

92- Marcuard S.P., Finley J.L., MacDonald K.C. (1993). Large-bore feeding tube occlusion by yeast colonies. J Parent Enteral Nutr, 17:187-90.

93- Hawser R. S., Douglas L.J. (1994). Biofilms formation by *Candida* species on the suface of catheter materials in vitro. Infect Immun 62: 915-21.

94- Kanbe T., Han Y., Redgrave B., Riesselman M.H., Cutler J.E. (1993). Evidence that mannans of *Candida albicans* are responsible for adherence of the yeast forms to spleen and lymph nodes tissue. Infect Immu., 61:2578-84.

95- Lehrer N., Segal E., Lis H., Gov Y. (1988). Effectt of *Candida albicans* cell wall components on the adhesion of the fungus to human and murine vaginal mucosa. Mycopathologia, 102: 115-21.

96- Hannula J., Saarela M., Jousimies-Somer H., Takala A., Syrjanen R., Kononen E., Asikainen S. (1999). Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. Oral Microbiol Immunol 14 (3): 176-82.

97- Jensen J., Warner T., Balish E. (1993). Resistance of the SCID mice to *Candida albicans* administered intravenously or colonizing the gut: role of polymorphonuclear leukocytes and macrophages. J Infect Dis, 167:912-19.

98- Samonis G., Gikas A., Anaissie E.J., Bodey G.P., Rosembaum B. (1993). Prospective evaluation of effects of broad-spectrum antibiotics on gastrointestinal yeast colonization of humans. Antimicrob Agents Chemother, 37: 51-53.

99- Reagan D.R., Pfaller M.A., Hollis R.J., Wenzel R.P. (1990). Characterization of the secuence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. J Clin Microbiol 28: 2733-38.

100- Lunel F., Meis J. F., Voss A. (1999). Nosocomial fungal infections: Candidemia. Diagn Microbiol Infect. Dis; 34: 213-20.

101- Walsh T.J., Merz W.G. (1986). Pathologic features in the human alimentary tract associated with invasiveness of *Candida tropicalis*. Am J Clin Pathol, 85: 498-502.

102- Pagano L., Antinori A., Ammassari A., Mele L., Nosari A., Melillo L., Martino B., Sanguinetti M., Equitani F., Nobile F., Carotenuto M., Morra E., Morace G., Leone G. (1999). Retrospective study of candidemia in patients with hematological malignancies. Clinical features, risk factors and outcome of 76 episodes. Eur J Haematol; 63: 77-85.

103- Martino P., Girmenia C., Venditti M. (1989). *Candida* colonization and systemic infection in neutropenic patients: a retrospective study. Cancer, 64: 2030-34.

104- Wade J.C. (1993). Epidemiology of *Candida* infections. En: Bodey G.P. ed. Candidiasis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. 2nd ed. New York, Raven Press: 85.

105- Eras P., Golstein M.J., Sherlock P. (1972). *Candida* infection of the gastrointestinal tract. Medicine (Baltimore), 51: 367-79.

106- Volkheimer G., Schulz F.H. (1968). The phenomenon of persorption. Digest. 1: 213-20.

107- Wells C.L., Maddaus M.A. Simmons R.L. (1988). Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. Rev Infect Dis; 10: 958-79.

108- Howlett J.A., Squier C.A. (1980). *Candida albicans* ultrastructure: colonization and invasion of oral epithelium. Infect Immun, 29: 252-60.

109- Borg M., Rüchel R. (1988). Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida spp.* during experimental infection of oral mucosa. Infect Immun, 56: 626-31.

110- Ibrahim A.S., Mirbod F., Filler S.G., Banno Y., Cole G.T., Kitajima Y., Edwards J.E., Nozawa Y., Ghannoum M.A. (1995). Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect Immun, 63: 1963-98.

111- Cole G.T., Seshan K.R., Lynn K.T., Franco M. (1993). Gastrointestinal candidiasis: histopathology of *Candida*-host interactions in a murine model. Mycol Res, 97: 385-408.

112- Cole T.C., Halawa A.A., Anaissie E.J. (1996). The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. Clin Inf Dis 22: 73-88.

113- Kreger-Van Rij N.J.W-. The Yeast, a taxonomic study. 3th Edition. Amsterdam: Elsevier Science B.V, 1984: 547-844.

114- Kimura L.H., Pearsall N.H. (1978). Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. Infect Immun; 21: 64-8.

115- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1992). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, proposed standard. NCCLS Document M27-P12(25).

116- Pope L., Cole G.T., Guentzel N., Berry J. (1979). Systemic and gastrointestinal candidiasis of infant mice after intragastic challenge. Infect Immun, 25: 702- 07.

117- Magaró H. M., Bracalenti B.J.C. de (1985). Interrelaciones entre protozoarios y levaduras intestinales de ratón. Boletín Chileno de Parasiitología, Vol. 40: 7-13.

118- Maraki S., Bafaloukos D., Chatzinikolaou I., Datseris G., Samonis G. (1998). Gut colonization of mice by yeasts: Effects of methylprednisolone and antibiotics. Hepato-Gastroenterology 45, 119-22.

119- Tosello M.E.; Biasoli M.S.; López S.N. y Magaró. H.M.: Biotipificación de especies de *Candida* aisladas del tracto gastrointestinal humano. Presentado en el VIII Congreso y XVIII Jornadas Argentinas de Micología. Tucumán, 12 al 14 de agosto de 1998.

120- Sandin R.L., Rogers A., Beneke E., Fernández M. (1987). Influence of mucosal cell origin on the in vitro adherence of *Candida albicans*: Are mucosal cells from different sources equivalent?. Mycopathologia; 98:111-19.

121- Samaranayake L.P., Hamilton D., MacFarlane T.W. (1982). The effect of indigenous bacterial population on buccal epithelial cells on subsequent microbial adhesion, *in vitro*. Oral Microbiol Immunol; 9: 236-40.

122- Silva T.M.J., Glee P.M., Hazen K.C. (1995). Influence of cell surface hydrophobicity on attachment of *Candida* albicans to extracellular matrix proteins. J Med Vet Mycol; 33: 117-22.

123- 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.

124- King R.D., Lee J.C. and Morris A.L. (1980) Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. Infect Inmun; 27:667-74.

125- Lee J.C., King R.D. (1983). Chracterization of *Candida albicans* adherence to human vaginal epithelial cells in vitro. Infect Inmun; 41: 1024-30.

126- Sobel J.D., Obedeanu N. (1983). Effects of subinhibitory concentrations of Ketoconazole on in vitro adherence of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells. Eur J Clin Microbiol; 2: 445-52.

127- Sandovsky-Losica H, Carmeli S., Gov Y., Segal E. (1995). Enzyme-linked immunosorbent assay for assessment of adherence of *Candida* albicans to human buccal epithelial cells. J Mycol Méd; 5: 71-74.

128- Filler S.G., Der L.C., Mayer C.L. Christenson P.D., Edwards J.E. Jr. (1987). An enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying adherence of *Candida* to human vascular endothelium. J Infect Dis; 156: 561-66.

129- Polancheck I., Antman A., Barth I., Sagi E., Giloh H. (1995). Adherence of *Candida* albicans to epithelial cells: studies using fluorescently labelled yeast and flow cytometry. Microbiology; 7: 1523-33.

130- Borg-vonZepelin M., Wagner T. (1995). Fluorescense assay for the detection of adherent *Candida* yeast to target cells in microtest plates. Mycoses; 38: 339-47.

131- Gibbons R.J. and Van Houte J. (1971). Selective bacterial adherence to oral epithelial surface and its role as an ecological determinant. Infect Immun; 3: 567-73.

132- Gibbons R.J. and Van Houte J. (1975). Bacterial adherence in oral microbial ecology. Ann Rev Microbiol; 29: 19-44.

133- Sobel J.D., Myers P.G., Levison M.E., Kaye D. (1982). Comparison of bacterial and fungal adherence to vaginal exfoliated epithelial cells and human vaginal epithelial tissue culture cells. Infect Immun; 35: 697-701.

134- Samaranayake L.P., MacFarlane T.W. (1980). An *in vitro* study of adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. Arch Oral Biol, 25: 603-09.

135.- Klotz S.A., Drutz D.J., Zajic J.E. (1985). Factors govering adherence of *Candida* species to plastic surfaces. Infect Immun; 50: 97-101.

136- Centeno A., Davis C., Cohen M. and Warren M. (1983). Modulation of *Candida albicans* attachment to human epithelial cells by bacteria and carbohydrates. Infect Immun; 39: 1354-60.

137- Samaranayake Y.H., Wu P.C., Samaranayake L.P., So M., Yuen K.Y. (1994). Adhesion and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces. J Med Microbiol; 25: 250-58.

138- Hadfield T.L. Smith M.B., Winn R.E., Rinaldi M.G., Guerra C. (1987). Mycoses caused by *Candida lusitaniae*. Rev Infect Dis; 9: 1006-12.

139- Morgan M.A., Wilkowske C.J., Roberts G.D. (1984). *Candida pseudotropicalis* fungemia and invasive disease in an immunocompromised patient. L Clin Microbiol; 20:1006-1007.

140- Gil M.L., Casanova M., Martínez J P., Santandreu R. (1991). Antigenic cell wall mannoproteins in *Candida* albicans isolates and in other *Candida* species. J Gen Microbiol; 137: 1053-61.

141- Sobel J.D., Myers P.G., Kaye D., Levinson M.E. (1981). Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and epithelial cell. J Infect Dis; 143: 76-82.

142- Persi M., Burnham C., Duhring J. (1985). Effects of carbon dioxide and pH on adhesion of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells. Infect Immun; 50:82-90.

143- Fukazawa Y., Kagaya K. (1997). Molecular basis of adhesion of *Candida* albicans. J Med Vet Micol; 35; 87-99.

144- McCourtie J., Douglas L.J. (1981): Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. Infect. Immun., 32:1234-41.

145- McCourtie J., Douglas L.J. (1984): Relationship between cell surface composition, adherence, and virulence of *Candida albicans*. Infect. Immun., 45:6-12.

146- Enache E., Eskandari T., Borja L., Wadsworth E., Hoxter B., (1996). *Candida albicans* adherence to a human oesophageal cell line. Microbiology; 142: 2741-2746.

147- Calderone R., Enache E., Eskandari T., Wadsworth E., Sturtevant J. (1996). Adherence of *Candida* albicans to mammalian cells in vitro: nutricilonal influences. In Proceedings of The International Symposium on Fungal Cells in Biodefense Mechanism, August 4-6, 1996, Miyagi, Japan.

148- Lyman C.A., Navarro E., Garrett K.F., Roberts D.D., Pizzo P.A., Walsh T.J. (1999). Adherence of *Candida* albicans to bladder mucosa: development and applicaton of a tissue explant assay. Mycoses; 42: 255-259.

149- Diez-Orejas R., Molero G., Ríos-Serrano I., Vazquez A., Gil C., Nombela C., Sanchez-Perez M. (1999). Low virulence of a morphological *Candida albicans* mutant. FEMS Microbio Lett; 176: 311-19.

150- 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: 285-90.

151- Casanova M., Martinez J.P., Chaffin W.L. (1990). Fab fragments from a monoclonal antibody against a germ tube manoprotein block the yeast-to-mycelium transition in *Candida albicans*. Infect Immun; 58: 3810-12.

152- Hostetter M.K. (1994). Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithellial and endothelial surfaces. Clin. Microbiol. Rev; 7: 29-42.

153- Klotz S.A. (1994). Plasma and extracellular matrix proteins mediate in the fate of *Candida* albicans in the human host. Medical Hypotheses; 42: 328-34.

154- Bjdáková H., Würzner R., Klobusický M., Dierich M. (1997). Expression and quantification of the iC3b-binding protein in different *Candida albicans* strains and their morphological stages. FEMS Immunol Med Microbiol; 18: 147-52.

155- López-Ribot J.L., Casanova M., Martinez J.P., Sentandreu R. (1991). Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*. Infect Immun., 59: 2324-2332.

156- Como J.A., Dismukes W.E. (1994). Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. New Engl J Med; 330: 263-72.

157- White T.C., Marr K.A., Bowden R.A. (1998). Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev; 11: 382-402.

158- Kibbler C.C., Mackenzie D.W.R., Odds F.C. (1996). Principles and Practice of Clinical Mycology. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 35-48.

159- Rex J.H., Pfaller M.A., Galgiani J.N., Bortlett M.S., Esppinel-Ingroff A., Ghannoum M.A., Lancaster M., Odds F.C., Rinaldi M.G., Walsh T.J., Barry A.L. (1997). Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility

testing: Conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. Clin infect Dis; 24. 235-47.

160- 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.

161- Bjdáková H., Lell C.P., Gruber A., Langgartner M.,Spotl L., Kuriskova S., Klobusicky M., Dierich M. P., Würzner R (1999). The influence of subinhibitory concentrations of conventional and experimental antifungal drugs on the expression of the iC3b binding protein in *Candida albicans* strains during filamentation. FEMS Immunol Med Microbiol; 26: 1-10.

162- 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: 325-32.

163- 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: 325-32.

164- 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: 249-65.

165- Finegold S.M., Baron E.J. (1989). Bailey Scott. Diagnóstico Microbiológico. 7º edición. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 257-272

166- Kennedy M.J., Volz P.A. (1985). Ecology of *Candida albicans* gut colonization: Inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gasstrointestinal tract by bacterial antagonism. Infect Immun; 49: 654-63.

167- Samonis G., Anastassiadou H., Dassiou M., Tselentis Y., Bodey G.P. (1994). Effects of broad-spectrum antibiotics on colonization of gastrointestinal tracts of mice. Antimicrob Agents Chemother, 38: 602-03.

168- Makrides H.C., Mac Farlane T.W. (1983). An investigation of the factors involved in increased adherence of *Candida albicans* to epithelial cells mediated by *E. Coli*. Microbios 38: 177-85.

169- Nair R.G., Samaranayake L.P. (1996). The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces. An *in vitro* study. APMIS; 104: 339-49.

170- Nair R.G., Samaranayake L.P. (1996). The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to buccal epithelial cells *in vitro*. J Med Microbiol; 45: 179-85.

171- Cole G.T., Saha K., Seshan K.R., Lynn K.T., France M., Wong P.K.Y. (1992). Retrovirus-induced immunodeficiency in mice exacerbates gastrointestinal candidiasis. Infect Immun; 60: 4168-78.

172- Cantorna M.T., Balish E. (1990). Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice. Infect. Immun; 58: 1093-100.

173- Cole G.T., Lynn K.T., Seshan K.R., Pope L.M. (1989). Gastrointestinal and systemic candidosis in immunocompromised mouse. J Vet Med Mycol; 27: 363-80.

174- Field L.H., Pope L.M., Cole G.T., Guentzel M.N., Berry L.J.(1981). Persistence and spread of *Candida albicans* after intragastric inoculation of infant mice. Infect Immun; 31: 783-91.

175- Cole G.T., Seshan K.R., Pope L.M., Yancey R.J. (1988). Morphological aspects of gastrointestinal tract invasion by *Candida albicans* in the infant mouse. J Med Vet Micol; 26: 173-85.

176- Ghannoum M.A., Abu-Elteen K., Ibrahim A., Stretton R. (1991). Protection against *Candida albicans* gastrointestinal colonization and dissemination by saccharides in experimental animals. Microbios; 67: 95-105.

177- Stone H.H., Kolb L.D., Currie C.A., Geheber C.E., Cuzzell J.Z. (1974). *Candida* sepsis: Pathogenesis and principles of treatment. Ann surg; 179: 697-710.

178- Inoue S., Wirman J.A., Alexander J.W., Trocki O., Cardell R.R. (1988). *Candida albicans* translocation across the gut mucosa following burn injury. J Surg Res; 44: 479-92.

179- Guentzel M.N., Cole G.T., Pope L.M. (1985). Animal models for candidiasis. Curr Top Med Mycol; 1:57-116.

180- Hoegl L., Ollert M., Korting H.C. (1996). The rol of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in the development of candidoses. Mol Med; 74: 135-42.

181- De Bernardis F., Chiani P., Ciccozzi M., Pellegrini G., Ceddia T., D´Offizzi G., Quinti I., Sullivan P., Cassone A. (1996). Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. Infect Immun; 64: 466-71.

182- Schaller M., Korting H.C., Schafer W., Bastert J., Chen W.C., Hube B. (1999). Secreted aspartic proteinse (SAP) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. Mol Microbiol ;34: 169-80.

183- Kretschmar M., Hube B., Bertsch T., Sanglard D., Merker R., Schröder M., Hof H., Nichterlein T. (1999). Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. Infect Immun 67: 6637-42.

184- Naglik J.R., Newport G., White T.C., Fernandes-Naglik L.L., Greenspan J.S., Greenspan D., Sweet S.P., Challacombe S.J., Agabian N. (1999). In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. Infect Immun; 67: 2482-90.

185- Tosello M.E., Biasoli M.S., Magaró H.M. (1999). Fosfolipasas en cepas del género *Candida*. IV Encuentro Bioquímico. Rosario, 6 de agosto.

186- Tosello M.E.; Biasoli M.S. Magaró H.M. (1999) Proteinases in *Candida* genus strains. Aceptado para su publicación en Biocell.

187- Wolochow H., Hildebrand G.J., Lamanna C. (1966). Traslocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. J. Infect. Dis., 116. 523-528.

188- Kennedy M. J., Volz P.A. (1983). Dissemination of yeasts after gastrointestinal inoculation in antibiotic-treated mice. Sabouraudia; 21: 27-33.

189- Kennedy M. J., Volz P.A., Edwards C.A., Yancey R.J. (1987). Mechanisms of association of *Candida albicans* with intestinal mucosa. J Med Microbiol 24: 333-41.

190- Frase V.J., Dunkel J., Storfer S., Medoff G., Dunagan W.C. (1992). Candidiemia in a terciary care hospital: epidemiology, risk factors and predictors of mortality. Clin Infect Dis 15; 414-21.

191- Fidel P.L., Vazquez J.A., Sobel J.D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev; 12: 80-96.

192- Girmenia G., Martino P., De Bernardis F., Gentile G., Boccanera M., Monaco M., Antonucci G., Cassone A. (1996). Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patientes with hematologic malignancies: Clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of causative strains. Clin Infect Dis; 23: 506-14.

193- Sanchez B., Vázquez J.A., Barth-Jones D., Dembry J., Sobel J.D., Zervos M.J. (1992). Epidemiology of nosocomial acquisition of *Candida lusitaniae*. J Clin Microbiol; 30: 3005-8.

194- Rex J.H., Bennett J.E., Sugar A.M., Pappas P.G., Serody J., Edwards J.E., Washburn R.G., NIAID Mycoses Study group, and Candidemia Study Group (1995). Intravascular catheter exange and duration of candidemia.Clin Infect Dis; 21: 994-996.

195- Biasoli, M.S., Tosello, M.E., Magaró, H.M. (1996). Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to buccal ephitelial cells. Publicaciones Biológicas de la Sociedad de Biología de Rosario; 14: 293.

196- Biasoli M.S., Tosello, M. E., Magaró H.M. (1998). Estudio de la adherencia de diferentes levaduras del género *Candida*. III Congreso Rosarino y XVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 18 de noviembre.

197- Biasoli, M.S., Tosello, M.E., Magaró, H.M. (1999). Study of the adherence of different yeasts of the genus *Candida*. Biocell; **23,** Resumen N° 85.

198- Biasoli, M.S., Tosello, M.E., Magaró, H.M. (2000) Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. Enviado a publicar.

199- Biasoli M.S., Tosello, M. E., Bottai, H., Cuesta C., Magaró, H.M. (1995) Estudios preliminares sobre el efecto de la temperatura y el pH en la adherencia de *Candida albicans*. VII Congreso y XVII Jornadas Argentinas de Micología. Rosario, 25 de agosto.

200- Biasoli, M.S., Tosello, M.E., Bottai, H., Cuesta, C., Magaró, H.M. (1999) Efecto de la temperatura y el pH en la adherencia de *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol; 16: 46-49.

201- Biasoli M.S., Tosello, M. E., Magaró. H.M. (1997) Relación entre la adherencia de *Candida albicans* y la diferente composición en hidratos de carbono del medio de cultivo. XVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, 25 de noviembre.

202- Biasoli, M.S., Tosello, M.E., Magaró, H.M.(1998). Relation between *Candida albicans* adherence and the different composition in carbohydrates in the culture medium. Biocell, **22**, Resumen N° 5.

203- Biasoli M.S., Tosello, M.E., Magaró. H.M. (1997). Influencia de la germinación en la adherencia de *Candida albicans*. III Encuentro Bioquímico. Rosario, 8 de agosto.

204- Biasoli M.S., Tosello, M.E., Magaró, H.M. (1998). Efecto del Fluconazol sobre la adherencia de *Candida albicans*. VIII Congreso y XVIII Jornadas Argentinas de Micología. Tucumán, 13 de agosto.

