



Efecto de la temperatura y el pH en la adherencia de *Candida albicans* *in vitro*

Marisa S Biasoli¹, María E Tosello¹, Hebe Bottai², Cristina Cuesta² y Hortensia M Magaró³

¹CEREMIC, ²Cátedra de Estadística, ³Área Parasitología del Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina

Resumen

La adherencia de levaduras es un paso muy importante en la colonización e infección por estos patógenos oportunistas. Son muchos los factores que pueden modificar este fenómeno *in vitro*. El objetivo de este trabajo ha sido conocer como las variaciones del pH y la temperatura modifican la adherencia de *Candida albicans* a células epiteliales *in vitro*. Se trabajó con células epiteliales bucales y una cepa de levadura según técnica de Gibbons y Van Houte con ligeras modificaciones.

En un primer ensayo se estudió simultáneamente la adherencia a 28°C y 37°C, y tres valores de pH 6, 7,2 y 8,4. No encontramos variaciones significativas en la capacidad de adherencia, pero se detectó un ligero incremento a pH 7,2 y 37°C. En un segundo ensayo se fijó la temperatura en 37°C y se probaron cuatro valores de pH: 3, 4, 5 y 7,2, encontrándose una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) entre la adherencia a pH 7,2 y la observada a los otros valores de pH. De acuerdo a estos resultados la adherencia de *C. albicans* a células epiteliales bucales *in vitro* se produce en condiciones óptimas a 37°C y pH 7,2.

Palabras clave

Candida albicans, Adherencia, pH, Temperatura

Influence of temperature and pH on the *in vitro* adherence of *Candida albicans*

Summary

Yeast adherence to epithelial cells is a very important step in colonization and infection caused by these opportunistic pathogens. This phenomenon may be modified *in vitro* by many factors. The aim of this work was to find out how variations in pH and temperature modify the *in vitro* adherence of *Candida albicans* to epithelial cells. We worked with epithelial buccal cells and a yeast strain according to Gibbons and Van Houte technique with slight modifications.

In the first assay, adherence at 28°C and 37°C, and three pH values, 6, 7.2 and 8.4 were simultaneously studied. We did not find significant variations in adherence capacity, but a slight increase was detected at pH 7.2 and 37°C. In the second assay, temperature was fixed at 37°C and four pH values were studied: 3, 4, 5, and 7.2. We find a highly significant difference ($p < 0.001$) between adherence at pH = 7.2 with respect to the other pH values. According to these results *C. albicans* adherence to epithelial buccal cells, *in vitro*, is produced at 37°C and pH 7.2 in optimal conditions.

Key words

Candida albicans, Adherence, Temperature, pH

Dirección para correspondencia:

Dra. Marisa S Biasoli
CEREMIC, Dpto. de Microbiología. Facultad de Ciencias
Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de
Rosario, Suipacha 531, (2000) Rosario, República Argentina.
Fax: +54 341 440 7111
E-mail: biasoli@cidoc.edu.ar

Aceptado para publicación el 22 de enero de 1999

Los microorganismos tienen la capacidad de adherirse a una amplia variedad de superficies, desde materiales inorgánicos [1,2] hasta tejidos de animales [3-10] y plantas. El reconocimiento de la importancia de la adherencia como factor de virulencia en la patogénesis de muchas infecciones microbianas [11-13], ha estimulado considerablemente el interés en el estudio de la adherencia de *Candida albicans* a distintas superficies mucosas.

La selectividad con la cual las levaduras se adhieren a varias superficies epiteliales supone la presencia de receptores específicos en la célula huésped, y a su vez en los microorganismos, de la presencia de las llamadas "adhesinas" [14,15]. La capacidad de las levaduras para adherirse depende de la síntesis de las "adhesinas" sobre la superficie fúngica y de las células epiteliales del huésped [10,16]. Esto explica la importancia de la composición físico-química que posee el medio ambiente. Son muchos los factores que pueden modificar el fenómeno de adherencia de *C. albicans*. La variación del pH [17] y la temperatura, la presencia de sustancias con acción antibiótica y antifúngica [18,19], la existencia de otros microorganismos [20], la presencia de ciertos azúcares [1,20,21], etc., son algunos de ellos.

La colonización microbiana de una superficie expuesta al flujo de un líquido corporal requiere que el microorganismo esté firmemente unido para evitar ser arrastrado. Por lo tanto, la adherencia es un primer paso muy importante, esencial en el proceso que conduce a una colonización permanente [14,22-24]. Las células epiteliales, con microorganismos adheridos son constantemente eliminadas por descamación y la progenie de estos microorganismos debe repetir la unión para mantener la colonización [25].

Con el propósito de dilucidar la naturaleza de esta unión célula-levadura, nos proponemos conocer como afectan distintos parámetros esta interacción. Entre ellos, la temperatura y el pH al que se realiza el ensayo de adherencia de *C. albicans*, mientras se mantienen fijos otros factores relacionados con la levadura y las células epiteliales.

El objetivo de este trabajo es estudiar las modificaciones que sobre la adherencia de *C. albicans* producen, las variaciones de pH y temperatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células epiteliales. Se utilizó una mezcla de células epiteliales bucales, obtenidas por hisopado de la cara interna de las mejillas provenientes de dos donantes que no presentaron signos ni síntomas de candidiasis bucal. Se transfirieron a 6 ml de tampón PBS, pH 7,2, se lavaron dos veces y se resuspendieron en el mismo tampón hasta una concentración final de 5×10^5 células/ml por recuento en cámara de Neubauer.

Levaduras. Se utilizó una cepa de *C. albicans* aislada a partir de una muestra de materia fecal, que presentó un recuento mayor de 5000 colonias de levaduras/g. Esta cepa fue seleccionada entre un total de seis cepas de *C. albicans* aisladas de muestras clínicas, por ser la más adherente en un ensayo preliminar. La misma se cultivó 18 a 24 h en caldo glucosado de Sabouraud a 37°C, con agitación constante, se fraccionó y se guardó en congelador a -20°C. Para cada ensayo se utilizó una muestra así conservada, se repicó 24 h antes de cada estudio en el medio antes citado y se incubó durante 18-24 h a 37°C, en agitación constante. Se tomó una alícuota de ese desarrollo, se lavó dos veces y se resuspendió en PBS hasta obtener una concentración final de 1×10^7 células/ml, determinadas por recuento en cámara de Neubauer.

Ensayo de adherencia. Se siguió la técnica de Gibbons y van Houte [8], con algunas modificaciones, de acuerdo a dos diferentes esquemas:

a. Ensayo de adherencia de levaduras a células epiteliales bucales a diferentes T° y pH (Figura 1). La misma consistió en mezclar 0,5 ml de la suspensión de la levadura con 0,5 ml de la suspensión de las células epiteliales en tubos de rosca, a tres pH diferentes: 7,2 (pH del buffer PBS), 6 (por agregado de HCl 0,1 N) y 8 (por agregado de NaOH 0,1 N). Se incubaron las muestras de cada pH a dos temperaturas diferentes: 28°C y 37°C, durante 1h, en agitación. Luego se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 41 (poros de $\approx 20 \mu\text{m}$), que permite el paso de las levaduras no adheridas y retiene las células epiteliales con las levaduras adheridas. Éstas se fijan, se colorean con Gram-Nicolle y se cuentan las levaduras adheridas a 100 células epiteliales. Los datos experimentales fueron analizados utilizando análisis de la varianza. El diseño experimental elegido correspondió al caso de dos factores fijos cruzados (pH y temperatura), en bloques completos aleatorizados (mezcla de hisopados de células epiteliales provenientes de dos únicos dadores), previo ensayo de los supuestos correspondientes.

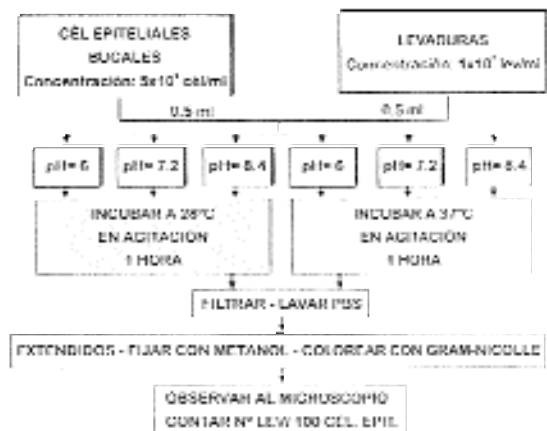


Figura 1. Ensayo de adherencia de levaduras a células epiteliales bucales a diferentes temperatura y pH.

b. Ensayo de adherencia de levaduras a células epiteliales bucales a diferentes pH (Figura 2). De acuerdo a los resultados del ensayo anterior, se realizó un nuevo ensayo de adherencia similar al anterior pero fijando la temperatura en 37°C, y a cuatro niveles diferentes de pH, pH 7,2, pH 5, pH 4 y pH 3. Los datos experimentales fueron analizados utilizando análisis de la varianza. El diseño

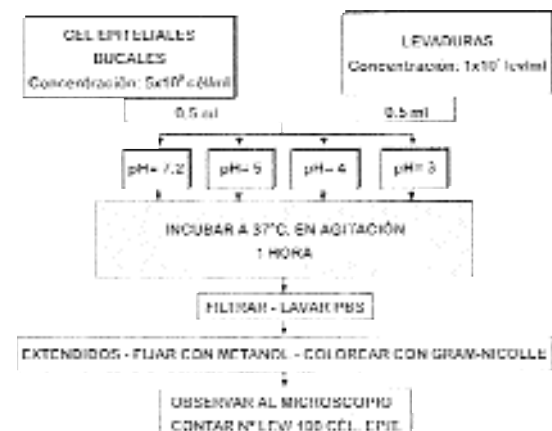


Figura 2. Ensayo de adherencia de levaduras a células epiteliales bucales a diferentes pH.

experimental elegido correspondió a un diseño en bloque, previo ensayo de los supuestos correspondientes.

RESULTADOS

Los resultados de los ensayos de adherencia de levaduras a células epiteliales bucales a diferentes temperaturas y pH se resumen en la Tabla 1. En dicha tabla se muestran los valores correspondientes al número de levaduras adheridas a 100 células epiteliales, para las distintas combinaciones de temperatura y pH: 28°C y pH 6, 28°C y pH 7,2, 28°C y pH 8,4, 37°C y pH 6, 37°C y pH 7,2, 37°C y pH 8,4. Se realizaron siete repeticiones del ensayo en las mismas condiciones, en diferentes días. Los valores promedio de levaduras adheridas muestran que la adherencia fue mayor a 37°C y pH 7,2.

Tabla 1. Ensayo de adherencia de levaduras a células epiteliales bucales a diferentes temperaturas y pH. Número de levaduras adheridas por 100 células epiteliales para los seis tratamientos.

Temperatura	pH		
	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	104	106
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	129	119,2

X= Valor promedio

En la Tabla 2 figuran los valores del número de levaduras adheridas a 100 células epiteliales correspondientes al ensayo de adherencia realizado a 37°C y a diferentes valores de pH ácido (pH 3, pH 4, pH 5) y pH 7,2 (pH del tampón, como testigo). El mismo ensayo se repitió ocho veces en diferentes días. Los valores promedios obtenidos muestran una disminución de la adherencia de *C. albicans* a medida que disminuye el pH.

Tabla 2. Ensayo de adherencia de levaduras a células epiteliales bucales a 37°C y a diferentes valores de pH. Número de levaduras adheridas por 100 células epiteliales para los cuatro tratamientos.

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=93	X=63,5	X=31

DISCUSIÓN

Sandin *et al.* [16], estudiaron la adherencia de *C. albicans* a células epiteliales procedentes de distintos sitios anatómicos. Concluyeron que, para las levaduras, eran más adherentes las células epiteliales bucales que las vaginales y éstas más que las del tracto urinario. También observaron que la adherencia varía significativamente de un individuo a otro, ya sean hombres o mujeres y más aún, para una misma persona de un día a otro. Estos resultados reflejan el efecto de factores ambientales, tales como la dieta y componentes nutricionales de los fluidos corporales, que resultan en diferencias en la expresión de receptores para *Candida* en distintos individuos o, en el mismo individuo, en diferentes días.

Basándonos en estos resultados se tomó una mezcla de células epiteliales de dos donantes, realizando repeticiones en diferentes días para el primero y segundo ensayos.

De acuerdo a los resultados del primer ensayo no se detectaron diferencias significativas atribuibles a variaciones en las células epiteliales utilizadas en diferentes días ($p=0,26$). El pH y la temperatura, estudiados simultáneamente, no interactúan sobre la adherencia de *C. albicans* a células epiteliales bucales ($p=0,41$).

A los valores estudiados de pH, no se encontraron variaciones significativas en la capacidad de adherencia de *C. albicans* a las células epiteliales ($p=0,79$), y para la temperatura tampoco hubo diferencias significativas en la adherencia a 28 y 37°C ($p=0,95$). No obstante, se observó a pH 7,2 y 37°C un ligero incremento de la adherencia con respecto a la encontrada a la misma temperatura con otros valores de pH (6 y 8,4). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ollert *et al.* [21] que encontraron que la máxima adherencia se observaba a 37°C.

De acuerdo a esto, en un segundo ensayo de adherencia se fijó la temperatura en 37°C y se realizaron variaciones del pH, utilizando valores de pH ácidos (3, 4 y 5) y se compararon con el pH del tampón (7,2). Los valores de pH ácido son hallados clínicamente en una secreción vaginal cuando una paciente cursa una candidiasis vaginal así como también con los cuadros de acidosis de pacientes diabéticos que frecuentemente presentan infecciones a *Candida*.

Los resultados del segundo ensayo nos permitieron observar una diferencia altamente significativa entre los valores promedios de adherencia de *C. albicans* a los diferentes valores de pH estudiados ($p<0,001$). 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 a 100 células epiteliales ($x=123,1$). No se hallaron diferencias en el número de levaduras adheridas para los pH 4 ($x=63,5$) y pH 5 ($x=72,1$) y a pH 3 el número de las mismas ($x=31$) fue significativamente menor al encontrado con los otros tres valores de pH.

Por otro lado, hubo diferencias significativas ($p<0,001$) debidas a variaciones en las células epiteliales en los diferentes días, por lo que resultó correcto realizar un estudio estadístico en bloques. Estos resultados coinciden con lo hallado por Sandin *et al.* [16] pero no coinciden con los resultados obtenidos por nosotros en este mismo sentido, en el primer ensayo. Es probable que, al haber estudiado el efecto del pH y la temperatura simultáneamente (Tabla 1) se hayan enmascarado las diferencias debidas a las variaciones introducidas por las células epiteliales

Persi et al. [17] encontraron que cepas diferentes de *C. albicans* adhieren en distinto grado el pH; una cepa adhería bien a valores de pH 5,6 ó 7, mientras que otra cepa de la misma especie adhería mejor a pH 8. King et al. [26] y Sobel et al. [27] demostraron que la adherencia de *C. albicans* a células epiteliales era óptima a un pH 6-7.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo nos permiten afirmar que la interacción levadura de *C. albicans*-célula epitelial, se produce en condiciones óptimas a un pH cercano a 7 y a una temperatura de 37°C. No obs-

tante, las levaduras pueden actuar como patógenos oportunistas y producir infecciones en pacientes con una patología de base que implique modificaciones del pH (acidosis diabética) ó en situaciones fisiológicas, como en el embarazo, en donde hay una disminución del pH vaginal, lo que sugiere la complejidad de la patogénesis de las infecciones por levaduras del género *Candida*.

Bibliografía

1. Mc Courtie J, Douglas J. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect Immun* 1981;32:1234-1241.
2. Hawser S. Adhesion of different *Candida* spp. to plastic: XTT formazan determinations. *J Med Vet Mycol* 1996, 34:407-410.
3. Kimura LH, Pearsall NH. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 1978;21:64-68.
4. Kimura LH, Pearsall NH. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 1980; 28: 464-468.
5. Maisch PA, Calderone RA. Role of surface mannan in the adherence of *Candida albicans* to fibrin- platelet clots formed *in vitro*. *Infect Immun* 1981;32:92-97.
6. Cox F. Adherence of *Candida albicans* to buccal epithelial cells in children and adults. *Intl J Labor Clin Med* 1983;102: 960-972.
7. Lee SC, King RD. Characterization of *Candida albicans* adherence to human vaginal epithelial cells *in vitro*. *Infect Immun* 1983;41:1024-1030.
8. Klotz SA. The adherence of *Candida* yeasts to human and bovine vascular endothelium and subendothelial extracellular matrix. *FEMS Microbiol Lett* 1987;48:201-205.
9. López-Ribot JL, Vespa MN, Chaffin WL. Adherence of *Candida albicans* germ tubes to murine tissues in an *ex vivo* assay. *Can J Microbiol* 1994, 40:77-81.
10. Samaranyake YH, Wu PC, Samaranyake LP, So M, Yuen KY. Adhesion and colonization of *Candida krusei* on host surfaces. *J Med Microbiol* 1994;41:250-258.
11. Gibbons R.J, Van Houte J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Ann Rev Microbiol* 1975;29:19-44.
12. Reed WP, Williams RC. Bacterial adherence: First step in pathogenesis of certain infections. *J Chron Dis* 1978;31: 67-72.
13. Gibbons RJ, Van Houte J. Selective bacterial adherence to oral epithelial surface and its role as an ecological determinant. *Infect Immun* 1971;3:567-573.
14. Hostetter MK. Adhesin and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:29-42.
15. Tronchin G, Bouchara JP, Annaix V, Robert R, Senet JM. Fungal cell adhesion molecules in *Candida albicans*. *Eur J Epidemiol* 1991; 7:23-33.
16. Sandin RL, Rogers A, Beneke E, Fernández M. Influence of mucosal cell origin on the *in vitro* adherence of *Candida albicans*: Are mucosal cells from different sources equivalent? *Mycopathologia* 1987;98:111-119.
17. Persi M, Burnham C, Duhring J. Effects of carbon dioxide and pH on adhesion of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells. *Infect Immun* 1985;50:82-90.
18. Sobel JD, Obedeau N. Effects of subinhibitory concentrations of ketoconazole on *in vitro* adherence of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells. *Eur J Clin Microbiol* 1983;2:445-452.
19. Braga PC, Dalsasso M, Maci M, Piatì C, Dannhorn DR, Bohn M. Inhibition of *Candida albicans* adhesiveness to human buccal and vaginal cells by sub-inhibitory concentrations of filopirox. *Arz Fors Drug Res*, 1995;45:84-87.
20. Centeno A, Davis C, Cohen M, Warren M. Modulation of *Candida albicans* attachment to human epithelial cells by bacteria and carbohydrates. *Infect Immun* 1983; 39: 1354-1360.
21. Ollert MW, Söhnchen R, Korting HC, Ollert U, Bräutigam S, Bräutigam W. Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun* 1993; 61:4560-4568.
22. Calderone RA. Host-parasite relationships in candidosis. *Mycoses* 1989; 32 (Suppl. 2): 12-17.
23. Ghannoum MA, Abbu-Elteen K. Adherence of *Candida albicans*: influencing factors and mechanism(s). En: Prasad R (Ed.) *Candida albicans*. Cellular and molecular biology. Berlin, Springer-Verlag, 1991: 144-163.
24. Klotz SA. Fungal adherence to the vascular compartment: a critical step in the pathogenesis of disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 1992;14:340-347.
25. Douglas JL. Adhesion to surfaces. En: Rose AH, Harrison JS (Eds.) *The Yeasts*, vol. 2: Yeasts and the Environment, 2nd ed. London, Academic Press 1987:239-280.
26. King RD, Lee JC, Morris AL. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* 1980;27:667-674.
27. Sobel JD, Myers PG, Kayl D, Levinson ME. Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and epithelial cell. *J Infect Dis* 1981;143:76-82.