

Efecto in vitro de hidratos de carbono y bacterias entéricas en la adherencia de *Candida albicans*

Marisa Susana Biasoli y Hortensia María Magaró

Centro de Referencia de Micología (CEREMIC), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

Resumen La adherencia de *Candida* a las células se considera esencial para iniciar el proceso que lleva a la colonización. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto que ejercen diferentes azúcares y la presencia de lactobacilos y *Escherichia coli* sobre la adherencia in vitro de *C. albicans*. La adherencia a células epiteliales bucales de *C. albicans* crecida a concentraciones de 50 y 200 mM de galactosa, 50, 200 y 500 mM de sacarosa y 500 mM de manosa, fue mayor que la adherencia de la levadura crecida en caldo glucosado de Sabouraud ($p < 0,01$). La presencia de otros microorganismos, como *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei*, provocó una disminución de la adherencia de *C. albicans* a células epiteliales bucales in vitro ($p < 0,05$), mientras que *E. coli*, no modificó la adherencia de esta levadura.

Palabras clave Adherencia, *Candida albicans*, Hidratos de carbono, Lactobacilos, *Escherichia coli*

In vitro effect of carbohydrates and enteric bacteria on adherence of *Candida albicans*

Summary The adherence of *Candida albicans* to any cell is considered essential in the process that leads to colonization. Our objective in this study was to evaluate the effect of different carbohydrates and the presence of lactobacilli and *Escherichia coli* on the in vitro adherence of *Candida albicans*. The adherence to buccal epithelial cells was higher when growing at concentrations of galactose of 50, and 200 mM, as well as 50, 200, and 500 mM of sucrose, and 500 mM of mannose, compared with that obtained when growing in Sabouraud dextrose broth ($p < 0,01$). The presence of other microorganisms, such as *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei*, caused a decrease in the in vitro adherence of *C. albicans* to buccal epithelial cells ($p < 0,05$), whereas *E. coli* did not modify this adherence at all.

Key words Adherence, *Candida albicans*, Carbohydrates, Lactobacilli, *Escherichia coli*

El sistema gastrointestinal humano tiene una población pequeña pero constante de levaduras como *Candida albicans*. En el adulto se ha establecido que otros miembros de la microbiota intestinal ejercen un control sobre la densidad de población de las levaduras [1,2]. Los estudios señalan una diversidad de factores antimicrobianos. Entre ellos, el ácido láctico es un potente inhibidor de *C. albicans* y se sabe que hay correlación entre el número de lactobacilos y otros microorganismos productores de ácido láctico y la cantidad de levaduras presentes.

Otro 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*.

La adherencia de *Candida* a la superficie de las células del hospedador 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 hospedero.

Es de interés conocer las modificaciones que ejercen, sobre la capacidad de adherencia in vitro de levaduras del tracto gastrointestinal humano, la variación en la composición y concentración de azúcares del medio de cultivo para el crecimiento de las levaduras y la presencia de otros microorganismos, como *Escherichia coli* y lactobacilos.

Efecto de hidratos de carbono en la adherencia de *C. albicans*

Para este estudio se utilizó la cepa de *C. albicans* CCC 112-2000, (colección de Cultivos del CEREMIC)

Dirección para correspondencia:

Dra. Marisa S. Biasoli
Sarmiento 308, 4.º piso
2000 Rosario, Argentina
Tel.: +54-341 440 7591
Fax: +54-341 480 4598
e-mail: mbiasoli@fbioyf.unr.edu.ar

Aceptado para publicación el 19 de septiembre de 2003

aislada de una muestra de heces. Para cada experimento, se inocularon 100 μ l de una suspensión de levadura en 10 ml de caldo de base nitrogenada de levadura (YNB, Difco) con el agregado de diferentes azúcares: glucosa, sacarosa, galactosa y mano-sa en concentraciones finales de 50, 200 y 500 mM, y en 10 ml de caldo glucosado de Sabouraud (grupo control). Se incubaron durante 24 h a 37 °C en agitación. Las levaduras se recogieron por centrifugación, se lavaron 2 veces con tampón fosfato salino (PBS), y se llevaron a una concentración final de $2,5 \times 10^7$ lev/ml.

Se utilizaron células epiteliales bucales (CEB) de varios donantes que no presentaban signos ni síntomas de candidiasis bucal. Se transfirieron a 6 ml de tampón PBS, se lavaron 2 veces y se resuspendieron a una concentración final de 5×10^5 cél/ml.

Los ensayos de adherencia se realizaron en forma independiente para la levadura crecida en presencia de los diferentes azúcares a distintas concentraciones. Se siguió la técnica de Kimura y Pearsall [3]. Se mezclaron 0,5 ml de la suspensión de levaduras con 0,5 ml de la suspensión de CEB (relación levaduras: células = 50:1) y se incubó a 37 °C durante una hora, en agitación. La mezcla se filtró a través de papel Whatman N.º 41 (poros de $\approx 20 \mu$ m), se lavó con 10 ml de PBS, se transfirió a un portaobjetos y se coloreó con Gram-Nicolle. Se contaron las levaduras adheridas a 100 células epiteliales bucales. Este ensayo se repitió cuatro veces en diferentes días. Los datos obtenidos se examinaron por análisis de la varianza (ANOVA), previo ensayo de los supuestos correspondientes. Diseño experimental: un factor control y las tres concentraciones de azúcares (glucosa, galactosa, sacarosa o manosa) en bloques completos aleatorizados (con células epiteliales de varios donantes). La variable en estudio fue el número de levaduras adheridas/100 células epiteliales. Se utilizó la técnica *Least Significant Difference* para detectar diferencias a un nivel de significación del 5%.

El número promedio de levaduras adheridas a CEB de la cepa *C. albicans*, tras crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa, galactosa, sacarosa y manosa, se muestra en la Figura 1. Se observó lo siguiente:

Glucosa: los valores promedio de adherencia de *C. albicans* crecida a concentraciones 50, 200 y 500 mM fueron mayores que en el control, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Galactosa: la adherencia promedio de *C. albicans* crecida a concentraciones de 50 y 200 mM, fue significativamente mayor que para el control ($p < 0,01$). A 500 mM la adherencia también fue mayor que el control, pero no significativamente.

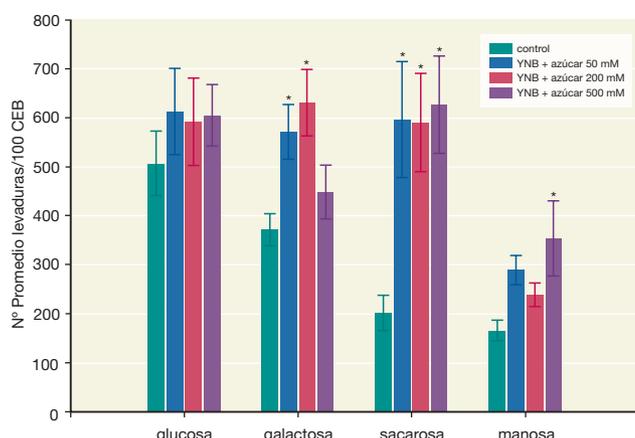
Sacarosa: la adherencia de *C. albicans* crecida a concentraciones de 50, 200 y 500 mM fue significativamente mayor que en el control ($p < 0,01$).

Manosa: la adherencia de *C. albicans* crecida a concentración de 500 mM fue significativamente mayor que en control ($p < 0,05$). A 50 y 200 mM la adherencia resultó mayor que en el control, pero no significativamente.

Efecto de otros microorganismos en la adherencia de *C. albicans*

Se utilizó la cepa de *C. albicans* CCC 112-2000, y se preparó de acuerdo a la técnica ya descrita.

Se utilizaron cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas a partir de la "Leche Bio" que contiene dos especies: *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*. La cepa de *Escherichia coli*, RM 2608, fue aislada de un paciente con



* ($p < 0,01$)

Figura 1. Adherencia de *C. albicans* CCC 112-2000 a células epiteliales bucales después de crecer en un medio con diferentes concentraciones de glucosa, galactosa, sacarosa y manosa.

infección del tracto urinario, caracterizada como uropatógena y con fimbrias P. Se tomaron, por separado, tres o cuatro colonias de lactobacilos o de *E. coli*, se lavaron con PBS y se resuspendieron hasta opacidad similar a la escala 0,5 Mc Farland.

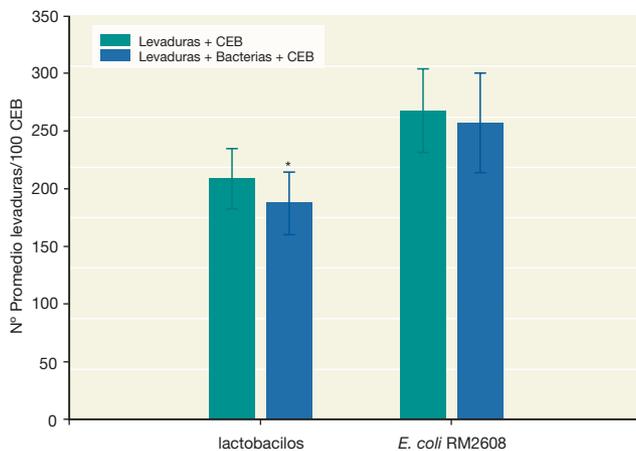
Para cada experiencia se utilizó una mezcla de CEB de varios donantes, de acuerdo al protocolo indicado anteriormente.

Para cada grupo de bacterias se realizaron dos ensayos de adherencia 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 ya señalado (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 min. 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 de adherencia descrita. Ambos ensayos se repitieron cinco veces en diferentes días.

Los datos fueron analizados por ANOVA. El diseño experimental elegido para este estudio fue de un factor (presencia de bacterias: *Lactobacillus*, *E. coli*) en bloques completos aleatorizados (una mezcla de células epiteliales de varios donantes). El factor fue estudiado a dos niveles: presencia o ausencia de bacterias. La variable en estudio fue el número de levaduras adheridas/100 células epiteliales. Se utilizó la técnica LSD para detectar diferencias a un nivel de significación del 5%. El número promedio de levaduras adheridas a CEB de la cepa *C. albicans*, en presencia y ausencia de bacterias se muestra en la Figura 2. Se observó una disminución en los valores de adherencia de *C. albicans* en presencia de lactobacilos con respecto al grupo control ($p < 0,05$). Si bien se detectó una disminución de la adherencia de *C. albicans* en presencia de *E. coli* RM 2608, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

La pared celular de *Candida* 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 los azúcares, incrementándose con el tiempo de cultivo. Este material fibrilar tendría un importante papel en la adherencia. El componente mayoritario de esta capa es una manoproteína de 66 kDa compuesta por un 80% de carbohidratos (principalmente



*($p < 0,05$)

Figura 2. Adherencia de *C. albicans* CCC 112-2000 a células epiteliales bucales en presencia y ausencia de bacterias.

D-manosa) que actuaría como adhesina, mediando la unión de *C. albicans* a las células epiteliales [4].

Al comparar la capacidad de adherencia a CEB de la cepa *C. albicans* CCC 112-2000, crecida en un medio definido (YNB) con el agregado de glucosa, galactosa, sacarosa y manosa, en concentraciones finales de 50, 200 y 500 mM, con la adherencia de la misma levadura crecida en CSG (medio que contiene glucosa al 4%, aproximadamente 222 mM), se encontró que esta levadura aumenta su capacidad de adherencia cuando desarrolla en un medio con galactosa (50 y 200 mM), sacarosa (50, 200 y 500 mM) y manosa (500 mM).

Para glucosa, el mismo azúcar que posee el control, se produjo un ligero incremento de la adherencia para las tres concentraciones utilizadas del azúcar en YNB. Este aumento no fue significativo y podría deberse a la diferente composición de los medios utilizados.

McCourtie y Douglas [5,6], Enache y colaboradores [7] y Calderone y colaboradores [8] observaron que ciertas cepas de *C. albicans* aumentan la adherencia en respuesta a una elevada concentración de diferentes azúcares del medio de cultivo, particularmente con galactosa. Este aumento de la adherencia observado para galactosa 500 mM 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 un factor de virulencia importante. Nikawa y colaboradores [9] encontraron que la preincubación de *C. albicans* en medio YNB suplementado con galactosa 500 mM, aumentaba la coadherencia de *C. albicans* con bacterias de la microbiota oral, con respecto a los resultados obtenidos con glucosa 250 mM.

La sacarosa es un azúcar común de la dieta, mientras que la galactosa es producida en la boca por degradación de la lactosa debido a la acción de bacterias de la microbiota 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 pueda favorecer el desarrollo o persistencia de una candidiasis oral.

En todos los ensayos de adherencia in vitro se utilizaron CEB. Para minimizar la variabilidad de esta población celular, se tomaron células de los mismos donantes y se repitieron los ensayos cuatro veces o más, en iguales condiciones y en días diferentes. Con este mismo fin, se utilizó un diseño estadístico en bloques completos aleato-

rizados (*pool* de células epiteliales de los mismos donantes en diferentes días). Además, se contaron las levaduras adheridas a un número elevado de CEB (100 células), para compensar la heterogeneidad en esta población celular.

En el 83,33 % (cinco de seis) de los ensayos de adherencia realizados se hallaron variaciones atribuibles a las células epiteliales utilizadas en distintos días, coincidiendo con los datos de diferentes investigadores [10-12]. Estos resultados indican que el diseño estadístico empleado fue correcto.

Las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente *E. coli*, constituyen la microbiota predominante del intestino humano, especialmente en la porción media y distal del intestino delgado. Por su parte, los lactobacilos aerobios son habitantes comunes de la cavidad oral, del tracto gastrointestinal y del tracto genital femenino, hábitats que frecuentemente albergan a *C. albicans* como parte de la microbiota habitual [1,13].

La adherencia de *Candida* a la superficie de las células del hospedero sería esencial para iniciar la colonización, y las bacterias de la microbiota intestinal podrían interferir en los mecanismos de interacción célula-levadura.

Al estudiar el efecto de diferentes bacterias sobre la adherencia de *C. albicans* a CEB se encontró que la presencia de *Lactobacillus* spp. reducía significativamente la adherencia de *C. albicans* a CEB, in vitro. Esta disminución fue del 10%, respecto de la adherencia de la misma cepa de levadura en ausencia de las bacterias.

Sobel y colaboradores [14] señalaron que la preincubación de las células epiteliales con aislamientos vaginales de *Lactobacillus* spp. producía una disminución significativa de la adherencia de las levaduras. Reid y Burton [15] encontraron que la instilación de lactobacilos en la vagina de ratones produjo una reducción de infecciones en el tracto urinario y mejoró el mantenimiento de la microbiota normal. Además cuando se suministró a los ratones una suspensión de lactobacilos por vía oral, se inhibió el desarrollo de patógenos intestinales. Estos autores postulan que estos efectos estarían mediados por factores anti-adhesión, a través de productos tales como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.

El estudio del efecto de la presencia de *E. coli* RM 2608 en la adherencia de *C. albicans* permitió observar una disminución del 4 % (diferencia no significativa), con respecto a la adherencia de esta misma cepa en ausencia de las bacterias. *E. coli* ha sido frecuentemente utilizada para estudiar el efecto de la presencia de bacterias en la adherencia de *C. albicans*, con resultados variables [12,16-18]. Centeno y colaboradores [12] observaron un aumento en la adherencia de *C. albicans* a CEB en presencia de *E. coli* con fimbrias tipo 1 (adhesinas manosa sensibles) al facilitar la adherencia de *C. albicans* a la superficie de las células epiteliales. Makrides y Mac Farlane [16] obtuvieron 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 y Samaranyake [17,18] observaron que *E. coli* producía una disminución significativa en la adherencia de *C. albicans* a CEB.

Nuestros resultados 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 y colaboradores [12] y Makrides y Mac Farlane [16], que tenía fimbrias tipo 1. 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 microbiota intestinal indígena inhibirían la colonización de *C. albicans* en el tracto gastrointestinal 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 [5], y b) inhibiendo la asociación de *Candida* a la

mucosa del tracto gastrointestinal [19]. 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 microbiota indígena que habitan el tracto gastrointestinal.

Bibliografía

1. Kennedy MJ, Volz PA. Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonization and dissemination by *Candida albicans*. Sabouraudia 1985; 23: 265-273.
2. Magaró HM, Biasoli MS, Thomas CG, Echenique CG, Tosello ME, Bracalenti BJC. Aspectos del ecosistema gastrointestinal humano y levaduras killer. Rev Iberoam Micol 1993; 10: 47-50.
3. Kimura LH, Pearsall NH. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. Infect Immun 1978; 21: 64-68.
4. Fukazawa Y, Kagaya K. Molecular basis of adhesion of *Candida albicans*. J Med Vet Micol 1997; 35: 87-99.
5. McCourtie J, Douglas LJ. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. Infect Immun 1981; 32: 1234-1241.
6. McCourtie J, Douglas LJ. Relationship between cell surface composition, adherence, and virulence of *Candida albicans*. Infect Immun 1984; 45: 6-12.
7. Enache E, Eskandari T, Borja L, Wadsworth E, Hoxter B. *Candida albicans* adherence to a human oesophageal cell line. Microbiology 1996; 142: 2741-2746.
8. Calderone R, Enache E, Eskandari T, Wadsworth E, Sturtevant J. Adherence of *Candida albicans* to mammalian cells in vitro: nutritional influences. In: Proceedings of The International Symposium on Fungal Cells in Biodefense Mechanism, 1996, Miyagi, Japan.
9. Nikawa H, Egusa H, Makihira S, et al. Alteration of the co-adherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugars. Oral Microbiol Immunol 2001; 16: 279-283.
10. 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.
11. King RD, Lee JC, Morris AL. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. Infect Immun 1980; 27: 667-674.
12. 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.
13. Finegold SM, Baron EJ, Bailey S. Diagnóstico Microbiológico, 7ª edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1989.
14. Sobel JD, Myers PG, Kaye D, Levinson ME. Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and epithelial cell. J Infect Dis 1981; 143: 76-82.
15. Reid G, Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes Infect 2002; 4: 319-324.
16. Makrides HC, Mac Farlane TW. An investigation of the factors involved in increased adherence of *Candida albicans* to epithelial cells mediated by *E. coli*. Microbios 1983; 38: 177-185.
17. Nair RG, Samaranayake LP. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces. An in vitro study. APMIS 1996; 104: 339-349.
18. Nair RG, Samaranayake LP. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to buccal epithelial cells in vitro. J Med Microbiol 1996; 45: 179-185.
19. Kennedy MJ, Volz PA. Ecology of *Candida albicans* gut colonization: Inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. Infect Immun 1985; 49: 654-663.