

774

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTO DE HORMONAS ESTEROIDES
SOBRE LA MICELIZACION DE
Candida albicans

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA
OBTENCION DEL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA

POR
MARISELA GUILLERMINA MENDOZA MENESES

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1995

TM

RC123

.C3

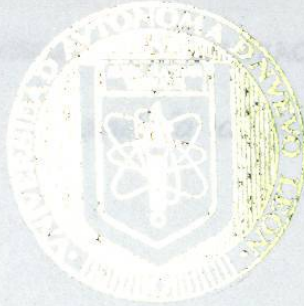
M4

C.1



1080073270

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTO DE HORMONAS ESTEROIDES
SOBRE LA MICELIZACION DE
Candida albicans

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA
OBTENCION DEL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA

POR
MARISELA GUILLERMINA MENDOZA MENESES

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1995

TM
RC123
E63
M4

Biblioteca Central Maestra
UAN
FONDO
TESIS
(73270)

BURDI Fondo Fines
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

EFFECTO DE HORMONAS ESTEROIDES
SOBRE LA MICELIZACION DE
Candida albicans

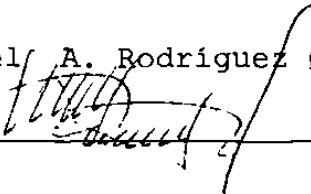
POR

MARISELA GUILLERMINA MENDOZA MENESES

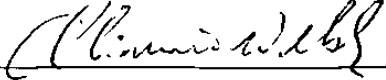
TESIS PRESENTADA A LA
FACULTAD DE MEDICINA
DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA
OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA
Monterrey, N.L.
Diciembre de 1995

COMISION DE TESIS

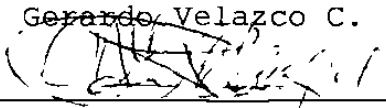
Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla



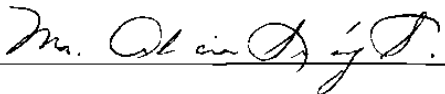
Dr. Oliverio Welsh Lozano



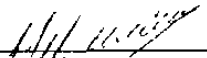
Dr. Gerardo Velazco C.



M.C. Alicia Suárez S.



M.C. Martha Merino



Este trabajo se realizó en el laboratorio de Micología, Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., así como en la División de Patología Experimental, Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jal., bajo la asesoría del Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla (U.A.N.L.) y Dr. Amado González Mendoza (I.M.S.S.)

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer infinitamente a las siguientes personas por su apoyo y colaboración en el presente trabajo de investigación.

A mi asesor, Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla, por haberme brindado su confianza para desarrollar este trabajo.

Dr. Amado González Mendoza, por permitirme llevar a cabo parte de esta investigación en la División de Patología Experimental, Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, I.M.S.S., Guadalajara, Jal.

Dr. Oliverio Welsh, Dr. Gerardo Velázco, M.C. Alicia Suárez S. y M.C. Martha Merino por sus valiosos consejos y observaciones.

M.C. Ana María Puebla Pérez por haberme impulsado y apoyado para que culminara este trabajo.

A todo el personal que labora en el Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Al personal de la División de Patología Experimental, C.I.B.O., I.M.S.S., Guadalajara, Jal.

A todo el personal que labora en el laboratorio de la Dra. Orla Conneely, Departamento de Biología Celular, Baylor College of Medicine, Houston, Texas.

A Rachele Kardon, por su ayuda en la elaboración de las gráficas.

A mis amigos Ana Isabel Vázquez V., Roberto Montes de Oca L. y Odila Saucedo C.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en el desarrollo de esta tesis de maestría.

DEDICATORIA

A mi familia

A mis maestros

A mis amigos

No importa cuanto se
tarde en llegar, lo
importante es alcanzar
la meta.

M.M.

INDICE

	Páginas
1) INTRODUCCION	12-26
1.1) CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS	12-14
1.2) CONSTITUCION DE LA PARED CELULAR	14
1.3) FACTORES DE PATOGENICIDAD EN <i>Candida albicans.</i>	15-20
1.3.1) Dimorfismo	15
1.3.2) Capacidad de cambiar rápidamente la expresión del fenotipo.	17
1.3.3) Tigmotropismo.	18
1.3.4) Hidrofobicidad superficial	18
1.3.5) Factores de virulencia. superficiales.	18
1.3.6) Mimetismo superficial.	19
1.3.7) Enzimas líticas.	20
1.4) MANIFESTACIONES CLINICAS Y FACTORES PREDISPONENTES A LA INFECCION.	20-24
1.4.1) Candidosis cutánea.	20
1.4.2) Candidosis mucocutánea crónica	23

	Páginas
1.4.3) Candidosis sistémica	23
1.5) PRESENCIA DE RECEPTORES HORMONALES	
EN <i>Candida albicans</i>.	24-27
1.6) HORMONAS ESTEROIDES.	27-33
1.6.1) Estrógenos	28
1.6.2) Progesterona	29
1.6.3) Regulación de la secreción de esteroides.	30
1.6.4) Mecanismo de acción de 17 β -estradiol y progesterona.	30
1.6.5) Concentraciones séricas de 17 β -estradiol y progesterona.	33
1.7) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	34
1.8) HIPOTESIS	35
1.9) OBJETIVO GENERAL	35
1.10) OBJETIVOS PARTICULARES	36
2) METODOLOGIA	37-42
2.1) MICROORGANISMO	37
2.2) MEDIO DE CULTIVO	37

	Páginas
2.3) PREPARACION DE LAS HORMONAS	37
2.3.1) 17 β -estradiol	38
2.3.2) Progesterona	38
2.4) PREPARACION DEL INOCULO	38
2.5) PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	39
2.6) DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DE 17 β -ESTRADIOL Y PROGESTERONA SOBRE LA PRODUCCION DE TUBOS GERMINATIVOS.	41
2.7) EVALUACION DE LOS RESULTADOS.	42
 3) RESULTADOS	 43-70
3.1) RESULTADOS DEL EFECTO DEL 17 β -ESTRADIOL Y PROGESTERONA SOBRE LA PROPORCION DE CELULAS DE <i>Candida albicans</i> QUE FORMARON TUBOS GERMINATIVOS	43-59
3.1.1) 17 β -estradiol	43-47
3.1.1.1) Cepa C-17	43-45
3.1.1.2) Cepa D-566	45-48

	Páginas
3.1.2) Progesterona	48-59
3.1.2.1) Cepa C-17	48-53
3.1.2.2) Cepa D-566	53-59
3.2) COMPARACION DEL PORCENTAJE DE FILAMENTACION ENTRE LAS CEPAS D-566 Y C-17 DE <i>Candida albicans</i> , EN PRESENCIA DE 17 β -ESTRADIOL Y PROGESTERONA.	59-64
3.3) ESTUDIOS PARA DETERMINAR LA LONGITUD DEL TUBO GERMINATIVO DE <i>Candida</i> <i>albicans</i> , CEPAS D-566 Y C-17, EN PRESENCIA DE 17 β -ESTRADIOL Y PROGESTERONA	64-69
3.3.1) 17 β -estradiol	64-66
3.3.1.1) Cepa C-17	64
3.3.1.2) Cepa D-566	66
3.3.2) Progesterona	66-69
3.3.2.1) Cepa C-17	66
3.3.2.2) Cepa D-566	69

	Páginas
4) DISCUSION	71-82
4.1) CONCLUSIONES	81
5) RESUMEN	83
6) BIBLIOGRAFIA	85-96
7) APENDICE	97-112

I N T R O D U C C I O N

1.1) CARACTERISTICAS MICROBIOLOGICAS: La candidosis es una infección aguda y crónica ocasionada principalmente por *Candida albicans*, aunque otras especies también pueden ser responsables . *C. albicans* forma parte de la flora normal de las mucosas oral, vaginal y digestiva en donde se desarrolla como células levaduriformes, aunque en su ciclo vital también pueden observarse la formación de pseudohifas e hifas verdaderas (1). La infección activa se asocia con la presencia de hifas (2-4), sin embargo hay reportes en los que se menciona que las tres formas pueden encontrarse en tejidos infectados (5,6).

La candidosis es una de las enfermedades micóticas más frecuentes en el humano, particularmente dentro de la categoría de las infecciones oportunistas, en las que el hongo puede invadir epitelio escamoso estratificado con varios grados de queratinización incluyendo aquellos de la cavidad oral, faringe, esófago, vagina y la

epidermis. Invade epitelio columnar simple (intestino) y epitelio columnar cornificado (lengua). *C. albicans* generalmente no coloniza o invade cabello, dientes, tejido adiposo o células nerviosas (7,8). Debido a que se han aislado consistentemente diversas cepas de *C. albicans* en individuos sanos, es probable que la mayoría de las infecciones sean endógenas (1).

C. albicans está clasificada taxonómicamente en la Subdivisión Deuteromycotina (hongos imperfectos), Clase Blastomycetes, Familia Criptococcaceae. El organismo presenta un dimorfismo relacionado con las condiciones en que se desarrolla, produciendo células levaduriformes (blastosporas), así como también clamidosporas, pseudohifas e hifas verdaderas (1,9). Las células levaduriformes presentan formas elipsoidales o esféricas, cuyo tamaño varía de 3 a 6 μ . Las pseudohifas consisten en cadenas de células levaduriformes elongadas, diferentes de las hifas verdaderas en apariencia y composición de la pared celular (10). La formación de hifas verdaderas se manifiesta mediante la aparición de un tubo germinativo o filamento que mide

aproximadamente la mitad del ancho y el doble del largo de la célula levaduriforme . Este se desarrolla por elongación apical formando tabiques con poros revestidos por una membrana y sus antígenos superficiales son diferentes a los de las blastosporas (11-13).

1.2) CONSTITUCION DE LA PARED CELULAR : La pared celular está constituida principalmente de los polisacáridos mananas, β -glucanas y quitina. Estos tres polímeros son químicamente semejantes entre blastosporas y micelio, si bien la proporción de quitina y manoproteínas varía (14,15). Las mananas se encuentran localizadas en toda la pared celular y representan entre 15.2 a 22.9% del peso seco de ésta o sobre 40% del total de los polisacáridos. Glucanas β -1-3-D y β -1-6-D constituyen sobre el 47 al 60% en peso de la pared celular. Las proteínas representan el 6 al 25%, lípidos 1 al 7% y quitina sobre 0.6 al 9% del peso de la pared celular la cual está compuesta de varias capas cuyo número y características pueden variar de acuerdo al estadio de crecimiento, morfología (levadura o micelio), cepa en estudio, medio de cultivo y al procedimiento

usado para la fijación. Las capas internas están compuestas en su mayoría de quitina y glucanas, las cuales proveen rigidez y parecen ser esenciales para la división celular (16). También se han encontrado diferencias en el contenido lipídico ya que las formas miceliales presentan una mayor proporción de esteroides que las blastosporas lo que podría justificarse, ya que se cree que los esteroides estabilizan las membranas celulares (17). En cuanto a las proteínas celulares, algunos autores han reportado que no existen diferencias en el tipo y cantidad de proteínas citoplasmáticas entre ambas formas del hongo, sin embargo otros investigadores han informado lo contrario (18,19).

1.3) FACTORES DE PATOGENICIDAD EN *Candida albicans*:

Se le atribuyen al menos nueve factores de patogenicidad.

1.3.1) DIMORFISMO: El dimorfismo se define como una interconversión entre las formas de levadura y micelial, asociándose ésta con la virulencia del microorganismo (20). Las hifas son consideradas como la forma invasiva

de *C. albicans*, mientras que las células levaduriformes se consideran responsables de la colonización del epitelio, sin embargo observaciones histopatológicas han mostrado a ambas formas del microorganismo en tejidos infectados. En algunos casos, las células de *C. albicans* pueden invadir tejidos sin la formación de hifas como es el caso de endotelio vascular, corneocitos y las microvellosidades intestinales (8). Las hifas se adhieren más rápidamente que las levaduras a las superficies epiteliales lo que podría servir como sustrato para una propagación adicional de estructuras levaduriformes infecciosas. Se conocen algunos factores que regulan el dimorfismo "in vitro", contándose entre los más importantes el medio de cultivo y la temperatura, ya que las levaduras predominan cuando se desarrollan a temperaturas de 24 a 25°C en presencia de carbohidratos fermentables (9,18,20) y las estructuras precursoras de micelio, los tubos germinativos, son inducibles cuando están en presencia de ciertos aminoácidos, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo, tioglicolato, albúmina de huevo, N-acetil-glucosamina a una temperatura de 37°C. La conversión de fase levaduriforme a la micelial se utiliza como una prueba

de laboratorio para diferenciar *C. albicans* de otras especies (1,7,18). Otros factores que también pueden regular el dimorfismo son la concentración de glucosa y el pH del medio de cultivo, pues se ha reportado que *C. albicans* puede formar tubos germinativos sólo en un rango de pH de 6 a 8 , sin embargo si se elimina la glucosa puede inducirse la formación de tubos germinativos a un pH de 3 (6,21). Si bien se conoce que los factores anteriormente mencionados son determinantes en la formación de tubos germinativos , no se sabe que papel desempeñan las hormonas esteroides en este proceso.

1.3.2) CAPACIDAD DE CAMBIAR RAPIDAMENTE LA EXPRESION DEL

FENOTIPO: *C. albicans* es un organismo diploide al que no se le conoce ciclo sexual. Su capacidad para organizarse genéticamente mediante rearrreglos cromosomales y recombinación pudo haber evolucionado como un sustituto para la reorganización por división meiótica más comúnmente observada en otros organismos. Este elevado potencial de variación fenotípica de una a otra célula, incrementa la diversidad de factores de virulencia en

células que son diseminadas de uno a otro micronicho del huésped en el curso del proceso infeccioso (8).

1.3.3) TIGMOTROPISMO: Cuando se colocan filtros o membranas con hifas en desarrollo sobre un medio con agar, éstas crecen a través de los poros y a lo largo de las ranuras. Esta propiedad pudiera ayudar a las hifas de *C. albicans* a penetrar algunos tejidos a través de las discontinuidades superficiales y orificios microscópicos (8).

1.3.4) HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL: Las células hidrofóbicas de *C. albicans* son más virulentas que las hidrofílicas (8). El aumento en la hidrofobicidad está relacionado con el grado de manosilación de las proteínas superficiales de la pared celular del hongo (22), lo que podría influir en una respuesta inmune eficaz, ya que se ha observado que la manosa puede inhibir la función de las células fagocitarias (4).

1.3.5) FACTORES DE VIRULENCIA SUPERFICIALES: Algunos estudios indican que las levaduras son capaces de adherirse a la membrana de células epiteliales mediante la interacción

con un receptor específico, y que los tubos germinativos pueden ser más adherentes que las blastosporas (23 24). La superficie de *C. albicans* posee diversos ligandos tales como C3d, iC3b, fibrinógeno, laminina, fibronectina, receptores para fucosa y N-acetilglucosamina que se unen selectivamente a componentes del huésped. La mayoría de los ligandos superficiales aparentemente ayudan al hongo a adherirse a las superficies del huésped, sin embargo los factores que se unen al complemento y fibrinógeno tienen algún otro papel en la capacidad patogénica de *C. albicans* (8,25,26). Se les han atribuido diversas propiedades biológicas a las proteínas superficiales de *C. albicans*, tales como actividad pirogénica e inmunosupresora a las mananas de la pared celular (8).

1.3.6) MIMETISMO SUPERFICIAL: En teoría, la habilidad de un microorganismo para producir o adquirir una cubierta superficial de moléculas que semeje los componentes del huésped es un factor de virulencia, dado que tal cubierta pudiera hacer al microorganismo irreconocible como un agente extraño para el huésped. Se ha observado que células de *C. albicans* circulando en el

torrente sanguíneo son rápidamente cubiertas por las plaquetas del huésped mediante el ligando que une fibrinógeno, lo que reduciría la detección del hongo por el sistema inmune (8).

1.3.7) ENZIMAS LITICAS: *C. albicans* secreta una proteinasa, una fosfolipasa, lipasas y una ácidomonoesterasa que favorecen la destrucción de las células del huésped y la invasividad (6,8). Se ha observado que únicamente las especies más virulentas de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*) producen proteinasas (8).

1.4) MANIFESTACIONES CLINICAS Y FACTORES PREDISPONENTES A LA INFECCION: La candidosis clínica puede agruparse en cutánea, mucocutánea crónica y sistémica.

1.4.1) Candidosis Cutánea: La infección de la piel, mucosas y uñas por *Candida* endógena puede ser ocasionada por circunstancias que dan como resultado la maceración

crónica de estas áreas, cambios fisiológicos en el huésped o un estado inmune comprometido.

Las lesiones que produce la candidosis de las mucosas se conocen como aftas. Las aftas orales se observan comúnmente en niños de primera infancia, pacientes con candidosis mucocutánea crónica y adultos bajo tratamiento con esteroides, drogas citotóxicas o antibióticos bacterianos (1).

La candidosis vaginal ocurre más a menudo en mujeres embarazadas, diabéticas, y mujeres que reciben tratamiento antibacteriano u hormonal, incluyendo fármacos anticonceptivos. Se desarrollan parches de seudomembrana blanco-grisácea en la mucosa vaginal, y la infección puede acompañarse de una secreción blanco-amarillenta. Desde las mucosas, la infección e inflamación pueden diseminarse a la piel adyacente. En estas lesiones abundan las levaduras y pseudohifas características. En mujeres no embarazadas, la frecuencia de vaginitis por *Candida* es del 10 al 17% , pero esta frecuencia aumenta aproximadamente al doble durante el embarazo. Los cambios fisiológicos en la

mucosa cervical y vaginal que dan como resultado un desarrollo excesivo del hongo se han correlacionado con:

1) Un aumento de la humedad y sustratos carbohidratados en la superficie mucosa (1).

2) Una disminución tisular local de transferrina llevaría a un aumento de los niveles de hierro disponible, el cual es un requerimiento esencial de crecimiento para *Candida* (1).

3) Una disminución de la concentración de IgA, aunque no se ha establecido el valor protector de este anticuerpo en la candidosis (2).

4) Aumento de la secreción de esteroides que podría promover una candidosis en forma indirecta por reducción de las defensas del huésped, como la fagocitosis (27-29), o bien en forma directa por la presencia de receptores para esteroides en *C. albicans* (6), lo cual constituye el punto central de éste trabajo.

1.4.2) Candidosis Mucocutánea Crónica (CMC): Esta patología se define como una infección producida por *C. albicans*, en cualquiera o todas las superficies del cuerpo: piel, mucosa oral, tracto respiratorio superior, epitelio gastrointestinal, urinario y genital. La invasión del torrente sanguíneo o tejidos más profundos es poco usual. *C. albicans* aparentemente atraviesa la membrana plasmática de las células epiteliales viables, causa una considerable distorsión de éstas células y persiste como un parásito intracelular. La CMC comienza tempranamente y a menudo persiste durante toda la vida. Diversas condiciones subyacentes se han relacionado con la CMC, como son una deficiencia en la inmunidad mediada por células y endocrinopatías, especialmente hipoparatiroidismo (1).

1.4.3) Candidosis Sistémica: Numerosas manifestaciones sistémicas de candidosis pueden ocurrir después de la introducción de *Candida* en el torrente circulatorio. Puede haber candidemia como resultado de contaminación por cateterismo, procedimientos quirúrgicos, traumatismo de la piel o tracto gastrointestinal, o aspiración durante la asistencia respiratoria en ciertos casos

clínicos. Algunas de sus manifestaciones pueden ser neumonía, meningitis, endocarditis y septicemia. Es muy frecuente encontrarla en los primeros lugares de las infecciones nosocomiales (1).

1.5) PRESENCIA DE RECEPTORES HORMONALES EN *Candida albicans*. El hallazgo de receptores para hormonas esteroides de mamíferos en *C. albicans*, abre la posibilidad de que la variación en la concentración de éstas durante el ciclo menstrual y embarazo afecte en forma directa el desarrollo del hongo.

En 1981, Loose y col. reportaron la existencia de una proteína de unión para corticosteroides (Corticosteroid Binding Protein, CBP), hipotetizando que tal vez representara un receptor hormonal primitivo. Además se encontró en extractos de *C. albicans* una sustancia que podía desplazar competitivamente corticosterona tritiada unida a CBP, determinándose que esta sustancia representa un "enlace endógeno" para la proteína de unión, la cual probablemente sea un análogo hormonal. No solo los corticosteroides de mamíferos pueden unirse al CBP, sino que el "enlace endógeno"

puede desplazar competitivamente corticosteroides de receptores glucocorticoides en células de mamíferos (30-31).

Powell y Drutz confirmaron la presencia de una proteína de unión específica para corticosterona en el citosol de *C. albicans* (CBP), demostrando que la constante de disociación y la capacidad de unión varió de una cepa a otra, así como que la progesterona y en menor grado el cortisol, compiten por esta proteína de unión con corticosterona (32). Malloy y col. clonaron el gen CBP para determinar su homología con receptores glucocorticoides, encontrando que no existe relación con éstos receptores hormonales (33).

Loose y col. mencionan haber probado el efecto de corticosterona, progesterona y dexametasona sobre *C. albicans* no encontrando cambios en la curva de crecimiento del hongo, así como tampoco en la conversión de levadura a fase micelial (34), mientras Wagner reporta que a una concentración de 8µg/ml de progesterona disminuyó el tiempo de generación en *C.*

albicans, en tanto que 40ng/ml no tuvo efecto sobre el crecimiento del hongo (6)

En 1989, Skrowski y Feldman reportaron la presencia de una proteína de unión para estrógenos (Estradiol Binding Protein, EBP) en cepas patógenas de *C. albicans*, la cual mostró una alta especificidad y estereoselectividad, encontrando que el compuesto más potente para desplazar H³-estradiol fue el 17 β -estradiol, seguido por estrona, estriol y 17 α -estradiol respectivamente (35).

Otros hongos además de *C. albicans* poseen receptores para hormonas esteroides: *Paracoccidioides brasiliensis* (36), *Coccidioides immitis* (37), *Trichophyton mentagrophytes* (38) y *Saccharomyces cerevisiae* (39-41).

En el caso de *T. mentagrophytes* y *P. brasiliensis* se ha demostrado que las hormonas esteroides inhiben el desarrollo de estos hongos (42,43), mientras que en *C. immitis* el efecto es contrario (37).

Como puede observarse, el efecto de las hormonas esteroides sobre un microorganismo patógeno en particular varía, por lo que es necesario conocer la estructura, función y producción de éstas para determinar cómo pueden interactuar con el microorganismo en cuestión.

1.6) HORMONAS ESTEROIDES: Los esteroides son hormonas cuya estructura básica es el esterano, compuesto derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno que comprende 3 anillos con 6 átomos de carbono y un núcleo con 5 átomos de carbono, todos ellos saturados. El esterano posee además 2 grupos metilo en posición 10 y 13. Las diferencias de actividad biológica y de afinidad por las proteínas transportadoras del plasma y receptores en el citoplasma de las células efectoras, son consecuencia de variaciones estructurales.

El precursor común de los esteroides es el colesterol. La primera etapa, determinante de la velocidad global de la biosíntesis, está integrada por varias reacciones enzimáticas que transforman el

colesterol en Δ^5 -pregnenolona, el precursor principal de todos los esteroides. A partir de la pregnenolona, se forman esteroides de tres tipos:

a) Esteroides de 21 átomos de carbono (pregnanos).

b) Esteroides de 19 átomos de carbono (androstano) o andrógenos.

c) Esteroides de 18 átomos de carbono (estrano) o estrógenos.

1.6.1) Estrógenos: Se sintetizan 3 tipos de estrógenos en el humano; la estrona, el estradiol que contiene un hidroxilo suplementario en posición 17β en relación con la estrona, y el estriol. La síntesis de estrógenos tiene lugar de modo predominante a nivel de las células de la teca interna del folículo de De Graaf. También sintetizan estrógenos las cortezas suprarrenales, la placenta y el testículo. El estradiol se produce a partir de la estrona, que experimenta hidrogenación en posición 17. También es posible que proceda de la testosterona la cual se forma por aromatización a partir

de la Δ^4 -androstenediona. El estriol se encuentra principalmente en la orina; no está demostrado que se sintetice en el ovario.

La acción de los estrógenos sobre el aparato genital va encaminada principalmente al desarrollo de sus distintas partes: vagina, endometrio, miometrio, mucosa endocervical. Favorecen el desarrollo de los labios mayores y menores, el ensanchamiento de la pelvis y la distribución femenina de grasa; inducen además el desarrollo de la glándula mamaria, disminuyen la temperatura corporal, favorecen la fijación ósea de calcio, provocan retención de agua en los tejidos, estimulan el anabolismo protéico así como el crecimiento del cartílago.

1.6.2) Progesterona: Es el progestágeno ovárico más activo y se sintetiza predominantemente en el cuerpo amarillo, por lo que su acción predomina durante la fase lútea del ciclo menstrual en vagina, cuello uterino, trompas, miometrio y sobre todo endometrio. En la glándula mamaria favorece la formación de los acinos (44). Después de la séptima semana de gestación el cuerpo lúteo puede ser removido sin que haya aborto, lo

que indica un incremento en la producción de progesterona por la placenta (45).

1.6.3) Regulación de la Secreción de Esteroides: De la regulación de la secreción de estrógenos se ocupan sobre todo las hormonas gonadotrópicas hipofisiarias, y muy especialmente la hormona folículoestimulante (FSH); la de la progesterona depende de la hormona luteinizante, LH, (44).

1.6.4) Mecanismo de Acción de 17β -Estradiol y Progesterona: Los efectos biológicos de las hormonas esteroides se llevan a cabo mediante receptores hormonales específicos.

El estradiol plasmático entra a las células blanco por difusión, siendo transportado al núcleo donde se une a sus respectivos receptores. Los receptores para estrógenos se encuentran en el núcleo de la célula unidos a diferentes proteínas termolábiles las que se disocian del receptor cuando éste se une al estradiol. El complejo ligand-receptor forma un homodímero que se une al elemento-respuesta sobre el gen para activar la transcripción de ARNm específicos.

Se ha estimado que existen entre 5 000 a 20 000 moléculas estrógeno-receptoras por célula. Estos receptores también sirven como sitios para regulación de la actividad hormonal. Por ejemplo, los estrógenos inducen un incremento en el número de receptores estrogénicos en algunos tejidos y estimulan también la síntesis de receptores para progesterona. Por el contrario, la progesterona puede causar una reducción en el número de receptores para estrógenos y progesterona.

La progesterona también entra a la célula por difusión, para unirse a sus respectivos receptores los cuales se encuentran distribuidos entre el núcleo y el citoplasma. El complejo ligando-receptor se une al elemento-respuesta para activar la transcripción del gen. El elemento-respuesta para progesterona parece ser similar a aquél para corticosteroides, siendo la especificidad de la respuesta determinada por el receptor que se encuentre en la célula, así como por otros factores de transcripción célula específicos. El receptor para progesterona también forma dímeros antes de unirse al ADN, pero al contrario que el receptor para estrógenos, puede formar heterodímeros. Si bien es

claro que estos receptores intracelulares median muchos de los efectos de las hormonas esteroides, algunos como el efecto anestésico de la progesterona y el efecto estimulador sobre el flujo sanguíneo uterino, sugieren que estos esteroides también pueden actuar a nivel de la membrana celular (45).

**1.6.5) Ciclo Concentraciones Séricas de 17 β -Estradiol y Progesterona
Durante el Ciclo Menstrual y Embarazo.**

ESTRADIOL:

Ciclo Menstrual: Fase folicular: 0.06 - 0.7 ng/ml

Fase lútea: 0.2 ng/ml

Embarazo: Primer trimestre : 2.5 - 5 ng/ml

Segundo trimestre: 5 - 10 ng/ml

Tercer trimestre (al término): 15-17 ng/ml

PROGESTERONA:

Ciclo Menstrual: Fase folicular: 0.95 ng/ml

Fase lútea: 11.3 ng/ml

Embarazo: Primer trimestre: 50 ng/ml

Segundo trimestre: 100 ng/ml

Tercer trimestre: 180 - 190 ng/ml

1.7) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA: La existencia de receptores para esteroides en un microorganismo patógeno, el cual tiene la capacidad de reconocer y responder a las hormonas circulantes del huésped, aumenta la posibilidad de que el medio ambiente hormonal pudiera interactuar directamente sobre éste mediante el receptor, y alterar su virulencia.

Dadas las anteriores condiciones en otros sistemas de relación hongo-hormonas sexuales, nos interesó observar en forma detallada el efecto de la acción de estas hormonas sobre el dimorfismo de *Candida albicans* con el propósito de determinar su grado de influencia sobre la producción de micelio, el cual es uno de los principales factores de patogenicidad en este hongo.

1.8) H I P O T E S I S

Concentraciones de progesterona y 17β -estradiol, similares a las del ciclo menstrual y embarazo, estimulan directamente la conversión de la fase levaduriforme a la micelial en *Candida albicans*.

1.9) OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que ejercen concentraciones fisiológicas de progesterona y 17β -estradiol, sobre la micelización de *Candida albicans*.

1.10) OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto que ejercen concentraciones fisiológicas de progesterona y 17β -estradiol en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación, sobre el porcentaje de filamentación de *Candida albicans*.

Determinar el efecto que ejercen concentraciones fisiológicas de progesterona y 17β -estradiol en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación, sobre la longitud de los tubos germinativos de *Candida albicans*.

Comparar el porcentaje y la longitud de los tubos germinativos en presencia de progesterona y 17β -estradiol, entre las cepas D-566 y C-17 de *Candida albicans*, para determinar si existe una respuesta específica.

M E T O D O L O G I A

2.1) MICROORGANISMO: Se trabajó con las cepas D-566 y C-17 de *Candida albicans* proporcionadas por el Departamento de Microbiología, Laboratorio de Micología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.2) MEDIO DE CULTIVO: Se utilizó un medio complejo SYEB (Sabouraud Yeast Extract Broth), el cual contiene: 40g de Glucosa (Merck), 10g de Polipeptona (Bioxón), 5g de Extracto de Levadura (Bioxón), 1000ml de agua destilada; pH 5.6 (20).

2.3) PREPARACION DE LAS HORMONAS: Formas cristalinas de 17β -estradiol y progesterona (Sigma Chemicals) se disolvieron en etanol al 96% (Merck) para preparar una solución patrón con una concentración de 1mg/ml a partir de la cual se hicieron diluciones en SYEB hasta obtener las concentraciones del ensayo, equivalentes a aquéllas

promedio alcanzadas durante el ciclo menstrual y embarazo (28,29,44,45). Ver sección 1.6.5.

17 β -estradiol:

- 0.3 ng/ml: Ciclo menstrual y primer trimestre del embarazo
- 5 ng/ml: Segundo trimestre del embarazo
- 10 ng/ml: Tercer trimestre del embarazo

Progesterona:

- 10 ng/ml: Ciclo menstrual
- 30 ng/ml: Primer trimestre del embarazo
- 80 ng/ml: Segundo trimestre del embarazo
- 130 ng/ml: Tercer trimestre del embarazo

2.4) PREPARACION DEL INOCULO: Se tomó una asada de la cepa respectiva, D-566 o C-17, y se inocularon tres tubos, con 10ml de medio de cultivo cada uno, los cuales contenían: 1) SYEB, 2) SYEB con hormona y 3) SYEB con etanol en una concentración equivalente a la que se utilizó para disolver las hormonas, para

determinar si éste no influía sobre la filamentación de *C. albicans*.

Se preincubó a 28°C/18h para obtener únicamente células en fase levaduriforme. Las células se centrifugaron a 3000 rpm/15 min y se lavaron 2 veces con buffer de fosfatos salino. El inóculo se ajustó a una concentración de 1×10^7 cél/ml mediante conteo con un hematímetro.

2.5) PROCEDIMIENTO DE ENSAYO: Del inóculo proveniente del tubo No. 1 (preincubación únicamente en medio de cultivo), se tomaron 3 alícuotas de 10µl para depositar cada una sobre un portaobjetos. Posteriormente se le añadió a cada inóculo 90µl de SYEB, 90µl de SYEB con 17β-estradiol o progesterona y 90µl de SYEB con etanol.

Del inóculo que provenía del tubo No. 2 (preincubación en medio de cultivo con hormona), se tomaron 10µl y se depositaron sobre un portaobjetos

para después agregar 90 μ l de medio de cultivo con 17 β -estradiol o progesterona.

Del inóculo que provenía del tubo No. 3 (preincubación en medio de cultivo con etanol), se tomaron también 10 μ l para depositarlos sobre un portaobjetos; posteriormente se agregaron 90 μ l de medio de cultivo con etanol.

En todos los casos, se mezcló el inóculo con su respectivo medio de cultivo, para después poner un cubreobjetos e incubar a 40°C durante cuatro horas en una cámara húmeda. Iniciando en un punto al azar, se observaron 10 campos sucesivos cada hora con el objetivo seco fuerte (40X) de un microscopio óptico (Carl Zeiss), para determinar cuántas células formaron tubos germinativos así como la longitud de éstos, los cuales fueron medidos con un micrómetro.

Se llevaron a cabo 3 repeticiones por experimento, cada una en ocasiones diferentes.

2.6) DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DE 17β -ESTRADIOL Y PROGESTERONA SOBRE LA PRODUCCION DE TUBOS GERMINATIVOS:

Como se mencionó con anterioridad , fueron cinco los tratamientos que se llevaron a cabo en cada experimento.

A) Control: Preincubación a 28°C por 18h en medio de cultivo (SYEB), e incubación a 40°C por 4h, también en medio de cultivo.

B) Preincubación a 28°C por 18h SYEB e incubación a 40°C por 4h en SYEB con hormona (17β -estradiol o progesterona).

C) Preincubación a 28°C por 18h en SYEB con hormona (17β -estradiol o progesterona), e incubación a 40°C por 4h en SYEB con la hormona correspondiente.

D) Preincubación a 28°C por 18h en SYEB, e incubación a 40°C por 4h en SYEB con etanol.

E) Preincubación a 28°C por 18h en SYEB con etanol, e incubación a 40°C por 4h en SYEB con etanol.

2.7) EVALUACION DE LOS RESULTADOS: Se llevaron a cabo una serie de tres repeticiones por cepa/hormona/concentración/tratamiento, cuyos resultados se evaluaron mediante las siguientes pruebas estadísticas:

Chi Cuadrada (χ^2) Para evaluar el porcentaje de filamentación entre los diferentes tratamientos.

t de Student: Para evaluar las diferencias entre la longitud de los tubos germinativos de los cinco tratamientos.

Regresión Múltiple y Análisis de Varianza: Para la comparación de los resultados entre los diferentes grupos y tratamientos (49).

R E S U L T A D O S

3.1) RESULTADOS DEL EFECTO DEL 17β -ESTRADIOL Y PROGESTERONA SOBRE LA PROPORCION DE CELULAS DE *Candida albicans*, QUE FORMARON TUBOS GERMINATIVOS.

3.1.1) 17β -ESTRADIOL

3.1.1.1.) CEPA C-17: El 17β -estradiol favoreció la producción de tubos germinativos en las concentraciones de 0.3 y 5 ng/ml, siendo en el medio que contenía .5ng donde se observaron diferencias altamente significativas con respecto al control durante los periodos de incubación; a las 4h pudo determinarse que la proporción de células que presentaron tubo germinativo en el control fue de 58.53%, en comparación con la concentración de 5ng, que fue de 82.64% ($p < 0.001$). Con 0.3ng no se observaron diferencias significativas con respecto al medio de cultivo sin la hormona a las 3 y 4h de incubación. En la concentración de 10ng se estableció un efecto contrario al de 0.3 y 5ng de 17β -

TABLA 1. EFECTO DE LA HORMONA 17 B-ESTRADIOL SOBRE EL PORCENTAJE DE FILAMENTACION DE *Candida albicans*, CEP4 C-17

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE 17B-ESTRADIOL (ng/ml)	T I E M P O (h)				COMPARACION "A" vs "B"			
		1	2	3	4	P*			
		%	%	%	%	1h	2h	3h	4h
A	_____	15.2	31.2	57.72	78.57	<0.001	<0.001	N.S	N.S.
B	0.3	29.75	53.27	70.4	83.73				
A	_____	4.06	20.32	39.83	58.53	<0.02	<0.001	<0.001	<0.001
B	5	13.93	41.8	73.77	82.64				
A	_____	20.8	44	66.4	77.6	N.S.	<0.05	<0.001	<0.001
B	10	12.39	27.86	48.76	57.85				

* PRUEBA DE X2

estradiol, observándose diferencias significativas con el control a partir de la segunda hora de incubación; a las 4h, el control presentó un 77.6% de células que formaron tubo germinativo, mientras que en SYEB con hormona se observa un 57.85%, $p < 0.01$, (Tabla 1).

Comparando el porcentaje de células que formaron tubo germinativo a las 4h en las 3 concentraciones de 17β -estradiol (0.3, 5 y 10 ng/ml), pudo determinarse que no hay diferencias significativas entre 0.3 (83.73%) y 5ng (82.64%). pero sí las hubo entre 0.3 (83.73) vs 10ng (57.85%), $p < 0.001$ y 5ng (82.64%) vs 10ng (57.85%), $p < 0.001$ (prueba χ^2).

El análisis de varianza de los parámetros concentración de la hormona y tiempo, dió una $p < 0.001$ para cada uno, mientras que el medio de cultivo no fue significativo. La evaluación mediante regresión múltiple (R múltiple) tuvo un valor de 0.6190 ($p < 0.001$).

3.1.1.2) CEPA D-566: También fue en la concentración de 5 ng/ml donde se observaron diferencias altamente significativas durante el período de incubación,

encontrándose que a las 4h el control presentó un 54.03% de células con tubo germinativo, mientras que en SYEB con la hormona se observa un 75% ($p < 0.001$). Es en ésta concentración donde se encontró el más alto porcentaje de filamentación. Al contrario de la cepa C-17, en 0.3ng no se encontraron diferencias significativas entre el control y las células incubadas con la hormona, aunque la producción de tubos germinativos siempre fue mayor en ésta. A la concentración de 10 ng/ml, en general hubo un menor porcentaje de filamentación con respecto a SYEB sin hormona, aunque sólo se observaron diferencias significativas a las 2h, presentando el control un 29.59% de filamentación, contra un 12.9% de las células incubadas en 17- β estradiol, $p < 0.05$, prueba χ^2 , (Tabla 2).

Al comparar el porcentaje de células que formaron tubos germinativos entre las 3 concentraciones del esteroide, a las 4h de incubación, se encontró que no hubo diferencias significativas entre 0.3 (66.94%) vs 5ng (75%), mientras que éstas sí se establecieron entre las concentraciones de 0.3 (66.94%) vs 10ng (43.54%), $p < 0.001$, y 5 (75%) vs 10ng (43.54%), $p < 0.001$. Este

TABLA 2. EFECTO DE LA HORMONA 17-B ESTRADIOL SOBRE EL PORCENTAJE DE FILAMENTACION DE *Candida albicans*, CEP4 D-566

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE 17-B-ESTRADIOL (ng/ml)	T I E M P O (h)				COMPARACION "A" vs "B"			
		1	2	3	4	P*			
A	10.65	48.36	53.65	62.09	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	0.3	20.49	50.81	61.6	66.94				
A	7.25	25	42.74	54.03	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
B	5	21.77	45.96	68.54	75				
A	10.65	24.59	36.06	41.8	N.S.	<0,05	N.S.	N.S.
B	10	4.85	12.9	27.4	43.54				

* PRUEBA CHI CUADRADA

comportamiento fue semejante al de la cepa C-17 (prueba χ^2).

Al evaluar el comportamiento de ambas cepas (prueba χ^2) en presencia del tratamiento "C" (preincubación a 28°C/18h en SYEB con 17 β -estradiol), se encontró que no había diferencia con los resultados del tratamiento "B" (preincubación a 28°C/ 18h sólo en medio de cultivo).

El análisis de varianza para los parámetros concentración de 17 β -estradiol, medio de cultivo y tiempo de incubación dió una significancia <0.001, para cada uno. El valor de R múltiple fue de 0.6923, (p <0.001).

3.1.2) PROGESTERONA

3.1.2.1) CEPA C-17: En el tratamiento "B" (preincubación a 28°C/ 18h sólo en medio de cultivo), no se observaron diferencias significativas durante el período de incubación con respecto al control, en las concentraciones de 10 y 30 ng/ml de progesterona. En la concentración de 80 ng/ml, el porcentaje de

TABLA 3. EFECTO DE PROGESTERONA SOBRE EL PORCENTAJE DE FILAMENTACION DE Candida albicans, CEPA C-17

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE PROGESTERONA (ng/ml)	T I E M P O (h)				COMPARACION "A" vs "B"			
		1	2	3	4	p*			
	%	%	%	%	1h	2h	3h	4h	
A	_____	27.2	51.2	64	74.4	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	10	22.65	46.09	66.4	74.21				
A	_____	31.96	52.45	68.85	78.68	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	30	23.01	47.6	61.9	68.25				
A	_____	6.4	17.6	42.4	59.2	<0.05	<0.00	<0.02	N.S.
B	80	15.44	43.08	58.53	68.29				
A	_____	15.62	21.09	35.39	50.78	<0.01	N.S.	N.S.	N.S.
B	130	4.72	25.98	40.15	52.75				

* PRUEBA CHI CUADRADA

filamentación fue mayor que en el control, observándose diferencias significativas hasta las 3h de incubación, 42.4% vs 58.53%, respectivamente ($p < 0.002$, prueba χ^2). A las 4h no se encontró significancia estadística. En 130 ng/ml tampoco se encontraron diferencias, con excepción del período de 1h de incubación, $p < 0.001$, (Tabla 3).

En el tratamiento "C" (preincubación a 28°C/18h en SYEB con hormona) los resultados para ésta cepa C-17, variaron con respecto al tratamiento "B" (preincubación a 28°C/18h en SYEB) pues se presentó diferencia estadísticamente significativa en relación a los controles, en las concentraciones de 10 y 80 ng/ml de progesterona. En 10 ng, el porcentaje de células que formaron tubo germinativo fue menor que en el testigo en los 4 períodos de incubación, encontrando valores de 42.18% y 64% respectivamente, a las 3h de incubación ($p < 0.001$, prueba χ^2). Los resultados son semejantes en la concentración de 30 ng/ml sin embargo, aquí sólo se encontró diferencia significativa con el control a la hora de incubación, 16.39% y 31.96%, respectivamente, ($p < 0.01$). En presencia de 80ng, el comportamiento de las

levaduras fue el opuesto al de 10 y 30 ng, ya que en forma general el porcentaje de filamentación fue mayor que en ausencia de progesterona, observándose una diferencia significativa en el tiempo de 2h de incubación; los valores obtenidos fueron de 40.62% en presencia de la hormona y 17.6% en ausencia de ésta, lo cual fue altamente significativo ($p < 0.001$, prueba χ^2). En 130 ng/ml de la hormona, no se establecieron discrepancias significativas con el control en ninguna de las 4 horas de incubación (Tabla 4).

En general, no se encontraron diferencias entre el porcentaje de filamentación de las células sometidas al tratamiento "B", preincubación a 28°C/18h en SYEB, (Tabla 3) y aquéllas del tratamiento "C", preincubación a 28°C/18h en SYEB con progesterona (Tabla 4), a excepción de la concentración de 10ng, donde se observó que las células del tratamiento "C" (1h, 13.38%; 2h, 27.34%; 3h, 42.18% y 4h, 63.28%) presentaron un menor porcentaje de tubos germinativos que las del tratamiento "B" (1h, 22.65%; 2h, 46.09%; 3h, 66.4% y 4h, 74.21%) determinándose una diferencia significativa a las 2h ($p < 0.01$) y 3h de incubación (< 0.001 , prueba χ^2).

TABLA 4. EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE EL PORCENTAJE DE FILAMENTACION DE *Candida albicans*, CEP4 C-17 CUANDO ES PREINCUBADA EN PRESENCIA DE LA HORMONA

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE PROGESTERONA (ng/ml)	T I E M P O (h)				COMPARACION "A" vs "C"			
		1	2	3	4	1h	2h	3h	4h
A	_____	27.2 %	51.2 %	64 %	74.4 %	<0.05	<0.001	<0.001	N.S.
C	10	13.38	27.34	42.18	63.28				
A	_____	31.96	52.45	68.85	78.68	<0.01	N.S.	N.S.	N.S.
C	30	16.39	47.1	56.19	64.16				
A	_____	6.4	17.6	42.4	59.2	<0.05	<0.001	<0.02	N.S.
C	80	16.4	40.62	54.68	66.04				
A	_____	15.62	21.09	35.39	50.7	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
C	130	12	29.6	40	51.2				

* PRUEBA CHI CUADRADA

El análisis de varianza de los parámetros concentración de progesterona y tiempo fue significativo ($p < 0.001$), no así el de medio de cultivo. La R múltiple presentó un valor de 0.6986, ($p < 0.001$).

3.1.2.2) CEPA D-566: En el tratamiento "B" (preincubación a 28°C/ 18h en SYEB), a la concentración de 10 ng/ml, se observó que las levaduras presentaron una menor proporción de filamentación durante el período de incubación, que el control; se encontraron diferencias significativas en 1, 3 y 4h, no así a las 2h. De las cuatro concentraciones bajo experimentación, es en ésta donde se establece la menor producción de tubos germinativos, observándose a las 4h un 56.9% de filamentación, en comparación con el control, 71.65% ($p < 0.05$, prueba χ^2). En 30 ng/ml sólo se observa una mayor producción de tubos germinativos a la hora de incubación ($p < 0.05$), ya que en los demás tiempos no hay diferencias significativas con el control sin hormona. Es en 80 ng/ml donde se presentó el mayor porcentaje de células con tubo germinativo (90.9%, 4h), si bien no hubo significancia en ningún tiempo con el control, lo

TABLA 5. EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE EL PORCENTAJE DE FILAMENTACION DE Candida albicans, CEP4 D-566

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE PROGESTERONA (ng/ml)	T I E M P O (h)				COMPARACION "A" vs "B"			
		1	2	3	4	p*			
		%	%	%	%	1h	2h	3h	4h
A	_____	25.19	45.66	62.99	71.65	<0,02	N.S.	<0,02	<0,05
B	10	12.29	35.77	47.15	56.9				
A	_____	23.25	54.26	75.96	82.94	<0,05	N.S.	N.S.	N.S.
B	30	36.58	59.34	73.98	81.3				
A	_____	20.96	66.12	88.7	95.16	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	80	32.23	65.28	84	90.9				
A	_____	16.6	59.52	76.98	85.71	N.S	N.S	N.S.	N.S.
B	130	15.32	52.41	70.16	80.64				

* PRUEBA CHI CUADRADA

que también se determinó en 130 ng/ml de progesterona (Tabla 5)

En el tratamiento "C" (preincubación a 28°C/18h en SYEB con progesterona) con 10 ng/ml de la hormona, se observa que el porcentaje de filamentación fue menor que en SYEB sin hormona, encontrándose significancia estadística a partir de las 2h de incubación; en forma semejante al tratamiento "B" (preincubación sólo en SYEB), es en ésta concentración donde se aprecia el menor porcentaje de tubos germinativos, en comparación con las demás concentraciones; a las 4h hubo un 49.60% en SYEB con la hormona y en el control, 71.65%, ($p < 0.001$). En 30 y 130 ng/ml puede decirse que, en forma general, también hubo menor cantidad de células con tubo germinativo, en comparación con el medio de cultivo sin progesterona, determinándose diferencias significativas a las 3 y 4h de incubación en el caso de la primera y a las 2 y 3h en el caso de 130ng. Con 80 ng/ml se observó una mayor producción de tubos germinativos que en el control, encontrándose significancia a 1 y 2h de incubación; es en ésta concentración donde hubo un mayor porcentaje de filamentación a las 4h (99.2%). El

TABLA 6. EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE EL PORCENTAJE DE FILAMENTACION DE Candida albicans, CEPA D-566 CUANDO ES PREINCUBADA EN PRESENCIA DE LA HORMONA

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE PROGESTERONA (ng/ml)	T I E M P O				COMPARACION "A" vs "C"			
		1	2	3	4	1h	2h	3h	4h
A	_____	25.19 %	45.66 %	62.99 %	71.65 %	N.S.	<0,05	<0,01	<0,001
C	10	15.74	32.28	41.73	49.6				
A	_____	23.25	54.26	75.96	82.94	N.S.	N.S.	<0,05	<0,01
C	30	26.82	51.36	63.93	68.03				
A	_____	20.96	66.12	88.7	95.16	<0,001	<0,02	N.S.	N.S.
C	80	53.6	80.8	95.2	99.2				
A	_____	16.6	59.52	76.98	85.71	N.S.	<0,001	<0,05	N.S.
C	130	11.47	36.88	63.93	79.5				

* PRUEBA CHI CUADRADA

comportamiento global de *C. albicans* es semejante al del tratamiento "B", sin embargo las discrepancias estadísticas con el control se presentan en distinta forma (Tabla 6).

En la Tabla 7 se muestra la comparación del porcentaje de filamentación de los tratamientos "B" y "C" con progesterona en la cepa D-566 de *C. albicans*. Se encontró que a la concentración de 80 ng/ml el porcentaje de filamentación del tratamiento "C" (preincubación a 28°C/18h en SYEB con progesterona) fue significativamente mayor que el del tratamiento "B", preincubación sólo en SYEB, ($p < 0.01$); en éste caso no se observaron diferencias significativas en las demás concentraciones (10, 30 y 130 ng/ml), salvo en 30 ng, a las 4h, ($p < 0.02$) y en 130 ng/ml, a las 2h ($p < 0.02$), si bien en éstos casos fueron las células del tratamiento "B" las que produjeron un mayor porcentaje de tubos germinativos (prueba χ^2).

El análisis de varianza de los parámetros concentración de progesterona y tiempo de incubación dió valores significativos para cada uno ($p < 0.001$), no

TABLA 7. COMPARACION DEL PORCENTAJE DE FILAMENTACION DE LOS TRATAMIENTOS "B" Y "C" CON PROGESTERONA, DE LA CEPA D-566 DE *Candida albicans*

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE PROGESTERONA (ng/ml)	T I E M P O (h)				COMPARACION "B" vs "C"			
		1	2	3	4	1h	2h	3h	4h
C	10	15.74	32.28	41.73	49.6	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
		12.29	35.77	47.16	56.9				
		26.82	51.36	63.93	68.03	N.S.	N.S.	N.S.	<0.02
		36.56	59.34	73.98	81.3				
B	80	53.6	80.8	95.2	99.2	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
		32.23	65.28	84	90.9				
		11.47	36.88	63.93	79.5	N.S.	0.02	N.S.	N.S.
		15.32	52.41	70.16	80.64				
B	130	15.32	52.41	70.16	80.64				
		11.47	36.88	63.93	79.5	N.S.	0.02	N.S.	N.S.
		53.6	80.8	95.2	99.2	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
		32.23	65.28	84	90.9				

• PRUEBA CHI CUADRADA

sucediendo lo mismo con el medio de cultivo. El valor de R múltiple fue de 0.6763, ($p < 0.001$).

3.2) COMPARACION DEL PORCENTAJE DE FILAMENTACION ENTRE LAS CEPAS D-566 y C-17 de *Candida albicans*, EN PRESENCIA DE 17 β -ESTRADIOL Y PROGESTERONA.

Los resultados de la comparación del porcentaje de filamentación entre las cepas D-566 y C-17 en presencia de 17 β -estradiol cuando se preincubó a 28°C/18h sólo en SYEB (tratamiento "B") se observan en la Tabla 8. En ella puede verse que fue la cepa C-17 la que formó una mayor cantidad de tubos germinativos encontrándose significancia en las concentraciones de 0.3ng a las 4h de incubación ($p < 0.001$) y en 10 ng/ml a las 2h ($p < 0.01$), 3h ($p < 0.001$) y 4h ($p < 0.05$, prueba χ^2).

En la Tabla 9 se compara el porcentaje de filamentación de ambas cepas en presencia de progesterona, cuando son preincubadas a 28°C/18h en medio de cultivo sin hormona (tratamiento "B"). La cepa C-17

TABLE 8. COMPARACION DEL PORCENTAJE DE FILAMENTACION ENTRE LAS CEPAS D-566 Y C-17
DE *Candida albicans* EN PRESENCIA DE 17 β -ESTRADIOL

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE 17 β -ESTRADIOL (ng/ml)	TIEMPO (h)	C E P A S		COMPARACION D-566 vs C-17 P*
			D-566 %	C-17 %	
B	0.3	1	20.49	29.75	1h- N.S.
		2	50.81	53.27	2h- N.S.
		3	61.6	70.4	3h- N.S.
		4	66.94	83.73	4h- < 0.01
	5	1	21.77	13.93	1h- N.S.
		2	45.96	41.8	2h- N.S.
		3	68.54	73.77	3h- N.S.
		4	75	82.64	4h- N.S.
	10	1	4.85	12.39	1h- N.S.
		2	12.9	27.86	2h- < 0.01
		3	27.4	48.76	3h- < 0.001
		4	43.54	57.85	4h- < 0.05

* PRUEBA CHI CUADRADA

TABLA 9. COMPARACION DEL PORCENTAJE DE FILAMENTACION ENTRE LAS CEPAS D-566 Y C-17 DE *Candida albicans* EN PRESENCIA DE PROGESTERONA

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE PROGESTERONA (ng/ml)	TIEMPO (h)	C E P A S		COMPARACION D-566 vs C-17 P*
			%	%	
B	10	1	12.29	22.65	1h- <0.05
		2	35.77	46.09	2h- N.S.
		3	47.15	66.4	3h- <0.01
		4	56.9	74.21	4h- <0.01
	30	1	36.58	23.01	1h- <0.02
		2	59.34	47.6	2h- N.S.
		3	73.98	61.9	3h- <0.05
		4	81.3	68.25	4h- <0.02
	80	1	32.23	15.44	1h- <0.01
		2	65.28	43.08	2h- <0.001
		3	84	54.68	3h- <0.001
		4	90.9	68.29	4h- <0.001
130	1	15.32	4.72	1h- <0.01	
	2	52.41	25.98	2h- <0.001	
	3	70.16	40.15	3h- <0.001	
	4	80.64	52.75	4h- <0.001	

* PRUEBA CHI CUADRADA

presentó también una mayor producción de tubos germinativos que la cepa D-566, pero sólo en la concentración de 10 ng/ml donde hubo significancia estadística a la 1h de incubación ($p < 0.05$), 3h ($p < 0.01$) y 4h ($p < 0.01$). La cepa D-566 formó un mayor porcentaje de tubos germinativos que la cepa C-17, en 30, 80 y 130 ng/ml, concentraciones en las que hubo significancia en casi todos los tiempos a excepción de 30ng, a las 2h de incubación. En la concentración de 80ng, la cepa D-566 presentó a partir de las 2h, un aumento altamente significativo ($p < 0.001$) en la filamentación durante el experimento, en comparación con la cepa C-17. Este mismo comportamiento se observó en presencia de 130 ng/ml de progesterona (prueba χ^2).

Los resultados anteriores variaron cuando las levaduras fueron preincubadas 28°C/18h en medio de cultivo con progesterona (tratamiento "C"). En la concentración de 10 ng/ml, la cepa C-17 produjo un porcentaje de tubos germinativos significativamente mayor a D-566, sólo a las 4h de incubación ($p < 0.05$), mientras que en 30ng la cepa D-566 presentó diferencias significativas con C-17 únicamente a la hora

TABLA 10. COMPARACION DEL PORCENTAJE DE MICELIZACION ENTRE LAS CEPAS D-566 Y C-17 DE *Candida albicans* CUANDO SON PREINCUBADAS EN PRESENCIA DE PROGESTERONA

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE PROGESTERONA (ng/ml)	TIEMPO (h)	C E P A S		COMPARACION D-566 vs C-17 p*
			D-566 %	C-17 %	
C	10	1	15.74	13.38	1h - N.S.
		2	32.28	27.34	2h - N.S.
		3	41.73	42.18	3h - N.S.
		4	49.6	63.28	4h - < 0.05
	30	1	26.82	16.39	1h - < 0.05
		2	51.36	47.1	2h - N.S.
		3	63.93	56.19	3h - N.S.
		4	68.03	64.16	4h - N.S.
	80	1	53.6	16.4	1h - < 0.001
		2	80.8	40.62	2h - < 0.001
		3	95.2	54.68	3h - < 0.001
		4	99.2	66.04	4h - < 0.001
130	1	11.47	12	1h - N.S.	
	2	36.88	29.6	2h - N.S.	
	3	63.93	40	3h - < 0.001	
	4	79.5	51.2	4h - < 0.001	

* PRUEBA CHI CUADRADA

de incubación ($p < 0.05$). Por otra parte con 80ng se encontró, en forma semejante al tratamiento "B", que el porcentaje de filamentación para la cepa D-566 fue significativamente mayor con respecto a C-17 ($p < 0.001$) durante todo el experimento, a diferencia de la concentración de 130ng donde ésta significancia de observó sólo a las 3 y 4h de incubación, $p < 0.001$, (Tabla 10).

3.3) ESTUDIOS PARA DETERMINAR LA LONGITUD DEL TUBO GERMINATIVO DE *Candida albicans*, CEPAS D-566 y C-17, EN PRESENCIA DE 17β -ESTRADIOL Y PROGESTERONA.

3.3.1) 17β -ESTRADIOL

3.3.1.1) CEPA C-17: No se encontraron diferencias estadísticas entre la longitud del tubo germinativo de las células en presencia de la hormona, y aquéllas en medio de cultivo solamente, tanto en el tratamiento "B", preincubación a $28^{\circ}\text{C}/18\text{h}$ en SYEB, (Tabla 11) como en el "C", preincubación a $28^{\circ}\text{C}/18\text{h}$ en SYEB con hormona (Datos no mostrados).

TABLA 11. EFECTO DE 17- β ESTRADIOL SOBRE LA LONGITUD DEL TUBO GERMINATIVO
DE *Candida albicans*, CEPA C-17

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE 17- β -ESTRADIOL (ng/ml)	T I E M P O (h)				COMPARACION "A" vs "B"			
		1 μ	2 μ	3 μ	4 μ	1h	2h	3h	4h
A	—	5 \pm 3	9 \pm 4	11 \pm 5	16 \pm 6	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	0.3	7 \pm 3	13 \pm 6	18 \pm 7	21 \pm 7				
A	—	8 \pm 7	17 \pm 10	16 \pm 10	20 \pm 11	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	5	10 \pm 6	14 \pm 8	17 \pm 8	20 \pm 9				
A	—	7 \pm 4	12 \pm 7	16 \pm 8	21 \pm 10	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	10	5 \pm 3	8 \pm 4	11 \pm 7	14 \pm 7				

* PRUEBA t DE STUDENT

μ : MICRAS

X \pm S: MEDIA Y DESVIACION ESTANDARD

3.3.1.2) CEPA D-566: En la Tabla 12 se observa el efecto del 17β -estradiol, tratamiento "B" (preincubación a 28°C en SYEB), sobre la longitud del tubo germinativo de la cepa D-566 de *C. albicans*. En forma semejante a la cepa C-17, tampoco encontramos diferencias significativas con el control, aunque en las concentraciones de 0.3 y 5 ng/ml el tubo germinativo fue, en promedio, mayor que en SYEB sin hormona. Estadísticamente no se encontraron diferencias entre el control y las células sometidas al tratamiento "C" (preincubación a $28^{\circ}\text{C}/18\text{h}$ en SYEB con hormona), ya que en éste caso la longitud fue semejante (prueba t de Student)

3.3.2) PROGESTERONA

3.3.2.1) CEPA C-17: En la tabla 13 se muestran los resultados de la influencia de progesterona sobre la longitud del tubo germinativo de la cepa C-17 de *C. albicans*. La longitud del tubo germinativo fue en general, menor o igual que el control, aunque éstas

TABLA 12. EFECTO DE 17- β -ESTRADIOL SOBRE LA LONGITUD DEL TUBO GERMINATIVO
DE *Candida albicans*, CEPA D-566

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE 17- β -ESTRADIOL (ng/ml)	T I E M P O (h)				COMPARACION "A" vs "B"			
		1 μ	2 μ	3 μ	4 μ	1h	2h	3h	4h
A	—	5 \pm 4	14 \pm 7	21 \pm 12	27 \pm 14	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	0.3	10 \pm 6	19 \pm 11	20 \pm 11	33 \pm 23				
A	—	9 \pm 7	11 \pm 7	17 \pm 13	22 \pm 15	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	5	10 \pm 5	18 \pm 11	24 \pm 15	28 \pm 17				
A	—	6 \pm 3	9 \pm 5	12 \pm 6	16 \pm 6	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	10	4 \pm 3	8 \pm 5	12 \pm 7	17 \pm 9				

* PRUEBA t DE STUDENT

μ : MICRAS

X \pm S: MEDIA Y DESVIACION ESTANDARD

DE LA CEP4 C-17 DE *Candida albicans*

DE LA CEP4 C-17 DE *Candida albicans*

TABLA 13. EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA LONGITUD DEL TUBO GERMINATIVO

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE PROGESTERONA (ng/ml)	T E M P O (h)				COMPARACION "A" vs "B"			
		1	2	3	4	1h	2h	3h	4h
A	—	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
		9 ± 4	14 ± 7	22 ± 12	30 ± 17				
B	10	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
		5 ± 2	9 ± 4	12 ± 5	14 ± 5				
A	—	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
		9 ± 4	15 ± 6	26 ± 13	38 ± 19				
B	30	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
		9 ± 6	15 ± 8	21 ± 12	28 ± 17				
A	—	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
		5 ± 4	10 ± 6	22 ± 11	37 ± 17				
B	80	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
		6 ± 4	14 ± 7	18 ± 8	24 ± 10				
A	—	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
		3 ± 3	8 ± 6	13 ± 9	22 ± 12				
B	130	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
		4 ± 5	7 ± 4	10 ± 4	12 ± 5				

* PRUEBA t DE STUDENT

diferencias no fueron significativas (prueba t de Student).

3.3.2.2) CEPA D-566: El comportamiento general de ésta cepa fue semejante al de C-17 ya que no se encontraron diferencias significativas con el control (Tabla 14).

TABLA 14. EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA LONGITUD DEL TUBO GERMINATIVO
DE LA CEPA D 566 DE *Candida albicans*

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE PROGESTERONA (ng/ml)	T I E M P O				COMPARACION "A" vs "B"			
		1 µ	2 µ	3 µ	4 µ	1h	2h	3h	4h
A	—	6 ± 2	9 ± 3	15 ± 8	19 ± 14	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	10	5 ± 2	8 ± 4	12 ± 6	15 ± 8				
A	—	7 ± 3	12 ± 4	17 ± 8	35 ± 24	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	30	9 ± 4	13 ± 6	18 ± 8	35 ± 23				
A	—	7 ± 3	17 ± 8	28 ± 14	43 ± 22	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	80	7 ± 3	18 ± 10	31 ± 14	39 ± 16				
A	—	7 ± 4	11 ± 5	20 ± 9	27 ± 12	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
B	130	9 ± 6	14 ± 8	19 ± 10	25 ± 13				

* PRUEBA t DE STUDENT

D I S C U S I O N

La incidencia de vaginitis por *C. albicans* se incrementa marcadamente durante el embarazo, declinando en forma abrupta inmediatamente después del parto. Aún no están bien establecidas las razones por las que *C. albicans* causa infección en vagina. Algunos investigadores sugieren que *Candida* no causa infección por sí misma en individuos sanos, sino que ésta se desarrolla cuando se incrementa la susceptibilidad del hospedero por factores predisponentes tales como inmunodeficiencias, diabetes, uso de anticonceptivos, ciclo menstrual y embarazo (6,33).

En éste trabajo se planteó que las hormonas 17β -estradiol y progesterona, en concentraciones fisiológicas semejantes a las encontradas durante el ciclo menstrual y embarazo, pudieran tener alguna influencia en la filamentación de *C. albicans* (importante factor de patogenicidad) lo que se ha comprobado, si bien tal influencia difiere de una cepa a otra y de uno

Los resultados que se obtuvieron de los anteriores experimentos dieron lugar a la metodología implementada en este trabajo. Se eligió el medio de cultivo Sabouraud Yeast Extract Broth, SYEB, (caldo sabouraud con extracto de levadura) y una temperatura de 40°C, los cuales no inhibieron la producción de tubos germinativos, a diferencia de las otras condiciones de cultivo en donde generalmente no había filamentación o bien se observaba formación de pseudomicelio.

Está comprobado que *C. albicans* es un hongo con una elevada capacidad de variación fenotípica, lo cual puede observarse entre células de una misma población, así como entre células de diferentes poblaciones (8). Tomando en cuenta la anterior referencia, se decidió utilizar un control para cada una de las concentraciones de prueba, debido a la variabilidad en el comportamiento de las levaduras, eligiéndose un período de incubación de 4h para determinar la influencia de 17 β -estradiol y progesterona sobre la filamentación de *C. albicans* (porcentaje y longitud) porque en este lapso de tiempo el tubo germinativo puede medirse en forma confiable, ya que después empieza a constituirse en una masa micelial.

A la temperatura de 28°C, *C. albicans* presenta forma de levadura. El procedimiento de preincubar a 28°C/18h en medio de cultivo con hormona o sin ella, para después incubar a 40°C/4h (tratamientos A,B,C) se llevó a cabo para establecer si la presencia de 17 β -estradiol o progesterona en diferentes condiciones de tiempo y temperatura podría influir en la formación de tubos germinativos, lo que sucedió con progesterona en algunos casos; con 17 β -estradiol no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Como puede observarse en los resultados, la concentración de 0.3 ng/ml de 17 β -estradiol favoreció en forma parcial la producción de tubos germinativos, únicamente en la cepa C-17. Aquéllas que más estimularon la producción de tubos germinativos fueron 5 ng/ ml de 17 β -estradiol, tanto en la cepa C-17 como D-566, y 80 ng/ml de progesterona, especialmente en la cepa C-17. Ambas concentraciones corresponden al segundo trimestre del embarazo, lo que podría indicar un

efecto directo de la hormona sobre *C. albicans* para el establecimiento de infección, especialmente vaginitis. Aunque las dos hormonas no tuvieron influencia sobre la longitud del tubo germinativo en ninguna de sus concentraciones, probablemente ésto no sea relevante ya que lo importante parece ser su formación, lo que aumentaría la adherencia del hongo a los tejidos facilitando así la invasión de éstos (3,4,6).

El porcentaje de filamentación significativamente más bajo se encontró en la concentración de 10 ng/ml, de 17 β -estradiol, principalmente en la cepa C-17, y en 10 ng/ml de progesterona, en ambas cepas; estas concentraciones corresponden al tercer trimestre del embarazo y al ciclo menstrual, respectivamente. Las concentraciones de 30 y 130 ng/ml de progesterona prácticamente no afectaron a *C. albicans*.

No se esperaba que alguna de las concentraciones de 17 β -estradiol y progesterona tuvieran un efecto inhibitorio sobre el dimorfismo de *C. albicans*, aún cuando un comportamiento similar se ha reportado en *P.*

brasiliensis (36) y *T. mentagrophytes* (38), ya que algunos de los factores predisponentes para la infección son el embarazo (1,6,9) y ciclo menstrual, en los que se registran cambios hormonales que podrían favorecerla (6,33,44) debido a la presencia de proteínas de unión para esteroides en el hongo (SBPs, Steroid Binding Proteins).

Powell y Drutz (32) mencionan que el aumento en los niveles de progesterona durante el embarazo puede ser responsable por el aumento en la incidencia de candidosis vaginal por *C. albicans*, ya que la incidencia de vaginitis por *C. tropicalis* y *C. pseudotropicalis* (las cuales presentan CBP, pero con baja afinidad para progesterona) no se elevan durante el embarazo. Por otra parte, Loose y col. (34) mostraron que la transformación de levadura a fase micelial no era afectada por la presencia de 10^{-6} M (314 ng/ml) de corticosterona, progesterona y dexametasona, mientras que Wagner (6) reporta que una concentración de 40 ng/ml de progesterona no tuvo efecto sobre el crecimiento de *C. albicans*, en tanto que 8 μ g/ml inhibió el desarrollo, disminuyendo el tiempo de generación. Como

pude verse, los resultados de Loose y Wagner no concuerdan con los de este trabajo probablemente porque las concentraciones hormonales y la metodología utilizada son diferentes, además de que Wagner mide el efecto de la progesterona tomando en cuenta el tiempo de generación y no la filamentación de *C. albicans*.

El principal efecto de hormonas esteroides como estradiol, progesterona y cortisona, es sobre la expresión genética, más que sobre la actividad enzimática o los procesos de transporte. Estas hormonas entran a las células blanco por difusión y son, transportadas al núcleo o citoplasma donde se unen al receptor. El complejo ligando-receptor se une al gen para activar la transcripción de ARNm, por lo que el impacto de éstos esteroides se mide principalmente en horas debido a que sus efectos biológicos dependen de la síntesis de nuevas proteínas. Por ejemplo, el primer paso en la estimulación del desarrollo uterino por 17β -estradiol, es su unión a un receptor específico en el citoplasma de las células uterinas; el complejo hormonal migra entonces al núcleo, donde se une a sitios específicos sobre el ADN. Otras hormonas esteroides

actúan en forma similar, estimulando el proceso de transcripción (51).

En el caso de *C. albicans* es probable que el mecanismo de acción de las hormonas esteroides sea semejante al anteriormente descrito (6,34), lo que explicaría su influencia en la producción de un mayor porcentaje de tubos germinativos en presencia de 5 ng/ml de 17β -estradiol y 80 ng/ml de progesterona (cepa C-17), en donde los resultados de los tratamientos "B" y "C" (preincubación en presencia y ausencia de la hormona, respectivamente) fueron semejantes. Sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual la preincubación a 28°C/18h y únicamente con progesterona, afectó el porcentaje de filamentación al disminuirlo en la mayoría de los casos, con excepción de la concentración de 80 ng/ml (cepa D-566); es posible que la saturación de la proteína de unión para progesterona (CBP) pudiera estar relacionada con ésta respuesta, o bien que la concentración de la hormona dentro del hongo interfiera con el estímulo de la temperatura (40°C) para la formación de los tubos germinativos.

También se desconoce la razón por la cual algunas concentraciones tienen un efecto inhibitorio sobre el dimorfismo de *C. albicans*; se ha propuesto que la proteína de unión pudiera tomar diversas conformaciones, dependiendo de la concentración del sustrato, las cuales al actuar sobre el genoma de *C. albicans* pudieran interactuar con él de diversas formas, promoviendo o inhibiendo la filialmentación o bien, que una función específica pudiera ser regulada dependiendo de los sitios de unión ocupados por la hormona (43).

En cuanto a la diferencia en la respuesta hacia las hormonas de las cepas de D-566 Y C-17 de *C. albicans*, es posible que ésta se deba a discrepancias en la afinidad de las proteínas de unión hacia 17β -estradiol o progesterona (EBP o CBP, respectivamente), de una u otra cepa, ya que en presencia de 17β -estradiol la cepa C-17 produjo en general, un porcentaje de tubos germinativos mayor que la cepa D-566; por el contrario, en presencia de progesterona la cepa D-566 filamento en forma general, en mayor proporción que la cepa C-17. Es necesario llevar a cabo más investigaciones para corroborar lo anteriormente propuesto, si bien Loose y

col. (34) describen en uno de sus trabajos que no encontraron una correlación entre la cantidad o afinidad de CBP para progesterona, y la virulencia de *C. albicans* "in vivo".

Hasta la fecha, hay pocos reportes sobre la influencia de las hormonas esteroides sobre el crecimiento o dimorfismo de *C. albicans*. Uno de estos trabajos es el que llevaron a cabo Wagner y Loose y col. en donde mencionan que éstas no tienen influencia sobre el desarrollo del hongo, específicamente progesterona (34), en tanto que Kalo y Segal (33) describieron que el tratamiento con progesterona incrementó la adhesión a células epiteliales. Por otra parte, Powell y col. indican que el 17β -estradiol en concentraciones de 10^{-8} M (2.72 ng/ml), es capaz de estimular directamente la formación de tubos germinativos en *C. albicans* (6), lo cual concuerda con los resultados de éste trabajo.

C O N C L U S I O N E S

Las hormonas esteroides 17β -estradiol y progesterona, en concentraciones fisiológicas, influyeron sobre el dimorfismo de *Candida albicans* "in vitro", particularmente en el porcentaje de filamentación, mientras que no tuvieron un efecto en la longitud de los tubos germinativos.

Las concentraciones que ejercieron un mayor estímulo fueron 5 ng/ml de 17β -estradiol, tanto en la cepa C-17 como D-566, y 80 ng/ml de progesterona especialmente en la cepa C-17. Esta respuesta indica un comportamiento específico del microorganismo.

El porcentaje de filamentación más bajo se encontró en la concentración de 10 ng/ml de 17β -estradiol, principalmente en la cepa C-17 y en 10 ng/ml de progesterona en ambas cepas.

El efecto de las hormonas esteroides es dependiente de la temperatura y del medio de cultivo. La preincubación a $28^{\circ}\text{C}/18\text{h}$ en caldo sabouraud extracto de

levadura (SYEB) con progesterona, influyó en la mayoría de los casos negativamente sobre la producción de los tubos germinativos, desconociéndose el mecanismo de esta respuesta.

La metodología utilizada en la presente investigación es sencilla y confiable, ya que permitió el seguimiento de una sola población disminuyendo la variación en los resultados.

Son necesarias más investigaciones para esclarecer los mecanismos por los cuales el 17β -estradiol y la progesterona influyen sobre el dimorfismo de *Candida albicans*, así como ensayar combinaciones de las concentraciones de prueba utilizadas en este trabajo para determinar cómo afectan la producción de tubos germinativos o de pseudomicelio, al cual también se le ha relacionado con procesos infecciosos producidos por *C. albicans*.

R E S U M E N

La candidosis, ocasionada principalmente por *Candida albicans*, es una de las enfermedades micóticas más frecuentes. El microorganismo presenta un dimorfismo relacionado con las condiciones en que se desarrolla, produciendo levaduras, pseudohifas e hifas verdaderas; éstas últimas se asocian con la infección activa. Diversas condiciones pueden predisponer a infecciones por *C. albicans*, particularmente vaginitis, infección muy frecuente. En ésta investigación se planteó que las hormonas esteroides 17β -estradiol y progesterona en concentraciones semejantes a las del ciclo menstrual y embarazo, podían influir directamente en la producción y longitud de los tubos germinativos del hongo, encontrándose un efecto únicamente en el porcentaje de filamentación. Se trabajó con 0.3, 5 y 10 ng/ml de 17β -estradiol y 10, 30, 80 y 130 ng/ml de progesterona así como con las cepas D-566 y C-17 de *C. albicans*. La concentración que estimuló significativamente la producción de tubos germinativos en ambas cepas fue la

de 5 ng/ml de 17β -estradiol mientras que 80 ng/ml de progesterona ejerció un efecto particularmente en la cepa C-17; el menor porcentaje de filamentación se presentó en la concentración de 10 ng/ml de 17β -estradiol en la cepa C-17, en tanto que en 10 ng/ml de progesterona este comportamiento se observó en ambas cepas. La preincubación a $28^{\circ}\text{C}/18\text{h}$ en presencia de progesterona disminuyó en forma general la producción de tubos germinativos, desconociéndose el mecanismo de ésta respuesta. Al comparar el porcentaje de filamentación entre ambas cepas, se encontró que la hormona 17β -estradiol estimuló principalmente a la cepa C-17, en tanto que la progesterona influenció a la cepa D-566. El comportamiento general de *C. albicans* en éste trabajo, indica la existencia de una respuesta específica hacia las hormonas de prueba, lo que podría estar relacionado con su virulencia.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Joklik, W.K., Willet, H.P. y Amos, D.B., (1986). Zinsser Microbiología. Décimooctava Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. Págs. 1334-1344.

- 2) Kimura, L.H. and Pearsall, N.N., (1978). Adherence of *Candida albicans* to Buccal Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 21: 64-68.

- 3) Sobel, J.D., Muller, G. and Buckley, H.R., (1984). Critical Role of Germ Tube Formation in the Pathogenesis of Candidal Vaginitis. *Infect. Immun.* 44: 576-580.

- 4) Diamond, R. , (1993). Interactions of Phagocytic Cells with *Candida* and Other Opportunistic Fungi. *Arch. Med. Res.* 24(4): 361-369.

- 5) Lee, C.J. and King, R.D., (1983). Characterization of *Candida albicans*. Adherence to Human Vaginal Epithelial Cells In Vitro. *Infect. Immun.* 41: 1024-1030.

- 6) Ryley, J.F. , (1986). Pathogenicity of *Candida albicans* With Particular Reference to the Vagina. J. Med. Vet. Mycol. 24: 5-22.

- 7) Conant, N.F., Smith, D.T., Baker, R.D. and Callaway, J.L., (1972). Micología. Tercera Edición. Editorial Interamericana, México. Págs. 252-279.

- 8) Odds, F.C. (1994). *Candida* Species and Virulence. ASM News, 60 (6): 313-318

- 9) Freeman, B.A. (1986). Microbiología de Burrows. Vigésimosegunda Edición. Editorial Interamericana. Págs. 1030-1036

- 10) Schermitz, C., Martin, R. and Ueberberg, H., (1978). Ultrastructural Investigations of the Formation of *Candida albicans* Germ Tubes and Septa. Sabouradia. 16: 115-124.

11) Sundstrom, P.M., Nichols, E.J. and Kenny, G.E., (1987). Antigenic Differences Between Mannoproteins of Germ Tubes and Blastospores of *Candida albicans*. Infect. Immun. 55 (3): 616-620.

12) Ponton, J. and Jones, J.M., (1986). Identification of Two Germ-Tube-Specific Cell Wall Antigens of *Candida albicans* Infect. Immun. 54(3): 864-868.

13) Sundstrom, P.M. and Kenny, G.E., (1984). Characterization of Antigens Specific to the Surface of Germ Tubes of *Candida albicans* by Immunofluorescence. Infect. Immun. 43(3): 850-855.

14) Elorza, M.V., Murgui, A. and Sentandreu, R., (1985). Dimorphism in *Candida albicans* : Contribution of Mannoproteins to the Architecture of Yeast and Mycelial Cell Walls. J. Gen. Microbiol. 131: 2209-2216.

15) Elorza, M.V., Marcilla, A. and Sentandreu, R., (1988). Wall Mannoproteins of the Yeast and Mycelial Cells of *Candida albicans*: Nature of the Glycosidic Bonds and Polydispersity of Their Mannan Moieties. J. Gen. Microbiol. 134 : 2393-2403.

16) Calderoni, R.A. and Braun, P.C., (1991). Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans* . Microbiol. Rev. 55(1): 1-20.

17) Ghannoum, M.A., Janini, G., Khamis, L. and S.S. Radwan, (1986). Dimorphism-Associated Variations in the Lipid Composition of *Candida albicans*. J. Gen Microbiol. 132: 2367-2375.

18) Ahrens, J.C., Daneo-Moore, L. and Buckley, H.R., (1983). Differential Protein Synthesis in *Candida albicans* During Blastospore Formation at 24.5°C and During Germ Tube Formation at 37°C. J. Gen. Microbiol. 129: 1133-1139.

- 19) Manning, M. and Mitchell, T.G., (1980). Morphogenesis of *Candida albicans* and Cytoplasmic Proteins Associated with Differences in Morphology, Strain, or Temperature. J. Bacteriol. 144(1): 258-273.
- 20) Niimi, M., Niimi, K., Tokunaga, J. and Nakayama, H., (1980). Changes in Cyclic Nucleotide Levels and Dimorphic Transition in *Candida albicans*. J. Bact. 142: 1010- 1014.
- 21) Pollack, J.H. and Hashimoto, T., (1987). The Role of Glucose in the pH Regulation of Germ-tube Formation in *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 133: 415-424.
- 22) Hazen, K.C., Lay, J.G., Hazen, B.W., Fu, R.CH. and Murthy, S., (1990). Partial Biochemical Characterization of Cell Surface Hydrophobicity and Hydrophilicity of *Candida albicans*. Infect. Immun. 58(1): 3469-3476.

23) Sobel, J.D., Meyers, P.G., Kaye, D. and Levison, M.E., (1981). Adherence of *Candida albicans* to Human Vaginal and Buccal Epithelial Cells. J. Infect. Dis. 143: 76-83.

24) Bouali, A., Robert, R., Tronchin, G. and Senet, J.M., (1987). Characterization of Binding of Human Fibrinogen to the Surface of Germ-Tubes and Mycelium of *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 133: 545-551.

25) Edwards, J.E., Gaither, T.A., O'Shea, J.J., Rotrosen, D., Lawley, T.J., Wright, S.A., Frank, M.M. and Green, I., (1986). Expression of Specific Binding Sites on *Candida* With Functional and Antigenic (Characteristics of Human Complement Receptors. J. Immunol. 137(11): 3577-3583.

26) Gilmore, B.J., Retsinas, E.M., Lorenz, J.S. and Hosteter, M.K., (1988). An iC3b Receptor on *Candida albicans*: Structure, Function and Correlates for Pathogenicity. J. Infect. Dis. 157(1): 38-45.

27) Luft, B.J. and Remington, J.S., (1982). Effect of Pregnancy on Resistance to *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* Infections in Mice. Infect. Immun. 38: 1664-1171.

28) Luster, M.I., Hayes, H.T., Kortach, K., Tucker, A.N., Dean, J.H., Greenlee, W.F. and Boorman, G.A., (1984). Estrogen Immunosuppression is Regulated Through Estrogenic Responses in the Thymus. J. Immunol. 133: 110-116.

29) Pung, O.J., Tucker, A.N., Vore, S.J. and Luster, M.I., (1985). Influence of Estrogen on Host Resistance: Increased Susceptibility of Mice to *Listeria monocytogenes* Correlates with Depressed Production of Interleukin 2. Infect. Immun. 50: 91-96.

30) Loose, D.S., Schurman, D.J. and Feldman, D., (1981). A Corticosteroid Binding Protein and Endogenous Ligand in *C. albicans* Indicating a Possible Steroid-Receptor System. Nature. 293: 477-479.

- 31) Loose, D.S. and Feldman, D., (1982).
Characterization of a Unique Corticosterone-Binding
Protein in *Candida albicans*. J. Biol. Chem. 257: 4925-
4930.
- 32) Powell, B.L. and Drutz, D.J., (1983).
Confirmation of Corticosterone and Progesterone Binding
Activity in *Candida albicans*. J. Infect. Dis. 147: 359.
- 33) Malloy, P.J., Zhao, X., Madani, N.D. and Feldman,
D., (1993). Cloning and Expression of the Gene from
Candida albicans that Encodes a High-Affinity
Corticosteroid-Binding Protein. Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. 90:1902-1906.
- 34) Loose, D., Stevens, D.A., Schurman, D.J. and
Feldman, D., (1983). Distribution of a Corticosteroid-
Binding Protein in *Candida* and Other Fungal Genera. J.
Gen. Microbiol. 129:2379-2385.

- 35) Skowronski, R. and Feldman, D., (1989). Characterization of an Estrogen-Binding Protein in the Yeast *Candida albicans*. *Endocrinology*. 124:1965-1972.
- 36) Stover, E.P., Schar, G., Clemons, K.V., Stevens, D.A. and Feldman, D., (1986). Estradiol-Binding Proteins from Mycelial and Yest-Form Cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun.* 51: 199-203.
- 37) Powell, B.L., Drutz, D.J., Huppert, M. and Sun, S.H., (1983). Relationship of Progesterone and Estradiol-binding Proteins in *Coccidioides immitis* to Coccidioidal Disemination in Pregnancy. *Infect. Immun.* 40: 478-485.
- 38) Schar, G., Stover, E.P., Clemons, K.V., Feldman, D. and Stevens, D.A., (1986). Progesterone Binding and Inhibition of Growth in *Trichophyton mentagrophytes*. *Infect. Immun.* 52: 763-767.

39) Feldman, D., Do, Y., Burshell, A., Stathis, P. and Loose, D.S., (1982). An Estrogen-Binding Protein and Endogenous Ligand in *Saccharomyces cerevisiae*: Possible Hormone Receptor System. Science. 218:297-298.

40) Feldman, D., Stathis, P.A., Altivist, M.A., Stover, E.P. and Do, Y.S., (1984). *Saccharomyces cerevisiae* Produces a Yeast Substance that Exhibits Estrogenic Activity in Mammalian Systems. Science. 224:1109-1111

41) Feldman, D., Tokés, L.G., Stathis, P.A., Miller, S.C., Kurz, W. and Harvey, D., (1984). Identification of 17 β -Estradiol as the Estrogenic Substance in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:4722-4726

42) Loose, D.S., Stover, E.P., Restrepo, A., Stevens, D.A. and Feldman, D., (1983). Estradiol Binds to a Receptor-Like Cytosol Binding Protein and Initiates a Biological Response in *Paracoccidioides brasiliensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 7659-7663.

- 43) Restrepo, A., Salazar, M.E., Cano, L.E., Stover, E.P., Feldman, D. and Stevens, D.A., (1984). Estrogens Inhibit Mycelium-to-Yeast Transformation in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for Resistance of Females to Paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 46 (2):346-353.
- 44) Meyer, P. , (1985). Fisiología Humana. Primera Edición. Salvat Editores, Barcelona, España. Págs. 374-382, 389,390,449.
- 45) Greenspan, F.S. and Baxter, J.D. , (1994). Basic and Clinical Endocrinology. Fourth Edition. Appleton and Lange, Editors.
- 46) Barnes, A.C. , (1968). Intra-Uterine Development. Lea and Febiger, Philadelphia.
- 47) Tulchinsky, D., Hobel, C.J., (1973). Plasma Human Chorionic Gonadotropin, Estrona, Estradiol, Estriol, Progesterone and 17- α Hidroxyprogesterone in Human Pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 117(7): 884-893.

48) Boroditsky, R.S., Reyes, F.I., Winter, J.S.D. and Faiman, D., (1975). Serum Human Chorionic Gonadotropin and Progesterone Patterns in the Last Trimester of Pregnancy: Relationship to Fetal Sex. Am J. Obstet. Gynecol. 121(7): 238-241.

49) Cañedo, D.L. , (1987). Investigación Clínica. Nueva Editorial Interamericana, México.

50) Barañao, R.I., Tenenbaun, A. and Rumi, L.S., (1993). Effects of Sexual Steroid Hormones on the functionality of Murine Peritoneal Macrophages. Steroids. 56:481-485.

51) Stryer, L. (1988). Biochemistry. Third Edition. W.A. Freeman and Company, N.Y., p.p767-1003.

A P E N D I C E

Las gráficas presentes en esta sección se elaboraron en base a los resultados de las tablas 1 a 10.

Los resultados de las tablas 1 a 6 se representan en forma de regresiones. A diferencia de éstas, en donde cada tratamiento tiene su respectivo control, se graficó un solo control cuyos datos se obtuvieron a partir de la media aritmética de todos los controles en el tiempo respectivo (V.G.: La media aritmética de los controles a la hora de incubación en las concentraciones de 0.3, 5 y 10 ng/ml de 17β -estradiol).

Los resultados de las tablas 7 a 10 se representan en forma de histogramas. En éstos puede verse que cada una de las concentraciones de progesterona o 17β -estradiol consta de cuatro barras , las cuales representan el porcentaje de filamentación a la 1, 2, 3 y 4h de incubación.

Gráfica # 1: Efecto de la hormona 17β -estradiol (ng/ml) sobre el % de filamentación de *Candida albicans*, cepa C-17: Al igual que en la tabla #1, se observa que el menor porcentaje de filamentación se presentó en la concentración de 10ng, en tanto que en las concentraciones de 0.3 y 5ng, éste fue mayor que en el control.

Gráfica # 2: Efecto de la hormona 17β -estradiol (ng/ml) sobre el % de filamentación de *Candida albicans*, cepa D-566: El efecto del 17β -estradiol sobre esta cepa es semejante al de la cepa C-17, ya que en las concentraciones de 0.3 y 5ng el porcentaje de filamentación fue mayor que en el control, en tanto que en la concentración de 10ng éste fue menor.

Gráfica # 3: Efecto de la hormona progesterona (ng/ml) sobre el % de filamentación de *Candida albicans*, cepa C-17. Un porcentaje de filamentación menor que en el control se observó en la concentración de 130ng. En las concentraciones de 30 y 80ng de progesterona la producción de tubos germinativos fue

mayor a las 2 y 3h de incubación, sin embargo a las 4h no hubo diferencias con el control. El mayor porcentaje de filamentación se observó en la concentración de 10 ng.

Gráfica # 4: Efecto de la hormona progesterona (ng/ml) sobre el % de filamentación de *Candida albicans*, cepa C-17 (preincubación). En este caso *C. albicans* se preincubó a 28°C/18h en presencia de progesterona. A las 4h de incubación a 40°C, se observó que el porcentaje de filamentación fue semejante al control en las concentraciones de 10, 30 y 80ng, mientras que el menor porcentaje de tubos germinativos se presentó también en la concentración de 130ng.

Gráfica # 5: Efecto de la hormona progesterona (ng/ml) sobre el % de filamentación de *Candida albicans*, cepa D-566. El efecto de progesterona sobre esta cepa es diferente al de la cepa C-17, ya que el menor porcentaje de filamentación se observó en la concentración de 10ng, mientras el mayor se presentó en

80ng/ml de progesterona. No hubo diferencias con respecto al control a las 4h de incubación en las concentraciones de 30 y 130ng.

Gráfica # 6: Efecto de la hormona progesterona (ng/ml) sobre el % de filamentación de *Candida albicans*, cepa D-566. El comportamiento de *C. albicans* fue diferente cuando se preincubó a 28°C/18h en presencia de progesterona . Si bien el mayor y menor porcentajes de filamentación se observan en las concentraciones de 80 y 10 ng respectivamente, también se observó que la producción de tubos germinativos fue menor que la del control en las concentraciones de 30 y 130 ng.

Gráfica #7: Comparación del % de filamentación entre los tratamientos B y C con progesterona de la cepa D-566 de *Candida albicans*. Puede observarse que en tres de las cuatro concentraciones de progesterona (10, 30 y 130ng) el porcentaje de filamentación fue mayor en el tratamiento B. En la concentración de 80ng la producción de tubos germinativos fue mayor en el tratamiento C.

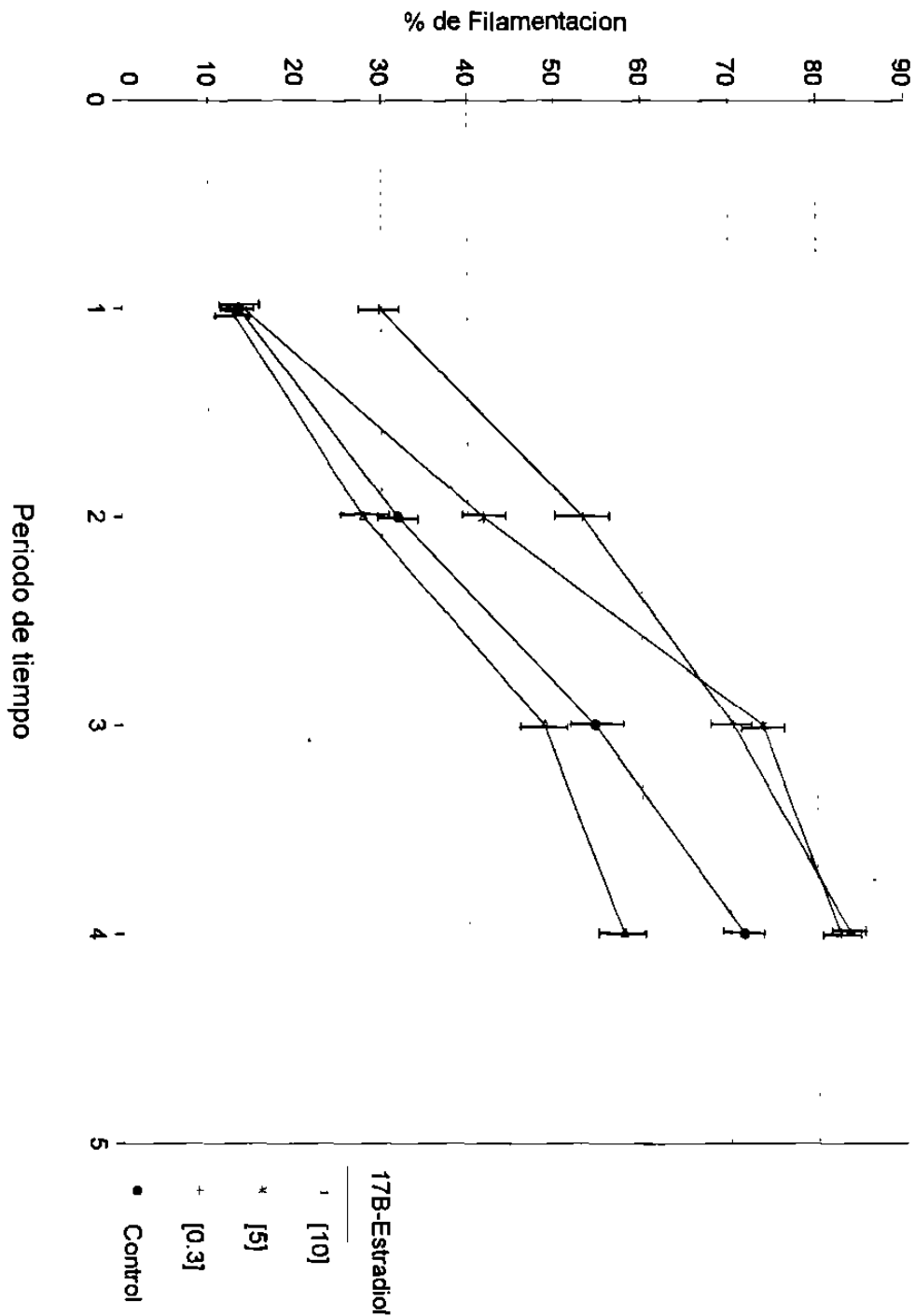
Gráfica # 8: Comparación del % de filamentación entre las cepas D-566 y C-17 de *Candida albicans* en presencia de 17β -estradiol. En presencia de esta hormona, la cepa C-17 produjo en general un mayor porcentaje de tubos germinativos que la cepa D-566.

Gráfica # 9: Comparación del % de filamentación entre las cepas D-566 y C-17 de *Candida albicans* en presencia de progesterona. En las concentraciones de 30, 80 y 130ng, el porcentaje de filamentación de la cepa D-566 fue mayor que el de la cepa C-17 sin embargo, en la concentración de 10ng/ml de progesterona, la cepa C-17 produjo una mayor cantidad de tubos germinativos.

Gráfica # 10: Comparación del % de filamentación entre las cepas D-566 y C-17 de *Candida albicans* cuando son preincubadas en progesterona. En general, el porcentaje de filamentación también fue mayor en la cepa C-17 sin embargo, el grado de significancia estadística al comparar ambas cepas, fue diferente

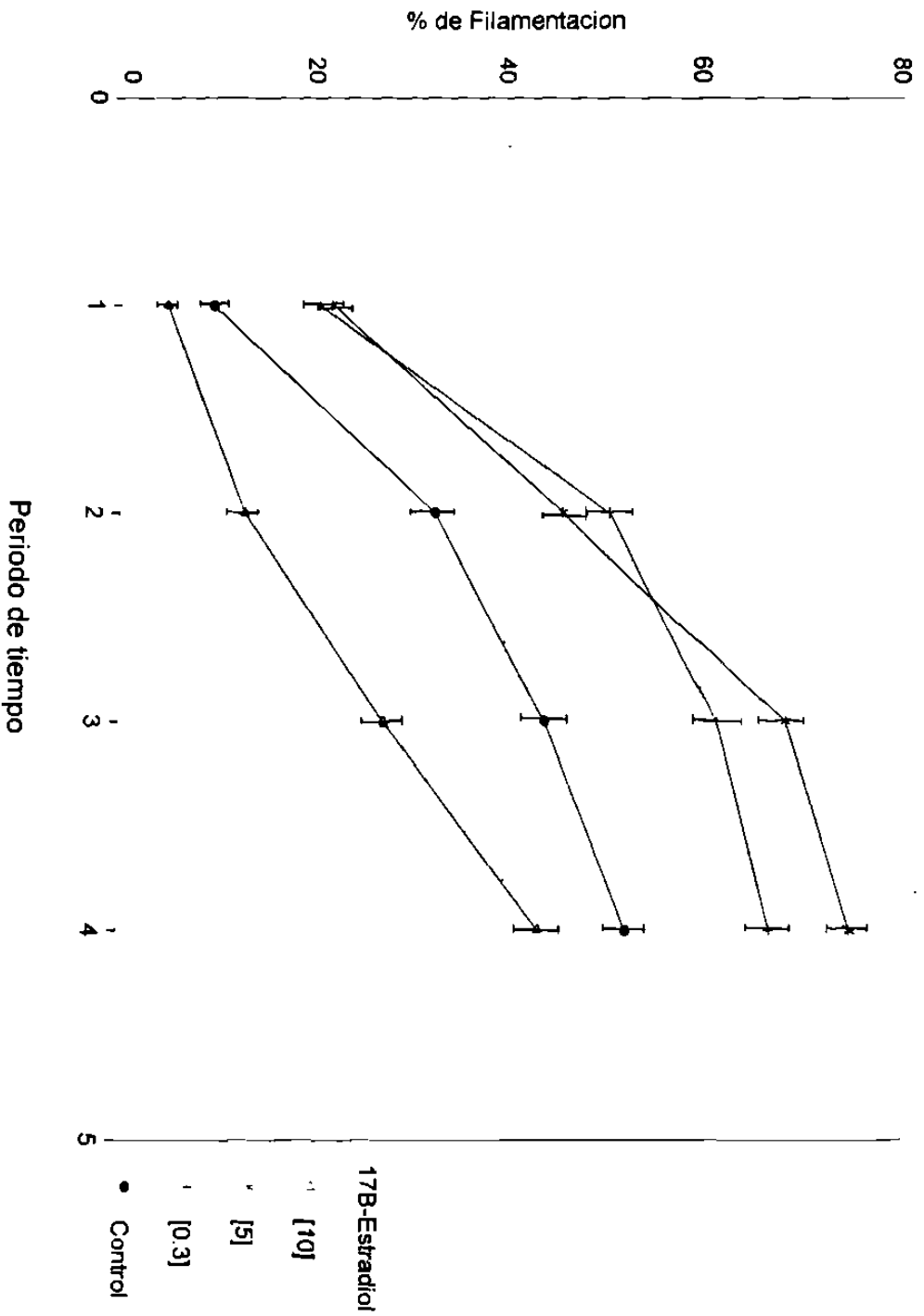
cuando se preincubó en presencia de la hormona (ver
tablas 9 y 10).

Grafica 1. Efecto de la hormona 17B-Estradiol (ng/ml) sobre el % de Filamentacion de Candida albicans, cepa C17.

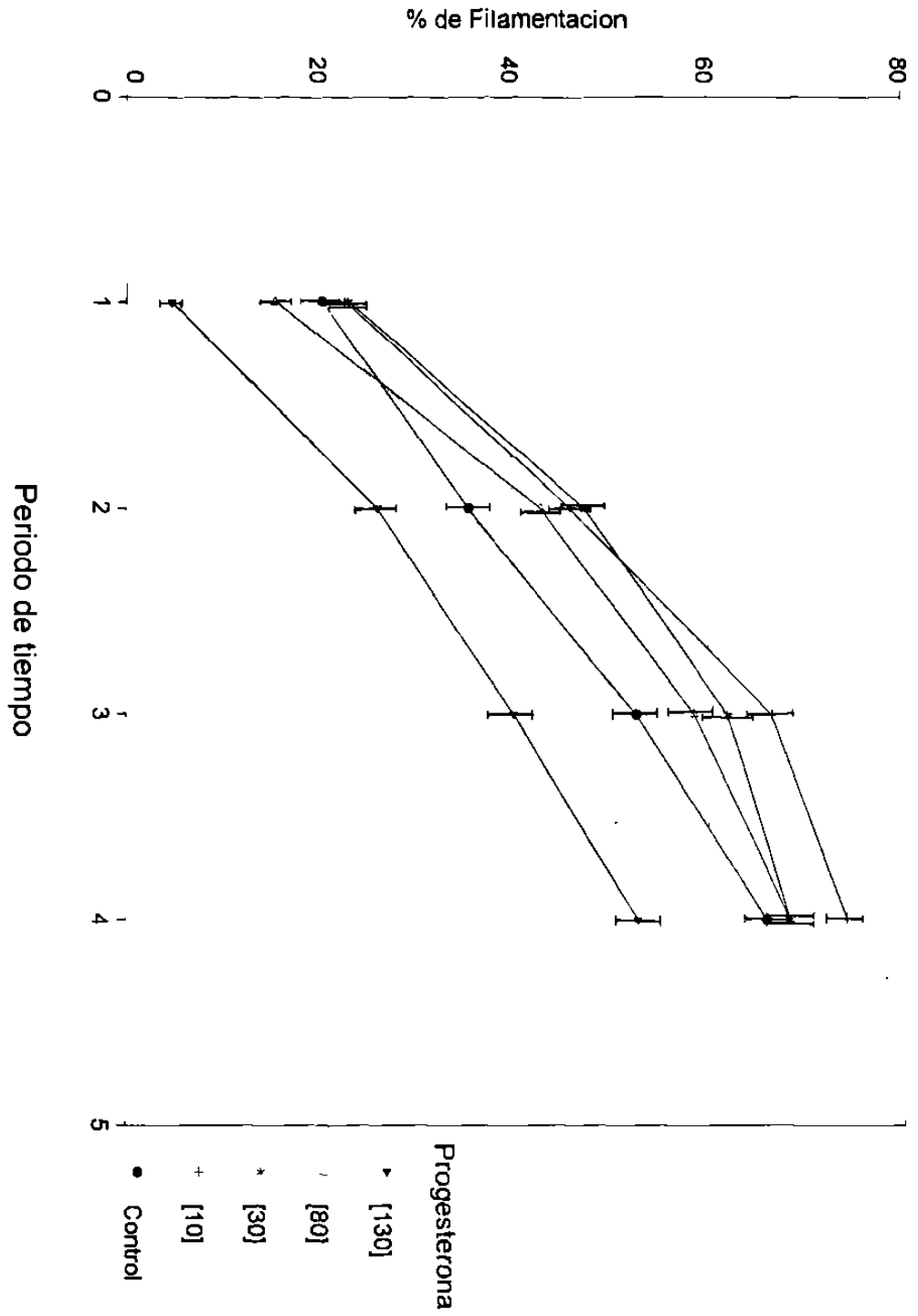


Grafica 2. Efecto de la hormona 17 β -Estradiol (ng/ml) sobre el

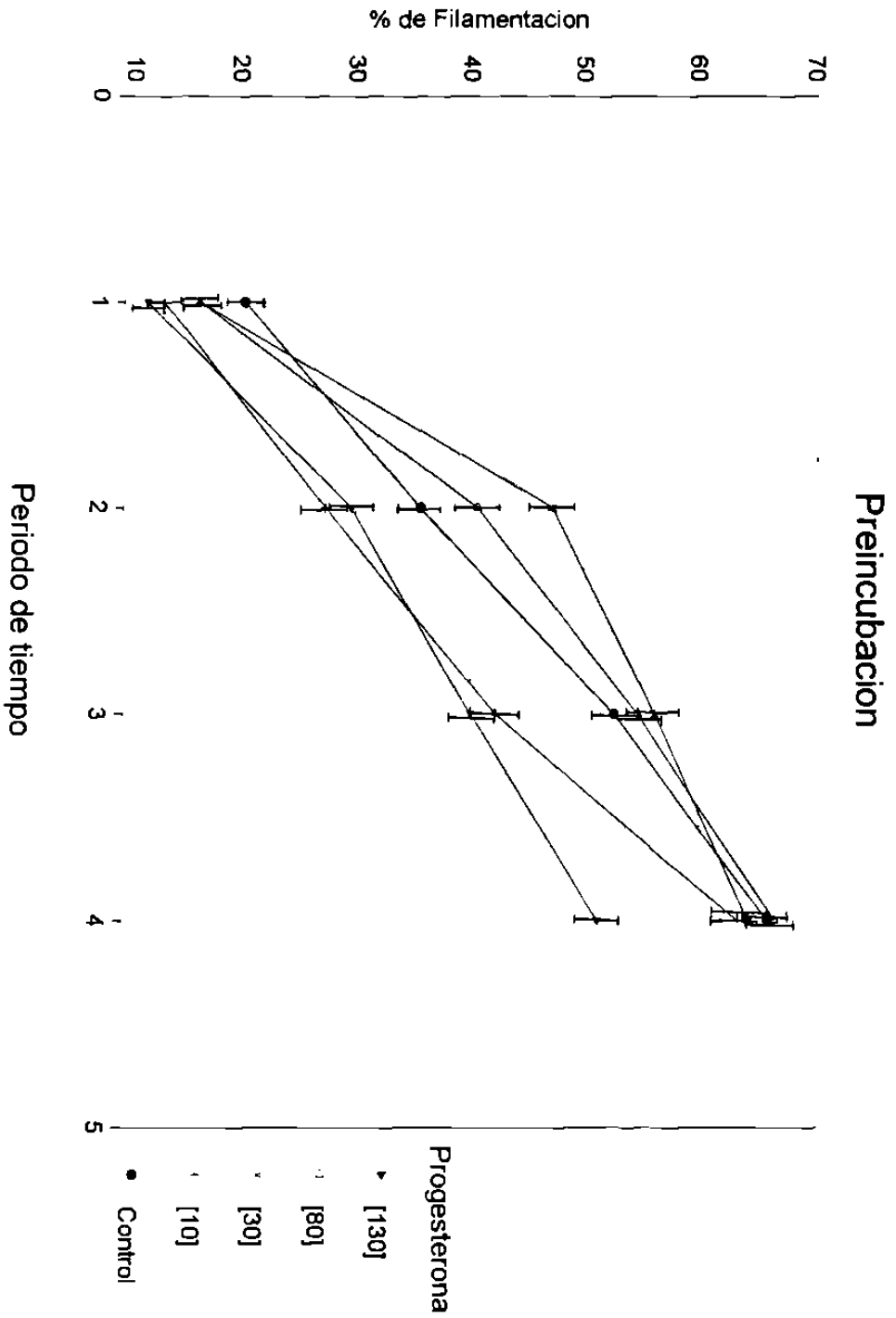
% de Filamentacion de *Candida albicans*, cepa D566.



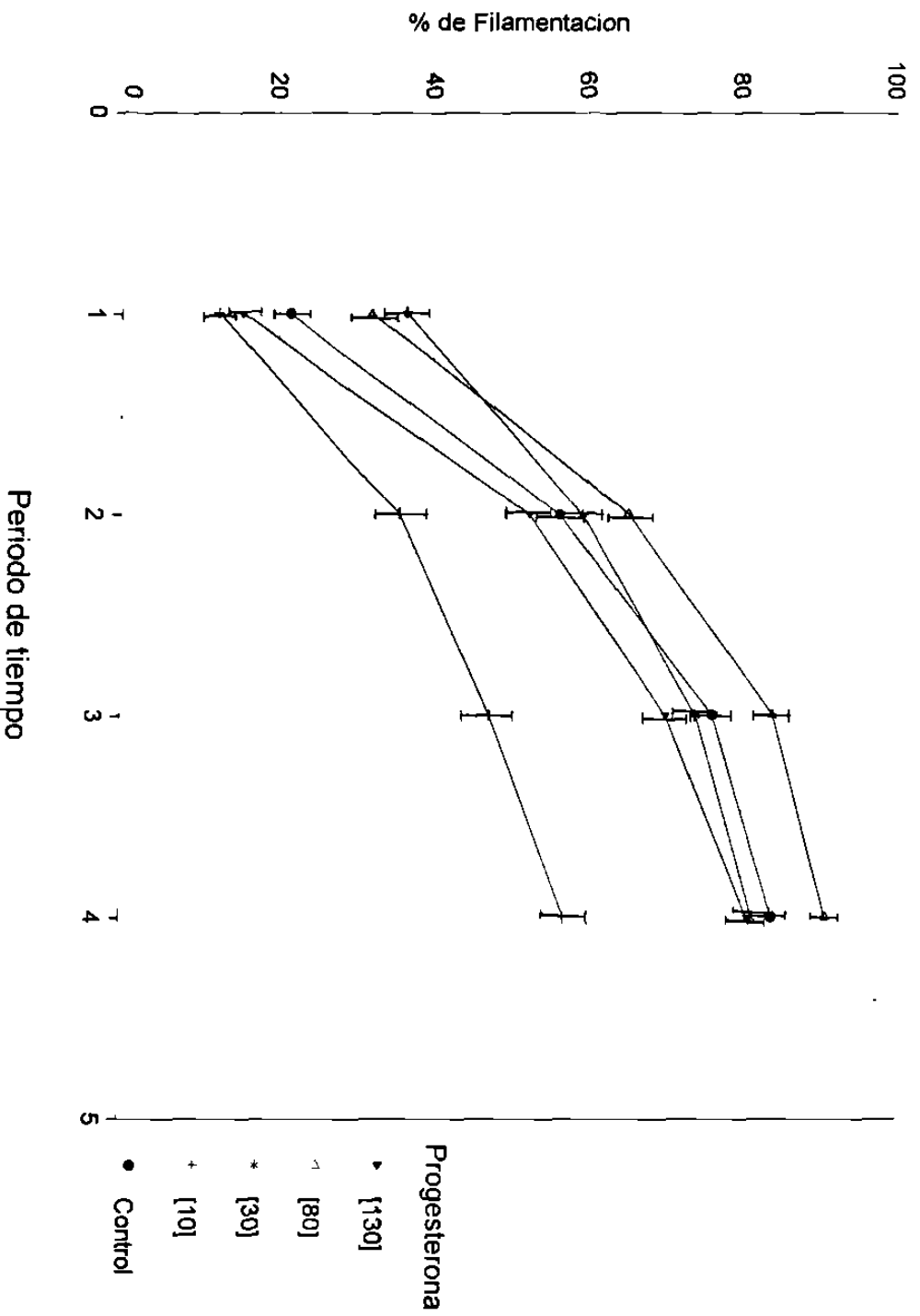
Grafica 3. Efecto de la hormona Progesterona (ng/ml) sobre el % de Filamentacion de Candida albicans, cepa C17.



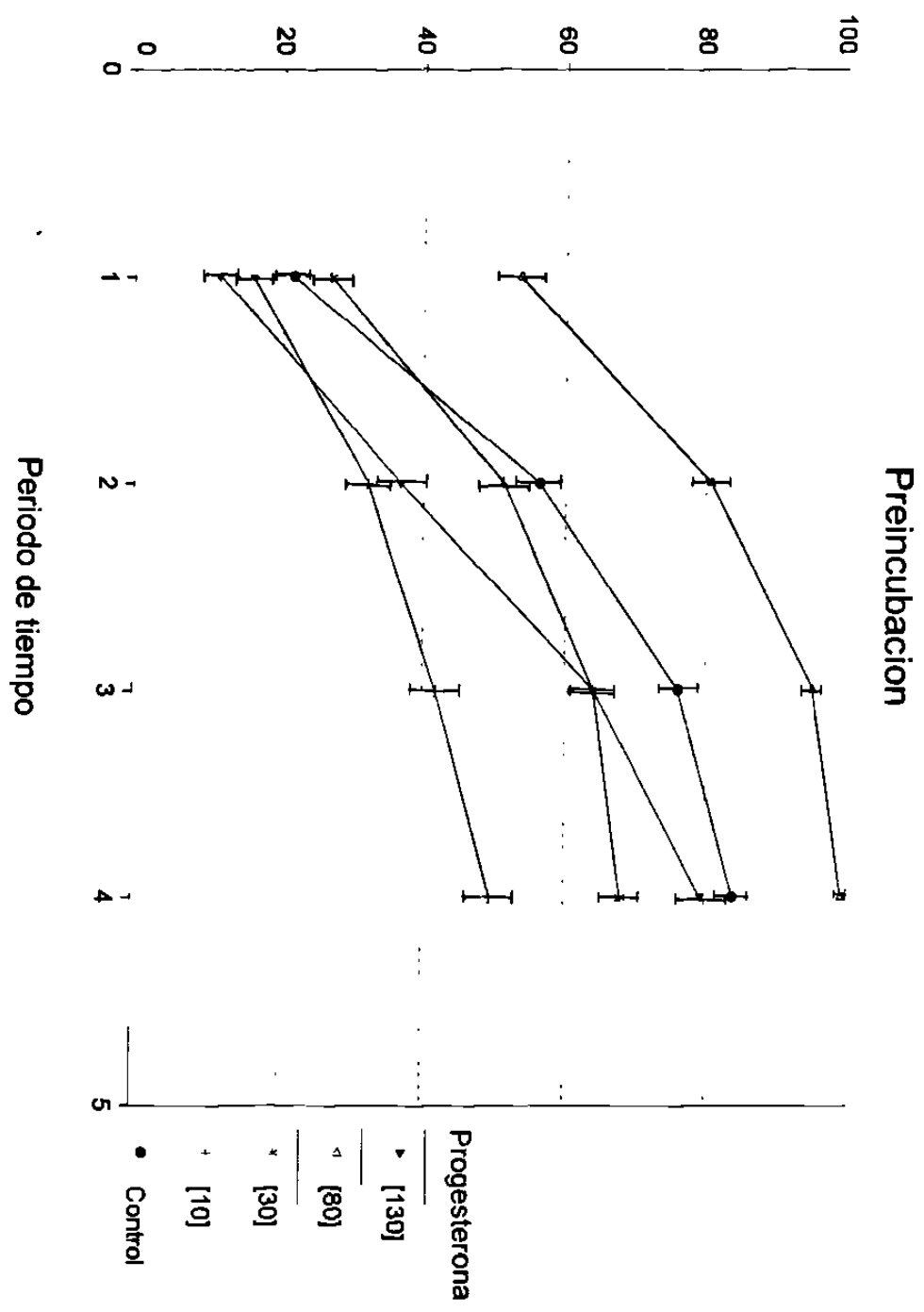
% de Filamentacion de Candida albicans, cepa C17.



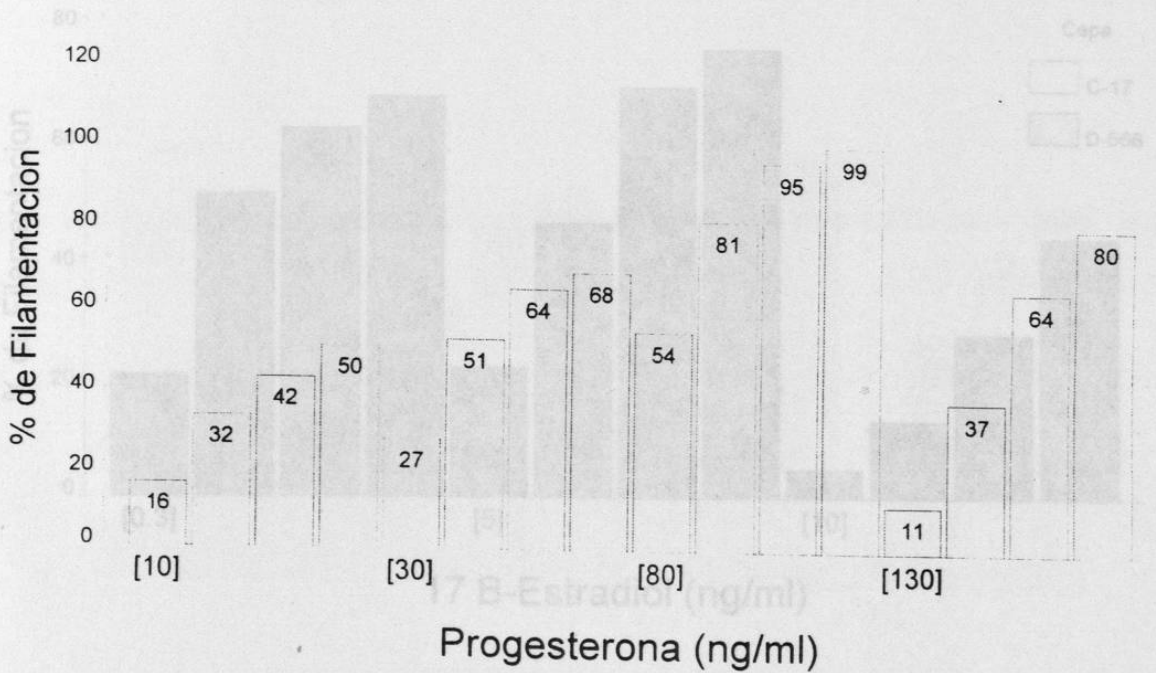
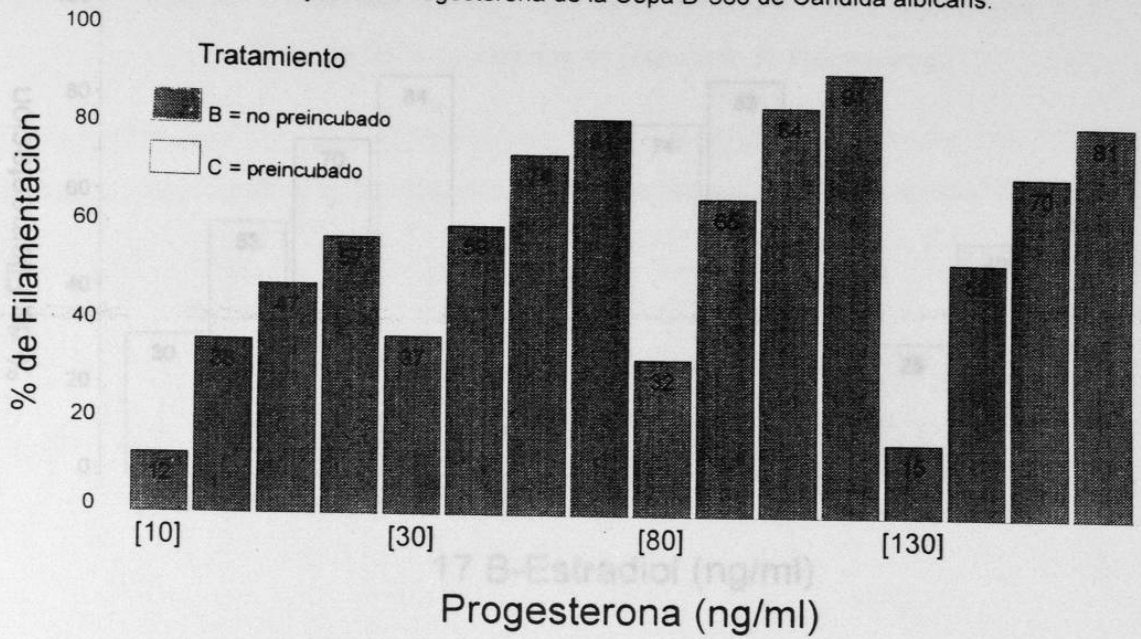
% de Filamentacion de Candida albicans, cepa D566.



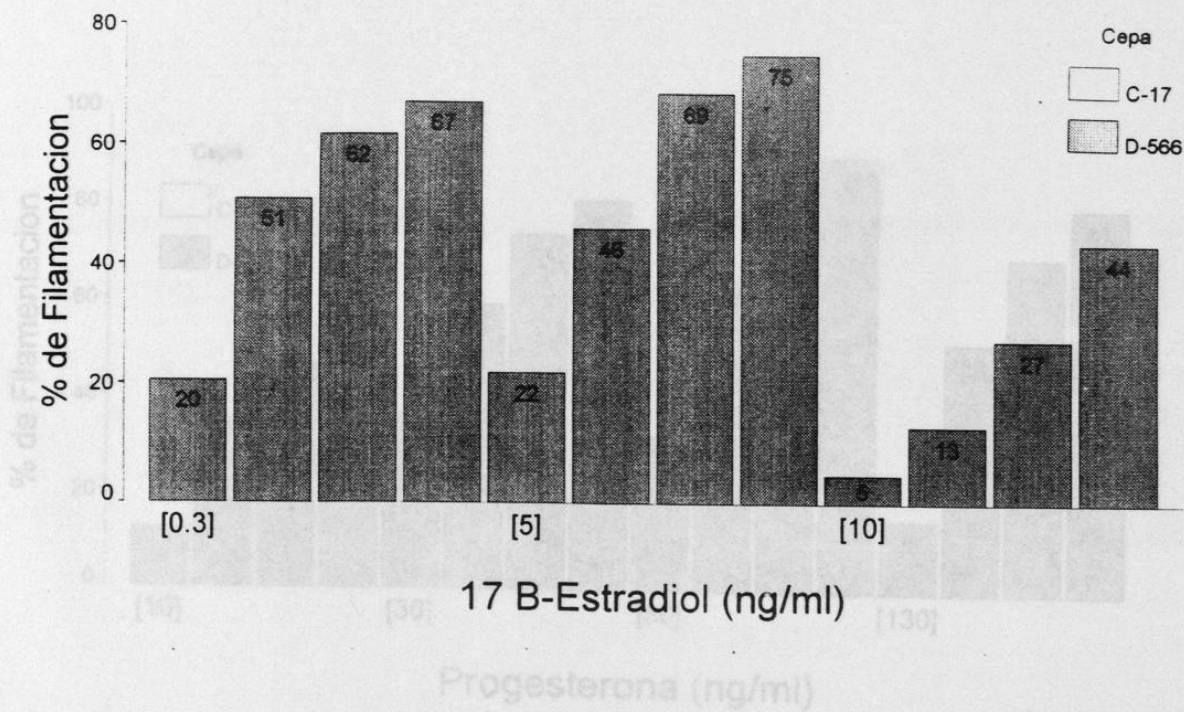
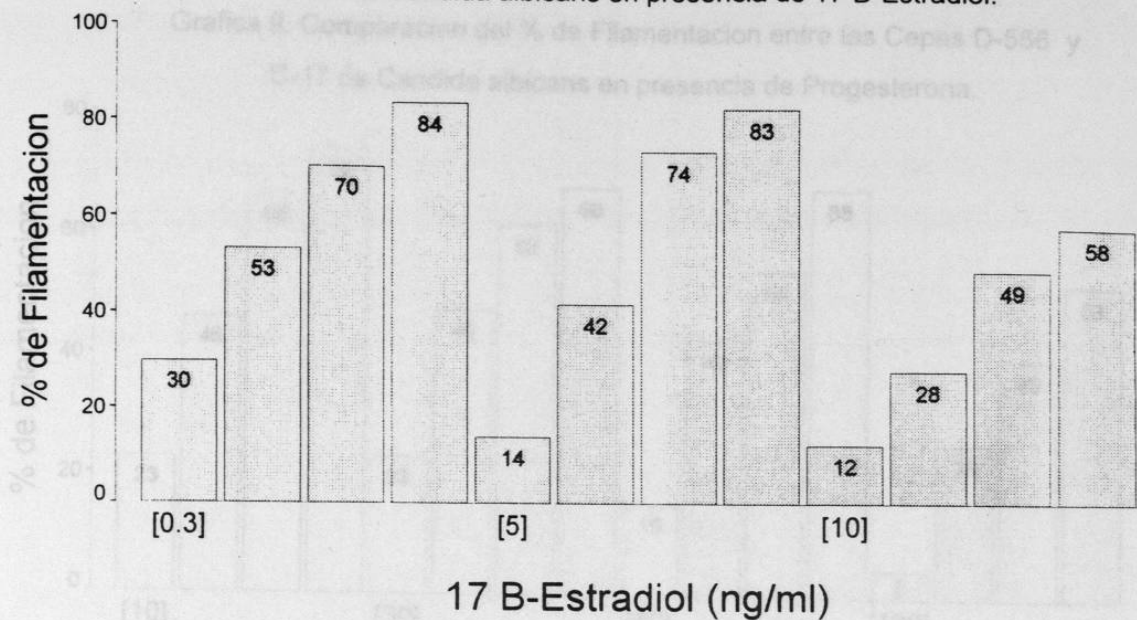
Grafica 6. Efecto de la hormona Progesterona (ng/ml) sobre el % de Filamentacion de Candida albicans, cepa D566.



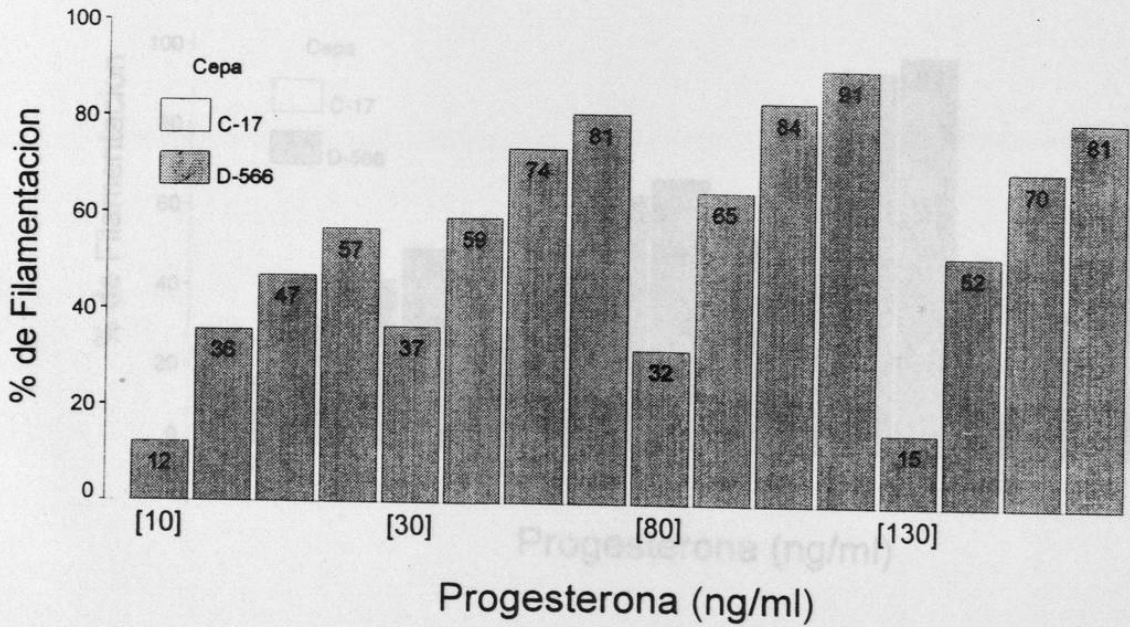
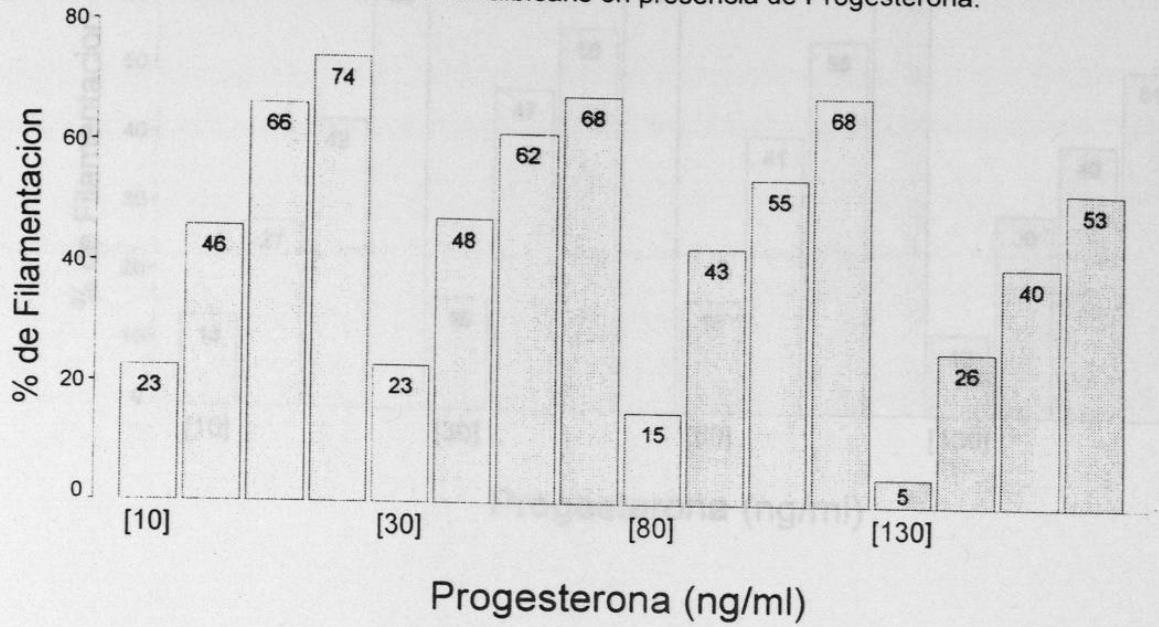
Grafica 7. Comparacion del % de Filamentacion entre los tratamientos B y C con Progesterona de la Cepa D-566 de *Candida albicans*.



Grafica 8. Comparacion del % de Filamentacion entre las Cepas D-566 y C-17 de *Candida albicans* en presencia de 17 B-Estradiol.



Grafica 9. Comparacion del % de Filamentacion entre las Cepas D-566 y C-17 de Candida albicans en presencia de Progesterona.



Grafica 10. Comparacion del % de Filamentacion entre las Cepas D-566 y C-17 de Candida albicans cuando son preincubadas en Progesterona.

