

---

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III

**EFECTO POSTANTIFUNGICO Y  
ACTIVIDAD FAGOCITICA DE  
LEUCOCITOS SOBRE *CANDIDA*  
*ALBICANS* TRATADA  
PREVIAMENTE CON VARIOS  
ANTIFUNGICOS**



\* 5 3 0 9 5 4 1 6 8 8 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TESIS DOCTORAL

MARIO LOZANO CHIU

MADRID, SEPTIEMBRE 1994

---

D. FERNANDO MINGUEZ MINGUEZ, Profesor Titular del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

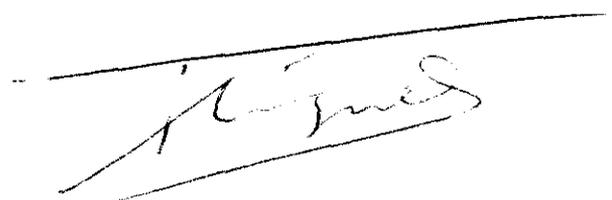
CERTIFICA

Que el presente trabajo de investigación, titulado **EFFECTO POSTANTIFUNGICO Y ACTIVIDAD FAGOCITICA DE LEUCOCITOS SOBRE CANDIDA ALBICANS TRATADA PREVIAMENTE CON VARIOS ANTIFUNGICOS**, constituye la memoria presentada por D. Mario Lozano Chiu para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, y ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid, Septiembre de 1994.



Fdo. Mario Lozano Chiu



Fdo. Fernando Mínguez Mínguez

I

## AGRADECIMIENTOS

## II

En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. D. José Prieto Prieto, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, quien me animó en la realización de este trabajo y que ha puesto a mi disposición todos los medios necesarios para llevarlo a cabo.

Al Prof. Dr. Fernando Mínguez Mínguez, director de este trabajo.

A Fernando Gaviria y Ricardo Ñique García por introducirme en el apasionante mundo de la Microbiología.

A Pedro Bas y Yolanda, por la ayuda dentro del laboratorio y fuera de él.

A Luis y Eva, quienes me han apoyado en todo momento, incluso en los momentos más negros, y al resto de los compañeros del Departamento, especialmente la Prof. Dra. María Luisa Gómez-Lus Centelles.

A José María del Olmo, Tutti, Alfonso Lugo, Mimí, Emilio y Mamen, Paco Mateo y Mari, Clemente y María, Antonio y Lola, Sara, Ana, Silvia, Nico y Selva, Pablo, Ariel, Julián, Cristina, Teresa, Cristina, Rafa, Angel, Manolo "El Marqués"... y especialmente a **LOS DE AYER** por este Verano, a los Grandes Clásicos y a todos aquellos que han estado siempre apoyándome.

A **Mamen**, por su entrega, paciencia, dedicación y abnegado apoyo.

Este trabajo está especialmente dedicado a **MOM** y **CHIBI**.

**INDICE GENERAL**

## IV

<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b> . . . . .	1
<b>INDICE DE FIGURAS</b> . . . . .	3
<b>INTRODUCCION</b> . . . . .	5
1. Introducción al sistema inmunitario . . . . .	6
2. Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) . . . . .	7
· 2.1. Origen . . . . .	7
· 2.2. Producción y características . . . . .	7
· 2.3. Funciones . . . . .	9
2.3.1. Migración . . . . .	9
2.3.2. Quimiotaxis . . . . .	10
2.3.3. Fagocitosis . . . . .	12
2.3.4. Acontecimientos postfagocíticos . . . . .	12
2.3.5. Mecanismos microbicidas . . . . .	13
3. <i>Candida albicans</i> . . . . .	18
· 3.1. Biología . . . . .	18
· 3.2. Pleomorfismo . . . . .	18
· 3.3. Patogenicidad . . . . .	19
3.3.1. Factores de virulencia . . . . .	19
3.3.2. Mecanismos de defensa del hospedador . . . . .	22
3.3.3. Switching . . . . .	23
4. Interacciones entre quimioterápicos, microorganismos y células fagocíticas . . . . .	26
· 4.1 Inducción de neutropenia . . . . .	26
· 4.2. Penetración de los quimioterápicos al medio intraleucocitario y actividad intracelular . . . . .	28
· 4.3. Interacción de los quimioterápicos con la actividad funcional de las células fagocíticas . . . . .	28
4.3.1. Quimiotaxis . . . . .	30
4.3.2. Fagocitosis . . . . .	30
4.3.3. Actividad microbicida y metabolismo neutrófilo . . . . .	30

. 4.4. Efecto de los quimioterápicos en las interacciones leucocito-microbio:	
Efectos PAE, PAFE, PALE . . . . .	31
4.4.1. Efecto PAE. Efecto PAFE . . . . .	31
4.4.2. Actividades antifúngica y antibacteriana de quimioterápicos durante las fases PAE y PAFE	33
4.4.3. Sensibilidades bacteriana y fúngica a los mecanismos microbicidas del suero . . . . .	33
4.4.4. El Efecto PALE . . . . .	34
5. Estructura y función de los quimioterápicos . . . . .	39
. 5.1. Anfotericina B . . . . .	39
. 5.2. Ketoconazol . . . . .	42
. 5.3. Fluconazol . . . . .	45
. 5.4. 5-Fluorocitosina . . . . .	48
<b>PROPOSITO DEL TRABAJO . . . . .</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALES . . . . .</b>	<b>54</b>
Aparatos . . . . .	55
Material . . . . .	55
Reactivos y productos . . . . .	56
<b>METODOS . . . . .</b>	<b>57</b>
<b>METODOS I . . . . .</b>	<b>58</b>
Preparación del medio de cultivo para PMN (HBSS) . . . . .	58
Preparación del medio de cultivo para <i>Candida albicans</i> . . . . .	59
Preparación de los quimioterápicos . . . . .	59
<b>METODOS II . . . . .</b>	<b>61</b>
Obtención de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos . . . . .	61
Microorganismos . . . . .	61
Ajuste de microorganismos mediante espectrofotometría . . . . .	61
Determinación de CMI, IC-50 e IC-25 para <i>Candida albicans</i> . . . . .	63
Valoración de la susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> previamente tratadas frente a los mecanismos microbicidas de los PMN . . . . .	64

Estudio del Efecto Postantifúngico de los quimioterápicos sobre <i>Candida albicans</i> en presencia o ausencia de suero . . . . .	66
Fotografías . . . . .	68
Análisis estadístico . . . . .	70
<b>RESULTADOS</b> . . . . .	71
CMI para <i>Candida albicans</i> . . . . .	72
IC-50 e IC-25 para <i>C. albicans</i> . . . . .	72
Valoración del PAFE inducido por anfotericina B . . . . .	73
Valoración del PAFE inducido por ketoconazol . . . . .	73
Valoración del PAFE inducido por fluconazol . . . . .	73
Valoración del PAFE inducido por 5-fluorocitosina . . . . .	74
Efecto de bajas concentraciones sobre <i>Candida albicans</i> en fase PAFE	74
Efecto del tratamiento quimioterápico sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i> . . . . .	74
Efecto fungicida de PMN sobre <i>Candida albicans</i> pretratada con anfotericina B . . . . .	75
Efecto fungicida de PMN sobre <i>Candida albicans</i> pretratada con ketoconazol . . . . .	75
Efecto fungicida de PMN sobre <i>Candida albicans</i> pretratada con fluconazol . . . . .	75
Efecto fungicida de PMN sobre <i>Candida albicans</i> pretratada con 5-fluorocitosina . . . . .	75
<b>TABLAS Y GRAFICAS</b> . . . . .	76
<b>DISCUSION</b> . . . . .	101
<b>CONCLUSIONES</b> . . . . .	125
<b>BIBLIOGRAFIA</b> . . . . .	127

**GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

<b>ATCC</b>	<b>American Type Culture Collection</b>
<b>bYNB-gl</b>	<b>Yeast Nitrogen Base glucosado y tamponado</b>
<b>CMB</b>	<b>Concentración Máxima Bactericida</b>
<b>CMI</b>	<b>Concentración Mínima Inhibitoria</b>
<b>HBSS</b>	<b>Solución Salina Tamponada de Hank</b>
<b>IC-25</b>	<b>Concentración mínima que inhibe el 25% de la población</b>
<b>IC-50</b>	<b>Concentración mínima que inhibe el 50% de la población</b>
<b>Ig</b>	<b>Inmunoglobulina</b>
<b>MPO</b>	<b>Mieloperoxidasa</b>
<b>PAE</b>	<b>Efecto Postantibiótico</b>
<b>PAFE</b>	<b>Efecto Postantifúngico</b>
<b>PALE</b>	<b>PostAntibiotic Leukocyte Enhancement</b>
<b>PBP</b>	<b>Proteínas Fijadoras de penicilinas</b>
<b>PMN</b>	<b>Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos</b>
<b>SOD</b>	<b>Superóxido Dismutasa</b>
<b>TC</b>	<b>Medio de cultivo de tejidos</b>
<b>UFC</b>	<b>Unidades Formadoras de Colonias</b>

**INDICE DE FIGURAS**

FIGURA 1. FUNCIONES DE LOS PMN . . . . .	11
FIGURA 2. MECANISMOS MICROBICIDAS MPO DEPENDIENTES . . .	16
FIGURA 3. MECANISMOS MICROBICIDAS MPO INDEPENDIENTES .	17
FIGURA 4. TRIANGULO DE DAVIS . . . . .	27
FIGURA 5. INTERACCIONES LEUCOCITO-QUIMIOTERAPICO . . . . .	38
FIGURA 6. ANFOTERICINA B . . . . .	40
FIGURA 7. KETOCONAZOL . . . . .	42
FIGURA 8. FLUCONAZOL . . . . .	45
FIGURA 9. FLUCITOSINA . . . . .	48
FIGURA 10. OBTENCION DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS . . . . .	62
FIGURA 11. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA TECNICA EMPLEADA PARA LOS ESTUDIOS DE CRECIMIENTO Y MUERTE INTRACELULAR DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> TRATADA PREVIAMENTE CON QUIMIOTERAPICOS, EN PRESENCIA DE SUERO O SUERO Y PMN . . . . .	65
CUADRO 1. EFECTO DIRECTO DE LOS QUIMIOTERAPICOS SOBRE LAS CELULAS FAGOCITICAS . . . . .	29

**INTRODUCCION**

## 1. INTRODUCCION AL SISTEMA INMUNITARIO

Las células fagocíticas son muy importantes en la defensa de los seres vivos frente a lo que les es extraño. Esta acción protectora se ve reforzada por el resto de los sistemas de defensa que junto a las primeras, constituyen el sistema inmunológico: las inmunidades específica e inespecífica.

A) La inmunidad inespecífica o innata, se compone de las barreras naturales, los factores celulares y los humorales.

a) Las barreras naturales están formadas por el revestimiento mucocutáneo que impide la penetración del antígeno, siendo el antagonismo microbiano un factor fundamental para el mantenimiento de un equilibrio ecológico de microorganismos en la superficie corporal.

b) Los factores humorales son de localización variada; unos se encuentran en la piel (como los ácidos grasos saturados), otros en las lágrimas, saliva y secreciones nasales (como la lisozima) y otros en el suero (como los sistemas del complemento y de la properdina y ciertas proteínas básicas).

c) Los factores celulares proceden de células pluripotenciales a través de dos líneas principales de diferenciación:

- la línea linfoide, que dará lugar a los linfocitos.
- la línea mieloide, precursora de las células fagocíticas.

Las células fagocíticas comprenden dos clases básicas: los monocitos y macrófagos históricos y los leucocitos polimorfonucleares, que según la tinción histológica de sus gránulos se dividen a su vez en neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Todas ellas son capaces de migrar hacia el lugar del foco infeccioso, reconocer al agente causal, unirse a él, fagocitarlo y destruirlo.

B) La inmunidad específica o adaptativa, surge tras la interacción entre el agente reconocido como extraño y el sistema inmune. Existen dos tipos de inmunidad específica (Letonturier, 1981):

- a) Inmunidad mediada por células, dependiente de los linfocitos T.
- b) Inmunidad humoral, dependiente de los anticuerpos producidos por los linfocitos B.

## 2. LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS

### 2.1. Origen.

Hace aproximadamente un siglo, Paul Ehrlich sentó las bases de la inmunidad inespecífica al describir la existencia de tres tipos de células fagocíticas en la sangre: los neutrófilos, los eosinófilos y los monocitos, pero fue Elie Metchnikoff quien delimitó poco más tarde sus funciones al observar que durante la respuesta inflamatoria los leucocitos ingerían microorganismos mediante el proceso que denominó fagocitosis. Existen dos tipos de fagocitos: los leucocitos polimorfonucleares (PMN), que son células circulantes que emigran a los sitios de inflamación y los fagocitos mononucleares, que circulan por la sangre o bien se encuentran fijos en los tejidos y que también se acumulan en los lugares de inflamación. De ahora en adelante nos dedicaremos a los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos exclusivamente.

### 2.2. Producción y características.

La médula ósea es el sitio de producción de los polimorfos y su desarrollo se puede dividir en dos etapas (Bainton, 1977): una primera fase proliferativa o mitótica seguida de una segunda fase de maduración. En la primera fase, de aproximadamente 7 días de duración, células madre pluripotenciales sufren una serie de divisiones y de sucesos morfológicos que dan como resultado la formación de metamielocitos. La fase de maduración, cuya duración media es de 6 días, se caracteriza por cambios nucleares y citoplásmicos que transformarán al metamielocito en PMN morfológicamente maduro (Zakhireh, 1979). Durante el desarrollo el PMN adquiere dos poblaciones de gránulos mayoritarias; los gránulos primarios (azurofílicos) aparecen durante el primer período mitótico y contienen mieloperoxidasa, hidrolasas ácidas, lisozima, proteínas catiónicas y proteasas neutras -entre las que se incluye elastasa-. Estos gránulos primarios se van a fusionar con el fagosoma tras la fagocitosis, dotando de esta forma al PMN de

actividad microbicida localizada. Los gránulos secundarios (específicos) se forman durante el período de maduración y contienen lactoferrina, lisozima, proteína enlazante de vitamina B<sub>12</sub>, citocromo b, colagenasa y ciertas moléculas receptoras (Sawyer, 1989). Se cree que estos gránulos específicos, cuyo contenido es vertido prácticamente en su totalidad al exterior de la célula, participan en una función reguladora de la respuesta inmune específica (Weissmann, 1980).

Recientemente se han identificado gránulos terciarios en los PMN; estos gránulos contienen gelatinasa, citocromo b y el receptor glicoproteico MAC-1, el cual ha sido clasificado como un importante mediador en la adherencia de estas células (Sawyer, 1989).

Los PMN circulantes representan un 5% del total corporal y cerca de la mitad de la población intravascular de los PMN no son circulantes, sino que están adheridos al endotelio de pequeños vasos en un fenómeno llamado marginación.

Tras permanecer en el torrente sanguíneo durante la mitad de su vida, los PMN entran a los tejidos en donde permanecen funcionales durante uno o dos días. Los PMN senescentes o incapacitados para ejercer su función adecuadamente son eliminados por macrófagos esplénicos o excretados vía superficies mucosas (Sawyer, 1989).

La característica más llamativa de la granulopoyesis es su enorme potencial de recambio ya que se ha demostrado que la producción diaria media de neutrófilos en un hombre de 70 kilogramos es aproximadamente de  $1 \times 10^{11}$ , la cual puede multiplicarse por un factor de al menos 5 veces durante una infección bacteriana (Cartwright, 1964).

Un incremento en el número total y en el porcentaje de PMN circulantes también se puede inducir mediante la liberación de subproductos bacterianos como las endotoxinas y los esteroides. Este incremento se lleva a cabo mediante el aumento de producción a cargo de la médula ósea, por una rápida liberación de las células producidas al torrente circulatorio y por la desmarginación (Bishop, 1968).

Existen además diversos factores que alteran el número de PMN; un mecanismo que aumenta la producción de la médula ósea actúa a través del componente C<sub>3e</sub> del sistema del complemento (Ghebrehiwet, 1979). También

participan unos factores solubles derivados de los linfocitos T (por ejemplo el GM-SCF o factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos), que estimulan a las células madre de las líneas de eritrocitos, megacariocitos, eosinófilos, PMN y macrófagos (Platzer, 1985). El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) probablemente gobierna la tasa y el porcentaje de granulocitos que emergen de la médula ósea. La interleucina 1 (IL-1), también conocida como pirógeno endógeno, produce neutrofilia tras inyección intravenosa (Kampschmidt, 1980).

También existen factores que disminuyen el número de PMN por supresión de la actividad de la médula ósea, por destrucción periférica, por secuestro celular o por aumento de la adherencia. Un ejemplo de este último caso lo constituye la activación generalizada de la proteína C<sub>5</sub> del complemento, lo cual provoca un aumento en la adherencia y unión de los PMN al endotelio capilar. Las citocinas también modulan la interacción del PMN con células endoteliales: la interleucina 1 estimula la adhesión leucocito-célula endotelial y parece estar relacionada con la expresión de una proteína de superficie sintetizada "de novo" (Pober, 1986).

### 2.3. Funciones.

La función de la célula fagocítica en la defensa del hospedador contra los microbios depende de los siguientes pasos (Zakhireh, 1979) (Fig 1): migración de los fagocitos sanguíneos al interior de los tejidos y establecimiento de contacto con los microbios invasores, fagocitosis, y acontecimientos postfagocíticos que conducen a la muerte intracelular y digestión de los microbios.

#### 2.3.1. Migración de los neutrófilos al interior de los tejidos.

La secuencia de sucesos en la migración de los neutrófilos comienza con la adherencia de la célula al endotelio vascular, especialmente a las vénulas postcapilares (Wilkinson, 1974). La adhesividad de los neutrófilos a las superficies es un proceso activo y está regulado por factores humorales no identificados completamente (MacGregor, 1976) aunque sí se conocen ciertas glicoproteínas de la superficie celular que la aumentan, permitiendo a los leucocitos unirse a una gran cantidad de dianas, especialmente cuando están activados (Crowley, 1980),

(Arnout, 1982), (Harlan, 1985).

El receptor MAC-1, también llamado MO-1 y OKM-1, se encuentra en PMN y también en monocitos, células NK y en algunos linfocitos; esta molécula funciona como el receptor de  $C_3b_i$  ( $CR_3$ ) (Dana, 1984).

Aunque el mecanismo exacto de la regulación no es bien conocido, intervienen diversos factores como el factor  $C_5a$  del complemento, los formilpéptidos (Dougherty, 1986), la fibronectina, agentes relacionados con el proceso inflamatorio, nucleótidos cíclicos, cationes divalentes, etc (Bryant, 1974), (Zakhireh, 1979), (McGuillen, 1980), (Seow, 1987).

El siguiente paso es la migración del neutrófilo a través de los espacios intercelulares del capilar, un fenómeno que se conoce como diapédesis. La diapédesis se logra por el movimiento natural de estas células y está asistida por la acción de factores de permeabilidad vasculares como son la histamina, serotonina, bradiquidinas, componentes del complemento y enzimas lisosomales.

El mecanismo por el cual las células atraviesan la membrana basal no está totalmente esclarecido, aunque puede estar implicada la destrucción de la membrana por enzimas proteolíticas producidas por células migrantes (Wilkinson, 1974). Una vez en el espacio extravascular, el comportamiento de las células está modulado por diversos factores quimiotácticos liberados en el sitio de inflamación.

El movimiento direccional de respuesta de los fagocitos hacia la inflamación es la propiedad de quimiotaxis (McCutcheon, 1946).

### 2.3.2. Quimiotaxis.

Los leucocitos son capaces de responder frente a determinadas sustancias con un movimiento dirigido, desde una concentración menor a una mayor. Este es el fenómeno de la quimiotaxis y depende del complemento e indirectamente de las inmunoglobulinas IgM e IgG que al unirse a los anticuerpos superficiales del organismo activan secuencialmente los componentes del complemento. Entre éstos,  $C_3a$  y  $C_5a$  tienen propiedades quimiotácticas (Ward, 1977). La activación del factor XII (de Hagman) durante la coagulación también tiene actividad quimiotáctica ya que se forman calicreína y activador de plasminógeno, conocidos agentes quimiotácticos (Kaplan, 1972, 1973). Otros productos que inducen quimiotaxis en

leucocitos son los peptidoglicanos y endotoxinas bacterianas (Ward, 1968) y ciertas lincinas (Altman, 1978) que son sustancias biológicamente activas producidas por los linfocitos.

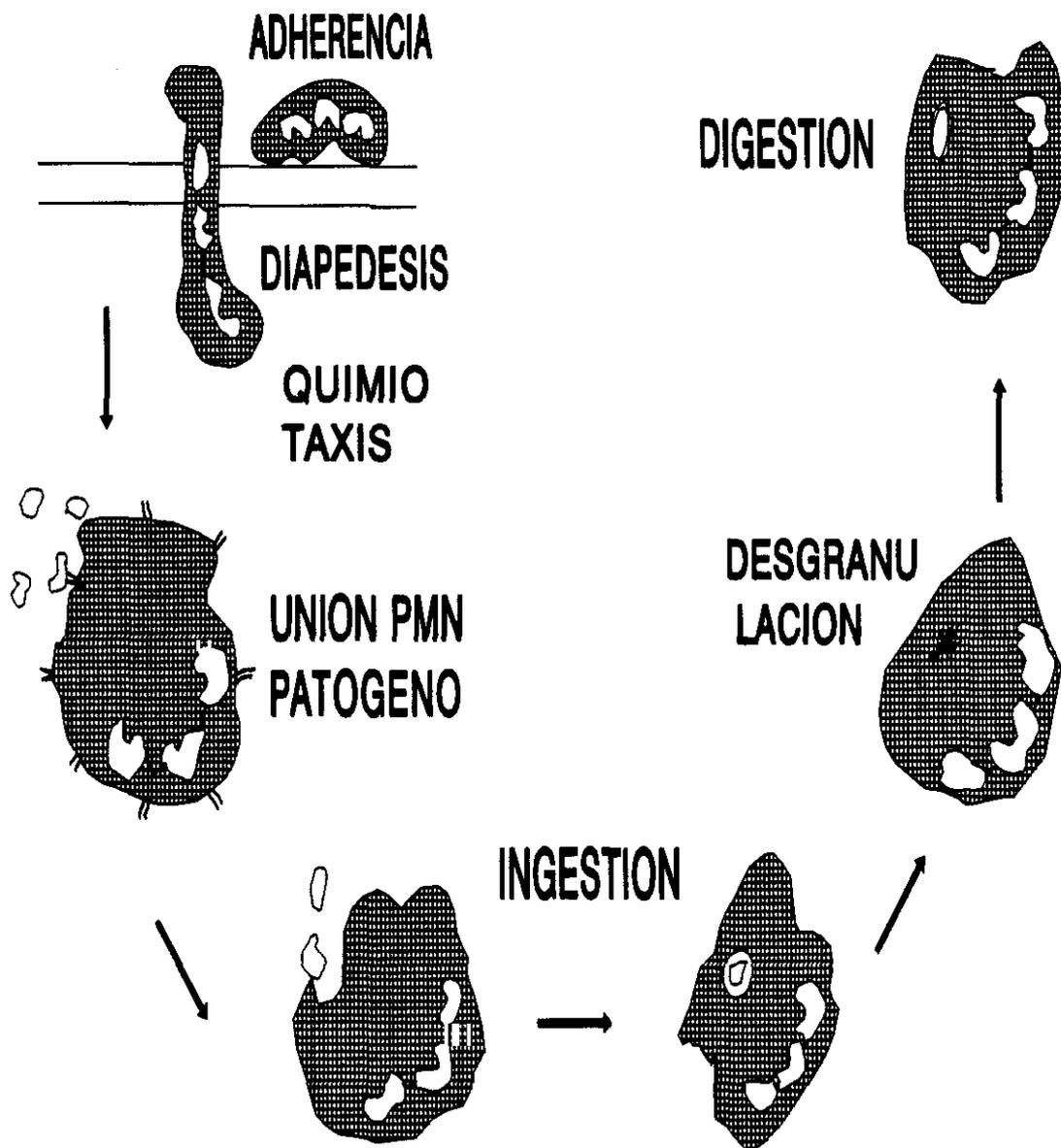


FIGURA 1. FUNCIONES DE LOS PMN

### 2.3.3. Fagocitosis.

La fagocitosis es el proceso por el cual las células ingieren sustancias particuladas. En ella hay un reconocimiento previo a la ingestión. Para que una partícula sea ingerida es necesario que se una a determinadas áreas de la célula fagocítica. Los microorganismos encapsulados evitan esa unión y por lo tanto resisten la ingestión, contribuyendo este hecho a su patogenicidad. Esta propiedad antifagocitaria puede quedar limitada por el proceso de opsonización, que consiste en recubrir los microorganismos con anticuerpos y complemento.

Aunque solamente las IgG tienen actividad opsonizante directa (Huber, 1968), las IgM y también las IgG, cuando se unen a la bacteria pueden fijar proteínas del complemento, y una de estas, la C<sub>3</sub>b, tiene receptores en la célula fagocitaria (Huber, 1968), (Quie, 1972). También existe la fagocitosis mediada por receptores que puede ser estimulada por citoquinas, péptidos de bajo peso molecular, etc. (Gresham, 1986), (Griffin, 1980).

El acto del reconocimiento es convertido en un movimiento activo de tipo ameboide que traerá como resultado la ingestión de la partícula. En dicho movimiento intervienen las mismas proteínas contráctiles que participan en la quimiotaxis. El polimorfo extiende pseudópodos alrededor de la bacteria y éstos se funden a nivel de sus extremos distales formando una vacuola fagocítica. La formación de esta vacuola requiere un gasto de energía metabólica que el PMN obtiene de la glucólisis anaerobia, de aquí el elevado contenido de estas células en glucógeno (Feliú, 1983). El fagosoma así formado se separa entonces de la membrana y se mueve centripetamente internándose en el interior celular.

### 2.3.4. Acontecimientos postfagocíticos.

Una vez ingerido el agente patógeno tienen lugar a) una desgranulación y b) una estimulación del metabolismo celular oxidativo.

#### a) Desgranulación.

La desgranulación es el proceso por el cual gránulos citoplásmicos se fusionan con la membrana del fagosoma y vierten su contenido enzimático al interior de aquél. Este fenómeno se ve acompañado de una caída del pH en el interior del fagosoma hasta valores de 3,5 o 4, acidez necesaria para activar las

hidrolasas ácidas vertidas por los gránulos (Jensen, 1973).

b) Estimulación del metabolismo celular oxidativo.

También llamado estallido respiratorio; implica un marcado aumento en el consumo de oxígeno y a un sistema enzimático, NADPH oxidasa, que cataliza la transferencia de un electrón del NADPH al oxígeno molecular. El producto de esta reacción es el anión superóxido ( $O_2^-$ ) con la consiguiente formación de agua oxigenada gracias al pH ácido del fagosoma (Root, 1977). También se activa el "shunt" de la hexosa monofosfato.

2.3.5. Mecanismos microbicidas.

Los mecanismos microbicidas se clasifican en oxígeno dependientes y oxígeno independientes, subdividiéndose los primeros en mieloperoxidasa (MPO) dependientes y mieloperoxidasa independientes.

A - Sistemas oxígeno dependientes.

a) Sistema mediado por mieloperoxidasa (fig.2).

El  $H_2O_2$  formado durante el metabolismo celular oxidativo interactúa con los iones de halógeno intracelulares y con la mieloperoxidasa, proteína presente en los gránulos azurófilos de los fagocitos formando complejos oxidados como el hipoclorito, potente agente microbicida que reacciona rápidamente con el amonio ( $NH_4$ ), para formar monocloramina ( $NH_2Cl$ ), y con las aminas para dar mono y dicloraminas ( $RNHCl$  y  $RNHCl_2$ ).

La concentración de compuestos nitrogenados *in vivo* es muy alta de modo que el hipoclorito tiene pocas oportunidades de reaccionar directamente con las células diana; por ello, la toxicidad del sistema MPO/ $H_2O_2$ / $Cl^-$  está mediada por las cloraminas (Grisham, 1984).

Estas son capaces de oxidar metionina, cisteína y triptófano, de clorar residuos de tirosina y de reaccionar con muchos otros componentes celulares que son rápidamente oxidados (Thomas, 1986).

b) Sistema mieloperoxidasa independiente (fig.3).

Los mecanismos MPO independientes se basan en la producción del anión superóxido, del radical hidroxilo y del singlete de oxígeno (Babior, 1978).

El anión superóxido, que por sí mismo no mata a los microorganismos a menos que se encuentre en grandes cantidades en el interior de los fagosomas (Babior, 1978), es producido en una reacción que implica a la catalasa, enzima presente en neutrófilos y monocitos cuyo sustrato es el  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



El radical hidroxilo es un agente oxidante, altamente inestable, que reacciona casi instantáneamente con la mayoría de moléculas orgánicas, produciendo la muerte del microorganismo por peroxidación de los lípidos de la pared celular. Su síntesis es dependiente de la reacción entre el  $\text{O}_2^-$  y compuestos peróxidos:



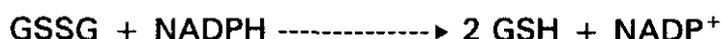
El singlete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ ) es un estado excitado electrónicamente del  $\text{O}_2$  que emite luz al regresar a su estado basal de triplete (propiedad de la quimioluminiscencia). Este agente es capaz de reaccionar con una gran variedad de compuestos que contienen dobles enlaces y que están presentes en la pared bacteriana. Todos estos radicales son altamente tóxicos para las células; por consiguiente estas células tienen sistemas de protección para su detoxicación. Existen al menos dos sistemas presentes en el citoplasma para la detoxicación del peróxido: la catalasa y el sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa.

El mecanismo de acción de la catalasa (visto anteriormente) indica que ésta es sólo efectiva a altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y por esta razón es el menos importante de los dos sistemas.

El sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa usa el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para oxidar glutatión reducido (GSH) en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa:



El glutatión oxidado es entonces reconvertido a glutatión reducido por medio de la glutatión reductasa produciéndose  $\text{NADP}^+$ , que también será reconvertido a  $\text{NADPH}$  por el "shunt" de la hexosa fosfato:



El efecto tóxico del anión superóxido puede anularse por medio de superóxido dismutasa (SOD), transformándose en  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



El agua oxigenada así formada por la acción de la SOD puede entonces ser eliminada por los sistemas anteriormente descritos.

#### B - Sistemas oxígeno independientes (fig.3)

Los gránulos citosólicos de los PMN contienen agentes antimicrobianos adicionales que se liberan al interior del fagosoma y que no requieren de la producción de oxidantes para realizar su función. Entre estos agentes están la lactoferrina, proteasas, fosfolipasas, glicosidasas y lisozima, además de otras proteínas y péptidos que alteran funciones microbianas o componentes estructurales (Thomas, 1988). Otro sistema oxígeno independiente consiste en la *disminución de pH en el fagosoma, llegando a niveles que pueden ser microbicidas* para ciertos microorganismos ácido sensibles como *Streptococcus pyogenes* y microbiostáticos para otros como *Escherichia coli*.

Recientemente se han identificado unas moléculas peptídicas con un amplio espectro de actividad *in vitro* contra bacterias grampositivas y gramnegativas, contra hongos y levaduras, incluyendo especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans* y contra ciertos virus encapsulados. Estas moléculas se han denominado defensinas y parece ser que sólo destruyen microorganismos metabólicamente activos (Ganz, 1985).

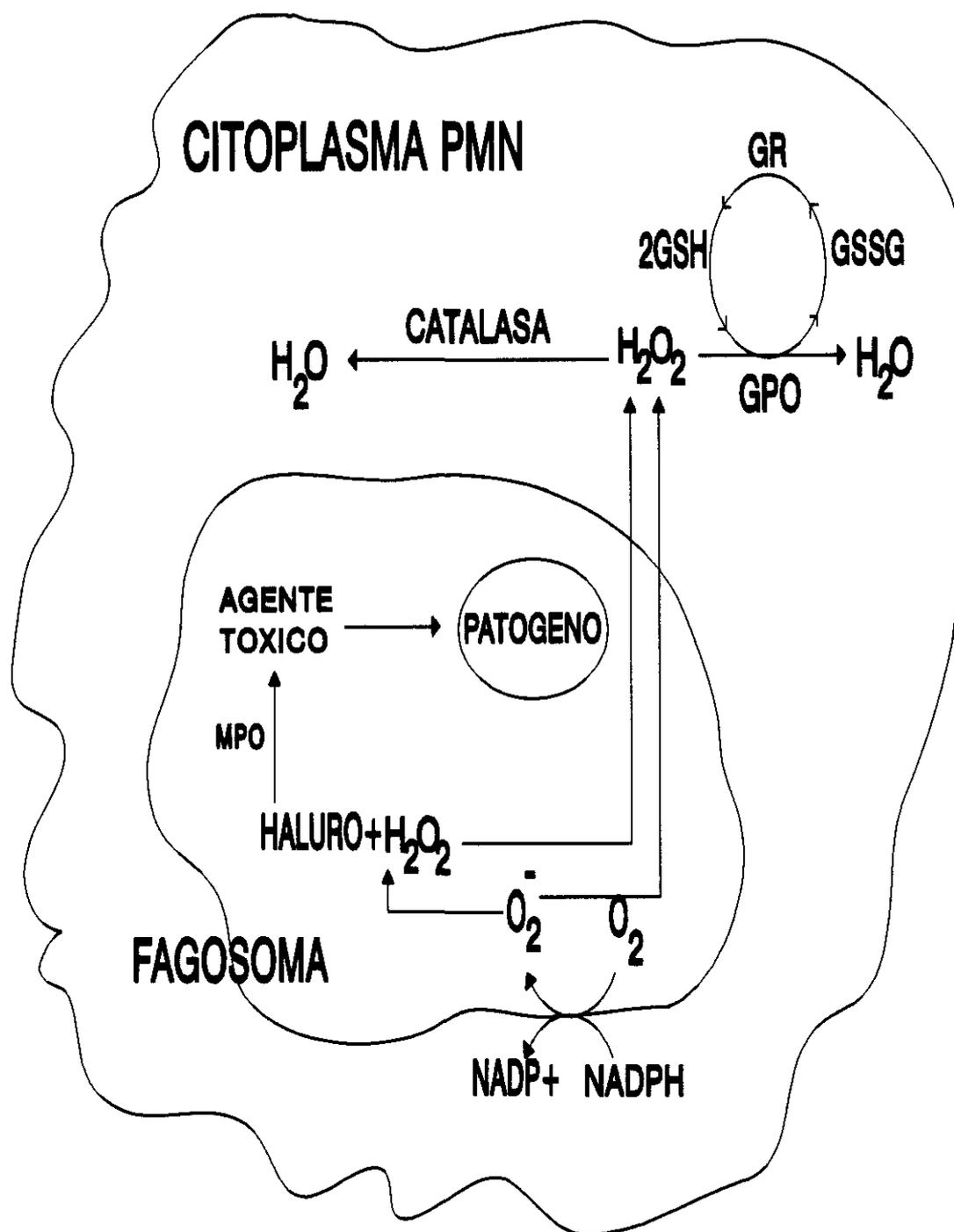


FIGURA 2. MECANISMOS MICROBICIDAS MPO DEPENDIENTES

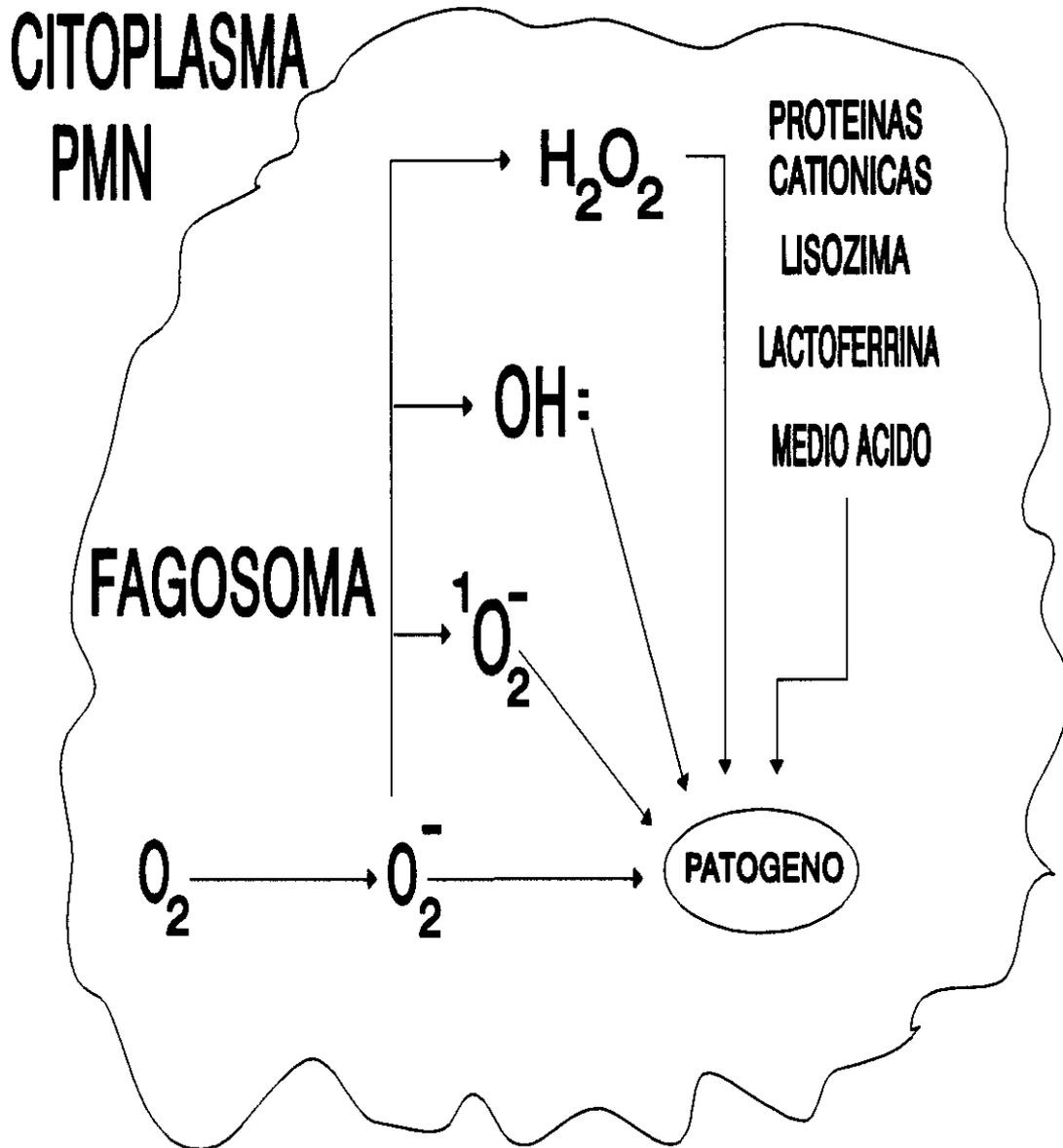


FIGURA 3. MECANISMOS MICROBICIDAS MPO INDEPENDIENTES

### 3. CANDIDA ALBICANS

#### 3.1. Biología.

*Candida albicans* es una levadura polimórfica (Odds, 1979a) asociada obligatoriamente a animales de sangre caliente. Normalmente está presente en el hombre como comensal asintomático pero se puede presentar como patógeno produciendo infecciones. La candidiasis puede adoptar dos formas: superficial, en la que se implican las mucosas, e invasiva o sistémica. De estas dos formas la primera es la más abundante, aunque en la mayoría de los casos la forma invasiva proviene de la diseminación desde los focos mucosos.

Bajo condiciones especiales de cultivo, por ejemplo en medio de agar con harina de maíz, *Candida albicans* forma clamidiosporas que son estructuras de pared engrosada y cuya producción se considera como prueba de identificación. Otra prueba de identificación está basada en la capacidad que tiene *Candida albicans* de formar filamentos cuando se incuba en presencia de suero a 37°C (Taschdjian, 1960). Esta levadura se desarrolla perfectamente a temperatura ambiente o a 37°C, siendo las colonias jóvenes en medio sólido como las de algunas bacterias: lisas y cremosas y las de mayor edad aparecen con mayor tamaño, hundidas y rugosas. En ambos casos el color es blanco (Zinsser, 1971).

#### 3.2. Pleomorfismo.

Generalmente *Candida albicans* crece en forma de levadura por gemación, pero también es capaz de desarrollar pseudomicelios, que son células de levadura elongadas, formadas por gemación polar y que presentan una constricción a la altura de las uniones celulares. Normalmente estas pseudohifas aparecen unidas formando cadenas y racimos.

Estos pseudomicelios se confunden fácilmente con los tubos de germinación que son el estado inicial de la transición levadura→hifa y que se caracterizan 1º) por la ausencia de constricción en la unión con la célula madre, 2º) por una localización

del primer septo (al que acompaña un anillo filamentoso) a 2 micrómetros de distancia de su unión con la célula madre y 3º) por una evaginación del micelio al azar, más que polar, a partir de la célula madre (Mitchell, 1979).

### 3.3. Patogenicidad.

Como patógeno, *Candida albicans* es capaz de invadir virtualmente todos los tejidos y cavidades del cuerpo humano y en el caso de infecciones sistémicas, que ocurren primordialmente en hospedadores inmunocomprometidos, puede causar la muerte.

#### 3.3.1. Factores de virulencia.

##### 3.3.1.1. Proteinasa ácida extracelular.

En 1965, Staib publicó sus primeras observaciones acerca del efecto proteolítico extracelular de *Candida albicans* al crecer en medio con albúmina sérica como única fuente de nitrógeno. Este efecto proteolítico fue posteriormente relacionado con una proteasa ácida (Remold, 1968) y clasificada por inhibición específica como proteinasa de aspártico (Ray, 1982).

Las proteinasas de *Candida* (CP) se han encontrado en el medio de cultivo de la mayoría de aislados de especies de *Candida* con relevancia clínica: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilopsis* y, más recientemente, se han descrito otras enzimas proteolíticas de *Candida albicans*, de localización intracelular, tales como la proteinasa vacuolar B, carboxipeptidasa y proteinasas de alto peso molecular (Portillo, 1986), (Logan, 1988). Ya que aún no existen pruebas de la contribución de estas últimas enzimas a la virulencia de *Candida*, se ha profundizado en los estudios sobre las CP extracelulares. En algunos de estos estudios se ha puesto de manifiesto la existencia de anticuerpos específicos contra las CP en el suero de pacientes con candidiasis sistémica, lo cual confirma su producción en la candidiasis humana (Rüchel, 1988) quedando establecida tal relación con la existencia de virulencia (Macdonald, 1983), (Kwon-Chung, 1985).

La hidrólisis de la albúmina sérica por parte de las CP es total, lo cual es sorprendente ya que dicha molécula está estabilizada por 17 puentes disulfuro. Por

lo tanto, son pocas las proteínas que pueden resistir tal ataque. Entre éstas últimas están la lisozima y la ferritina.

La mayoría de las células de *Candida* que son fagocitadas por los neutrófilos son muertas y sólo una pequeña fracción son capaces de resistir la muerte intracelular. Macdonald (1983) estableció una relación entre la resistencia a la muerte intracelular y la producción de CP. Esta resistencia se debe a que en el interior del fagolisosoma, las CP atacan a proteínas implicadas en la generación de radicales de oxígeno microbicidas deprimiendo, de este modo, la respuesta respiratoria de los fagocitos y promoviendo la resistencia de *Candida*.

### 3.3.1.2. Adhesinas manoproteicas de *Candida albicans*.

Para que *Candida albicans* pueda colonizar e infectar con éxito las superficies mucosas del hospedador, tiene que adherirse a superficies epiteliales. En varios experimentos se ha observado que las mucosas de animales libres de gérmenes eran colonizadas en mayor proporción que aquellas de animales control, y que los tratamientos antibacterianos apoyaban la colonización por parte de *Candida*. Estos datos sugieren que la flora bacteriana indígena suprime la colonización por *Candida albicans*.

Las manoproteínas comprenden una mezcla heterogénea de grandes moléculas en las que el carbohidrato (manano), que llega a ser hasta el 95% del peso total, está unido covalentemente a proteínas. Las manoproteínas de *C. albicans* son similares a las de *S. cerevisiae* aunque están más fosforiladas, tienen cadenas más largas y contienen algunos residuos de manosa unidos por enlaces  $\beta$  (Nelson, 1991). Las cadenas laterales contienen los epítomos que determinan la seroespecificidad (serotipo A o B).

*C. albicans* se adhiere a diferentes tipos de células epiteliales y por medio de diferentes mecanismos; por ejemplo, una regulación de la expresión de las adhesinas está mediada por azúcares. *In vivo*, tal regulación es importante en la cavidad bucal donde se encuentran altas concentraciones de sacarosa y otros azúcares de la dieta. La adhesión inducida por glucosa también puede ser determinante en la patogénesis de infecciones vaginales entre las mujeres diabéticas y embarazadas, cuyos altos niveles de glucógeno vaginal pueden ser

transformados en glucosa por enzimas presentes en tejidos o producidas por la flora normal. En un estudio reciente, Sweet (1991) demostró que el hierro también representa un mecanismo de control *in vivo*.

Parece ser que ciertas adhesinas se expresan sólo en la fase hifa de *C. albicans*. Por ejemplo, los tubos de germinación e hifas son capaces de unirse a fibrinógeno (Page, 1988), laminina (Bouchara, 1990) y al producto de conversión del complemento C<sub>3</sub>d (Calderone, 1988), mientras que las células de la fase levadura no lo son. Además, la formación del tubo de germinación promueve la adhesión a células epiteliales (Kimura, 1980) y al plástico (Tronchin, 1988), sugiriéndose que al cambio morfológico le acompaña un aumento de la síntesis de adhesinas.

Otro factor que influye en la adhesividad son las interacciones hidrofóbicas que participan en la adhesión específica y en procesos de anclaje no específicos entre receptores (del hospedador) y adhesinas (de *C. albicans*) complementarios. Por ejemplo, células en fase levadura son más hidrofóbicas al crecer a temperatura ambiente (22-24°C) que aquellas que lo hacen a 37°C (Hazen, 1986). Además, la expresión de hidrofobicidad en la superficie celular de *Candida albicans* es un proceso dinámico en el que células hidrofóbicas e hidrofílicas pueden variar su *status* en un período inferior a 30 minutos (Hazen, 1988). Los tubos de germinación son alta e invariablemente hidrofóbicos (Hazen, 1987). De todos estos estudios se puede concluir que la hidrofobicidad de la superficie celular está implicada en la adhesión, aunque no es el mecanismo predominante (Hazen, 1989).

3.3.1.3. Mimetismo molecular. Moléculas similares al receptor de complemento humano de *Candida*.

El hallazgo fortuito de la unión de eritrocitos de carnero recubiertos de complemento humano a las hifas de *C. albicans*, ha llevado al descubrimiento de que el organismo posee moléculas que imitan ciertas características funcionales y estructurales de los receptores CR<sub>2</sub> y CR<sub>3</sub> de leucocitos humanos. Existen similitudes sustanciales en estas moléculas como son la unión específica a iC<sub>3</sub>b, el reconocimiento por anticuerpos monoclonales específicos para receptores de complemento humano y la unión a EA<sub>1</sub>C<sub>3</sub>b y EAC<sub>3</sub>d, aunque dichas moléculas

fúngicas se diferencian de los receptores CR<sub>2</sub> y CR<sub>3</sub> humanos en el peso molecular, la glicosilación y en el reconocimiento por anticuerpos monoclonales que reconocen a los receptores CR<sub>2</sub> y CR<sub>3</sub>.

### 3.3.2. Mecanismos de defensa del hospedador.

Los anticuerpos y el complemento no son capaces de lisis por ellos mismos a *Candida albicans*, y la actividad protectora de los anticuerpos anti-cándida está asociada con una fagocitosis mediada por complemento en el caso de los PMN y por una óptima opsonización en el de los monocitos.

La destrucción de *Candida albicans*, que es relativamente resistente a los neutrófilos humanos, requiere mieloperoxidasa y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo los mecanismos oxígeno independientes mínimamente efectivos contra *C. albicans*.

La capacidad de los leucocitos de destruir algunos hongos (*Candida parapsilopsis*, *Candida pseudotropicalis*) en ausencia de metabolismo oxidativo refleja la presencia de proteínas y péptidos con intrínseca actividad antifúngica.

Los gránulos primarios (azurófilos) de PMN humanos contienen compuestos con actividad antifúngica; entre éstos se encuentran la CLCP (chymotrypsin-like cationic protein), proteína cuya actividad antifúngica es independiente de la enzimática, y varias proteínas altamente catiónicas (Odeberg, 1975), (Drazin, 1977).

Existen otros compuestos granulocíticos que también pueden apoyar las defensas del hospedador contra los hongos. Por ejemplo, la apolactoferrina (lactoferrina desprovista de hierro) puede, mediante el secuestro del hierro necesario para el óptimo crecimiento del hongo, inhibir el crecimiento de *Candida albicans in vitro* (Kirkpatrick, 1971) y destruir *C. albicans*, también *in vitro*, si es preparada a partir de calostro humano (Arnold, 1980). La lisozima, una hidrolasa de los gránulos primarios y específicos de PMN y macrófagos, es capaz de destruir *Coccidioides immitis* y *Cryptococcus neoformans* (Gadebusch, 1966), (Collins, 1973). Los leucocitos también poseen fosfolipasas que hidrolizan los triglicéridos de la membrana formando ácidos grasos libres e isolecitinas, aunque todavía faltan pruebas directas de su actividad antifúngica.

*C. albicans* coloniza las superficies mucosas predominantemente bajo la forma levadura (blastospora) y la invasión de tejidos la realiza por medio del desarrollo de tubos de germinación, pseudomicelios e hifas verdaderas. Esto indica que ambas formas -levadura y micelial- son patógenas, no limitándose su localización únicamente a los lugares anteriormente descritos ya que se pueden encontrar micelios, pseudomicelios y células levadura en tejidos infectados (Louria, 1963).

Estos diferentes fenotipos permiten a *C. albicans* escapar de la acción de los fagocitos ya que 1º) los micelios y pseudomicelios de *C. albicans* no pueden ser fagocitados y han de ser atacados por medio de la aposición fagocito-micelio, con descarga extracelular del interior de los gránulos lisosómicos (mecanismo aparentemente menos eficaz) (Diamond, 1978), y 2º) pueden evitar la muerte intracelular por medio de la germinación en el interior de la célula fagocítica (Stanley, 1969), (Odds, 1979b).

### 3.3.3. Variación fenotípica o Switching.

La variación fenotípica (switching) es un fenómeno que implica un cambio heredable en la morfología de la colonia, forma celular o alteraciones en otras características tales como sensibilidad a los agentes antifúngicos. Más aún, la capacidad de producir tal variación fenotípica es en sí misma un rasgo heredable. Por ello, el éxito de *C. albicans* en la colonización puede deberse en parte a su capacidad de crecer en una gran variedad de entornos ecológicos. *C. albicans* logra tal capacidad de diferentes formas:

#### 1) Variabilidad de cepas.

Intraespecíficamente, pueden existir varias cepas cada una adaptada a una circunstancia ambiental diferente. En este caso, cada nicho ambiental o estado fisiológico del hospedador seleccionaría la cepa más adaptada. De hecho, existe gran literatura sobre esta cuestión (revisada en profundidad por Odds en 1988) que demuestra las diferencias entre cepas en antigenicidad, secreción de proteasa ácida, condiciones ambientales para la formación de hifas, sensibilidad a los agentes antifúngicos, adhesión a diferentes epitelios y plástico, asimilación de azúcares...

## 2) Fenotipos múltiples a partir de un repertorio básico.

Cada célula individual puede tener en su repertorio de desarrollo un abanico de fenotipos además de las formas básicas de levadura e hifa, y expresar el más adecuado en función del entorno en que se encuentre. *Candida albicans* es capaz de presentar diferentes grados morfológicos entre los fenotipos blastoconidial y micelial (Merson-Davies, 1989) y se ha propuesto que las grandes diferencias entre estas dos fases implican cambios temporales, espaciales, cuantitativos y cualitativos (Soll, 1986). Si tales diferencias están implicadas en la adaptación a un entorno concreto, entonces se esperaría encontrar en diferentes localizaciones anatómicas o en diferentes tipos de infecciones unos fenotipos particulares para cada caso. Por ejemplo, en los lugares de infección existe propensión a la formación de micelios, aunque a este fenotipo *per sé* no se le puede considerar como diagnóstico de infección (Odds, 1988). Sin embargo, es cierto que la formación de hifas es importante en la patogénesis de *Candida* hasta el punto que los mutantes no productores de hifa (hifa-) son menos virulentos al ser inoculados a un ratón (Sobel, 1984).

## 3) Switching fenotípico de alta frecuencia.

Cada organismo individualmente puede poseer un sistema de transición de fase de alta frecuencia, espontáneo y reversible que genere continuamente variabilidad en una población, produciendo en cada entorno el fenotipo mejor adaptado de este repertorio.

Este fenómeno ocurre en *Candida spp*, aunque el mecanismo molecular aún se desconoce. La transición de fase de alta frecuencia en *C. albicans* ha de seguir unas reglas que son comunes para otras especies de *Candida* y que son (Soll, 1990):

1) Existencia de un número limitado de fenotipos provocados por la transición de fase.

2) Capacidad de lograr transiciones de fase a altísimas frecuencias.

3) Reversibilidad e interconvertibilidad.

4) Transiciones de fase de alta y baja frecuencias correlativas con los diferentes fenotipos obtenibles por switching.

##### 5) Inducción de la transición de fase por irradiación con UV.

*Candida albicans* es capaz de llevar a cabo una transición de fase levadura→hifa además de variaciones fenotípicas de alta frecuencia, las cuales abarcan desde diferencias en morfología de la colonia hasta diferencias en forma y superficie celulares y permeabilidad. Estas propiedades pueden ser importantes en la patogénesis de *Candida albicans* (Soll, 1988) y son de gran interés como procesos biológicos (Shepherd, 1985). De hecho, Soll demostró en otro trabajo (1987) que cepas patogénicas procedentes de la cavidad oral, variaban su fenotipo más frecuentemente que cepas comensales de la misma procedencia.

La transición más estudiada ha sido la del sistema blanco-oscuro hallado primeramente en la cepa OW-1 y posteriormente en otros 3 aislados. En esta transición, las células cambian, con una relativa frecuencia, de una unidad formadora de colonia blanca a otra oscura, distinguibles por el tamaño, color y altura de la cúpula de la colonia formada. Los rasgos fenotípicos afectados por esta transición son: morfología de la colonia, contenido en esteroles y lípidos, sensibilidad a los agentes antifúngicos, arquitectura de la pared y morfología celulares, expresión génica, dinámica de la expansión de la pared celular, sensibilidad a los PMN y oxidantes, adhesión al epitelio bucal y cohesión, antigenicidad, secreción de proteasa ácida, patrones de asimilación de azúcares, virulencia en modelos animales e inducción ambiental de la transición al fenotipo opuesto (Soll, 1991).

Todo esto nos indica el posible papel que juega la variación fenotípica en el comensalismo y patogénesis de *Candida albicans*.

#### 4. INTERACCIONES ENTRE QUIMIOTERAPICOS, MICROORGANISMOS Y CELULAS FAGOCITICAS

La evolución favorable de las enfermedades infecciosas depende esencialmente de la eficacia de las células fagocíticas para destruir microorganismos y de una quimioterapia adecuada. Esto hace que sea necesario conocer las interacciones que se establezcan entre microorganismos, células fagocíticas y quimioterápicos. La elección del tratamiento es especialmente importante en enfermos inmunodeprimidos o en el caso de que los mecanismos de defensa no sean tan eficaces frente a estos microorganismos.

Los quimioterápicos pueden modificar la acción de las células fagocíticas de varias formas (fig.4):

4.1. Inducción de neutropenia.

4.2. Penetración de los quimioterápicos al medio intraleucocitario y actividad intracelular.

4.3. *Interacción de los quimioterápicos con la actividad funcional de la células fagocíticas.*

4.4. Efecto de los quimioterápicos en las interacciones leucocito-microbio: EFECTO POSTANTIBIOTICO, EFECTO POSTANTIFUNGICO Y EFECTO PALE.

Salvo la aparición de neutropenia, comprobada en relación con la administración de determinados quimioterápicos, los otros efectos se han estudiado en su mayoría "in vitro" y no se conocen totalmente su significado ni repercusión clínicos, aunque estos hechos no pueden ser ignorados de ninguna manera.

4.1. Inducción de neutropenia.

La aparición de neutropenia en relación con la administración de determinados quimioterápicos es un hecho conocido hace tiempo y de gran interés clínico. El mecanismo de producción de neutropenia por quimioterápicos es desconocido pero parece que en el caso de cloranfenicol y rifampicina se produce una toxicidad directa sobre los precursores mieloides y en el caso de los

betalactámicos el mecanismo parece ser inmunológico, ya que en este caso el quimioterápico se fija a la superficie de la célula y forma un complejo que actúa como hapteno e induce la formación de anticuerpos contra el medicamento. Estos anticuerpos se unen a los grupos haptenos y destruyen las células. Otro mecanismo de acción consiste en la formación de un complejo entre el fármaco y las proteínas del plasma, que induce la formación de anticuerpos actuando como complejos inmunes. Otros quimioterápicos capaces de inducir neutropenia son gentamicina, estreptomina y sulfamidas.

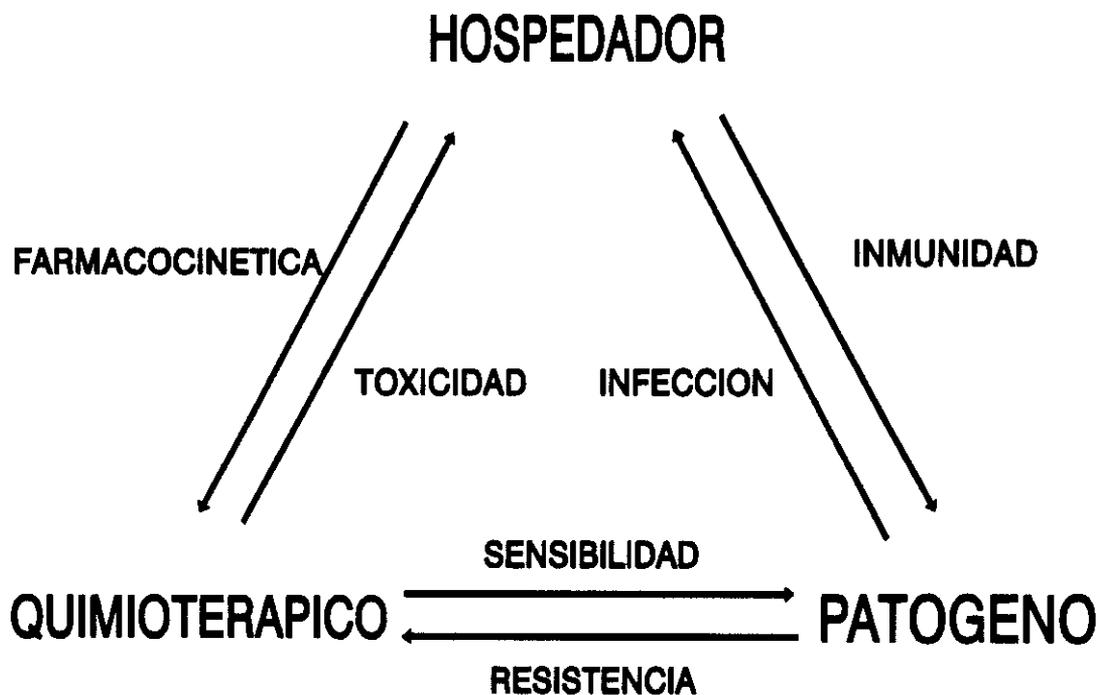


FIGURA 4. TRIANGULO DE DAVIS

#### 4.2. Penetración de los quimioterápicos al medio intraleucocitario y actividad intracelular.

Ciertos organismos son capaces de vivir en el interior de las células fagocíticas originando de este modo enfermedades infecciosas crónicas difíciles de erradicar. En esta situación, la capacidad de penetración del quimioterápico en el PMN y su actividad en el medio intracelular son de gran importancia.

Estas dos características varían grandemente según el quimioterápico que sea: la cilofungina, cefalosporinas y penicilinas presentan baja capacidad de penetración al interior del fagocito; los aminoglicósidos tienen diferentes grados de penetración; así la gentamicina penetra poco aunque más que la estreptomina. Entre los quimioterápicos que presentan buena penetración están las tetraciclinas, el cloranfenicol, la anfotericina B, el ketoconazol, la polimixina B y la lincomicina. Entre los que la tienen excelente están la clindamicina y la eritromicina.

En cuanto a los mecanismos de actividad intracelular de los quimioterápicos se sabe que algunos de ellos son bacteriostáticos a tiempos cortos (clindamicina y eritromicina) y que estreptomina, penicilina, cloranfenicol y gentamicina retienen al menos algo de su actividad en el interior de los PMN. Con respecto a los antifúngicos, la anfotericina B y el ketoconazol inhiben completamente la formación del tubo de germinación de *Candida albicans* tanto intracelular como extracelularmente; el fluconazol y el itraconazol también son capaces de hacerlo, aunque incompletamente (Van't wout, 1990).

#### 4.3. Interacción de los quimioterápicos con la actividad funcional de las células fagocíticas.

Los quimioterápicos pueden actuar directamente sobre las células fagocíticas modificando su capacidad funcional. Este hecho reviste gran importancia en el paciente inmunocomprometido ya que éste presenta alteraciones de las inmunidades humoral y celular. Las funciones que pueden quedar alteradas son la quimiotaxis, la fagocitosis y la capacidad microbicida (Cuadro 1)

**CUADRO 1. EFECTO DIRECTO DE LOS QUIMIOTERAPICOS SOBRE LAS CELULAS FAGOCITICAS**

	ACTIVACION	INHIBICION	SIN EFECTO
QUIMIOTAXIS	Bacitracina	Tetraciclinas	Fluconazol
	Clindamicina	Cloranfenicol	Ketoconazol
	Ketoconazol	Eritromicina	5-FC
		Anfotericina B	Josamicina
		Cefotaxima	Quinolonas
		Gentamicina	Moxalactam
FAGOCITOSIS	Pefloxacina	Tetraciclinas	Itraconazol
	Polimixina B	Anfotericina B	Ketoconazol
	Ketoconazol	Cefotaxima	Cilofungina
	Anfotericina B	Sulfonamidas	Quinolonas
		Bacitracina	Aminoglicósidos
		SCH-39304	Moxalactam
		Clotrimazol	Cefoxitina
		Ampicilina	
ACTIVIDAD MICROBICIDA	Cefodizima	Tetraciclinas	Aminoglicósidos
	Cilofungina	Sulfonamidas	Quinolonas
	Anfotericina B	Clotrimazol	Itraconazol
	Polimixina B	5-FC	Cilofungina
	Cefotaxima	Aminoglicósidos	Ketoconazol
	Ketoconazol	Anfotericina B	Fluconazol

#### 4.3.1. Respuesta quimiotáctica.

El comportamiento quimiotáctico de los PMN puede estimularse por los quimioterápicos aunque en la mayoría de los casos la inhibición es más frecuente. Las tetraciclinas tienen un efecto depresor sobre la migración; el cloranfenicol afecta a la movilidad celular y la eritromicina también. En general, los betalactámicos no poseen ningún efecto significativo sobre la quimiotaxis -a excepción de cefoxitina y cefotaxima- y los aminoglicósidos la inhiben en la mayoría de los estudios.

De entre los antifúngicos, la anfotericina B produce una inhibición reversible de la quimiotaxis; el ketoconazol la aumenta y el fluconazol, 5-fluorocitosina y cilofungina no poseen efecto alguno sobre ella.

#### 4.3.2. Fagocitosis.

La mayoría de los estudios realizados, además de no contar con una estandarización de las técnicas empleadas sobre la fagocitosis, no discriminan entre las fases de opsonización, unión y englobe; por lo tanto las conclusiones acerca de la naturaleza de los efectos de los quimioterápicos sobre la capacidad fagocítica deben ser tomadas con precaución.

Los aminoglicósidos y tetraciclinas tienen un efecto depresivo sobre la fagocitosis, especialmente en la ingestión de bacterias y hongos aunque sólo a concentraciones muy elevadas. También se ha encontrado una disminución de la misma por ampicilina y cefotaxima. La polimixina y bacitracina en grandes dosis disminuyen la fagocitosis de *S. aureus* y de partículas de látex.

La anfotericina B inhibe la fagocitosis a bajas concentraciones, el ketoconazol la activa, y el fluconazol y la 5-fluorocitosina la disminuyen, aunque sólo a concentraciones no terapéuticas (Roilides, 1990).

#### 4.3.3. Actividad microbicida y metabolismo neutrófilo.

Los quimioterápicos pueden afectar ciertos sucesos postfagocíticos como son la actividad microbicida y el metabolismo neutrófilo. Este se puede evaluar por diferentes métodos; uno de ellos es la medida de la quimioluminiscencia emitida, que aumenta cuando existe fagocitosis, y que cuantifica la generación de peróxido de hidrógeno. Así, la eritromicina y las cefalosporinas la mantienen neutral o la

aumentan mientras que la rifampicina, anfotericina B, tetraciclinas y las propias cefalosporinas a altas concentraciones lo deprimen.

La actividad microbicida de los PMN también se puede alterar según el quimioterápico utilizado. Las sulfonamidas interfieren con esta actividad, al igual que la cefalotina; en las tetraciclinas este efecto es dosis dependiente y de entre los aminoglicósidos, la gentamicina la disminuye. La anfotericina B disminuye la capacidad microbicida de los PMN a altas concentraciones aunque la aumenta a concentraciones terapéuticas, mientras que el ketoconazol, fluconazol, cilofungina y 5-fluorocitosina no tienen efectos o la activan.

#### 4.4. Efecto de los quimioterápicos en las interacciones leucocito-microbio: EFECTOS PAE, PAFE Y PALE.

Los efectos de los quimioterápicos sobre las células fagocíticas descritos anteriormente se pueden suplementar con los efectos independientes de los quimioterápicos sobre los propios agentes patógenos.

##### 4.4.1. EFECTO POSTANTIBIOTICO. EFECTO POSTANTIFUNGICO.

El término efecto postantibiótico (PAE) se refiere al fenómeno de supresión del crecimiento bacteriano que persiste tras una exposición limitada a un quimioterápico (Mc Donald, 1977). Esta supresión del crecimiento también se puede producir en hongos; de ahí el término efecto postantifúngico (PAFE) (Scalarone, 1992), (Mínguez, 1993a).

El fenómeno PAE fue descubierto por Bigger en 1944 al observar un retraso en el desarrollo de turbidez, después de añadir penicilasa, en cultivos de estafilococos y estreptococos previamente expuestos a penicilina G. Años más tarde (1950), Eagle demostró la existencia de este efecto *in vivo*.

La cuantificación, tanto del PAE como del PAFE, se realiza mediante la fórmula (Mc Donald, 1977), (Bundtzen, 1981):

$$\text{PAE o PAFE} = T - C$$

donde  $T$  es el tiempo requerido para que el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cultivos tratados aumente  $1 \log_{10}$  (10 veces) respecto a las UFC contabilizadas inmediatamente después de la eliminación de la droga, y  $C$  es el tiempo que se requiere para que el número de UFC en un control no tratado aumente  $1 \log_{10}$  con respecto a las UFC observadas inmediatamente después de realizar la misma operación que con los tratados.

La duración de este efecto postantibiótico puede estar influido por diversos factores (Mínguez, 1993b): tipo de organismo y quimioterápico, concentración de la droga, duración de la exposición, tamaño del inóculo, fase del crecimiento del organismo, tipo de medio, pH, combinación de quimioterápicos, presencia del suero en el medio, presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y presencia de agitación mecánica.

Por otra parte, la determinación del PAE *in vivo* se ha basado en 5 modelos experimentales:

- 1) Infección en muslo de ratón (Craig, 1988), (Vogelman, 1988).
- 2) Tiras subcutáneas infectadas en ratones (Rennenberg, 1988).
- 3) Meningitis en conejos (Tauber, 1984).
- 4) "Jaulas de tejido" infectadas (Odenholt, 1988).
- 5) Endocarditis en ratas (Hensen, 1989).

De estos 5 modelos, el de la infección en muslo de ratón fue el primero que se utilizó y en la actualidad es el más empleado, aunque se ensaya con ratones neutropénicos en lugar de ratones normales (Vogelman, 1988).

El mecanismo de acción, tanto del PAE como del PAFE, no es conocido pero es obvio que estos efectos se deben a daños subletales y a la persistencia del fármaco en el lugar de actuación; la duración de tales efectos podría relacionarse con el grado de reversibilidad del daño causado.

La utilidad clínica del PAE y del PAFE reside en los regímenes de dosificación de quimioterápicos: la administración del quimioterápico en aquellos sistemas fármaco-microorganismo que presenten PAE o PAFE, podría ser más espaciada que en aquellos que no los presenten; en otras palabras, el éxito de la terapia intermitente se puede deber, en parte, a dichos efectos.

#### 4.4.2. Actividades antifúngica y antibacteriana de quimioterápicos durante las fases PAFE y PAE.

Aunque los datos sobre este apartado son limitados, parece ser que los organismos que se encuentren en fase PAE o PAFE demuestran una susceptibilidad alterada a las actividades antibacteriana y antifúngica de ciertos quimioterápicos (Gerber, 1981), (Totsuka, 1988). Así, parece que existe una disminución de la actividad bactericida con  $\beta$ -lactámicos durante la fase PAE (Gerber, 1982), aunque la controversia continúa ya que Odenholt (1989, 1990) sugiere en unos estudios realizados *in vivo* e *in vitro* que los microorganismos en fase PAE son más sensibles a los efectos inhibitorios de concentraciones sub-CMI de penicilina.

#### 4.4.3. Sensibilidades bacteriana y fúngica a los mecanismos microbicidas del suero. Interacciones quimioterápico-suero-microorganismo.

La alteración de la superficie bacteriana debida al quimioterápico puede modificar la susceptibilidad de la bacteria al complemento, afectando este hecho a su posterior encuentro con las células fagocíticas. Por ejemplo, la colistina y la polimixina B actúan sinérgicamente con el suero en la actividad microbicida de *Escherichia coli*, tanto suero sensible como suero resistente, y hace a otros patógenos más sensibles a la lisozima sérica. Del mismo modo, cocos gram positivos como los estreptococos son más sensibles a la muerte por suero si han sido tratados previamente con concentraciones menores que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de penicilina, incluso cuando el complemento ha sido inactivado por calor. Sin embargo, a concentraciones no bactericidas de cloranfenicol *E. coli* y *S. dysenteriae* son más resistentes a los efectos bactericidas del suero. Respecto a los hongos, la incubación de *Candida albicans* (previamente tratada con fluconazol) con 10% de suero humano, demostró que éste no poseía efectos fungicidas apreciables (Chiu, 1993).

Además de los efectos de los quimioterápicos sobre los mecanismos de acción del suero, existen efectos del propio suero sobre los quimioterápicos que pueden alterar su eficacia. De hecho, se sabe que la unión del quimioterápico a proteínas séricas disminuye la cantidad de antibiótico libre capaz de difundir a otros lugares. Sin embargo, Meunier (1990) ha demostrado que el suero incrementa la

actividad inhibitoria del SCH 39304 y del fluconazol frente a *C. albicans*. Este efecto también se ha encontrado en bacterias ya que el suero normal potencia los efectos de colistina y polimixina sobre *E. coli* suero resistente.

#### 4.4.4. EFECTO PALE

Los agentes quimioterápicos pueden aumentar la sensibilidad de las bacterias y levaduras a la fagocitosis y muerte intracelular. Este fenómeno es conocido como PALE (PostAntibiotic Leukocyte Enhancement) y fue observado por primera vez por Pruul (1979) y Mc Donald (1981). Como su nombre indica, este efecto tiene lugar sobre los organismos que se hallan en fase PAE o PAFE y en él podemos diferenciar las etapas de fagocitosis y muerte intracelular.

##### 4.4.4.1 Variación de la sensibilidad a la fagocitosis.

El cambio puede ser a) por modificación de la opsonización, o b) por alteración de la interacción fagocito-microbio.

##### a) Modificación de la opsonización.

Los quimioterápicos, según su naturaleza, pueden alterar la opsonización de varias formas: a) interaccionando directamente con las opsoninas; b) uniéndose a factores esenciales como los cationes divalentes; c) ocultando las moléculas receptoras de las opsoninas de la superficies bacteriana o fúngica; d) alterando los receptores de superficie para la fagocitosis de los PMN, como el C<sub>3</sub>b y el receptor para la porción Fc de la IgG y e) reduciendo la concentración de factores antifagocíticos de la superficie de ciertos microorganismos.

Por ejemplo, la exposición de estreptococos del grupo A a concentraciones inferiores a la CMI de clindamicina induce la pérdida de varios antígenos de superficie, incluida la proteína antifagocítica M, siendo la bacteria más susceptible a la fagocitosis, activando el complemento más eficazmente y permitiendo un aumento de la deposición de C<sub>3</sub>b sobre su superficie. Asimismo, la anfotericina B se une a membranas celulares fúngicas e induce alteraciones estructurales, entre las que destacan cráteres y protusiones, aumentando este hecho también la deposición de C<sub>3</sub>b sobre la superficie del hongo.

#### b) Modificación de la adsorción e ingestión.

Existen muchos estudios acerca de la modulación de la fagocitosis que demuestran que las bacterias y levaduras expuestas a los quimioterápicos, tanto antes como durante el ataque de los neutrófilos, muestran una susceptibilidad alterada frente a la ingestión por PMN (De Brabender, 1980), (McDonald, 1981).

Así, *E. coli* tratada previamente con concentraciones inferiores a la CMI de polimixina, gentamicina, estreptomycinina o ampicilina es fagocitada con más rapidez por macrófagos peritoneales de ratón que las bacterias sin tratar. También con antifúngicos se ha recogido este efecto; la incubación de *Candida glabrata* con bajas concentraciones de itraconazol aumentó tanto la fagocitosis como la muerte intracelular (Xhonneux, 1992) y el ketoconazol aumentó la fagocitosis de *Candida albicans* por PMN en cultivos mixtos (De Brabender, 1980).

#### 4.4.4.2. Variación de la sensibilidad a la muerte intracelular.

Los quimioterápicos pueden aumentar las susceptibilidades bacteriana y fúngica frente a la muerte intracelular, ya sea por penetración al interior del fagocito y actuación directa sobre el microorganismo ingerido (efecto descrito anteriormente) o mediante la alteración del microorganismo previamente a su ingestión, debiendo estar el mismo en fase postantibiótica o postantifúngica ya que en este estado es más susceptible a la actividad microbicida de los PMN.

Estas fases postantibiótica y postantifúngica pueden lograrse a concentraciones superiores o inferiores a la CMI y se caracteriza por una disminución del metabolismo y crecimiento bacterianos o fúngicos, según el caso, durante un período que se sitúa más allá del tiempo de exposición (Mínguez, 1993a), (Mínguez, 1993c). A estos cambios que ocurren en la fase postantibiótica se le han de añadir otros efectos debidos también a los quimioterápicos y que serán determinantes para el PALE; entre ellos se cuentan la alteración de la morfología y la modificación de la adherencia, pero siempre manteniéndose la viabilidad.

Estos cambios en las superficies bacteriana o fúngica atenúan la patogenicidad al disminuir los factores de virulencia y paralelamente favorecen el reconocimiento e ingestión de los microorganismos por las células fagocíticas (Mc Donald, 1981). De hecho *S. aureus* y *S. pyogenes* en fase postantibiótica (fase

PAE) son fagocitadas y muertas por PMN a una tasa mayor que los organismos control.

A) Exposición a niveles mayores que la CMI.

Pruul en el año 1981 demostró que leucocitos humanos fagocitaban y destruían *E. coli* tratada con cloranfenicol con más eficacia que aquellas de las pruebas control, asociando la disminución de viabilidad bacteriana con el aumento de la muerte intracelular de bacterias fagocitadas que se hallaban dañadas por la acción del quimioterápico. Otras pruebas, realizadas con grampositivos, incluyeron a *S. aureus* expuesto durante 10 minutos con concentraciones 10 veces superiores a la CMI de penicilina G, eritromicina, amoxicilina o rifampicina; en estos estudios, Mc Donald demostró que bacterias tratadas previamente con los quimioterápicos mencionados eran más susceptibles a la fagocitosis por PMN que los organismos control no tratados, no existiendo una disminución importante del crecimiento estafilocócico con ninguno de los quimioterápicos en ausencia de leucocitos (Mc Donald, 1981).

También Pruul demostró con sus trabajos sobre *Bacteroides fragilis*, un anaerobio, que éste podía ser modificado tras su exposición a cloranfenicol y clindamicina, haciéndole más susceptible a la muerte intrafagocítica.

B) Exposición a niveles menores que la CMI.

También se ha estudiado la misma interacción a niveles bajos de quimioterápicos; así tenemos que el tratamiento previo de *E. coli* con concentraciones menores de la CMI de cloranfenicol, provocan una muerte mayor de *E. coli* fagocitadas; de la misma forma, tanto concentraciones subCMI durante largo tiempo como altas concentraciones en un corto espacio de tiempo, producen un aumento de la muerte de *Haemophilus influenzae* tipo b por los PMN.

También se ha encontrado que la preincubación de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias con subCMI de cefotaxima promueve la quimiotaxis (Bassaris, 1984).

Las causas de estos hechos no se conocen totalmente pero se sabe que la preincubación de *Streptococcus* con concentraciones subinhibitorias de clindamicina modifica su superficie con pérdida de la proteína M, produciendo un

aumento de la fagocitosis y digestión del microorganismo por las células fagocíticas. De la misma forma, el tratamiento de *Streptococcus* de tipo b con penicilina induce la liberación de componentes de su superficie, facilitando su digestión (Horne, 1981).

En la mayoría de los casos no se conocen los mecanismos moleculares implicados en estas observaciones, aunque se supone que los cambios morfológicos inducidos por quimioterápicos se corresponden con cambios topográficos o químicos de la superficie bacteriana que darían lugar a un aumento en la unión de componentes activados del complemento.

Respecto a los hongos, la falta de estandarización de las pruebas de susceptibilidad, entre otras causas (Galgiani, 1987), ha limitado grandemente los avances en el estudio sobre estos organismos. Sin embargo, algunos autores han registrado la existencia del efecto PALE con ketoconazol (Farkas, 1983), anfotericina B (Johnson, 1986) e itraconazol (Xhonneux, 1992), entre otros quimioterápicos.

Finalmente, se ha confirmado la importancia clínica del PALE, demostrándose que PAE/PAFE y PALE ocurren en la realidad simultáneamente. En unos estudios con animales, Vogelman (1988) y Craig (1990) demostraron que la duración del PAE *in vivo* era menor en ratones neutropénicos que en ratones normales, sugiriendo que los leucitos polimorfonucleares neutrófilos jugaban un papel fundamental.

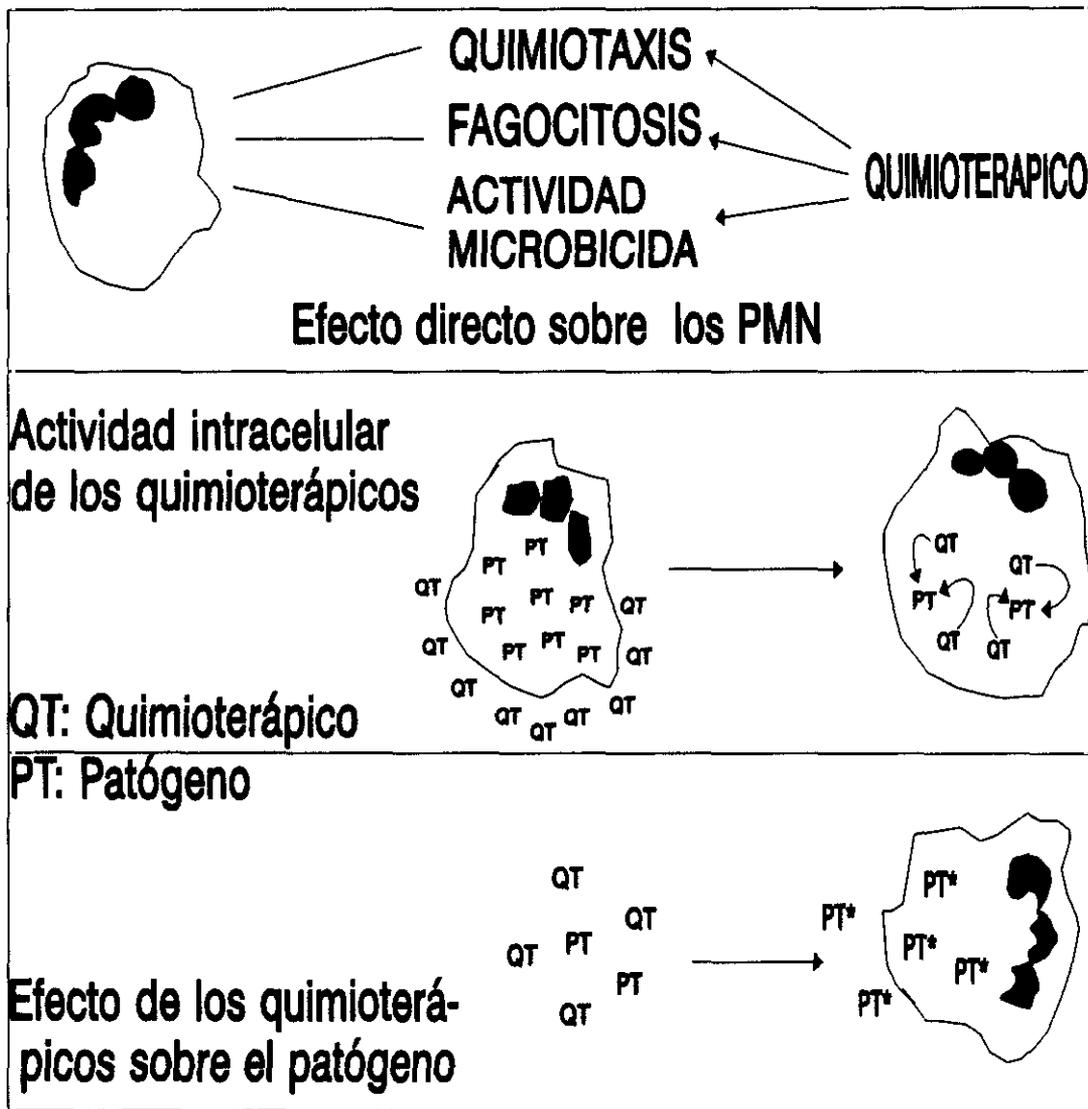


FIGURA 5. INTERACCIONES PMN-QUIMIOTERAPICO

## 5. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LOS QUIMIOTERAPICOS

### 5.1. ANFOTERICINA B

La anfotericina B es un producto natural de la fermentación de un actinomicete -*Streptomyces nodosus*- extraído de suelo recogido en Venezuela en 1953. El compuesto tiene un amplio espectro de acción antifúngica y pertenece al grupo de los antibióticos polienos cuya característica común es el componente macrólido con una porción  $\beta$ -hidroxilada y un sistema de dobles enlaces conjugados en el anillo lactona.

#### 5.1.1. Estructura química.

La estructura química de la anfotericina B fue dilucidada en 1970 (Mechlinski, 1970). La molécula consiste en un gran anillo macrólido de lactona de 37 átomos de carbono. Un lateral del anillo macrólido se compone de una cadena lipofílica rígida de 7 dobles enlaces conjugados mientras que en el opuesto existe igual número de grupos hidroxilo. De este modo, la molécula es anfipática y se cree que esta característica estructural es importante en su mecanismo de acción biológica, aunque existe una correlación clara entre el tipo de acción biológica y el tamaño del anillo macrólido poliénico. El peso molecular es 924,1.

#### 5.1.2. Mecanismo de acción.

La acción antifúngica de la anfotericina B reside en el daño a la membrana celular fúngica por medio de su unión irreversible al ergosterol, el principal esteroide de la membrana, lo que provoca una disfunción en los mecanismos de captación, induce pérdida de potasio, azúcares, amoníaco, fosfato, ácidos carboxílicos, ésteres fosfóricos, nucleótidos y proteínas y favorece la acidificación celular. Además de sus efectos antifúngicos, la anfotericina B posee potentes efectos inmunomoduladores en el hospedador.

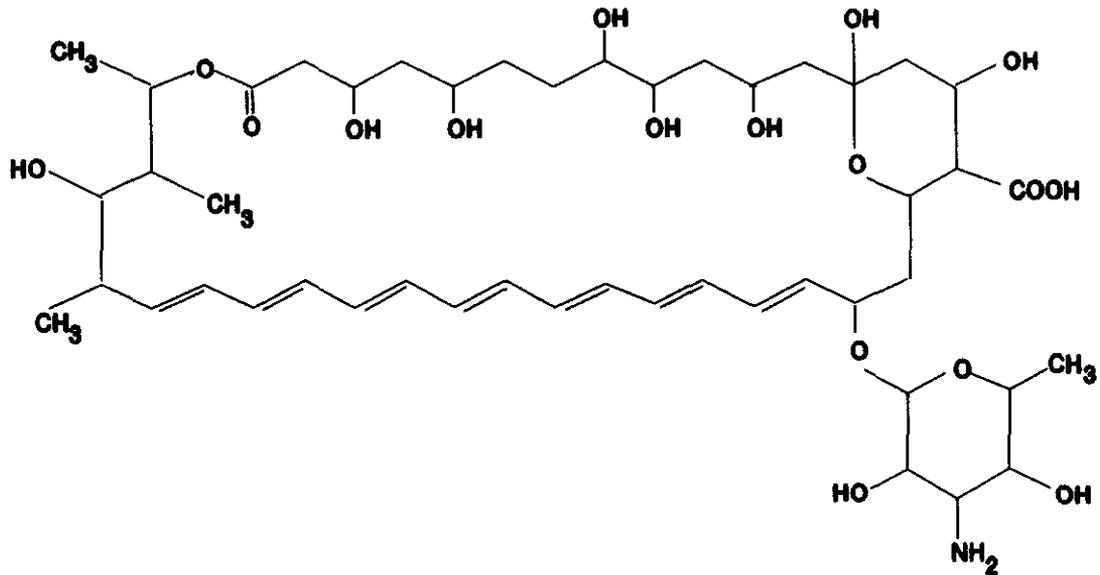


FIGURA 6.

### 5.1.3. Espectro de actividad.

La anfotericina B es el antifúngico de más amplio espectro conocido.

Son sensibles *Candida albicans* y otras *Candida* spp excepto *C. lusitanae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Zygomycetes*, *Coccidioides immitis* y *Paracoccidioides brasiliensis*, entre otros. Otros microorganismos sensibles son *Leishmania* spp, *Plasmodium falciparum* y *Naegleria fowleri*.

Son resistentes los agentes del micetoma, hialoficomiosis y cromoblastomiosis. También hay algunos dermatofitos resistentes como son *Trichophyton*, *Microsporum*, y *Epidermophyton* spp.

#### 5.1.4. Mecanismos de resistencia.

La resistencia de *C. albicans* y *C. neoformans* a la anfotericina B está asociada frecuentemente con alteraciones en la naturaleza de los esteroides de membrana o en la cantidad de esteroides presentes, aunque se han registrado casos de resistencia de cepas con niveles normales e incluso elevados de ergosterol. En estos casos debe existir otro mecanismo de resistencia que puede estar relacionado con los altos niveles de catalasa encontrados en estas cepas, ya que dichos niveles les protegen de posibles daños por oxidación.

Para acceder a la membrana fúngica, la anfotericina B ha de ser primero transportada a través de la rígida pared celular. En *C. albicans* las alteraciones en el contenido de  $\beta$ -1,3-glucano de la pared celular tras la supresión del crecimiento, evitan que la droga alcance la membrana provocando que las células sean más resistentes a la anfotericina B (Gale, 1986). Sin embargo, esta resistencia "fenotípica" se pierde tan pronto se reanuda el crecimiento, desconociéndose su significado clínico.

#### 5.1.5. Farmacocinética.

La anfotericina B no se absorbe en el tubo gastrointestinal tras la administración oral. Por ello la vía de administración idónea es la intravenosa por perfusión mantenida durante 6-8 horas. La penetración en el LCR es pobre, tanto si las meninges están inflamadas como si no lo están. La mayor parte del fármaco es degradada *in situ* y sólo un pequeño porcentaje se elimina por la orina. La vía de eliminación del fármaco es la biliar. La unión a las proteínas séricas es superior al 90%.

## 5.2. KETOCONAZOL

El ketoconazol es un compuesto imidazólico sintético, derivado dioxolénico y relacionado con el miconazol, el clotrimazol y el econazol. El mecanismo de acción es muy similar al del miconazol, aunque se diferencia de él por ser soluble a pH 3. La solubilidad en solución acuosa ácida se debe en gran parte a su anillo de piperazina básica, siendo la molécula altamente lipofílica. El ketoconazol requiere para su absorción la presencia de acidez gástrica, por lo que los antiácidos interfieren con aquélla (Bodey, 1988).

### 5.2.1. Estructura química.

El ketoconazol es un compuesto imidazólico sintético. En concreto, es el derivado 1,3-dioxolanilmetilimidazol, similar al miconazol en su espectro de actividad, aunque más activo *in vitro*. Su peso molecular es 531,43.

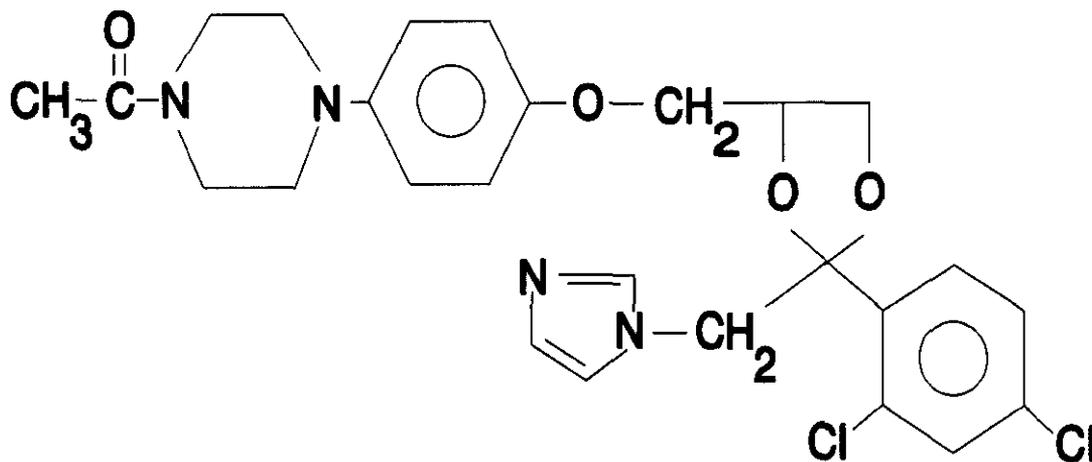


FIGURA 7.

### 5.2.2. Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de los azoles (ya sean imidazoles o triazoles) es el mismo y consiste en la inhibición específica de la desmetilación del C-14 del lanosterol, el cual es necesario para la síntesis de ergosterol. La desmetilación es dependiente del sistema enzimático  $P_{450}$ , sistema que es inhibido específicamente por el ketoconazol. La diferencia de acción entre los imidazoles y los triazoles consiste en que aquellos son menos selectivos que los triazoles.

Otro mecanismo de acción que poseen los azoles es el de la inhibición de las enzimas oxidativas y peroxidativas del citocromo *c*, lo cual lleva a una producción aumentada de peroxidasa intracelular; y el ketoconazol, en concreto, bloquea el transporte electrónico de la cadena respiratoria de *C. albicans* (Shigematsu, 1982), (Uno, 1982).

### 5.2.3. Espectro de actividad.

Los resultados sobre la actividad de los azoles *in vitro* depende de muchos factores: tamaño de inóculo, medio de cultivo, duración y temperatura de incubación y fase proliferativa del hongo, entre otros. A pesar de todo, las pruebas *in vitro* proporcionan información básica sobre el espectro general de actividad útil que sería de esperar para un fármaco antimicótico.

El ketoconazol es activo frente a la mayoría de los hongos patógenos. Entre ellos se encuentran: *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*. También es activo contra dermatofitos -*Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum canis*- y, como otros imidazoles antimicóticos, es activo *in vitro* contra determinadas bacterias grampositivas -*S. aureus*, *S. epidermidis*-. Respecto a protozoos ketoconazol, *in vivo*, tiene actividad contra *Plasmodium falciparum*, tanto sensible como resistente a la cloroquina y contra *Leishmania*.

#### 5.2.4. Mecanismos de resistencia.

La resistencia a los azoles antifúngicos es rara en aquellos pacientes que reciben terapia prolongada con ketoconazol, aunque se han descrito casos en enfermos con candidiasis mucocutánea crónica y en pacientes de SIDA. También hay algunos casos de cepas de *C. albicans* resistentes al ketoconazol y que mostraban resistencia cruzada con otros azoles (Ryley, 1984).

Se cree que la resistencia puede tener dos causas; una implica el bloqueo de la ingestión de la droga azólica al interior del hongo y la otra sugiere que algunos organismos son capaces de sintetizar ergosterol en una ruta que evita el paso de la desmetilación del C-14 bloqueado por los azoles (Ryley, 1984).

#### 5.2.5. Farmacocinética.

El ketoconazol presenta buena absorción tras la administración oral, siendo mucho mejor en presencia de alimentos que en ayunas. Puesto que se trata de una sustancia dibásica, la acidez del estómago tiene un papel importante, requiriendo secreción gástrica suficiente para su disolución y posterior absorción. Se metaboliza en el hígado y se excreta por la bilis y por la orina, en forma inactiva, principalmente. La unión a las proteínas séricas es superior al 90%.

### 5.3. FLUCONAZOL

El fluconazol, un derivado de los agentes antimicóticos triazólicos, es un inhibidor potente y específico de la síntesis fúngica de esteroides. En concreto es un bistriazol propanólico con amplio espectro de actividad, una larga vida media en suero que permite una única dosis diaria, y la suficiente solubilidad acuosa que facilita su administración intravenosa. Todas estas características le permiten ser una droga de especial relevancia en el tratamiento de las infecciones fúngicas.

#### 5.3.1. Estructura química.

El desarrollo de varios derivados triazólicos, incluido el fluconazol, ha sido posible mediante la realización de modificaciones estructurales sobre imidazoles previamente disponibles. La sustitución del anillo imidazólico por uno triazólico, la adición de un segundo anillo triazólico y la sustitución de un grupo difluorofenil por otro diclorofenil, han dotado al fluconazol de una mayor selectividad en la inhibición de sistemas enzimáticos fúngicos, una mayor estabilidad metabólica y una mayor solubilidad (Richardson, 1988). La fórmula molecular es  $C_{13}H_{12}F_2N_6O$  y su peso molecular 306,3.

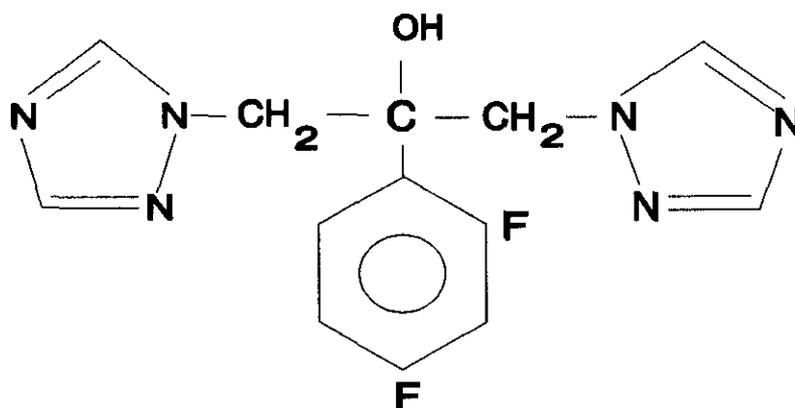


FIGURA 8.

### 5.3.2. Mecanismo de acción.

El N-4 del anillo triazólico se une al 6º grupo hemo axial de la enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilasa del citocromo P<sub>450</sub> fúngico, parando de este modo la conversión del lanosterol al ergosterol. Ya que el ergosterol es una molécula integral de la membrana fúngica, se producen malfunciones en la actividad de enzimas ligadas a membrana, en la propia permeabilidad de la membrana y en la coordinación de la síntesis de quitina. Morfológicamente, las células expuestas al fluconazol *in vivo* e *in vitro* presentan un engrosamiento irregular de la pared celular y un gran acúmulo de lípidos intracelulares y vesículas membranosas.

### 5.3.3. Espectro de actividad.

Debido a que la actividad de los azoles puede quedar modificada según el medio de cultivo, pH, tamaño de inóculo, temperatura de incubación y duración empleados (Galgiani, 1987), no existe una correlación clara entre los resultados obtenidos *in vitro* y la respuesta clínica *in vivo*. Los estudios *in vitro* demuestran que el fluconazol es sensiblemente menos activo que la anfotericina B y el ketoconazol contra hongos filamentosos y levaduras en medio de cultivo de tejidos (TC) y más activo contra levaduras, incluyendo especies de *Candida* y a *Cryptococcus neoformans*.

Los estudios con animales de experimentación han demostrado la alta eficacia que tiene el fluconazol *in vivo*; de este modo mejora la supervivencia de animales a los que se les ha inoculado una dosis letal de *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides* o *Histoplasma*. Además, el fluconazol parece ser más potente que el ketoconazol en animales infectados con inóculo intravenoso de *A. flavus*, *C. neoformans* o *C. albicans*.

#### 5.3.4. Mecanismos de resistencia.

El desarrollo de resistencia al fluconazol es muy raro, aunque hay algunos casos registrados (*C. albicans*, *C. glabrata*) resultantes de la terapia prolongada con dicho agente. Se cree que tal resistencia se debe a la disminución de la permeabilidad de la membrana a los azoles. Por otra parte, hay que tener en cuenta que tras el tratamiento con fluconazol (u otros agentes azólicos) el metabolismo fúngico de esteroides queda alterado, produciéndose una reducción en la cantidad de esteroides saponificables y consiguientes cambios en la susceptibilidad a otros agentes antifúngicos, como por ejemplo a anfotericina B.

#### 5.3.5. Farmacocinética.

A causa de su solubilidad en el agua, el fluconazol no se ve afectado por el pH gástrico y se absorbe muy bien oralmente. La administración por vía intravenosa se debe realizar en un período de 30 minutos aproximadamente. El fluconazol, debido a su gran solubilidad, su pequeño tamaño y su baja unión a proteínas (12%), penetra muy bien en la mayoría de los tejidos, incluido el SNC.

#### 5.4. FLUCITOSINA (5-FLUOROCITOSINA)

La 5-fluorocitosina es una pirimidina sintética fluorada, relacionada con el 5-fluoroacilo y con la floxuridina, que actúa como antimetabolito de la citosina. Se sintetizó por primera vez en 1957 como un potencial agente antitumoral y en 1964 se descubrieron sus propiedades antifúngicas al ser efectivo en el tratamiento de candidemia murina. El primer caso de eficacia en humanos como agente antifúngico data de 1967, siendo comercializado en los Estados Unidos en 1972.

##### 5.4.1. Estructura Química.

La fórmula de la flucitosina es 4-amino-5-fluoro-2(1H)-pirimidona y se trata de un polvo blanco, inodoro, cristalino, moderadamente soluble en agua a 25°C y totalmente en agua y alcohol a 60°C. El peso y la fórmula moleculares son 129,1 y  $C_4H_4FN_3O$ , respectivamente.

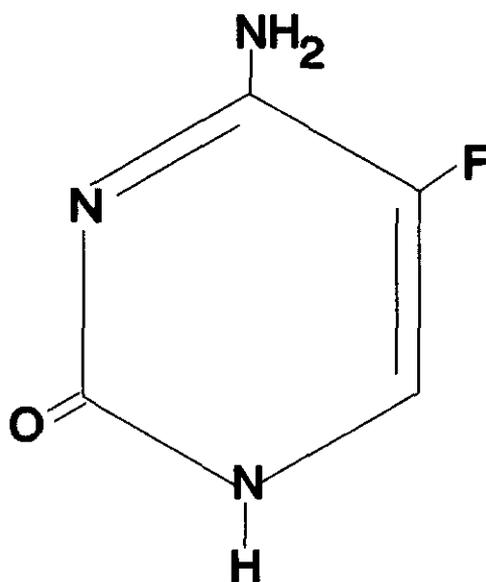


FIGURA 9.

#### 5.4.2. Mecanismo de acción.

La flucitosina es un antimetabolito de la citosina. La 5-fluorocitosina para poder actuar ha de atravesar la membrana celular de los hongos y por este motivo necesita que éstos posean la enzima citosín-permeasa. Una vez que ha penetrado, se produce una desaminación por la intervención de una citosín-desaminasa, transformándose en 5-fluorouracilo, que a su vez se metaboliza a 5-fluorouridina y tras fosforilación se transforma en 5-fluorouridín-trifosfato que se incorpora al RNA, bloqueando la síntesis de las proteínas indispensables para la vida de la célula fúngica. Las células humanas carecen de esta desaminasa, por lo cual la metabolización de la 5-fluorocitosina no se produce en el hombre. También se sugiere que la posterior conversión a monofosfato de fluorodesoxiuridina produce una inhibición de la actividad de la timidilato sintetasa y posteriormente de la síntesis de DNA (Bennett, 1977), (Diaso, 1978), (Koldin, 1983).

#### 5.4.3. Espectro de actividad.

Tiene muy buena actividad sobre *C. albicans* y la mayoría de las otras especies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candidum*, algunos *Aspergillus* (especialmente *A. fumigatus*) y los patógenos de la cromoblastomycosis (*Phialophora* y *Cladosporium*).

Tiene acción sinérgica con la anfotericina B sobre *Candida*, *C. neoformans* y *Aspergillus* y carece de actividad sobre *H. capsulatum*, *C. immitis*, *B. dermatitidis*, *Epidermophyton*, *Mucor* y otros hongos filamentosos y las bacterias.

#### 5.4.4. Mecanismos de resistencia.

Se ha encontrado resistencia primaria en cepas de *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*. Durante el curso de tratamientos prolongados con 5-FC a dosis insuficientes, se ha encontrado resistencia secundaria en *Candida spp* y *Cryptococcus neoformans*. La resistencia que aparece durante siembras seriadas

o largos tratamientos con 5-FC se produce frecuentemente por mutación, que da como resultado la pérdida de la actividad citosín-permeasa (Hoeprich, 1974). Otros mecanismos de resistencia implican la pérdida de la permeasa (Jund, 1970), o la de la actividad uridina monofosfato pirofosforilasa (Normak, 1972). No hay resistencia cruzada con otros antifúngicos.

#### 5.4.5. Farmacocinética.

Se absorbe por vía oral rápida y completamente (90% de la dosis), pudiéndose administrar también de forma intravenosa. Se distribuye muy bien por todo el organismo, incluido el LCR. La unión proteica es mínima (2,9-4%) y no influye la concentración de la droga (Block, 1974). Se elimina por vía urinaria en forma activa sin metabolizar.

**PROPOSITO DEL TRABAJO**

## PROPOSITO DEL TRABAJO

La evolución de las enfermedades infecciosas depende esencialmente de los mecanismos de defensa del hospedador y de la aplicación de una quimioterapia adecuada. Esto hace que sea necesario conocer las interacciones que se establecen entre microorganismos, células fagocíticas y quimioterápicos, y sus implicaciones clínicas.

Ciertos microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Brucella spp*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, etc, poseen la capacidad de sobrevivir en el interior de las células fagocíticas, siendo este hecho fundamental en la patogénesis de ciertas enfermedades infecciosas. Además, en los últimos años ha aumentado considerablemente el número de hospedadores inmunodeprimidos, cuya evolución favorable reside totalmente en la administración de un tratamiento adecuado.

De este modo, es esencial el uso de quimioterápicos que unan a su efecto antimicrobiano la capacidad de actuación intracelular y la posibilidad de modificar la susceptibilidad de los microorganismos remanentes al ataque de las células del sistema inmune.

Dado que *Candida albicans* es capaz de sobrevivir en el interior de los PMN y que tanto la anfotericina B, como el ketoconazol, el fluconazol y la 5-fluorocitosina constituyen una terapia actual para el tratamiento de infecciones por esta levadura, nos proponemos estudiar:

- la existencia de efecto postantifúngico (PAFE) sobre *Candida albicans* ATCC 10231 inducido mediante el tratamiento de dicha levadura con concentraciones alcanzables en suero de anfotericina B, ketoconazol, fluconazol y 5-fluorocitosina, tanto en presencia como en ausencia de suero.

- el efecto de bajas concentraciones de estos quimioterápicos sobre el crecimiento *Candida albicans* ATCC 10231 en fase postantifúngica, tanto en presencia como en ausencia de suero.

- el efecto que tiene la exposición previa de *Candida albicans* ATCC 10231 a determinadas concentraciones de los antifúngicos anteriormente nombrados sobre su susceptibilidad frente a los mecanismos microbicidas de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos.

MATERIALES

**APARATOS**

- Espectrofotómetro Hitachi U-1100.
- Medidor de pH eléctrico, Giralt.
- Balanza de precisión, Precisa 80-200 M.
- Nevera Zanussi.
- Autoclave, Selecta Autester.
- Estufa, Selecta.
- Microscopio óptico Nikon SE.
- Agitador de tubos Heidolph Reax 200.
- Centrífuga de precisión, Selecta Meditronic.
- Baño de agitación, Selecta Unitronic 3200 R.

**MATERIAL**

- Micropipetas fijas y regulables, Gilson.
- Puntas de micropipeta de 1000 y 100  $\mu$ l, Soria Greiner S.A.
- Pipetas Pasteur.
- Placas Petri 100x15 mm, Soria Greiner S.A.
- Asas de siembra.
- Matraces, pipetas y probetas Simax y Schott Mainz.
- Jeringas estériles de un sólo uso, Soria Greiner S.A.
- Hemocitómetro de Neubauer.
- Tubos de plástico y vidrio, Soria Greiner S.A.
- Tubos cónicos de 1,5 ml en polipropileno, Labclinics.
- Tubos con fondo cónico de 20 ml, Labclinics.
- Tubos de 5 ml con EDTA desechables, Labclinics.

**REACTIVOS Y PRODUCTOS**

- Alcohol metílico, Merk.
- Glucosa, Kodak.
- Cloruro amónico, Sigma.
- Cloruro sódico, Panreac.
- Cloruro potásico, Panreac.
- Cloruro magnésico, Panreac.
- Cloruro cálcico, Panreac.
- Sulfato magnésico, Panreac.
- Fosfato disódico, Sigma.
- Fosfato monopotásico, Panreac.
- Bicarbonato sódico, Panreac.
- Azul de tripano, Panreac.
- Azul de metileno, Panreac.
- Gelatina, Sigma.
- Caldo Base de Nitrógeno para Levaduras (YNB), Oxoid.
- Agar de Sabouraud, Oxoid.
- Desoxicolato sódico, Merck.
- Dimetil sulfóxido, Panreac.

**METODOS**

**MÉTODOS I****Solución salina tamponada con fosfato**

La solución fisiológica utilizada tiene la siguiente composición por litro:

- ClNa.....9,00 gr.
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ....0,144 gr.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ....0,795 gr.

**Tampón fosfato 0.01 M**

Las siguientes cantidades se disuelven en 1 litro de agua destilada y se esteriliza.

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....0,33 gr.
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....0,92 gr.

**Solución salina**

Se preparó disolviendo 9 gramos de ClNa en 1 litro de agua destilada, esterilizando posteriormente la disolución en autoclave y conservándola en nevera a 4°C.

**Medio de cultivo para células HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)**

Se ha utilizado como medio de cultivo para PMN solución fisiológica de Hank (HBSS) a pH 7,0, preparada con la siguiente composición por litro:

- HBSS sin  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  ni  $\text{NaHCO}_3$ .
  - ClNa.....8,0 gr.
  - KCl.....0,4 gr.
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....0,048 gr.
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....0,06 gr.
  - Glucosa.....1,0 gr.
- Reactivos adicionales para HBSS completo.
  - $\text{CaCl}_2$ .....0,14 gr.
  - $\text{NaHCO}_3$ .....0,35 gr.
  - $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ....0,16 gr.
  - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ....0,10 gr.

**Preparación de HBSS al 0,1 % de gelatina**

Se disuelve 1 gramo de gelatina purificada (Sigma) en 100 ml de agua destilada estéril y se calienta al baño maría para licuarla, guardándose posteriormente en nevera. A 90 ml de HBSS se le añaden 10 ml de gelatina al 1 %, obteniéndose HBSS con un 0,1 % de gelatina.

**Solución isotónica de cloruro amónico**

Se pesan:

- $\text{CINH}_4$ .....4,16 gr.
- $\text{NaHCO}_3$ .....0,42 gr.

y se disuelven en 500 ml de agua destilada estéril.

**Azul de Tripano al 4%**

Se pesan 4 gr. de colorante en polvo azul de tripano y se disuelven en 100 ml de agua destilada estéril.

**Agar de Sabouraud**

Se suspenden 65 gr del preparado comercial en 1 litro de agua destilada y se lleva a ebullición para su disolución. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

**Caldo Yeast Nitrogen Base tamponado al 1% de glucosa (bYNB-gl)**

Se prepara 1 litro de tampón fosfato, se ajusta el pH a 7,0 y se le añade:

- Medio YNB.....3,35 gr.
- Glucosa.....5,00 gr.
- Cloranfenicol.....0,20 gr.
- Gentamicina.....0.02 gr.

Una vez bien disuelto se vuelve a ajustar el pH y queda listo para su uso.

**Preparación de los quimioterápicos.****Anfotericina B**

Fue proporcionada en forma de polvo valorado por Bristol-Myers Squibb y se preparó pesando 50 mg de anfotericina B, 41 mg de desoxicolato sódico y 25,2 mg de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , disolviendo el total de la pesada en 10 ml de agua destilada estéril y dejándose reposar durante 30 minutos para su autoesterilización. Posteriormente se tomaron alícuotas y se congelaron a -70°C hasta el momento de su utilización.

### Ketoconazol

Fue suministrado por Janssen Farmacéutica en forma de polvo valorado con una potencia de 998 mg/gr. Se tomaron 50 mg del polvo valorado y se disolvieron en 5 ml de dimetil sulfóxido (DMSO), esterilizándose posteriormente dicha solución.

La distribución de la droga en viales y su almacenamiento se realizaron de la misma manera que con la anfotericina B.

### Fluconazol

Fue proporcionado en forma de polvo valorado por Pfizer con una potencia de 996 mg/gr y se preparó muy concentrado disolviéndolo en agua destilada estéril y guardándose en alícuotas a -70°C hasta el momento de su utilización.

### 5-Fluorocitosina

Fue suministrada en forma de polvo valorado por Roche con una potencia de 999 mg/gr. Se preparó disolviendo 50 mg de la droga en un matraz con 5 ml de agua destilada estéril y se situó en baño de agua caliente a una temperatura de 52°C hasta la completa disolución de la droga. Posteriormente se esterilizó mediante filtración y se distribuyó en viales, congelándose a -70°C hasta el momento de su utilización.

## METODOS II

### Obtención de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos

Preparación de PMN y suero (fig. 10).

Los PMN fueron extraídos de sangre humana tratada con EDTA (Ethylene Diamine Tetracetic Acid) para evitar su coagulación. A 4 ml de esta sangre se le añadieron 16 ml de una mezcla de cloruro amónico y bicarbonato sódico (Eggleton, 1989), agitándose todo durante 15 minutos en baño de agua fría a 4°C para lisar los eritrocitos. Tras este tiempo, la mezcla se sometió a centrifugación durante 10 minutos a 55 g y se resuspendió en 10 ml de dicha disolución de cloruro amónico, repitiéndose el proceso una segunda vez. El sedimento así obtenido se resuspendió en 5 ml de HBSS sin calcio ni magnesio para evitar una activación de los neutrófilos no deseada. Las células se mantuvieron en baño a 4°C hasta su posterior uso en la fagocitosis, momento en el que se volvieron a centrifugar y resuspender en HBSS, esta vez ya con calcio y magnesio, y suplementado con gelatina al 0,1%, ajustándose el número de células a  $1 \times 10^6$  clas/ml en la cámara de Neubauer (la pureza en PMN fue siempre superior al 90%). Paralelamente se evaluó la viabilidad celular con el colorante azul de tripano (Metcalf, 1986) y siempre fue superior al 95%.

El suero se obtuvo de sangre humana haciéndose un pool universal a partir de varios donantes y se congeló en viales de 500  $\mu$ l a -80°C hasta su uso.

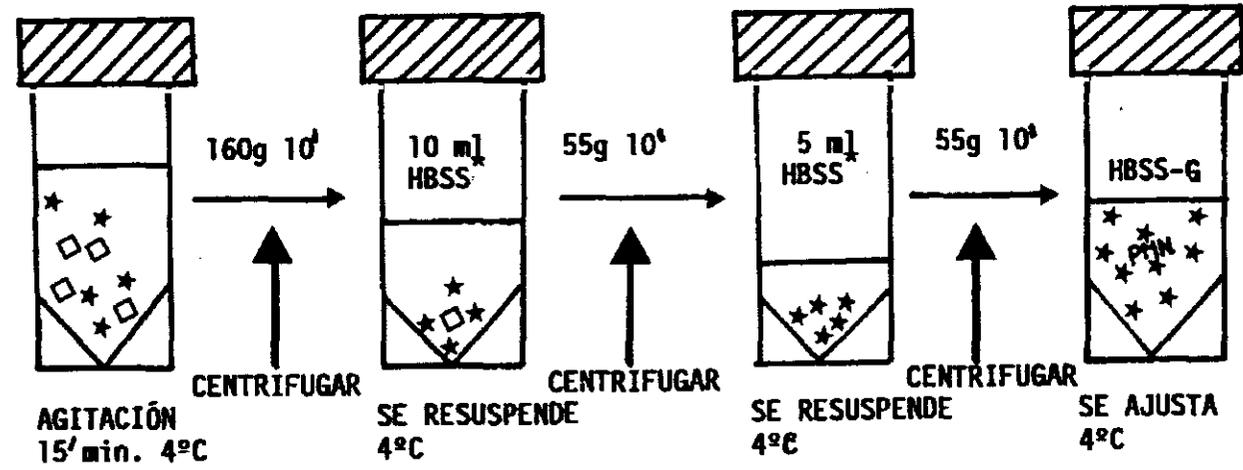
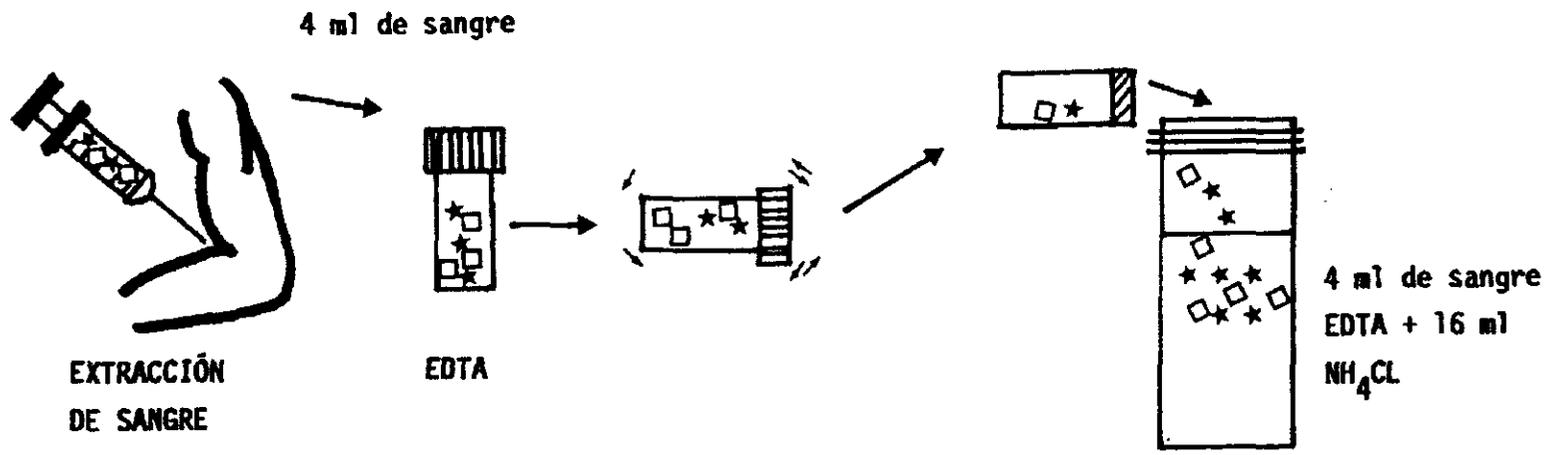
### Microorganismos

Para los estudios con los antifúngicos anfotericina B, ketoconazol, fluconazol y 5-fluorocitosina se utilizó *Candida albicans* ATCC 10231.

### Ajuste de organismos mediante espectrofotometría

Para poder determinar el número de ufc/ml de levadura durante todo el estudio nos servimos de un espectrofotómetro; de este modo se prepararon rectas patrones a 540 nm, siendo el inóculo de partida de  $1 \times 10^3$ - $10^4$  ufc/ml y el medio utilizado bYNB-glucosa. Para determinar el número de colonias viables de levaduras se midió la absorbancia cada 30 minutos y se hicieron plaqueos en agar Sabouraud, leyéndose los resultados a las 24 horas.

FIGURA 10. OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS



HBSS\* : Sin Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, NaHCO<sub>3</sub>

### Pruebas de susceptibilidad empleadas

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los quimioterápicos se determinaron por el método de dilución en tubo (Washington, 1974) y las actividades de los antifúngicos se estimaron calculando la concentración mínima que inhibía el 50% de la población en un tiempo determinado (IC-50) mediante un método turbidimétrico (Galgiani, 1978).

### Determinación de la CMI, IC-50 e IC-25 para *Candida albicans*

Una suspensión de *Candida albicans* en medio bYNB-glucosa se dejó crecer durante toda la noche en baño de agitación a 37°C y 140 osc/min en un volumen de 50 ml. Al día siguiente se ajustó el cultivo a  $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  ufc/ml mediante espectrofotometría (0,25 de absorbancia a 540 nm) y posteriormente se incubaron 19 mL de la suspensión de *Candida albicans* más 1 mL del antifúngico empleado según el caso y concentrado 20 veces en diversos matraces, cuyo número era igual al número de concentraciones utilizadas en el estudio, más uno de control. Las concentraciones de antifúngico utilizadas fueron para la anfotericina B y flucitosina, 0; 0,03; 0,07; 0,15; 0,3; 0,6; 1,25; 5, 10 y 20  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ; para el ketoconazol, 0; 0,01; 0,03; 0,07; 0,15; 0,3; 0,6; 1,25; 5; 10 y 20  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ; y para el fluconazol, 0; 0,16, 0,8, 4, 20, 100 y 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Los frascos de control sin droga se prepararon añadiendo 1 ml de bYNB-glucosa, incluido el disolvente de la droga en los casos de anfotericina B y ketoconazol, a los 19 mL de la suspensión ajustada de *Candida*; seguidamente se incubaron todos los matraces en baño de agitación a 37°C a 140 osc/min. y cada cierto período de tiempo se determinó su crecimiento tomando muestras de 2 ml y midiendo el cambio de absorbancia y transmitancia. La CMI se determinó simultáneamente como la última concentración de quimioterápico que impedía la formación de turbidez de la suspensión de *Candida albicans*.

Las concentraciones inhibitorias IC-50 e IC-25 se calcularon a partir de los datos obtenidos por espectrofotometría, como las más bajas concentraciones de quimioterápicos que cumplían el criterio:

$$\%T > (\%T_{\text{control}} + N (100 - \%T_{\text{control}}))$$

en donde:

- %T<sub>control</sub> es el porcentaje de transmisión del control (libre de quimioterápico).

- N, puede ser ½ (IC-50) o ¼ (IC-25); esta fórmula fue diseñada para definir la fracción de inhibición (N) como una función de la turbidez en los tubos control libres de quimioterápico (Galgiani, 1978).

Estudio del retraso del crecimiento de *Candida albicans* en presencia de suero tras el pretratamiento con los quimioterápicos

Este efecto se evaluó cada t = 60 minutos y se expresó como el porcentaje de retraso en el crecimiento (RC) debido al quimioterápico mediante la relación:

$$RC_t = 100 \times (1 - (ST/SC))$$

donde ST representa, como log<sub>10</sub> ufc/mL, la diferencia entre el número de cándidas pretratadas con el quimioterápico en el tiempo t respecto del tiempo 0 (principio del experimento); y SC representa lo mismo pero con cándidas control.

Valoración de la susceptibilidad de *Candida albicans* tratada previamente frente a los mecanismos microbicidas de los PMN (fig.11).

*Candida albicans* en crecimiento exponencial se ajustó a  $5 \times 10^6 - 10^7$  ufc/ml y se incubó junto a una concentración determinada de antifúngico, que variaba según la droga en estudio, durante 6 horas en bYNB-gl a 37°C en baño de agitación y a 140 osc/min. Transcurrido dicho tiempo, se eliminó la droga del medio mediante tres centrifugaciones sucesivas y posteriormente se resuspendió la levadura en la solución de Hank suplementada con gelatina (HBSS-gelatina) y se ajustó a una concentración de  $5,5 \times 10^6$ . Los PMN, previamente obtenidos por el método descrito anteriormente, se ajustaron a  $5,5 \times 10^6$  PMN/ml en HBSS-gelatina.

Alícuotas de 500 µl de la suspensión de *Candida albicans* tratada previamente, se añadieron a dos tipos de tubos: unos con 400 µl de HBSS-gelatina más 100 µl de suero y otros con 150 µl de HBSS-gelatina más 250 µl de PMN más 100 µl de suero. De esta manera, la relación final levadura/PMN fue 2:1. También se prepararon del mismo modo tubos de levaduras sin tratar.

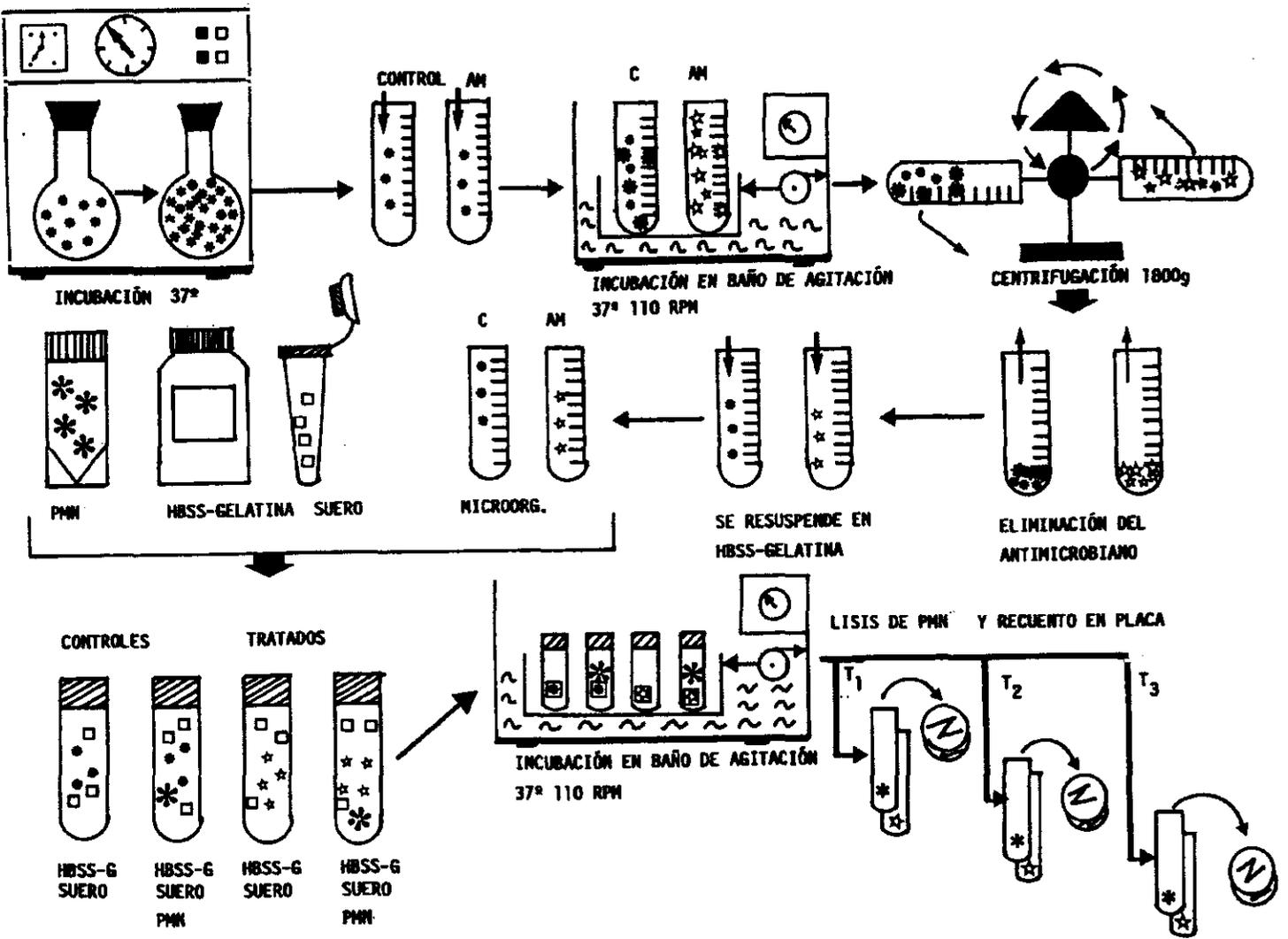


FIGURA 11. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA TECNICA EMPLEADA PARA LOS ESTUDIOS DE CRECIMIENTO Y MUERTE INTRACELULAR DE *Candida albicans* PREVIAMENTE TRATADA CON QUIMIOTERAPICOS EN PRESENCIA DE SUERO O SUERO Y PMN.

Los cuatro tubos (2 tratados y 2 controles) se incubaron a 37°C en baño de agitación a 140 osc/min y cada 60 minutos se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ l y se añadieron a tubos con agua destilada estéril a pH 11 para lisar los PMN (Gargan, 1989). Todos estos tubos de agua básica se agitaron vigorosamente y se realizaron diluciones seriadas en solución salina; de estos últimos tubos se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ l y se sembraron en agar Sabouraud por triplicado; tras 24 horas de incubación en estufa a 37°C se procedió al recuento de las placas, expresando los resultados como  $\log_{10}$ ufc/mL.

El aumento de susceptibilidad de *C. albicans* pretratada con los diferentes quimioterápicos se determinó a tiempos determinados  $t = 60$  minutos y se expresó como el incremento del efecto fungicida de los PMN debido al quimioterápico (EF) expresado en porcentajes mediante la relación:

$$EF_t = 100 \times (ST-PT/SC-PS - 1)$$

donde **ST** representa, en  $\log_{10}$  ufc/mL, la diferencia entre el número de candidas pretratadas con el quimioterápico en el tiempo  $t$  respecto del tiempo 0 (principio del experimento); y **SC** representa lo mismo pero con candidas control. **PT** representa la diferencia entre el número de levaduras viables (previamente tratadas con quimioterápico) incubadas con PMN en el tiempo  $t$  respecto del tiempo 0; y **PS** representa lo mismo pero con candidas control.

#### Estudio del efecto postantifúngico de anfotericina B, fluconazol, ketoconazol y flucitosina sobre *Candida albicans* en presencia o ausencia de suero

Una vez obtenida la fase de crecimiento exponencial de un inóculo de *Candida albicans*, se prepararon tres matraces con la levadura ajustada a una concentración de  $10^5$  ufc/mL y se distribuyeron de la siguiente forma: un matraz fue el control (libre de quimioterápico); un segundo matraz fue expuesto a una cantidad determinada de quimioterápico y el tercer matraz fue también expuesto, pero a una concentración de droga mayor. Los tres matraces fueron incubados durante 12 horas en presencia o ausencia de suero a 37°C y 140 osc/min. Transcurrido este tiempo se eliminó del medio de incubación el quimioterápico

mediante 3 centrifugaciones sucesivas, resuspendiéndose finalmente en bYNB-gl. Los cultivos control fueron tratados de idéntica forma. Estos tres matraces, ya libres de la droga, se subdividieron cada uno en dos matraces, añadiéndose un submúltiplo de las concentraciones iniciales de los quimioterápicos a sólo uno de los matraces resultantes de la división. A partir de entonces se estudiaron durante 12 horas (con toma y sembrado de muestras cada dos horas en agar Sabouraud) los siguientes efectos, tanto en presencia como en ausencia de suero:

- Efecto postantifúngico de dos concentraciones del mismo quimioterápico sobre el crecimiento de *Candida albicans*.

- Efecto de bajas concentraciones del mismo quimioterápico sobre *Candida albicans* previamente expuesta a dicha droga (en fase postantifúngica).

La duración del efecto postantifúngico se calculó a partir del contaje de viables resultantes de las curvas de recrecimiento usando la fórmula (Mc Donald, 1977):

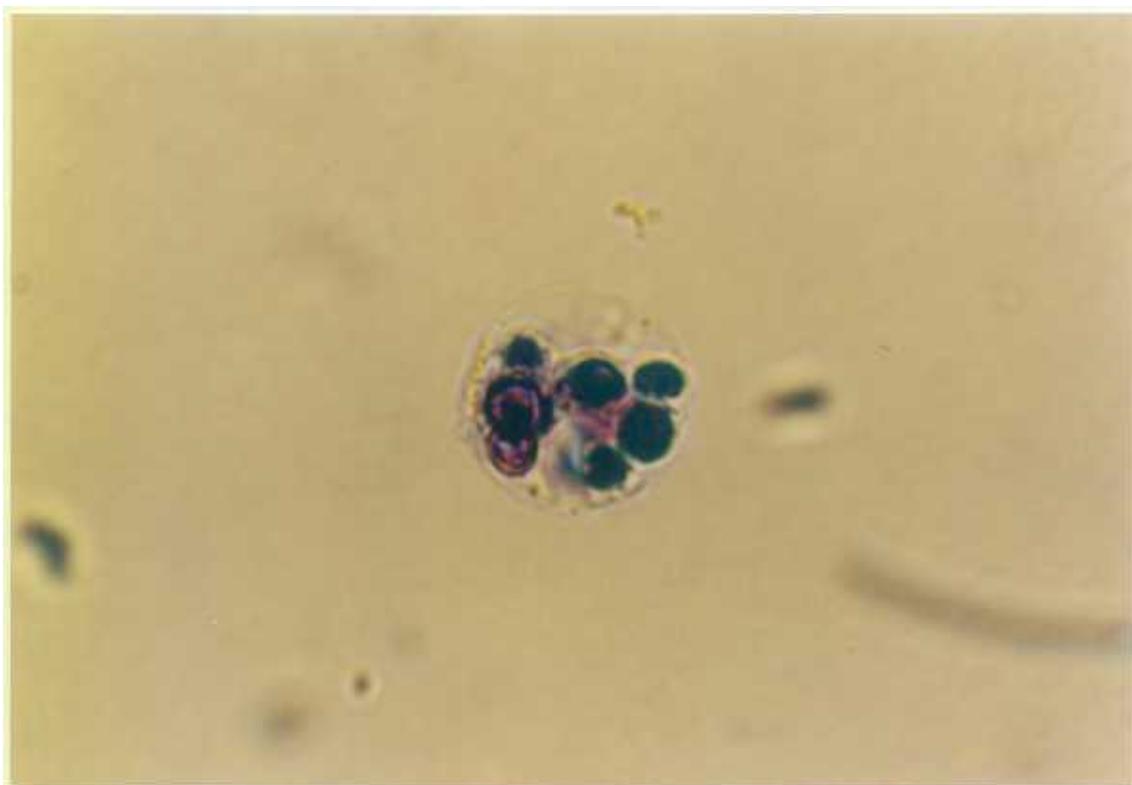
$$\text{PAFE} = T - C$$

en la que **T** es el tiempo requerido para que el número de unidades formadoras de colonias -ufc/mL- en cultivos tratados aumente  $1 \log_{10}$  (10 veces) respecto a las ufc/mL contabilizadas inmediatamente después de eliminar la droga; y **C** es el tiempo que se requiere para que el número de ufc/mL en un control no tratado aumente  $1 \log_{10}$  con respecto a las observadas inmediatamente después de realizar la misma operación que con los cultivos tratados.

**FOTOGRAFIA 1.** Fagocitosis y muerte de varias cándidas por un leucocito polimorfonuclear neutrófilo.

**FOTOGRAFIA 2.** Fagocitosis de dos levaduras, una de ellas con tubo germinativo.

**FOTOGRAFIA 3.** Fagocitosis y muerte de dos cándidas, una de ellas con tubo germinativo.



**FOTOGRAFIA 1.**



**FOTOGRAFIA 2.**



**FOTOGRAFIA 3.**

## **ANALISIS ESTADISTICO**

Se calcularon para cada grupo de datos la media aritmética y la desviación estándar, mediante las fórmulas habituales para el número de datos manejados.

Para comparar estadísticamente las medias de dos grupos experimentales (tratados y no tratados), se utilizó el método estadístico de la *U de Mann-Whitney*.

Se consideró que la diferencia de las muestras era no significativa (n.s.) cuando el valor de la probabilidad de la significación ( $p$ ) era mayor que 0,05 ( $p > 0,05$ ), y que la diferencia de las muestras era significativa cuando dicho valor fue menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

**RESULTADOS**

Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los antifúngicos empleados para *Candida albicans* ATCC 10231.

Las CMI obtenidas para un inóculo de  $1 \times 10^5$  ufc/mL de *Candida albicans* a las 24 horas de incubación fueron:

Agente antifúngico	CMI ( $\mu$ gr/mL)
anfotericina B	1
ketoconazol	5
fluconazol	40
5-fluorocitosina	0,5

Concentraciones inhibitorias del 25% y 50% del crecimiento de *Candida albicans* (IC-25, IC-50).

Agente antifúngico	Tiempo de incubación	IC-25 ( $\mu$ gr/mL)	IC-50 ( $\mu$ gr/mL)
anfotericina B	24 horas	0,6	1,25
	48 horas	5	5
	72 horas	5	5
ketoconazol	24 horas	0,6	0,6
	48 horas	5	5
	72 horas	5	5
fluconazol	24 horas	0,8	0,8
	48 horas	100	100
	72 horas	> 100	> 100
5-fluorocitosina	24 horas	0,07	0,07
	48 horas	0,3	0,3
	72 horas	0,3	0,3

Efecto postantifúngico de *Candida albicans* inducido por anfotericina B en presencia o ausencia de suero mediante incubación durante 12 horas.

Se probaron 2 concentraciones de anfotericina B sobre el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231, tanto en presencia como en ausencia de suero al 10%; estas concentraciones fueron 0,5  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  y 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ . Con 0,5  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de anfotericina B se consiguió inducir en la levadura un efecto postantifúngico de  $1,3 \pm 0,4$  horas; y con 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , un PAFE de  $2,4 \pm 0,7$  horas. En presencia de suero, con 0,5  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  se obtuvo un PAFE de  $1,8 \pm 0,4$  horas, mientras que con 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , se obtuvo uno de  $3,4 \pm 0,9$  horas.

Efecto postantifúngico de *Candida albicans* inducido por ketoconazol en presencia o ausencia de suero por medio de una incubación de 12 horas.

Con este quimioterápico también probamos dos concentraciones, que fueron 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  y 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ . En ausencia de suero, no se pudieron inducir PAFE positivos: todos fueron negativos, en los que la población expuesta al imidazol crecía más rápidamente que la población control ( $-1,4 \pm 0,7$  y  $-1,5 \pm 0,8$  horas con 1 y 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , respectivamente). Contrastando con lo anterior, aquellos experimentos en los que el suero era incorporado trajeron como resultado PAFE positivos; con 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de ketoconazol se consiguió un PAFE de  $0,15 \pm 0,05$  horas y con 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , uno de  $0,52 \pm 0,2$  horas.

Efecto postantifúngico de *Candida albicans* inducido por fluconazol en presencia o ausencia de suero en incubación de 12 horas.

Este triazol fue ensayado a concentraciones de 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  y 8  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ . En ausencia de suero, pudimos comprobar que los azoles presentan PAFE nulos o negativos. El fluconazol no fue una excepción a este hecho, ya que a ambas concentraciones no se pudo inducir ningún tipo de PAFE ( $-0,4 \pm 0,3$  y  $-0,3 \pm 0,2$  horas con 4 y 8  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , respectivamente). Curiosamente, al igual que el imidazol en presencia de suero, el fluconazol produjo PAFE positivos e incluso mayores que aquellos obtenidos con ketoconazol: con 4 y con 8  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de fluconazol se consiguieron unos PAFE de  $2 \pm 0,6$  y  $2,5 \pm 1,0$  horas, respectivamente.

**Efecto postantifúngico de *Candida albicans* inducido por 5-fluorocitosina en presencia o ausencia de suero en incubación conjunta durante de 12 horas.**

Tanto en presencia como en ausencia de suero, nosotros pudimos conseguir con la flucitosina los PAFE de más larga duración de todos los antifúngicos ensayados. En ausencia de suero obtuvimos unos PAFE de  $1,7 \pm 0,7$  y  $3,6 \pm 0,9$  horas utilizando concentraciones de 4 y 20  $\mu\text{gr/mL}$ , respectivamente. En presencia de suero, con 4  $\mu\text{gr/mL}$  obtuvimos un PAFE de  $2,9 \pm 0,5$  horas, mientras que con 20  $\mu\text{gr/mL}$  logramos un PAFE de  $3,8 \pm 0,8$  horas.

**Efecto de bajas concentraciones de anfotericina B, ketoconazol, fluconazol y 5-fluorocitosina sobre *Candida albicans* en fase PAFE.**

Una vez que la levadura se encontraba en fase PAFE, se le volvía a exponer al antifúngico que le había inducido dicho estado, aunque a concentraciones menores. Como resultado de esta reexposición en fase postantifúngica pudimos comprobar que este segundo tratamiento prolongaba dicha fase PAFE en todos los casos.

**Efecto del pretratamiento de *Candida albicans* con anfotericina B, ketoconazol, fluconazol y 5-fluorocitosina sobre su crecimiento y su susceptibilidad frente a la acción fungicida de los PMN humanos.**

En este estudio hemos valorado dos parámetros: el primero depende exclusivamente de la droga; es el retraso en el crecimiento (RC) de la levadura, y el segundo implica a la droga y a los leucocitos; es decir, cuantificamos el efecto fungicida (que puede aumentar o disminuir) de los PMN sobre *Candida albicans* previamente tratada con los antifúngicos anteriormente nombrados.

**Efecto del tratamiento quimioterápico sobre el crecimiento *C. albicans***

La incubación de *C. albicans* junto con las drogas siempre tuvo la misma duración y fue igual a 6 horas. La exposición a 1  $\mu\text{gr/mL}$  de anfotericina B produjo un retraso en el crecimiento que, una vez eliminada la droga del medio de cultivo, perduró durante las tres horas siguientes alcanzando valores de 66% a la primera hora, 50% a la segunda y 48% a la tercera. La flucitosina también presentó una

gran actividad a la concentración de 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , siendo del 91% a la primera hora, del 65% a la segunda y del 54% a la tercera.

Respecto a los azoles, el ketoconazol a 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  presentó unos retrasos del 85% en la primera hora, del 65% en la segunda y del 34% a la tercera, mientras que en el caso del fluconazol, el retraso obtenido en el crecimiento de *Candida albicans* tras su exposición a 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  durante 6 horas fue del 72% en la primera hora, del 60% en la segunda y del 55% en la tercera.

#### Efecto fungicida de los PMN sobre *Candida albicans* pretratada con anfotericina B.

El pretratamiento de *C. albicans* con 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  durante 6 horas produjo un aumento de su susceptibilidad a la acción fungicida de los PMN que tuvo como valores 109% a la primera hora, 41% a la segunda y 32% a la tercera ( $p < 0,05$ ).

#### Efecto fungicida de los PMN sobre *Candida albicans* pretratada con ketoconazol.

El ketoconazol, a concentraciones de 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , hizo que la levaduras presentasen una muerte intracelular del 80% a la primera hora, del 54% a la segunda y del 32% a la tercera ( $p < 0,05$ ).

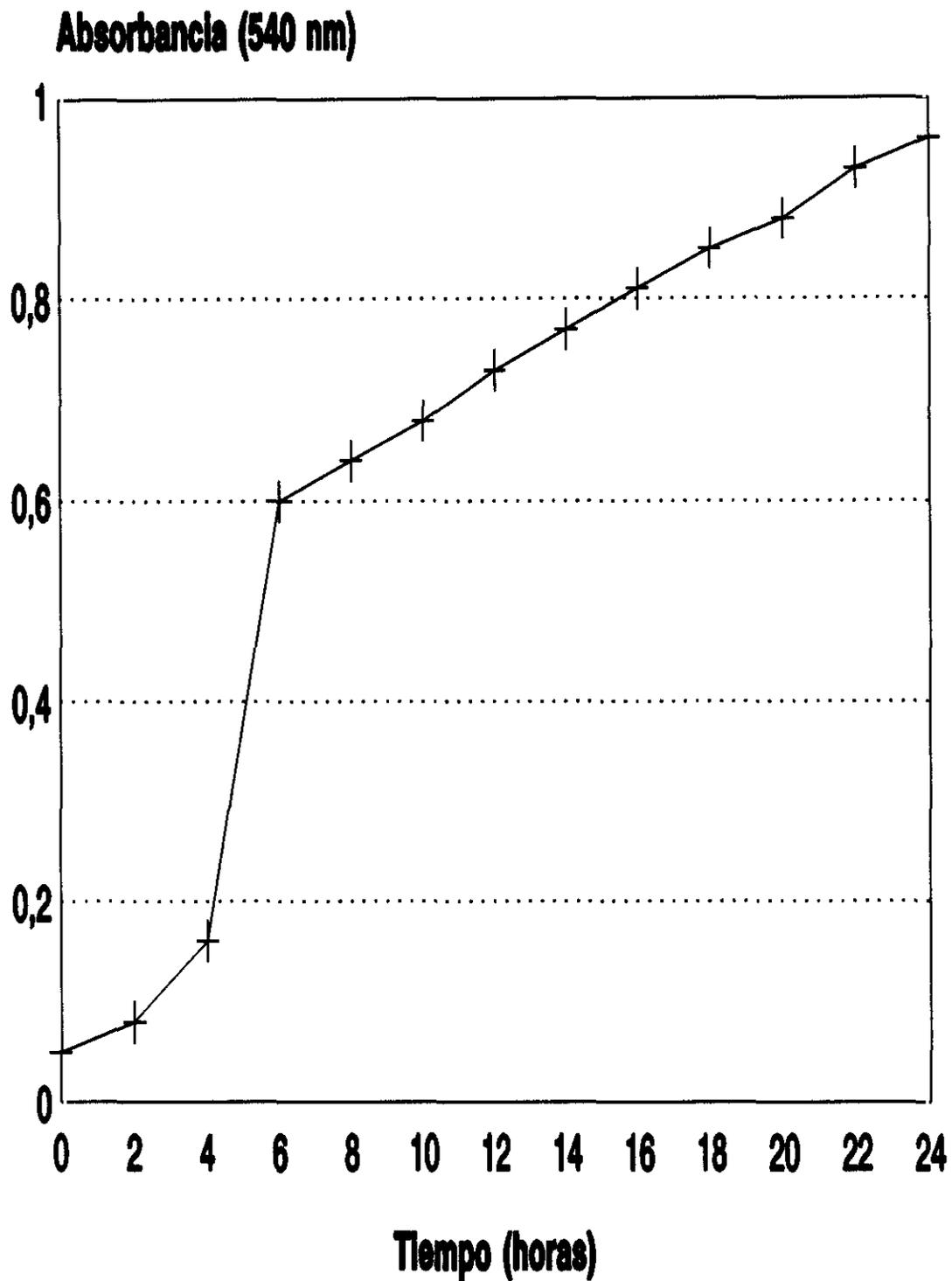
#### Efecto fungicida de los PMN sobre *Candida albicans* pretratada con fluconazol.

La previa incubación de *C. albicans* con 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  trajo como resultado un aumento de su sensibilidad a los mecanismos microbicidas de los PMN que fue significativo sólo a la primera hora, siendo del 44%. ( $p < 0,05$ ).

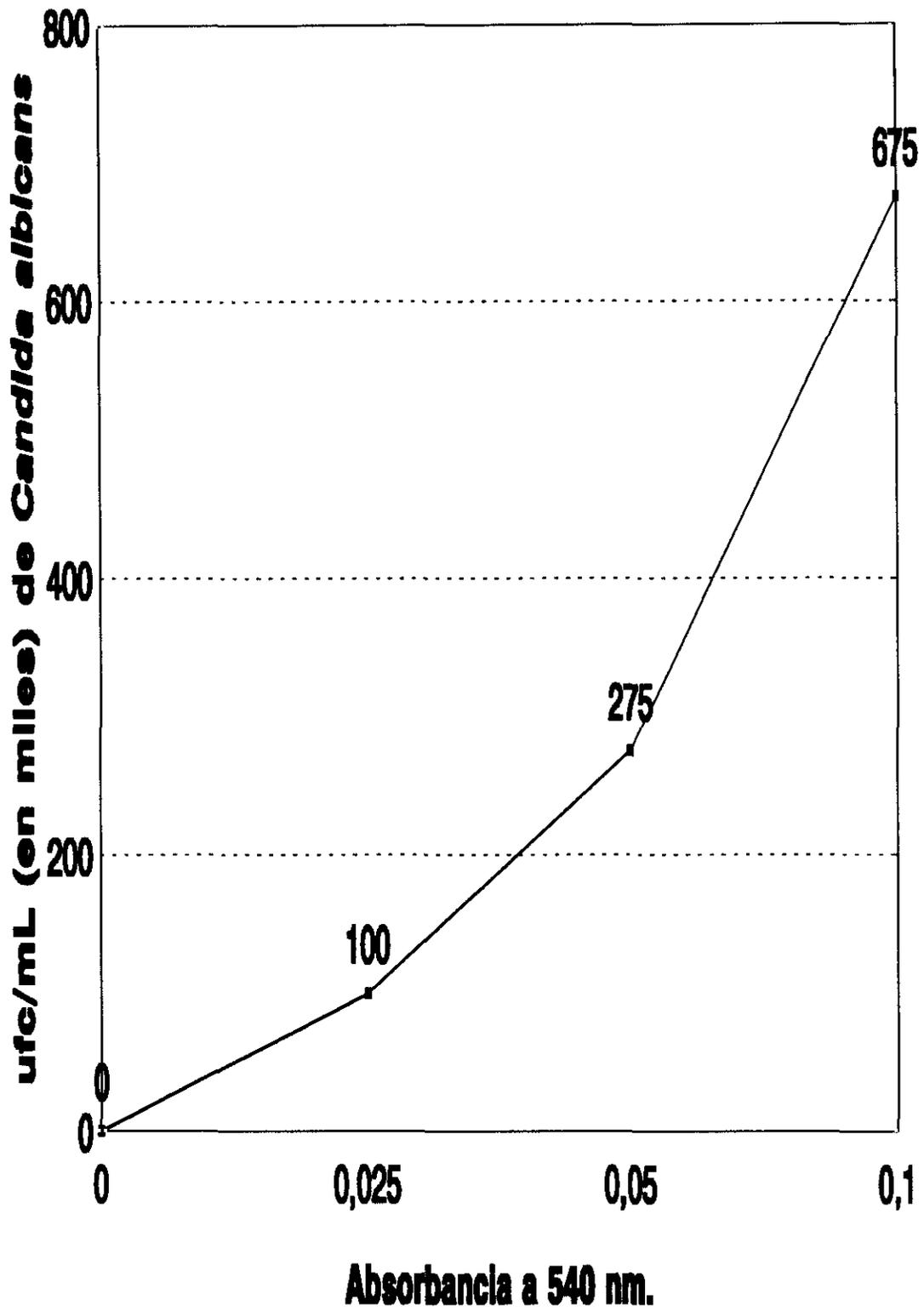
#### Efecto fungicida de los PMN sobre *Candida albicans* pretratada con flucitosina.

El pretratamiento con este agente a una concentración de 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  produjo en la levadura la mayor tasa de muerte intracelular registrada en los estudios de los cuales esta Memoria es objeto, y fue a la primera hora del 122%, del 90% a la segunda y del 77% a la tercera ( $p < 0,05$ ).

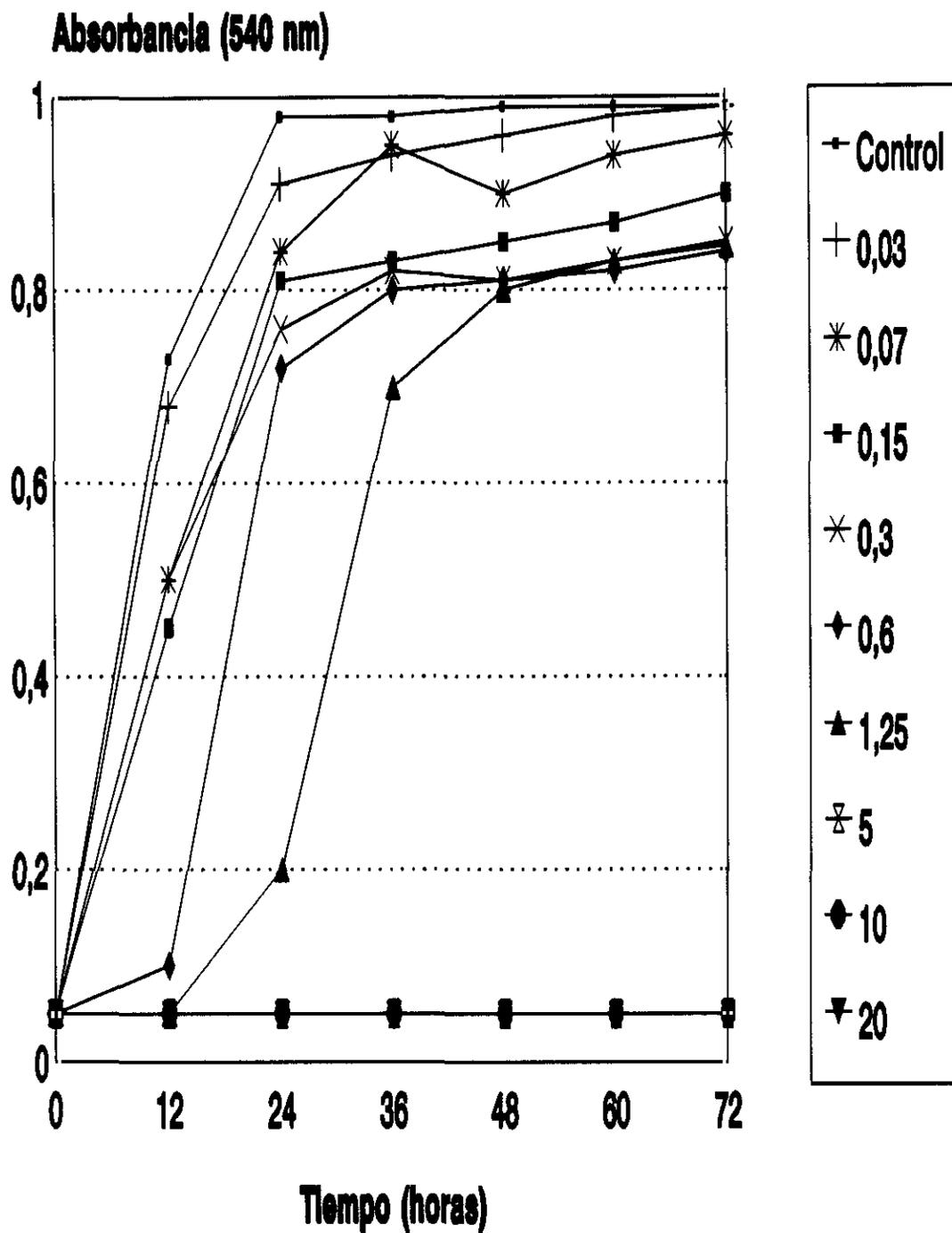
TABLAS Y GRAFICAS



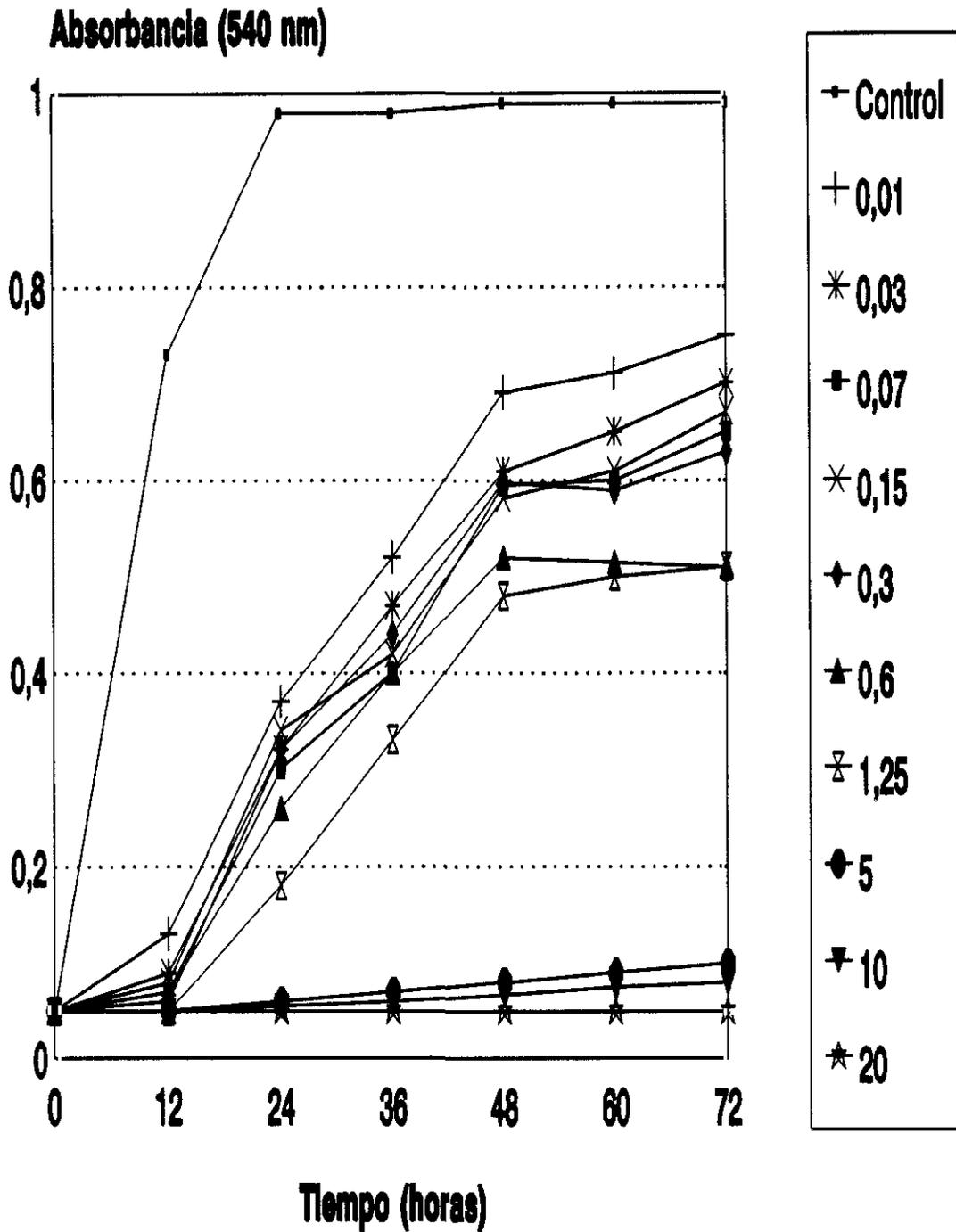
Gráfica 1. Curva de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 en la que se relacionan absorbancias medidas a 540 nanómetros con tiempos de lectura.



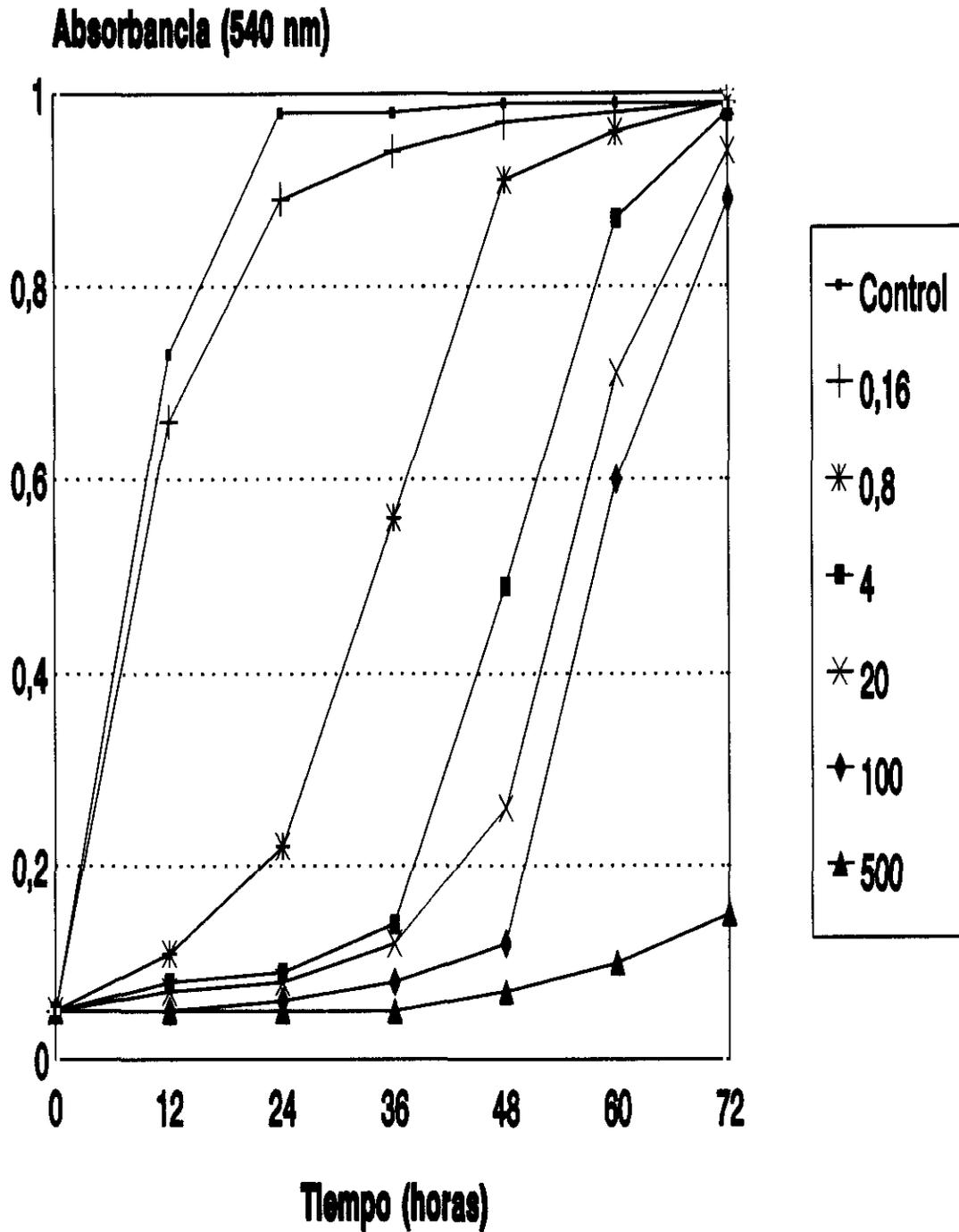
Gráfica 2. Equivalencia entre absorbancias medidas a 540 nanómetros y ufc/mL.



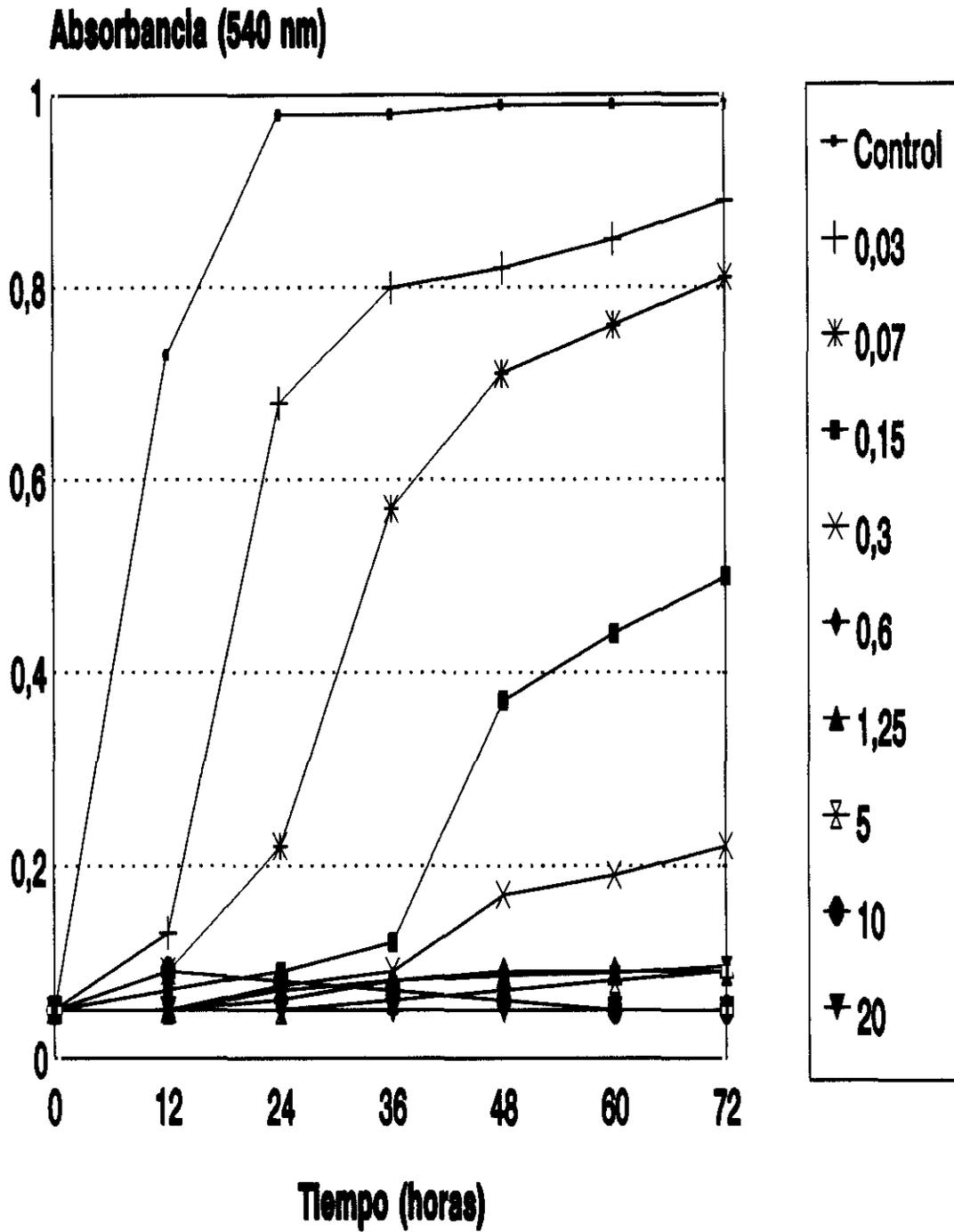
Gráfica 3. Efecto del incremento de la concentración de anfotericina B en el crecimiento de *Candida albicans* en medio bYNB-gl tamponado a pH 7, durante 72 horas y con un inóculo de partida de  $10^5$  ufc/mL. Las concentraciones utilizadas aparecen en la clave.



Gráfica 4. Efecto del incremento de la concentración de ketoconazol en el crecimiento de *Candida albicans* en medio bYNB-gl tamponado a pH 7, durante 72 horas y con un inóculo de partida de  $10^5$  ufc/mL. Las concentraciones utilizadas aparecen en la clave.



Gráfica 5. Efecto del incremento de la concentración de fluconazol en el crecimiento de *Candida albicans* en medio bYNB-gl tamponado a pH 7, durante 72 horas y con un inóculo de partida de  $10^5$  ufc/mL. Las concentraciones utilizadas aparecen en la clave.



Gráfica 6. Efecto del incremento de la concentración de flucitosina en el crecimiento de *Candida albicans* en medio bYNB-gl tamponado a pH 7, durante 72 horas y con un inóculo de partida de  $10^5$  ufc/mL. Las concentraciones utilizadas aparecen en la clave.

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>SC</b>	<b>ST</b>	<b>PS</b>	<b>PT</b>	<b>Retraso en el Crecimiento</b>	<b>Efecto Fungicida</b>
<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>1</b>	<b>0,00±0,05</b>	<b>0,03±0,02</b>	<b>-0,02±0,01</b>	<b>-0,2±0,002</b>	<b>66%</b>	<b>100%</b>
<b>2</b>	<b>0,3±0,08</b>	<b>0,15±0,04</b>	<b>-0,16±0,02</b>	<b>-0,5±0,003</b>	<b>50%</b>	<b>41%</b>
<b>3</b>	<b>0,48±0,04</b>	<b>0,25±0,02</b>	<b>-0,3±0,03</b>	<b>-0,78±0,001</b>	<b>48%</b>	<b>32%</b>

Gráfica 7. Variación del crecimiento y efecto fungicida de PMN humanos sobre *Candida albicans* sin tratar y tratada durante 6 horas con 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de anfotericina B. SC: levaduras sin tratar, en presencia de suero; ST: levaduras tratadas, en presencia de suero; PS: levaduras sin tratar, en presencia de suero y PMN; PT: levaduras tratadas, en presencia de suero y PMN; RC: porcentaje de retraso en el crecimiento de ST respecto a SC; EF: efecto fungicida de PMN sobre *Candida albicans*. Los resultados se expresan como variación de  $\log_{10}\text{ufc}/\text{mL}$ . Nivel de significación:  $p < 0,05$ . Curvas realizadas a partir de 8 individuos.

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>SC</b>	<b>ST</b>	<b>PS</b>	<b>PT</b>	<b>Retraso en el Crecimiento</b>	<b>Efecto Fungicida</b>
<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>1</b>	<b>0,13±0.04</b>	<b>0,02±0.006</b>	<b>-0,13±0.05</b>	<b>-0,5±0.1</b>	<b>85%</b>	<b>80%</b>
<b>2</b>	<b>0,43±0.06</b>	<b>0,13±0.04</b>	<b>-0,1±0.03</b>	<b>-0,82±0,005</b>	<b>65%</b>	<b>54%</b>
<b>3</b>	<b>0,57±0.05</b>	<b>0,34±0.05</b>	<b>-0,35±0.1</b>	<b>-0,82±0.07</b>	<b>34%</b>	<b>32%</b>

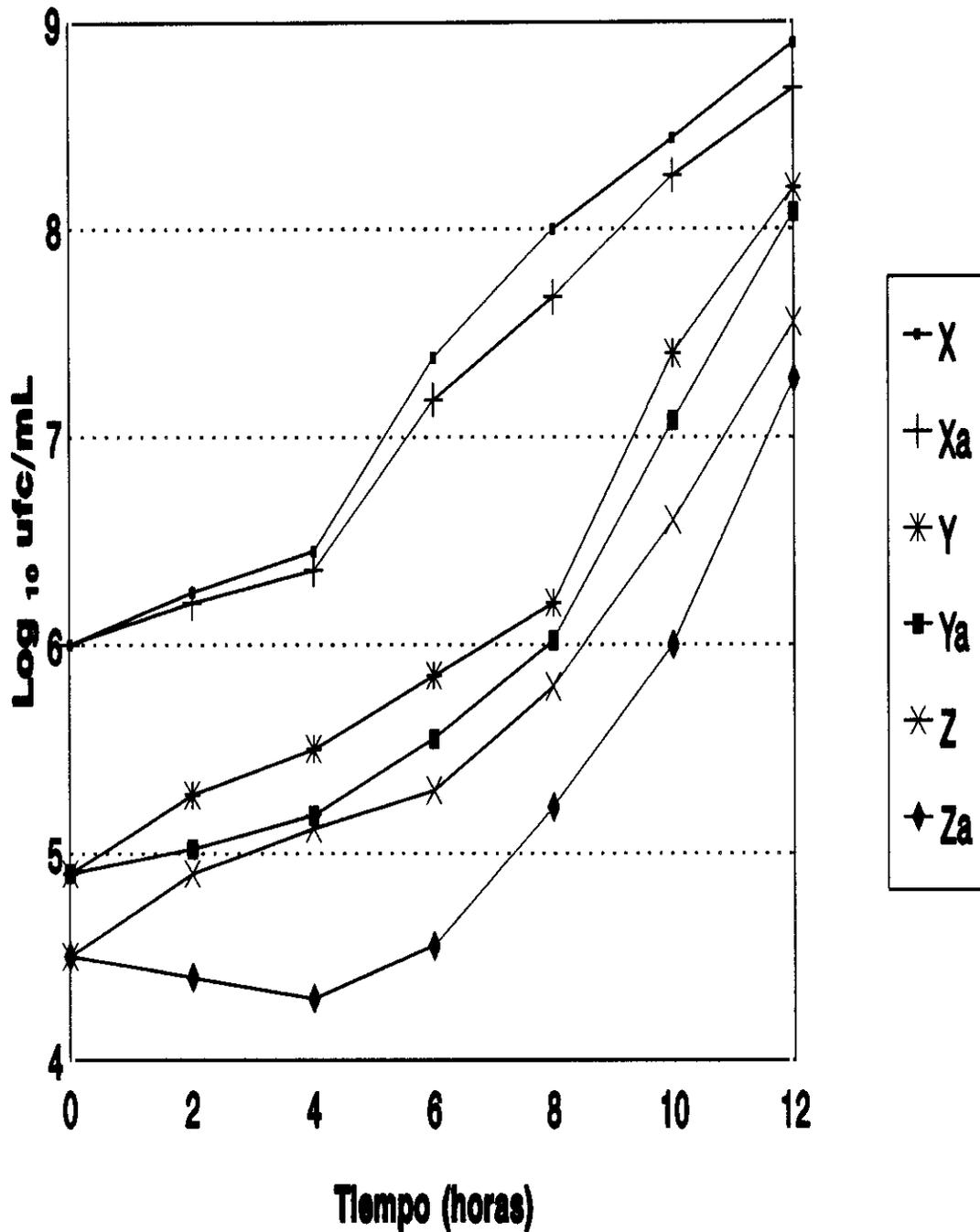
Gráfica 8. Variación del crecimiento y efecto fungicida de PMN humanos sobre *Candida albicans* sin tratar y tratada durante 6 horas con 1  $\mu$ gr/mL de ketoconazol. SC: levaduras sin tratar, en presencia de suero; ST: levaduras tratadas, en presencia de suero; PS: levaduras sin tratar, en presencia de suero y PMN; PT: levaduras tratadas, en presencia de suero y PMN; RC: porcentaje de retraso en el crecimiento de ST respecto a SC; EF: efecto fungicida de PMN sobre *Candida albicans*. Los resultados se expresan como variación de  $\log_{10}$  ufc/mL. Nivel de significación:  $p < 0,05$ . Curvas realizadas a partir de 8 individuos.

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>SC</b>	<b>ST</b>	<b>PS</b>	<b>PT</b>	<b>Retraso en el Crecimiento</b>	<b>Efecto Fungicida</b>
<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>1</b>	<b>0,15±0,03</b>	<b>0,04±0,03</b>	<b>-0,08±0,03</b>	<b>-0,26±0,04</b>	<b>72%</b>	<b>44%</b>
<b>2</b>	<b>0,5±0,06</b>	<b>0,2±0,04</b>	<b>-0,27±0,06</b>	<b>-0,36±0,09</b>	<b>60%</b>	<b>ns.</b>
<b>3</b>	<b>0,65±0,05</b>	<b>0,29±0,07</b>	<b>-0,42±0,06</b>	<b>-0,54±0,09</b>	<b>55%</b>	<b>ns.</b>

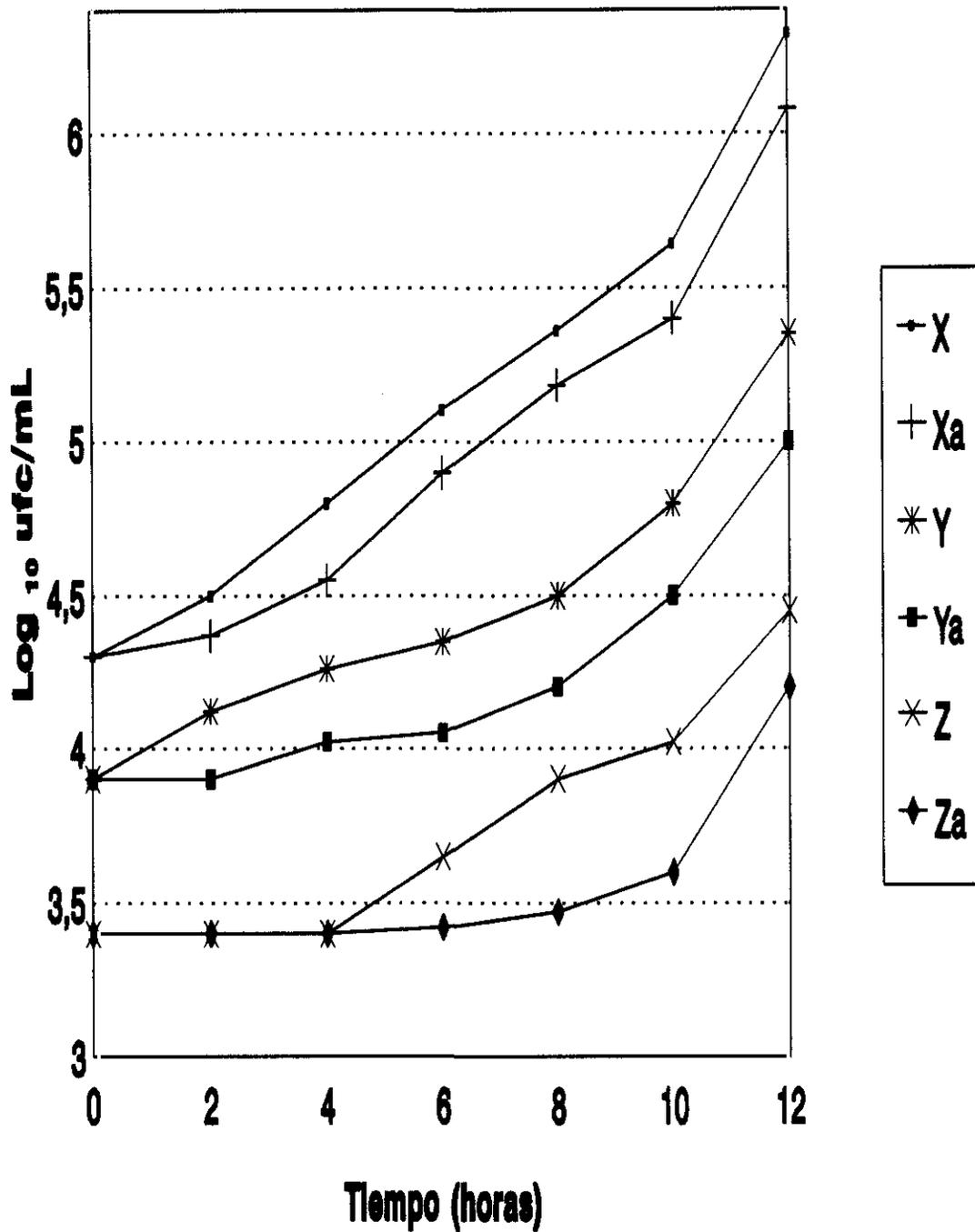
Gráfica 9. Variación del crecimiento y efecto fungicida de PMN humanos sobre *Candida albicans* sin tratar y tratada durante 6 horas con 4  $\mu$ gr/mL de fluconazol. SC: levaduras sin tratar, en presencia de suero; ST: levaduras tratadas, en presencia de suero; PS: levaduras sin tratar, en presencia de suero y PMN; PT: levaduras tratadas, en presencia de suero y PMN; RC: porcentaje de retraso en el crecimiento de ST respecto a SC; EF: efecto fungicida de PMN sobre *Candida albicans*. Los resultados se expresan como variación de  $\log_{10}$  ufc/mL. Nivel de significación:  $p < 0,05$ ; ns., no significativo. Curvas realizadas a partir de 8 individuos.

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>SC</b>	<b>ST</b>	<b>PS</b>	<b>PT</b>	<b>Retraso en el Crecimiento</b>	<b>Efecto Fungicida</b>
<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>1</b>	<b>0,12±0.07</b>	<b>0,01±0.008</b>	<b>-0,06±0.05</b>	<b>-0,39±0.1</b>	<b>91%</b>	<b>122%</b>
<b>2</b>	<b>0,29±0.04</b>	<b>0,1±0.05</b>	<b>-0,14±0.04</b>	<b>-0,72±0.05</b>	<b>65%</b>	<b>90%</b>
<b>3</b>	<b>0,55±0.04</b>	<b>0,25±0,06</b>	<b>-0,15±0.03</b>	<b>-0,99±0,14</b>	<b>54%</b>	<b>77%</b>

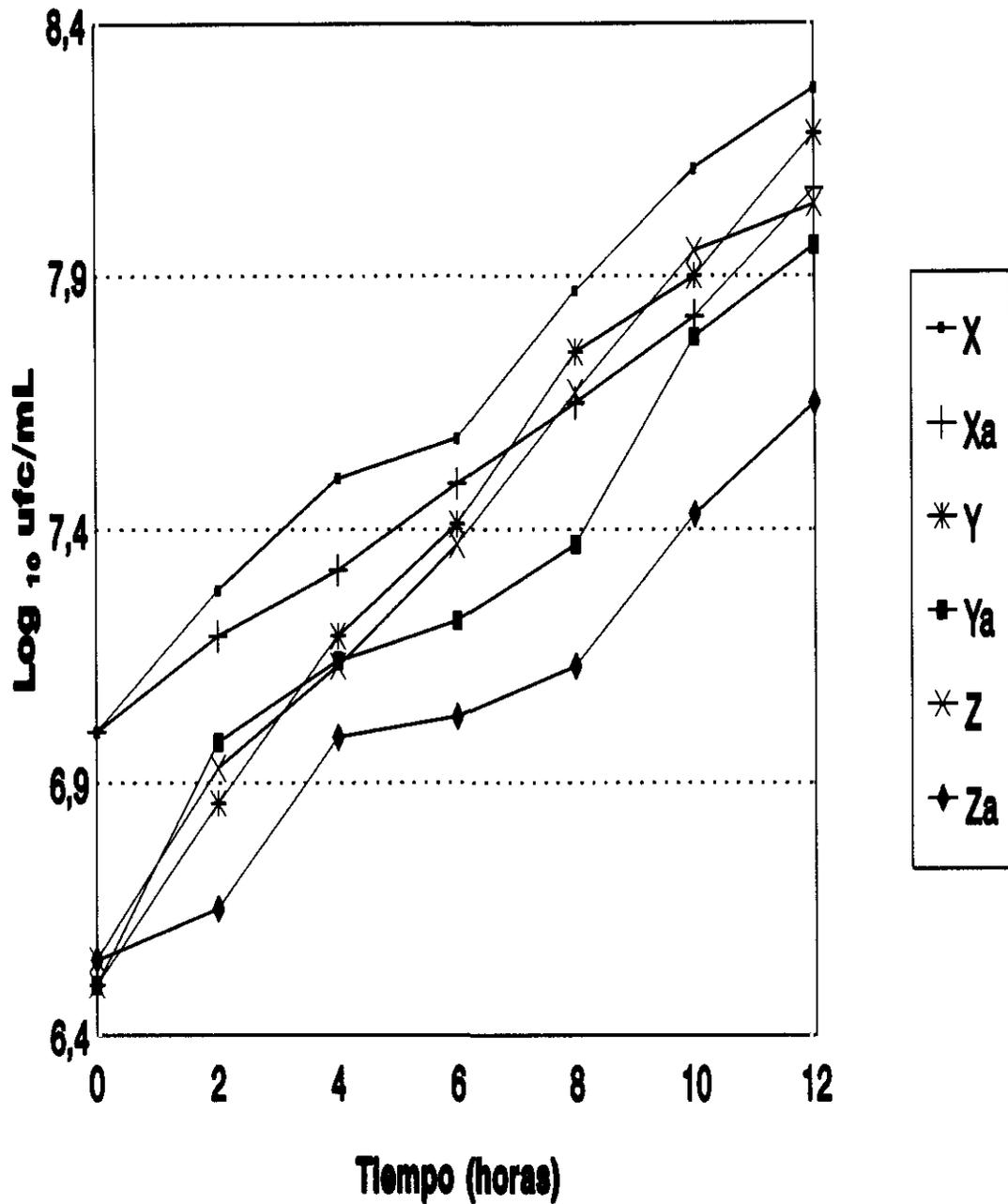
Gráfica 10. Variación del crecimiento y efecto fungicida de PMN humanos sobre *Candida albicans* sin tratar y tratada durante 6 horas con 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de flucitosina. SC: levaduras sin tratar, en presencia de suero; ST: levaduras tratadas, en presencia de suero; PS: levaduras sin tratar, en presencia de suero y PMN; PT: levaduras tratadas, en presencia de suero y PMN; RC: porcentaje de retraso en el crecimiento de ST respecto a SC; EF: efecto fungicida de PMN sobre *Candida albicans*. Los resultados se expresan como variación de  $\log_{10}\text{ufc}/\text{mL}$ . Nivel de significación:  $p < 0,05$ . Curvas realizadas a partir de 8 individuos.



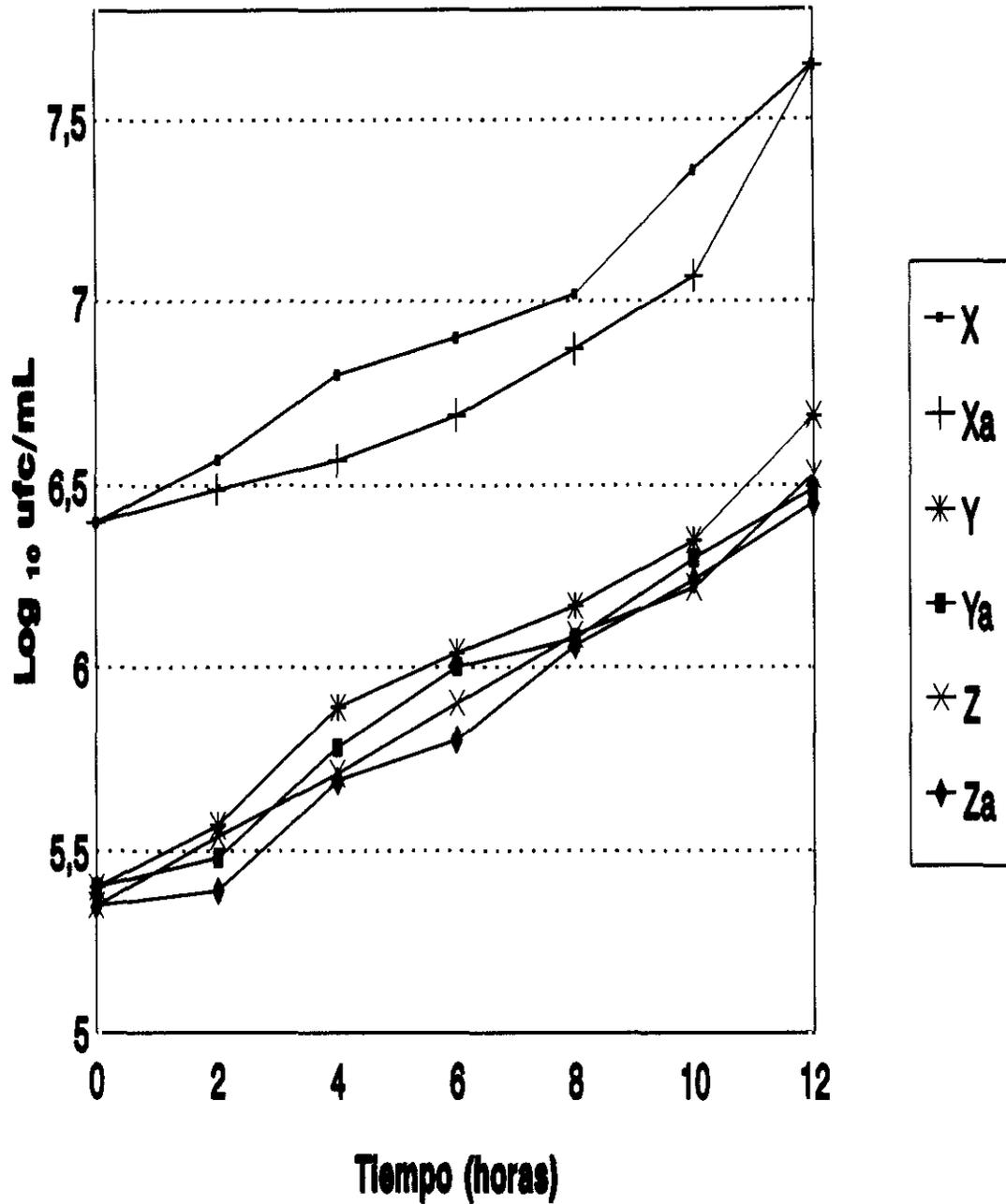
Gráfica 11. Efecto Postantifúngico de anfotericina B en ausencia de suero. Curvas de crecimiento de *Candida albicans* sin tratar (X) y tratadas con 0,5 (Y) y 1  $\mu$ gr/mL (Z) de anfotericina B durante 12 horas, y efecto de 0,25 gr/mL de anfotericina B sobre *Candida albicans* control (Xa) y en fase PAFE (Ya, Za). Los resultados vienen expresados como  $\log_{10}$  ufc/mL.



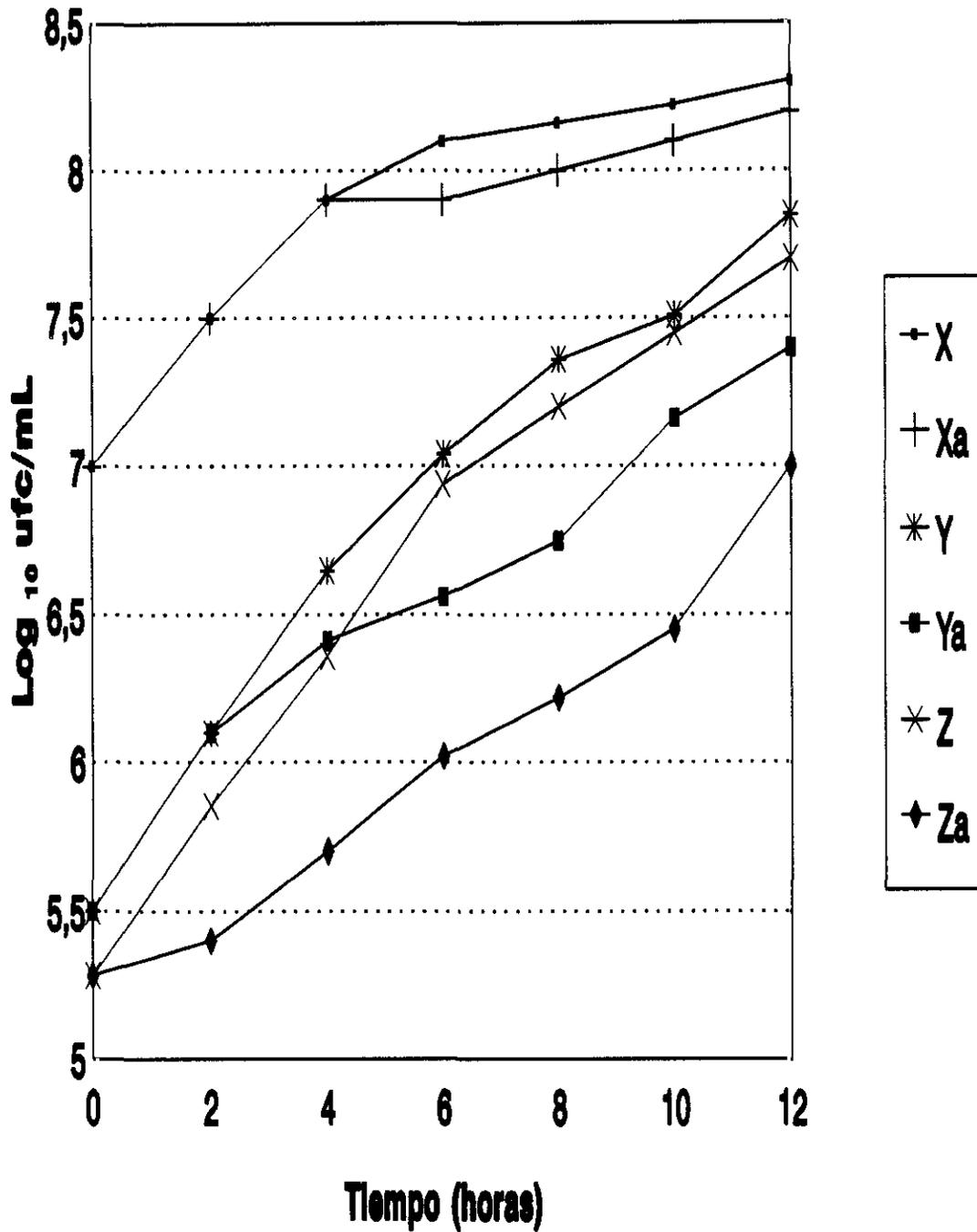
Gráfica 12. Efecto Postantifúngico de anfotericina B en presencia de suero. Curvas de crecimiento de *Candida albicans* sin tratar (X) y tratadas con 0,5 (Y) y 1  $\mu$ gr/mL (Z) de anfotericina B durante 12 horas, y efecto de 0,25 gr/mL de anfotericina B sobre *Candida albicans* control (Xa) y en fase PAFE (Ya, Za). Los resultados vienen expresados como  $\log_{10}$  ufc/mL.



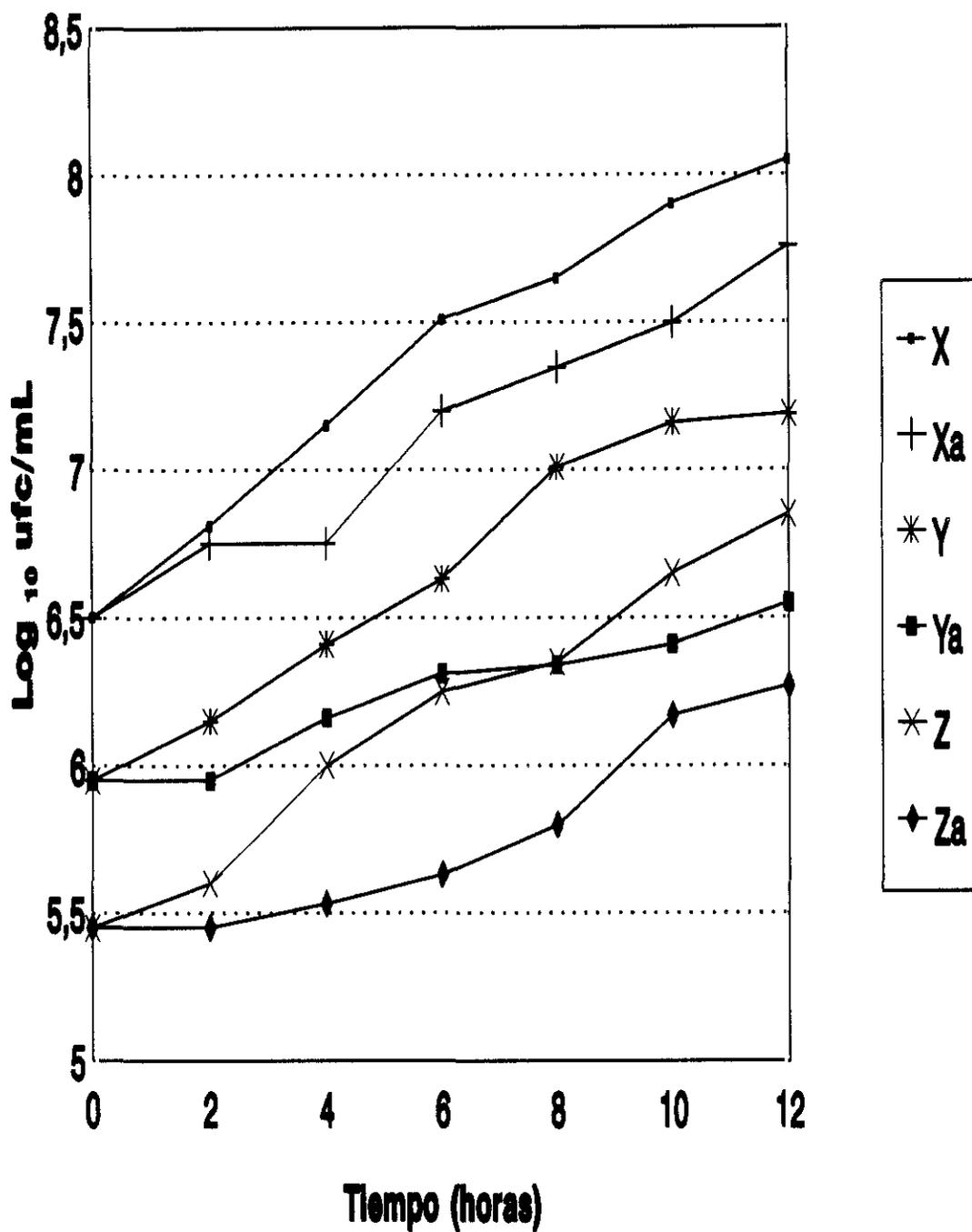
Gráfica 13. Efecto Postantifúngico de ketoconazol en ausencia de suero. Curvas de crecimiento de *Candida albicans* sin tratar (X) y tratadas con 1 (Y) y 4  $\mu\text{gr/mL}$  (Z) de ketoconazol durante 12 horas, y efecto de 1  $\mu\text{gr/mL}$  de ketoconazol sobre *Candida albicans* control (Xa) y en fase PAFE (Za). Efecto de 0,25  $\mu\text{gr/mL}$  de ketoconazol sobre *C. albicans* en fase PAFE (Ya). Los resultados se expresan como  $\log_{10}\text{ufc/mL}$ .



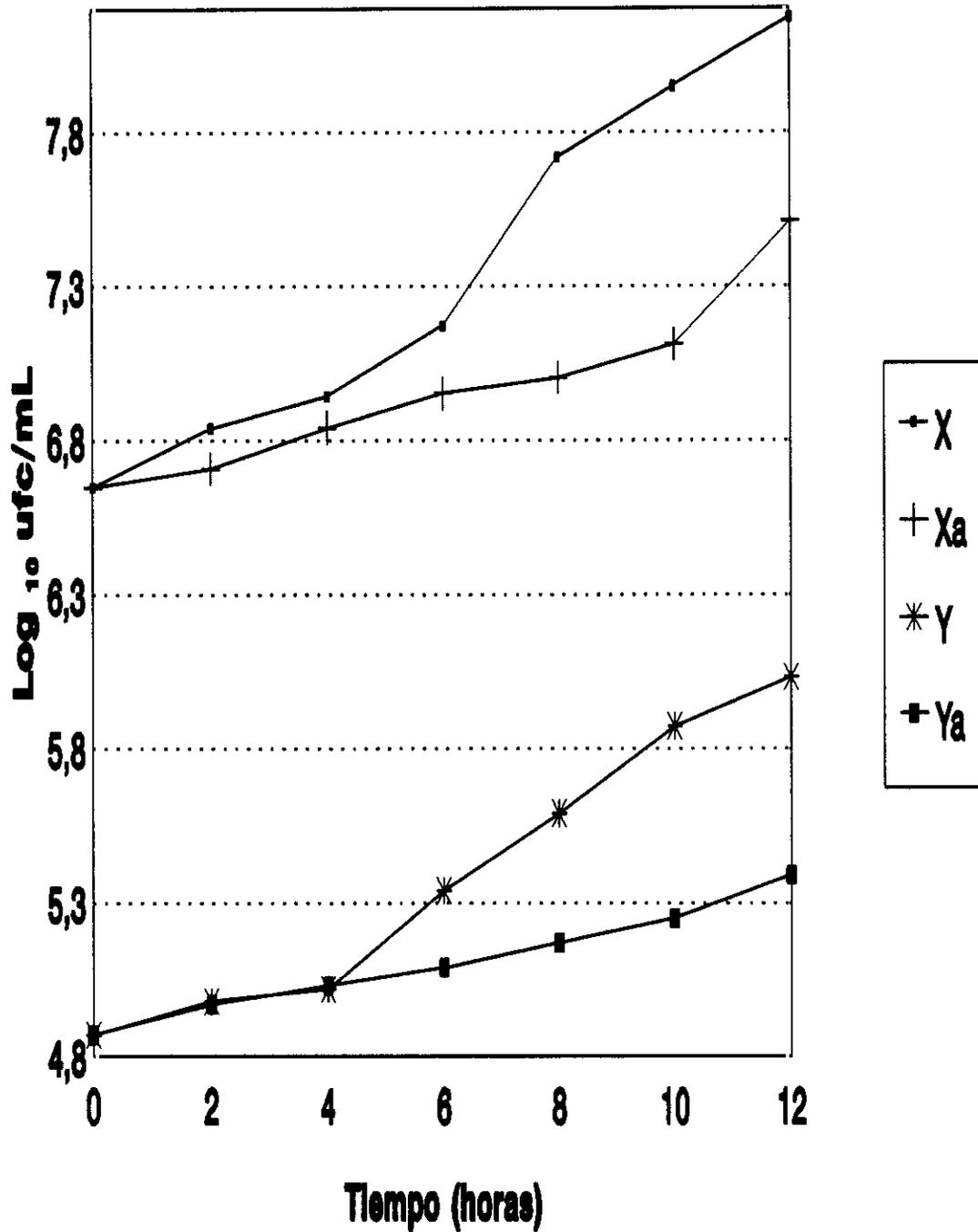
Gráfica 14. Efecto Postantifúngico de ketoconazol en presencia de suero. Curvas de crecimiento de *Candida albicans* sin tratar (X) y tratadas con 1 (Y) y 4  $\mu\text{gr/mL}$  (Z) de ketoconazol durante 12 horas, y efecto de 1  $\mu\text{gr/mL}$  de ketoconazol sobre *Candida albicans* control (Xa) y en fase PAFE (Za). Efecto de 0,25  $\mu\text{gr/mL}$  de ketoconazol sobre *C. albicans* en fase PAFE (Ya). Los resultados se expresan como  $\log_{10}$  ufc/mL.



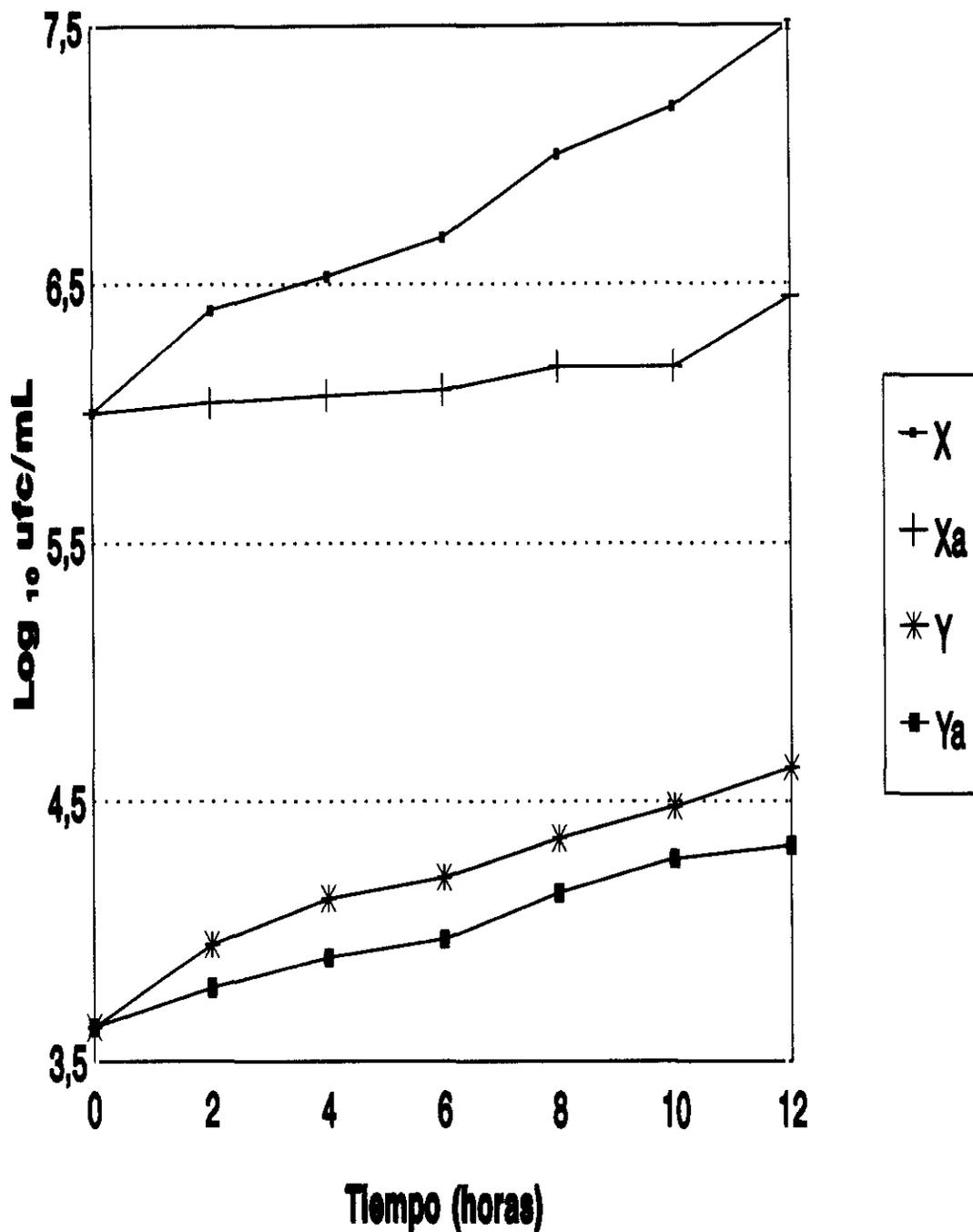
Gráfica 15. Efecto Postantifúngico de fluconazol en ausencia de suero. Curvas de crecimiento de *Candida albicans* sin tratar (X) y tratadas con 4 (Y) y 8  $\mu\text{g/mL}$  (Z) de fluconazol durante 12 horas, y efecto de 1  $\mu\text{g/mL}$  de fluconazol sobre *Candida albicans* control (Xa) y en fase PAFE (Ya, Za). Los resultados vienen expresados como  $\text{log}_{10} \text{ ufc/mL}$ .



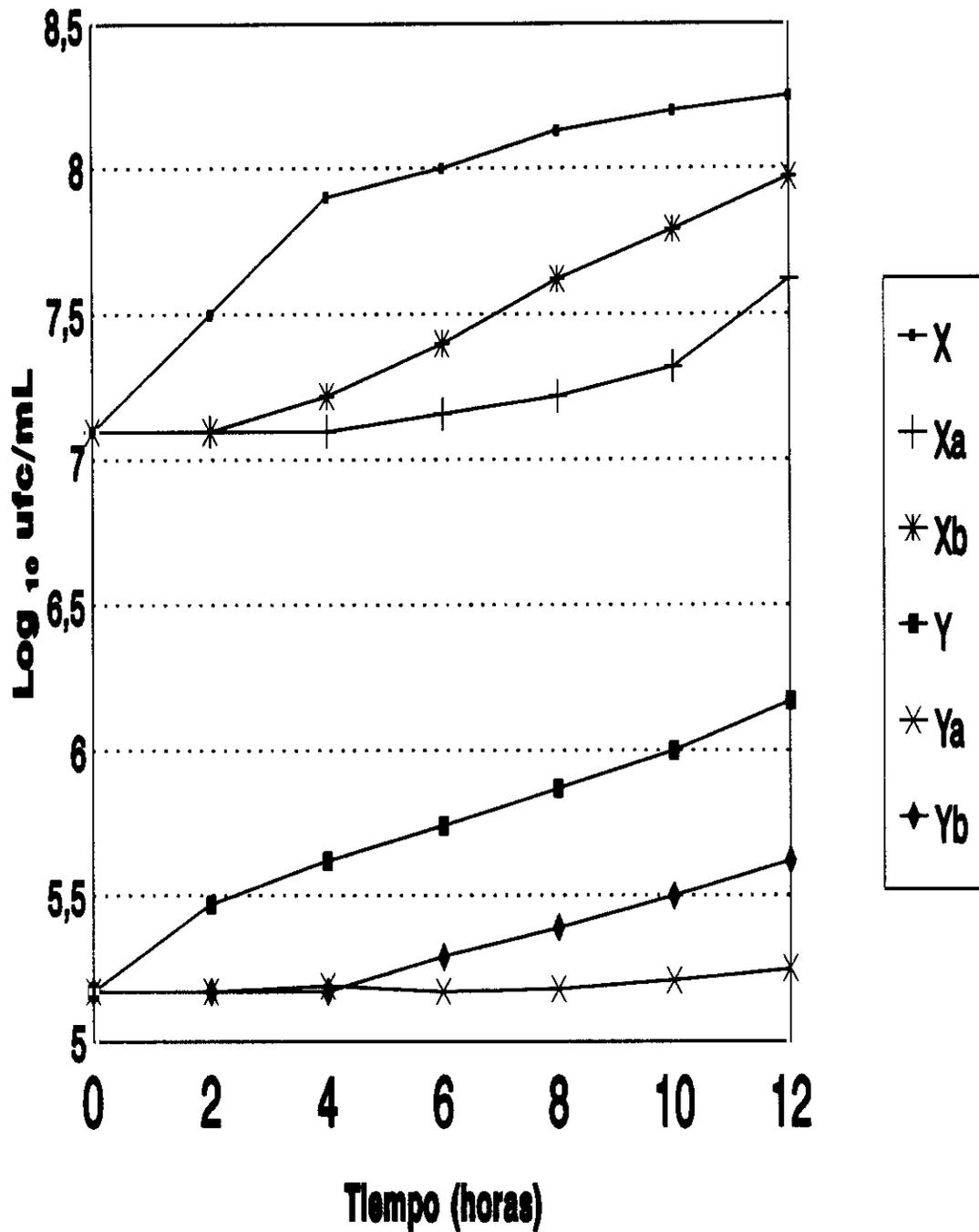
Gráfica 16. Efecto Postantifúngico de fluconazol en presencia de suero. Curvas de crecimiento de *Candida albicans* sin tratar (X) y tratadas con 4 (Y) y 8  $\mu\text{g/mL}$  (Z) de fluconazol durante 12 horas, y efecto de 1  $\mu\text{g/mL}$  de fluconazol sobre *Candida albicans* control (Xa) y en fase PAFE (Ya, Za). Los resultados vienen expresados como  $\log_{10}$  ufc/mL.



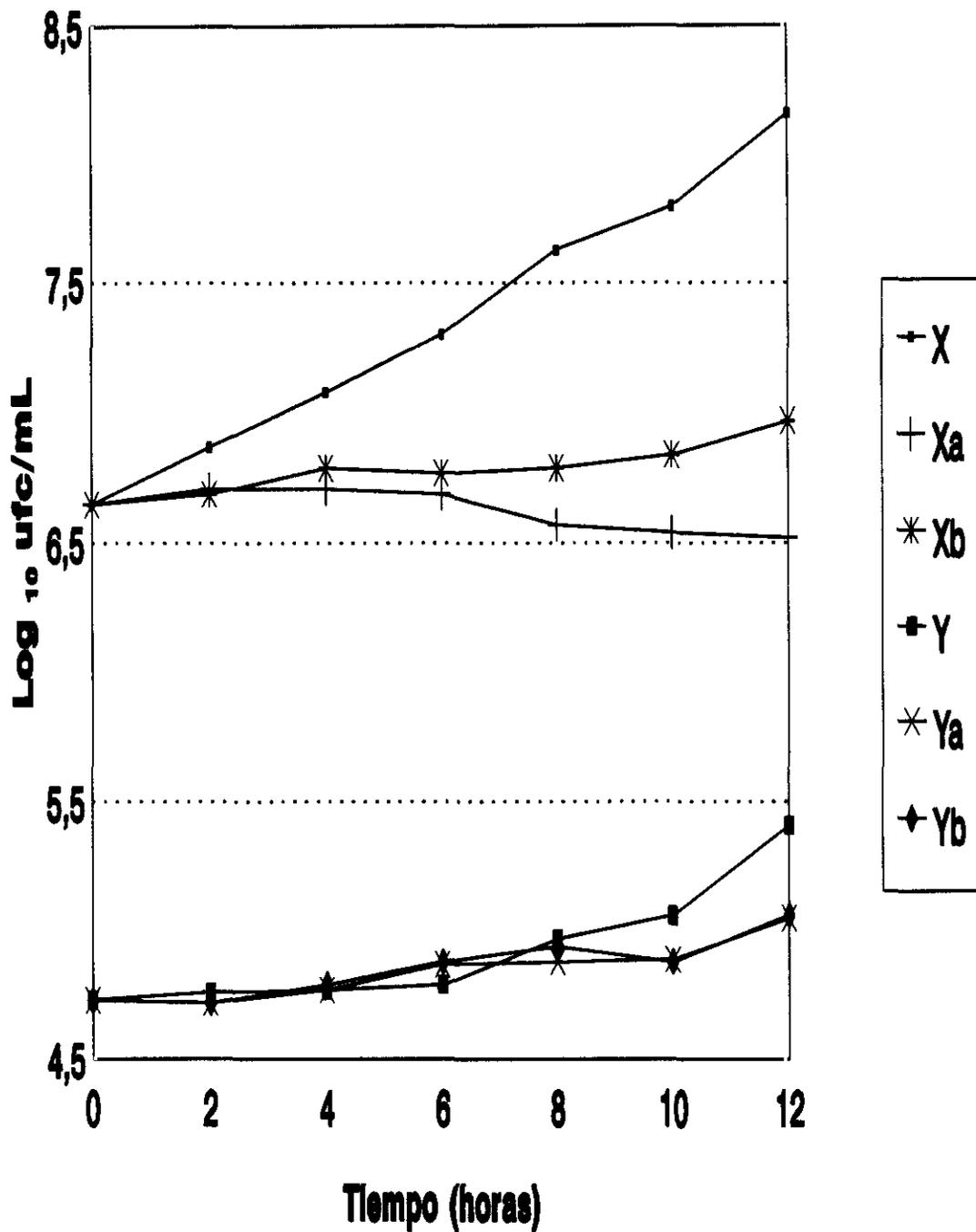
Gráfica 17. Efecto Postantifúngico de flucitosina en ausencia de suero. Curvas de crecimiento de *Candida albicans* sin tratar (X) y tratadas con 4  $\mu\text{g/mL}$  (Y) de flucitosina durante 12 horas, y efecto de 1  $\mu\text{g/mL}$  de flucitosina sobre *Candida albicans* control (Xa) y en fase PAFE (Ya). Los resultados están expresados como  $\text{log}_{10} \text{ ufc/mL}$ .



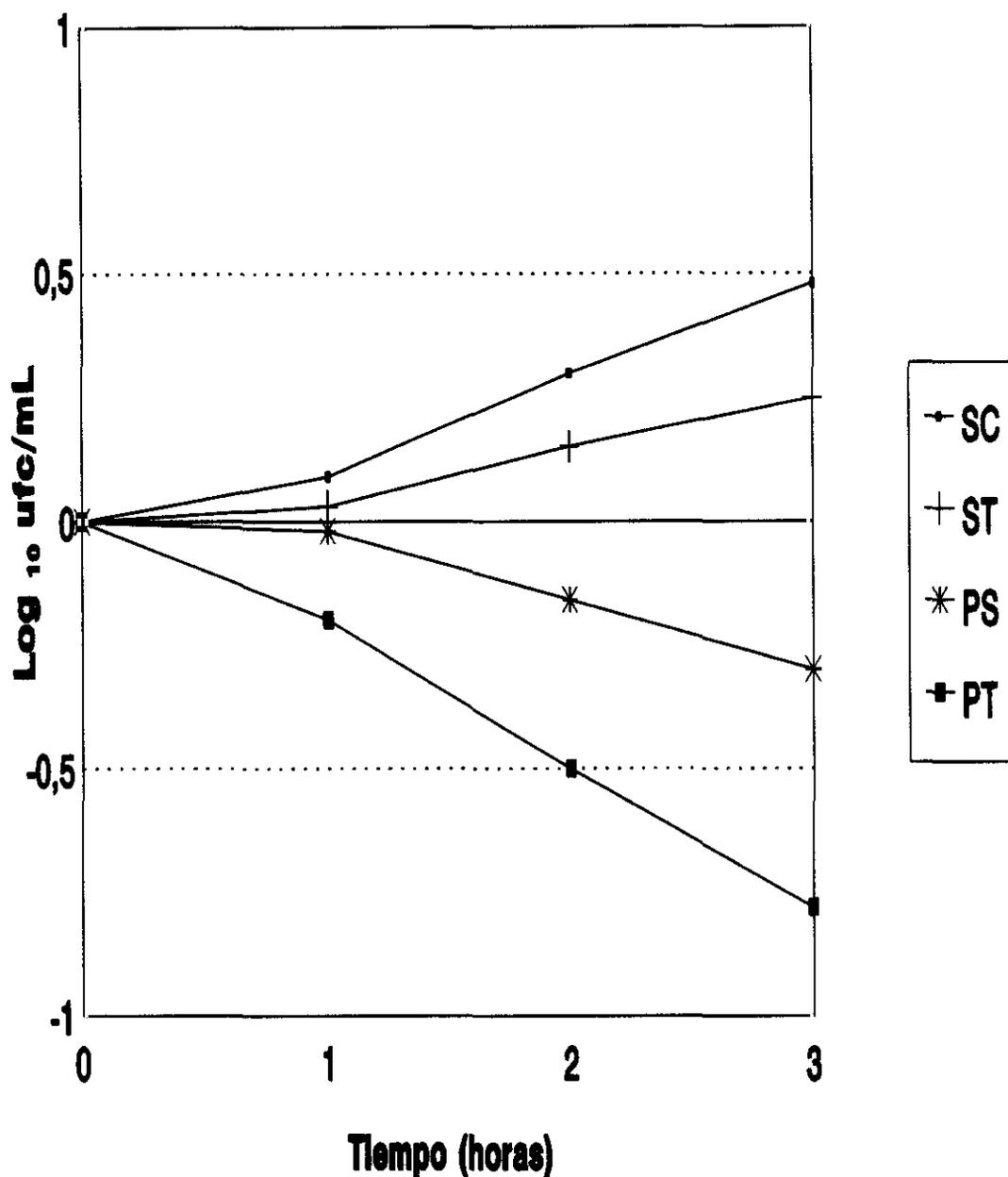
Gráfica 18. Efecto Postantifúngico de flucitosina en presencia de suero. Curvas de crecimiento de *Candida albicans* sin tratar (X) y tratadas con 4 µgr/mL (Y) de flucitosina durante 12 horas, y efecto de 1 µgr/mL de flucitosina sobre *Candida albicans* control (Xa) y en fase PAFE (Ya). Los resultados se expresan como log<sub>10</sub>ufc/mL.



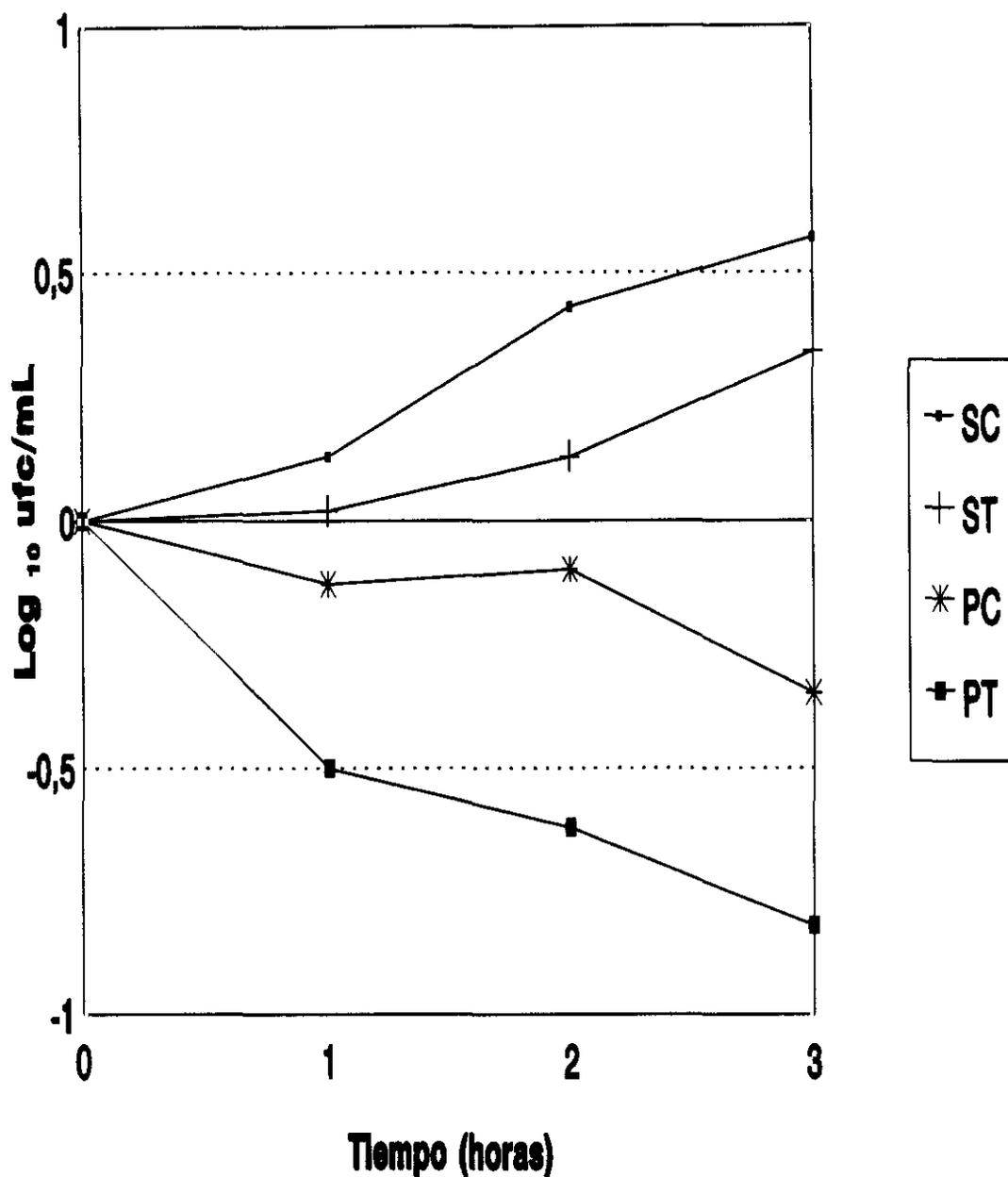
Gráfica 19. Efecto Postantifúngico de flucitosina en ausencia de suero. Curvas de crecimiento de *Candida albicans* sin tratar (X) y tratadas con 20 µgr/mL (Y) de flucitosina durante 12 horas, y efecto de 5 y 1 µgr/mL de flucitosina sobre *Candida albicans* control (Xa, Xb, respectivamente) y en fase PAFE (Ya, Yb, respectivamente). Los resultados se expresan como log<sub>10</sub>ufc/mL.



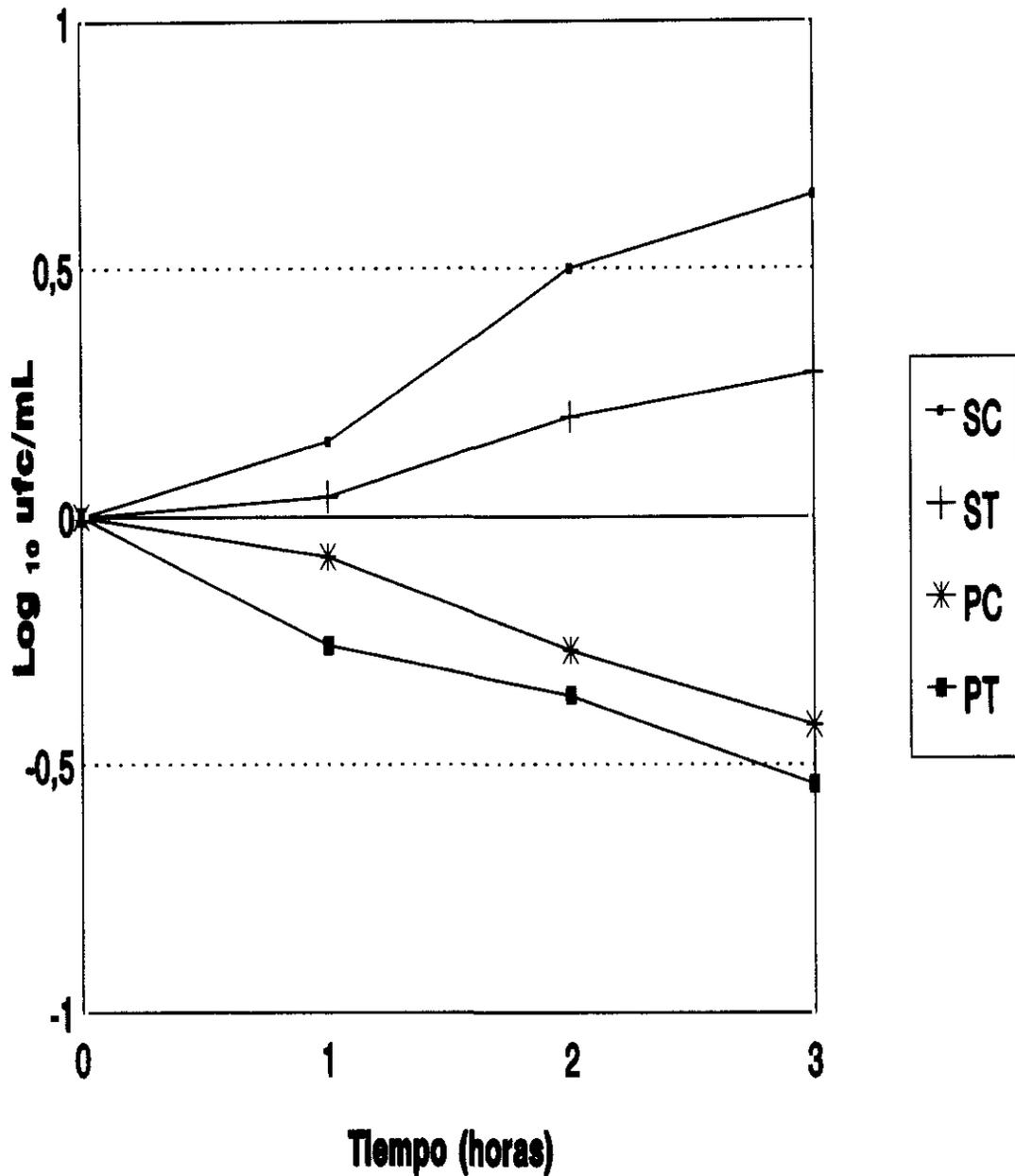
Gráfica 20. Efecto Postantifúngico de flucitosina en presencia de suero. Curvas de crecimiento de *Candida albicans* sin tratar (X) y tratadas con 20  $\mu$ gr/mL (Y) de flucitosina durante 12 horas, y efecto de 5 y 1  $\mu$ gr/mL de flucitosina sobre *Candida albicans* control (Xa, Xb, respectivamente) y en fase PAFE (Ya, Yb, respectivamente). Los resultados se expresan como  $\log_{10}$  ufc/mL.



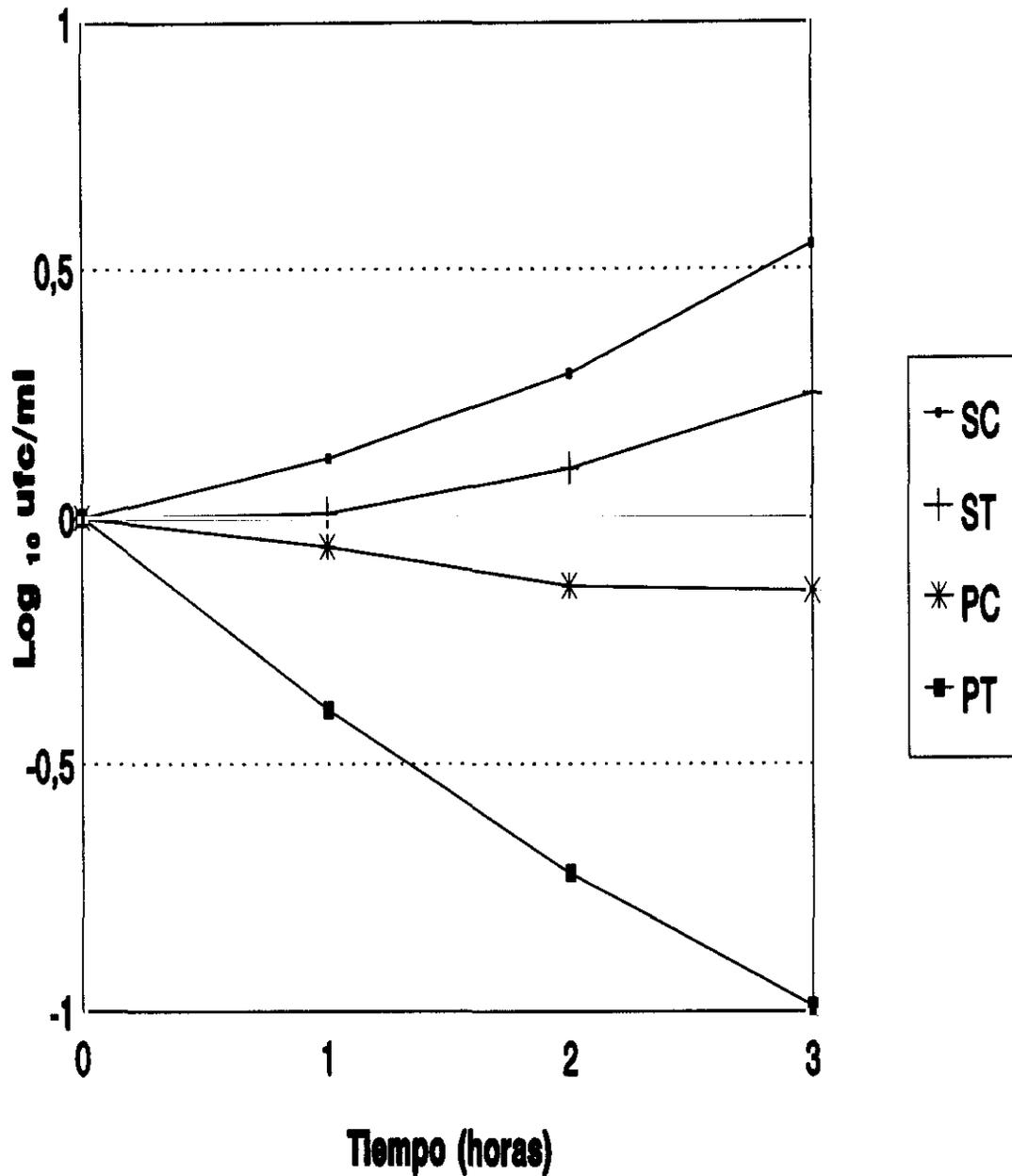
Gráfica 21. Actividad fungicida de PMN humanos sobre *Candida albicans* sin tratar y tratada previamente con 1  $\mu$ gr/mL de anfotericina B durante 6 horas. SC: levaduras sin tratar, en presencia de suero; ST: levaduras tratadas, en presencia de suero; PS: levaduras sin tratar, en presencia de suero y PMN; PT: levaduras tratadas, en presencia de suero y PMN. Los resultados se expresan como  $\log_{10}$  ufc/mL. Curvas realizadas a partir de 6 determinaciones y usando PMN de distintos individuos. Significancia:  $p < 0,05$ .



Gráfica 22. Actividad fungicida de PMN humanos sobre *Candida albicans* sin tratar y tratada previamente con 1  $\mu$ gr/mL de ketoconazol durante 6 horas. SC: levaduras sin tratar, en presencia de suero; ST: levaduras tratadas, en presencia de suero; PS: levaduras sin tratar, en presencia de suero y PMN; PT: levaduras tratadas, en presencia de suero y PMN. Los resultados se expresan como  $\log_{10}$  ufc/mL. Curvas realizadas a partir de 6 determinaciones y usando PMN de distintos individuos. Significancia:  $p < 0,05$ .



Gráfica 23. Actividad fungicida de PMN humanos sobre *Candida albicans* sin tratar y tratada previamente con 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de fluconazol durante 6 horas. SC: levaduras sin tratar, en presencia de suero; ST: levaduras tratadas, en presencia de suero; PS: levaduras sin tratar, en presencia de suero y PMN; PT: levaduras tratadas, en presencia de suero y PMN. Los resultados se expresan como  $\log_{10}\text{ufc}/\text{mL}$ . Curvas realizadas a partir de 6 determinaciones y usando PMN de distintos individuos. Significancia:  $p < 0,05$ . Las horas 2 y 3 no son significativas.



Gráfica 24. Actividad fungicida de PMN humanos sobre *Candida albicans* sin tratar y tratada previamente con 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de flucitosina durante 6 horas. SC: levaduras sin tratar, en presencia de suero; ST: levaduras tratadas, en presencia de suero; PS: levaduras sin tratar, en presencia de suero y PMN; PT: levaduras tratadas, en presencia de suero y PMN. Los resultados se expresan como  $\log_{10}\text{ufc}/\text{mL}$ . Curvas realizadas a partir de 6 determinaciones y usando PMN de distintos individuos. Significancia:  $p < 0,05$ .

DISCUSSION

DISCUSION DE LOS EFECTOS POSTANTIFUNGICO Y DE BAJAS  
CONCENTRACIONES DE QUIMIOTERAPICO SOBRE *CANDIDA ALBICANS* EN FASE  
POSTANTIFUNGICA

En comparación con los agentes antibacterianos, los avances en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de infecciones producidas por hongos son muy recientes. De hecho, la anfotericina B, a falta de otros agentes, ha sido la piedra angular de la terapia antifúngica durante los últimos treinta años, mientras que las sulfamidas ya se utilizaban hace sesenta años; por lo tanto, no es de extrañar que exista un gran retraso en el campo de los antifúngicos.

En la actualidad se ha detectado un gran aumento de las infecciones por hongos, predominantemente en pacientes inmunodeprimidos (Horn, 1985), (Walsh, 1988), (Anaissie, 1989). Además, hongos considerados anteriormente comensales inofensivos ahora se han transformado en patógenos, y algunos de ellos son resistentes a varios antifúngicos (Lutwick, 1976), (Anaissie, 1989), (Reuben, 1989). Todo esto ha hecho que se promueva el desarrollo y producción de nuevos fármacos y también que aumente la necesidad de realizar pruebas de susceptibilidad fiables para informar a los clínicos de cuáles son los tratamientos más adecuados.

El principal problema que presentan los antifúngicos es la falta de reproducibilidad encontrada en las pruebas de susceptibilidad. Esto ha quedado patente en los trabajos de varios grupos de investigación que estudiaron una gran cantidad de fármacos entre los que se encontraban anfotericina B, flucitosina, ketoconazol y fluconazol (Calhoun, 1986), (Galgiani, 1987), (McIntyre, 1989), (Cook, 1990).

Existen varios factores que pueden alterar las pruebas de susceptibilidad; uno de ellos es el medio de incubación (Utz, 1976), (Bannatyne, 1978), (Johnson, 1978), (Calhoun, 1984), (Doern, 1986), (Galgiani, 1986), (MacKerrow, 1987). De este modo, la flucitosina puede resultar antagonizada por las purinas y pirimidinas del medio de incubación. Otro factor condicionante es el pH del medio; por

ejemplo, el ketoconazol a  $\text{pH} < 6$  puede quedar inactivo (Bannatyne, 1978), (Johnson, 1978), (Minagawa, 1983), (Calhoun, 1984).

Asimismo, el tiempo de lectura puede influir en el efecto del antifúngico y también el tamaño de inóculo, que cuanto mayor sea, mayor pérdida de susceptibilidad existe, como en los casos de la flucitosina y algunos imidazoles (Block, 1973), (Galgiani, 1976), (Galgiani, 1978), (Calhoun, 1986)

Además, existen estudios (Craig, 1991) en los que se sugiere que las concentraciones mínimas inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) y, por extensión, la concentración mínima fungicida (CMF), por sí mismas, pueden no ser buenos predictores de las actividades antibacteriana y antifúngica. Hay dos razones para ello:

- Las CMB y CMF no indican la rapidez con la que el microorganismo muere, o si la muerte se aumenta a concentraciones mayores de las CMB y CMF.

- La CMI no indica si existen o no efectos que persisten una vez que la concentración de quimioterápico ha caído por debajo de la CMI (éstos son los efectos postantibiótico y postantifúngico).

Por otra parte, existen 2 factores que son importantes determinantes de eficacia cuando se combate una infección: las distribuciones en suero y en tejidos (Bergan, 1991).

Hay diferentes modelos que estudian la penetración de quimioterápicos al interior de los tejidos; una característica importante que todos estos modelos han demostrado es que el quimioterápico alcanza los líquidos extracelulares (linfa, líquido peritoneal o vesicular) rápidamente tras la administración, y este fenómeno ocurre con independencia de si la unión al suero es baja o alta (ampicilina 5 %, temocilina 85 % y flucloxacilina 96 %) (Bergan, 1991).

Esto sugiere que la unión proteica al suero tiene sólo consecuencias moderadas sobre la capacidad de los quimioterápicos para penetrar a los tejidos y erradicar la infección. Por ejemplo, pese a su diferente unión proteica, se han encontrado tasas de penetración similares para  $\beta$ -lactámicos como temocilina y ampicilina. Esto también es válido para otros quimioterápicos como la flucloxacilina,

que con un 96% de unión proteica al suero humano, alcanza relativamente altas concentraciones en linfa periférica y líquido vesicular tras sólo 10-30 minutos de ser administrado (Bergan, 1986).

Por último, sólo queda por recordar que la cantidad de droga libre está relacionada con la fracción unida a proteína, aunque la solución de este problema tan sólo radica en aumentar la dosis total de quimioterápico administrado para obtener niveles efectivos de droga en el sitio de infección.

Teniendo en cuenta todos estos hechos, cuya conclusión final es que los tradicionales parámetros de valoración de susceptibilidad son menos aplicables de lo deseable a los hongos, nosotros hemos utilizado en nuestros estudios aquellas concentraciones de quimioterápico que tienen significado terapéutico; es decir, aquellos niveles de fármaco que se encuentran -tanto en concentración como en duración- en el suero durante un tratamiento antifúngico standard.

Nuestros estudios, bien sean del efecto postantifúngico como del efecto PALE, están diseñados de forma que la fase con la que se trabaja siempre sea la fase levadura. Previamente a cualquier experimento, lo que se hace es obtener un crecimiento exponencial, en el cual sólo existe la fase levadura o blastoconidial. Dicha fase se obtiene mediante la incubación de *Candida albicans* en placa de agar Sabouraud durante 24 horas a 37°C (en estas condiciones *C. albicans* sólo crece en fase blastoconidial y con ausencia total de tubos de germinación y pseudohifas).

Posteriormente, obtenemos la fase de crecimiento exponencial por la reincubación del inóculo anterior en medio de ensayo fresco (bYNB-gl) durante 5 horas a 37°C, bajo continua agitación (Roilides, 1990), (Van Etten, 1991).

Esta agitación se mantiene durante todo el experimento y, por lo tanto, la fase exponencial se ve favorecida a lo largo del mismo.

En este trabajo se ha querido estudiar también la influencia del suero en la cinética de crecimiento de *Candida albicans*.

Ya que el suero contiene factores aglutinantes estables al calor que pueden agrupar a las células fúngicas y a que es un inductor del crecimiento del microorganismo en fase micelial, se esperarían una reducción en el conteo de

viabiles en placa y una disminución de la tasa de multiplicación al hacer recuento en ufc/mL, respectivamente. Esta reducción puede evitarse mediante el efecto disgregante de la agitación previa al plaqueo (Mínguez, 1994) sumada al efecto inhibitorio de la filamentación del propio antifúngico empleado (Borgers, 1979), (Nugent, 1986), (Nugent, 1987). Para la mayoría de los estudios, el hecho de que se cuenten unidades formadoras de colonias más que células individuales no altera la validez del conteo de colonias (Knaysi, 1935).

De todas formas, al emplear este método se asume que existe una proporcionalidad constante entre el número de colonias formadas y el número de organismos viables en la muestra de ensayo (Lehrer, 1969a). Volviendo al efecto que el suero provoca, se ha encontrado que su presencia promueve la producción de tubos de germinación por *Candida albicans* e interacciona sinérgicamente con azoles (SCH 39304 y Fluconazol) contra *Candida* spp (Meunier, 1990). Además, el propio crecimiento exponencial se ha asociado a un aumento de susceptibilidad a los azoles (Odds, 1985).

Los parámetros de crecimiento para la estimación de la actividad de una droga más ampliamente usados son, en orden de preferencia, (Petrou, 1991): densidad óptica, conteo de viables y conteo total. Nosotros nos hemos decantado por el método de conteo de viables en placa ya que su uso está ampliamente difundido en la actualidad (Van't Wout, 1990), (Van Etten, 1991), (Petrou, 1991).

Además, el método por densidad óptica presenta problemas que ya fueron puestos en evidencia por primera vez por Odds (1979b) al ensayar actividades de drogas antifúngicas en medio líquido. Por otra parte, con este último método se han obtenido resultados solamente reproducibles con polienos, pero no con imidazoles (Petrou, 1991).

## DISCUSION DEL PAFE DE *CANDIDA ALBICANS* INDUCIDO POR ANFOTERICINA B Y DEL EFECTO DE BAJAS CONCENTRACIONES SOBRE LA LEVADURA EN FASE POSTANTIFUNGICA

La supresión del crecimiento bacteriano, o efecto postantibiótico (PAE), tras la exposición a un agente antibacteriano es un fenómeno que se ha observado durante décadas (Bigger, 1944). El efecto postantifúngico (PAFE) es una extensión del PAE en el que el quimioterápico y el microorganismo utilizados son un antifúngico y un hongo, respectivamente.

La anfotericina B induce una desestabilización de la membrana celular por medio de la unión a los esteroides y se entiende el PAFE como el tiempo para la "reparación" de la membrana antes de que se puedan restablecer la gemación y multiplicación activas.

Obviamente, esta desestabilización ocurre tanto a bajas concentraciones (como las utilizadas en este estudio 0,5-1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ) como a altas, aunque en este último caso aquellas que son superiores a 5  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  se consideran tóxicas (Roilides, 1990).

La incubación de *Candida albicans* durante 12 horas obedece al hecho de que la anfotericina B es capaz de permanecer activa en el medio de incubación durante el período anteriormente citado; es más, Van Etten (1991) demostró que la anfotericina B mantenía su actividad antifúngica en el medio de incubación durante al menos 24 horas.

Tras la incubación de *C. albicans* durante 12 horas con 0,5  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de anfotericina B pudimos registrar un efecto postantifúngico (PAFE) de  $1,3 \pm 0,4$  horas, y utilizando una concentración mayor (1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ) obtuvimos un PAFE de  $2,4 \pm 0,7$  horas.

Estos resultados coinciden con los de Turnidge (1982), quien obtuvo un PAFE de 5,7 horas, aunque con concentraciones mayores.

Teniendo presente -a la vista de estos resultados- que el PAFE con anfotericina B es dosis dependiente, la diferencia entre los PAFE obtenidos por

Turnidge y por nosotros, probablemente se deban a que nuestra incubación (aunque de mayor duración: 12 horas *versus* 2 horas) se realizó con una concentración menor, ya que está demostrado que la anfotericina B presenta efectos estimuladores del crecimiento a bajas concentraciones, aumentando consiguientemente el número de ufc/mL (Brajtburg, 1981).

Algunos autores han señalado que el suero ejerce un profundo efecto sobre la anfotericina B al ensayar contra *Candida albicans* extracelularmente. Meunier, en 1990, encontró que las concentraciones mínimas inhibitoria y fungicida (CMI y CMF, respectivamente) se duplicaban cuando se exponía *C. albicans* a la anfotericina B en presencia del 25 % de suero humano. La explicación de la reducción de actividad antifúngica de la anfotericina B en presencia de suero puede explicarse por la alta unión proteica que presenta la anfotericina B, que reduce su biodisponibilidad.

Sin embargo, este último dato contrasta fuertemente con los obtenidos por Petrou en 1991, quien utilizando el mismo tamaño de inóculo que nosotros ( $1 \times 10^4$ - $10^5$ ), el mismo medio de incubación (YNB), la misma proporción de suero (10%) y la misma concentración de anfotericina B ( $0,5 \mu\text{gr}/\text{ml}$ ) que nosotros, encontró que la adición de suero aumentaba la actividad de anfotericina B, siendo ésta mayor que sin suero. Nosotros, según este esquema, hemos encontrado unos PAFE de  $1,8 \pm 0,4$  horas usando  $0,5 \mu\text{gr}/\text{mL}$  y de  $3,4 \pm 0,9$  horas utilizando  $1 \mu\text{gr}/\text{mL}$ .

Respecto al efecto de una segunda exposición (a una menor concentración de anfotericina B,  $0,25 \mu\text{gr}/\text{mL}$ ) sobre *Candida albicans* previamente tratada, pudimos comprobar que el efecto debido a este segundo tratamiento era mayor que el originado por la primera exposición. Este hecho ocurrió independientemente de la presencia o ausencia de suero y alcanzó su máximo valor en las levaduras previamente tratadas con  $1 \mu\text{gr}/\text{mL}$  en presencia de suero.

## DISCUSION DEL PAFE DE *CANDIDA ALBICANS* INDUCIDO POR KETOCONAZOL Y DEL EFECTO DE BAJAS CONCENTRACIONES SOBRE LA LEVADURA EN FASE POSTANTIFUNGICA

Los imidazoles, como el ketoconazol, tienen al menos dos modos de acción reconocidos: el primero está basado en una acción directa sobre la membrana (Sud, 1979) (Ånséhn, 1984); y el segundo es la inhibición de la conversión enzimática de lanosterol a ergosterol por medio de su acción sobre el citocromo P450 (Brajtburg, 1982).

El primer mecanismo de acción es inmediato a altas concentraciones de la droga y puede causar la muerte de la célula fúngica, mientras que a concentraciones más bajas la droga es capaz de causar alteraciones en la membrana celular y puede tardar tan sólo dos horas en suprimir el crecimiento (Swamy, 1974), (Borgers, 1982). La concentración máxima segura alcanzable en plasma para el ketoconazol es de 5  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  (Roilides, 1990).

Nosotros hemos estudiado el efecto postantifúngico de 2 concentraciones de ketoconazol (1 y 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ) sobre *Candida albicans* en presencia o ausencia de del 10% de suero. En ausencia de suero no pudimos encontrar PAFEs positivos, tanto al utilizar 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  como 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ .

Estos resultados concuerdan con el conocido hecho de que los azoles presentan PAFE negativos o nulos. Las causas exactas por las que los azoles no presentan tal efecto se desconocen, pero probablemente influya el hecho de que, por ejemplo, el ketoconazol posea una baja actividad contra *Candida albicans in vitro* en medios de cultivo convencionales (Dixon, 1978). Sin embargo, hay estudios que demuestran lo contrario; Turnidge, en 1982, halló que cortas exposiciones de varias especies de *Candida* a los antifúngicos ketoconazol y miconazol, producían un retraso persistente en sus tasas de crecimiento. Posteriores experimentos, que para la eliminación de la droga utilizaban lavados sucesivos seguidos de una dilución, demostraron que el efecto encontrado por Turnidge se debía sin duda a la droga residual que permanecía activa incluso

a concentraciones de 1/1000 de la CMI.

En presencia de suero, la situación fue bien diferente: con ambas concentraciones, 1 y 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , se obtuvieron PAFE de  $0,15 \pm 0,05$  y  $0,52 \pm 0,2$  horas, respectivamente. Esto indica que el PAFE de ketoconazol sobre *C. albicans* en presencia de suero es dosis dependiente. De hecho, Georgopapadakou (1987) observó que imidazoles como el ketoconazol, el miconazol, el clotrimazol y el econazol no sólo presentaban un efecto dependiente de concentración, sino que, además, también era dependiente del tiempo de exposición.

En principio, se podría pensar que la adición del suero a nuestros estudios traería como consecuencia una inhibición de la actividad del ketoconazol *in vitro*, ya que, al igual que la anfotericina B, esta droga tiene un alto porcentaje de unión proteica ( $> 90\%$ ). Este caso, al igual que el del polieno, presenta sorprendentes hallazgos; en contra de lo que se podría pensar *a priori*, la adición de suero no altera la actividad normal del ketoconazol (Odds, 1982), sino que aquél hace que la droga tenga una mayor actividad (Aerts, 1980).

Hawkins (1980), trabajando con suero humano termoinactivado al 50% encontró que aunque la CMI de ketoconazol para *Histoplasma capsulatum* se incrementaba considerablemente, la droga seguía siendo fungicida para el hongo a concentraciones tan bajas como  $< 1 \mu\text{gr}/\text{mL}$ . Esto indica que la inactivación del suero sugiere que el complemento o algún otro componente lábil al calor puede tener un importante papel en el efecto postantifúngico, tal y como ocurre con las fluoroquinolonas y *Staphylococcus aureus* o con la tetraciclina y *Escherichia coli* (Davidson, 1991).

Además, con respecto a la alta afinidad por la unión proteica por parte del ketoconazol, Block (1974) asume que el sitio primario de unión esperado de la membrana celular fúngica serían las proteínas de dicha membrana, produciendo, de esta manera, otro efecto negativo sobre *Candida albicans*.

También hemos estudiado el efecto de una segunda exposición de la levadura al ketoconazol (con 0,5  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  si la exposición previa fue de 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  y con 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  si la exposición previa fue de 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ); pudimos observar que sus

efectos fueron mayores que los provocados por la primera exposición, hecho lógico si se considera que las células expuestas ya estaban previamente dañadas.

### **DISCUSION DEL PAPE DE *CANDIDA ALBICANS* INDUCIDO POR FLUCONAZOL Y DEL EFECTO DE BAJAS CONCENTRACIONES SOBRE LA LEVADURA EN FASE POSTANTIFUNGICA**

Una característica común de las drogas antifúngicas es que presentan una gran dificultad a la hora de poder establecer una correlación clara entre sus actividades *in vitro* e *in vivo*. El fluconazol representa uno de los casos más extremos de este problema, hasta el punto de que la droga no se hubiese desarrollado si únicamente se hubiese prestado atención a sus resultados de actividad *in vitro* (Graybill, 1989).

Una prueba de esto es que aunque el fluconazol es capaz de inhibir el desarrollo de hifas y ramificaciones de *C. albicans* a concentraciones de 0,3  $\mu\text{gr/ml}$ , el ketoconazol y el miconazol, en las mismas pruebas, son igualmente activos a concentraciones 100 veces menores que la del triazol (Odds, 1986).

A pesar de todo, el fluconazol es muchísimo más activo *in vivo* que el ketoconazol (20 veces), tal y como demuestran los estudios de Rogers (1986), en los que se comparan las actividades de fluconazol y ketoconazol contra *Candida albicans in vitro* e *in vivo*.

El fluconazol, además de las mismas características de otros azoles, presenta una mayor selectividad para la desmetilación del C-14 de intermediarios metílicos de la síntesis de ergosterol y un mínimo efecto sobre otras reacciones mediadas por el citocromo P450. De hecho, Marriott (1987) comprobó que el fluconazol era 10,000 veces más selectivo para la enzima C-14 desmetilasa fúngica que para su homóloga mamífera (Gull, 1986).

Odds (1986) y Yamaguchi (1989) hallaron que el fluconazol a concentraciones de 0,3 y 0,2  $\mu\text{gr/mL}$ , respectivamente, inhibía la ramificación de las hifas casi totalmente y reducía la longitud la longitud del micelio en 1/3.

Nosotros, utilizando 4 y 8  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de fluconazol en ausencia de suero no pudimos obtener un efecto postantifúngico positivo, aunque en su presencia obtuvimos  $2 \pm 0,6$  y  $2,5 \pm 1$  horas, respectivamente. El empleo de suero en nuestro sistema de susceptibilidad como aproximación a la situación que se produce *in vivo*, puede ser una de las razones por las que el fluconazol exhiba una mayor actividad *in vivo* que *in vitro*. De hecho, los resultados obtenidos por nosotros concuerdan con los de Meunier (1990) quien utilizando una concentración de suero del 25%, encontró que éste incrementaba la actividad inhibitoria del fluconazol sobre *Candida albicans*. Una de las razones por las que ocurre esto es que el suero induce una mayor tasa de crecimiento de las células de levadura, lo cual trae como consecuencia la entrada de un mayor número de células en fase exponencial. Dicha fase de crecimiento exponencial está asociada a una mayor susceptibilidad a los azoles (Odds, 1985).

El fluconazol -a diferencia de los otros agentes antifúngicos utilizados en este estudio- no presentó un efecto dependiente de la concentración, ya que el PAFE obtenido por la exposición de *Candida albicans* a 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  no difiere mucho del obtenido con 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Estos resultados concuerdan con los de Hughes (1988), quien demostró que el aumento en las dosis de fluconazol no se asociaba con un aumento en la actividad antifúngica; este hecho fue posteriormente confirmado por Meunier (1990).

Respecto a la reexposición de levaduras previamente tratadas con fluconazol, pudimos observar que el efecto inhibitorio obtenido por esta segunda exposición era mucho mayor que el que se obtuvo mediante una exposición única.

#### **DISCUSION DEL PAFE DE *CANDIDA ALBICANS* INDUCIDO POR FLUCONAZOL Y DEL EFECTO DE BAJAS CONCENTRACIONES SOBRE LA LEVADURA EN FASE POSTANTIFUNGICA**

La inducción de Efecto Postantifúngico por esta droga es posible gracias a su mecanismo de acción: la flucitosina interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos

mediante su comportamiento como antimetabolito de la citosina y por medio de su unión no competitiva a la enzima timidilato sintetasa (Bennet, 1977), (Diaso, 1978), (Koldin, 1983).

Es posible que el PAFE que se induce tras la exposición a esta droga represente el período de latencia que se produce en la síntesis de ácidos nucleicos (DNA y RNA) previa a la división de la célula fúngica, y que este fenómeno ocurra mediante un mecanismo similar a los que operan sobre las bacterias que han sido expuestas a quinolonas y rifampicina.

Tanto en presencia como en ausencia de suero hemos observado que la actividad de la flucitosina es dependiente de la duración de la incubación y de la concentración con la que se realiza la misma; estos hechos también han sido observados por Scalarone (1993) y Van der Auwera (1986), encontrando éste último una relación entre retraso en el crecimiento y concentración de flucitosina, aunque en ausencia de suero.

El PAFE de la flucitosina puede tener aplicación clínica en relación a su administración en infecciones sistémicas provocadas por hongos, ya que este período de retraso en el crecimiento persistiría todavía cuando las concentraciones de la droga hubiesen ya descendido. Este hecho sugiere que existe la posibilidad de administrar la flucitosina a intervalos más espaciados de lo que lo son ahora recomendados (Gudmundsson, 1991).

En nuestros estudios, en ausencia de suero y utilizando 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , hemos inducido un PAFE de  $1,7 \pm 0,7$  horas, y con 20  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , un PAFE de  $3,6 \pm 0,9$  horas. Estos resultados son bastante interesantes ya que estas concentraciones fueron capaces de producir un PAFE a niveles de 5-fluorocitosina considerablemente menores que aquellas que normalmente se alcanzan en suero durante la administración de dosis standard (Bodey, 1988). Además, estas concentraciones son claramente superiores a las CMI e IC-50 de flucitosina registradas en este estudio para *Candida albicans* (0,5 y 0,3  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , respectivamente), lo cual indica que este agente es especialmente efectivo con aquellas cepas que son sensibles a dicha droga.

Afortunadamente, la concentración de flucitosina no influye sobre la tasa de inducción de resistencia a dicho antifúngico *in vitro* (Normak, 1972), aunque se ha observado que la emergencia de resistencias *in vivo* parece ocurrir con mayor frecuencia a bajas dosis más que a altas (Shadomy, 1970).

Sabiendo que la unión proteica de la flucitosina al suero es mínima (2,9-4%) y que dicha unión no está afectada por la concentración de la droga, se esperarían resultados como mínimo similares a los que se obtuvieron sin suero en la inducción del PAFE. Esto fue así, ya que con cualquiera de las concentraciones utilizadas, el PAFE obtenido fue mayor que en ausencia de suero.

Entre los factores que influyen en el efecto postantifúngico, tanto en hongos como en bacterias, se encuentran el complemento o algún otro componente lábil al calor ya que la inactivación del suero por calor reduce tal efecto (Davidson, 1991), y el pH; de hecho Turnidge (1994) ha hallado recientemente que los PAFE inducidos por la flucitosina a pH 7 tienen mayor duración que aquellos encontrados a pH 5. Una explicación a este hecho puede que sea que el grupo amino de la molécula de 5-fluorocitosina tenga un  $pK_a$  de 10,71 (Diaso, 1978). Esto significa que a pH neutro, dicho grupo está menos ionizado que a pH ácido, pudiendo incrementarse, de este modo, la actividad de la droga ya que en ese estado de menor ionización la transferencia del compuesto a través de la membrana celular fúngica se realiza con mayor facilidad. Además, Davies (1971) y Schönebeck (1973) han hallado que la presencia del suero no disminuye la actividad biológica de la 5-fluorocitosina.

También se ha estudiado el efecto de una segunda exposición de flucitosina sobre *Candida albicans* previamente expuesta y en fase PAFE; esta reexposición se ha hallado que ejercía un efecto inhibitorio muy prolongado, con independencia de la presencia o ausencia de suero.

DISCUSION DE LA VARIACION DE SUSCEPTIBILIDAD DE *CANDIDA ALBICANS* A  
LOS MECANISMOS MICROBICIDAS DE PMN HUMANOS A RESULTAS DE SU  
TRATAMIENTO PREVIO CON VARIOS QUIMIOTERAPICOS

La fagocitosis es el proceso por el cual ciertas células ingieren objetos particulados. Este fenómeno juega un papel de especial importancia en la protección contra las infecciones en la mayoría de las especies.

La susceptibilidad de *Candida albicans* a la fagocitosis depende de la deposición del complemento o de anticuerpos específicos en la superficie de la levadura. Este hecho hace que las células fagocíticas sean capaces de reconocer, por medio de sus receptores específicos, al hongo. Los agentes antifúngicos, por medio de la alteración de la topografía de la superficie celular fúngica, pueden inhibir o fomentar este proceso (Domer, 1989).

Respecto a *Candida albicans*, los PMN humanos son capaces de fagocitar la fase blastoconidial y eliminar aproximadamente, de este modo, un tercio de los organismos intracelulares (Lehrer, 1969a), ya que en ausencia de antifúngicos la levadura es capaz de germinar en el interior de los fagocitos y provocar la lisis celular en un tiempo inferior a 4 horas (Louria, 1974). Los neutrófilos humanos forman la primera línea de defensa contra *C. albicans* (Rogers, 1980), y el descenso de su número o la existencia de defectos en su función son factores importantes en el asentamiento de candidiasis graves (Lehrer, 1969b).

La mayoría de los agentes antifúngicos son fungistáticos más que fungicidas a concentraciones terapéuticas normales y la función fagocítica es, por lo tanto, normalmente crucial para la erradicación de las infecciones por *Candida albicans*. De este modo, la modulación de la función celular de los PMN inducida por quimioterápicos puede tener una significancia determinante (Johnson, 1986).

En este estudio se han valorado 2 parámetros: Retraso en el Crecimiento y Efecto Fungicida sobre un inóculo de *Candida albicans* de  $5 \times 10^6 - 10^7$  ufc/mL, el cual es fácilmente encontrable en una situación infecciosa *in vivo* (Sugar, 1991).

El retraso en el crecimiento se debe exclusivamente a los efectos que el quimioterápico provoca sobre el organismo; por ejemplo, daños subletales que impiden el correcto crecimiento de la levadura.

En la página 31 se habla de Efecto Postantifúngico (PAFE) y se define como el tiempo de retraso inducido por un quimioterápico sobre un cultivo para alcanzar  $1 \log_{10}$  de crecimiento, respecto del tiempo que tarda su control en alcanzar  $1 \log_{10}$ .

Aquí realmente no podemos hablar de la existencia del PAFE en un sentido estricto, ya que no se le da el tiempo necesario al cultivo para que alcance el logaritmo. Lo que realmente se pretende, más bien, es imitar la situación que se da *in vivo* tras la administración del fármaco; es decir, se utilizan concentraciones próximas a los picos séricos de cada quimioterápico y se incuban con la levadura durante un tiempo aproximado y similar al que permanecerían tales picos en el cuerpo humano (6 horas). De hecho, los 4 antifúngicos estudiados demuestran la existencia de este "mini PAFE" o retraso tras 6 horas de incubación.

El tiempo de exposición de las levaduras previamente tratadas a los PMN se determinó finalmente en 3 horas ya que la máxima fagocitosis se produce a los 20 minutos del contacto PMN-*Candida* y la muerte intracelular alcanza su pico transcurrida la primera hora, no aumentando significativamente si se prolonga la incubación hasta 4 horas (Belcher, 1973). Además, está el problema de la formación de filamentos por *Candida albicans* en presencia de suero (Taschdjian, 1960), (Chilgren, 1968); la existencia del suero en nuestros experimentos se justifica porque sus factores se requieren para una opsonización y fagocitosis óptimas de *Candida* por parte de los PMN (Lehrer, 1969a).

Aunque nuestros estudios se han llevado a cabo bajo condiciones que favorecen la fase blastospora de *C. albicans* (alta agitación, alta oxigenación, crecimiento exponencial...), el crecimiento de esta levadura en presencia de suero se realiza de formar micelial al ser incubados juntos durante 4 horas (Lehrer, 1969a). Este estado micelial no es el adecuado para la fagocitosis por los PMN, aunque sí que es susceptible al ataque por estas mismas células (Diamond, 1978).

## DISCUSION DEL EFECTO INDIRECTO DE LA ANFOTERICINA B SOBRE *CANDIDA ALBICANS*

La anfotericina B es un quimioterápico antifúngico poliénico usado principalmente en el tratamiento de infecciones sistémicas. Se ha demostrado que posee propiedades inmunoactivas entre las que se incluyen: incremento de la adherencia y agregación de los PMN (Marmer, 1981) (Berliner, 1985), activación de los macrófagos (Lin, 1977), inducción de la producción del factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y de la  $\beta$ -interleucina-1 (IL-1 $\beta$ ) (Gelfand, 1988), activación de las inmunidades humoral y mediada por células en ratones (Medoff, 1977) e inhibición de la adherencia de *Candida albicans in vitro* (Vuddhakul, 1988).

Además, es capaz de inhibir la inducción de tubos de germinación en presencia de suero (Nugent, 1986) y también en el interior de las células fagocíticas (Van't Wout, 1990), (Van Etten, 1991).

En el presente estudio hemos incubado *C. albicans* con una concentración de anfotericina B igual a 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  durante 6 horas. Esta concentración es fácilmente alcanzable en el cuerpo humano ya que tras una dosis de 50 mg por vía intravenosa, se obtienen niveles de 2  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ .

Las concentraciones arriba mencionadas no son en absoluto tóxicas, ya que se ha comprobado que el límite seguro de concentración de la anfotericina B alcanzable en plasma es de 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  (Roilides, 1990); de hecho la anfotericina B, a concentraciones de 5  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , compromete la viabilidad de los PMN (Chunn, 1977), aunque esta concentración se puede alcanzar en el interior de los tejidos (Collette, 1989).

La gran ventaja que posee la anfotericina B en su acción antifúngica, y que comparte con los imidazoles, es que su actuación no necesita células metabólicamente activas a diferencia de la cilofungina (Roilides, 1990).

La incubación de *Candida albicans* durante 6 horas produjo un retraso en el crecimiento del 66 % a la primera hora, del 50 % a la segunda y del 48 % a la tercera hora de haber sido retirado el quimioterápico. Estos resultados contrastan

fuertemente con los de Van Etten (1991), quien obtuvo una tasa de muerte (que no de retraso en el crecimiento) de *C. albicans* del 99% a concentraciones tan bajas como 0,2  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ .

Este retraso en el crecimiento debido a la acción del antifúngico concuerda con los estudios de Turnidge (1982), quien encontró un PAFE significativo de la anfotericina B tras la incubación de *C. albicans* durante 2 horas y a concentraciones de 4 a 8 veces la CMI.

Respecto a la muerte intracelular, hemos encontrado que a la primera hora fue del 109 %, a la segunda del 41 % y del 32 % a la tercera.

El alto porcentaje de muerte intracelular a la primera hora -109 %- es bastante lógico ya que la anfotericina B a concentraciones de 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  inhibe totalmente la capacidad de *Candida albicans* para formar tubos de germinación (Nugent, 1986), (Van't Wout, 1990) e inhibe la quitina sintasa de la levadura (Rast, 1981), entre otros efectos (Nugent, 1987).

Una concentración subletal, como la usada en este estudio (1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ), no destruye a *Candida albicans* aunque sí altera su sensibilidad de algún modo para ser más fácilmente ingerida y muerta por los neutrófilos. De hecho, la inhibición de la formación de tubos de germinación favorece la continuidad de la fase blastoconidial, que es más apta para ser fagocitada que la micelial. Si a este efecto le sumamos otros como el de la inhibición de ciertas enzimas, la producción de irregularidades en la topografía superficial fúngica, la salida de iones esenciales ( $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ), el aumento de la permeabilidad de membrana y la reducción de la cantidad de manano superficial (Al-Bassam, 1985), podremos asumir que las células de *C. albicans* están gravemente dañadas y con crecimiento nulo a la hora de enfrentarse con los PMN, siendo más frágiles a los mecanismos microbicidas de estas mismas células (Van der Auwera, 1989). Otros autores también sugieren que el aumento de muerte intracelular de *C. albicans* debido a la anfotericina B puede deberse, además, a sus grandes propiedades inmunoadyuvantes a concentraciones terapéuticas (Roilides, 1990).

Se podría pensar que el disolvente usado para solubilizar la anfotericina B, el desoxicolato sódico, podría ser el responsable de los efectos que aquí se atribuyen a la anfotericina B. Esto no es así ya que previamente se hicieron pruebas en las que se puso de manifiesto la inocuidad del desoxicolato sódico en el sistema anfotericina B-desoxicolato sódico- $\text{HNa}_2\text{PO}_4$ . Además, se contaba con estudios que defendían justamente esto mismo (Van der Auwera, 1991) y con el precedente de que la formulación de este sistema coincidía con la preparación farmacéutica de anfotericina B que se perfunde a pacientes (Fungizone, Bristol Myers-Squibb).

### **DISCUSION DEL EFECTO INDIRECTO DEL KETOCONAZOL SOBRE *CANDIDA ALBICANS***

Los agentes antifúngicos azólicos son las drogas más frecuentemente usadas en el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales, siendo muy útiles a la vez en la terapia de micosis sistémicas (Fromtling, 1984).

El grupo de los azoles engloba a los derivados imidazólicos -tales como el ketoconazol y clotrimazol-, y a los derivados triazólicos como el fluconazol y el itraconazol.

Aunque todos estos compuestos poseen características farmacocinéticas que varían considerablemente de una droga a otra, comparten un modo de acción antifúngica común: la inhibición de la actividad del citocromo P450 fúngico que conduce a una alteración de la composición de esteroides de la membrana fúngica (Vanden Bossche, 1985). Los imidazoles, además, poseen un efecto indirecto sobre los ácidos grasos insaturados fúngicos -complementario del efecto inhibitorio de la síntesis de ergosterol- y se cree que son dependientes de concentración y tiempo de exposición (Georgopapadaku, 1987).

Debido a que el pH ácido antagoniza la actividad del ketoconazol, en nuestros estudios nos vimos obligados a utilizar YNB-gl tamponado (bYNB-gl), ya que Ånséhn (1984) comprobó que mantenía el pH inicial del medio incluso tras 24 horas de crecimiento. De todas formas, hay que tener presente que la acidez del

estómago es importante para su disolución y posterior absorción, ya que se trata de una sustancia dibásica.

Para nuestros experimentos hemos utilizado 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de ketoconazol en el tratamiento previo de *Candida albicans*, ya que consideramos que es una concentración asequible en plasma durante al menos 6 horas, que son precisamente las que dura dicho pretratamiento. Además, su farmacocinética indica que se alcanzan picos séricos de 3-4,5  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  tras 1-2 horas de su administración y que su curva de desaparición es de 7-10 horas, siendo la concentración máxima segura alcanzable en plasma de 5  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  (Roilides, 1990).

Partiendo del hecho de que el crecimiento celular y la fluidez de membrana aumentan según se incrementa la cantidad de ácidos grasos libres insaturados presentes en la membrana, podemos aceptar como válidos los altos retrasos en el crecimiento de *C. albicans* encontrados, ya que, por ejemplo, Kuroda (1978) y Sud (1979) hallaron, al estudiar modelos de membrana cuyos componentes mayoritarios eran ácidos grasos libres insaturados, que tales membranas eran muy susceptibles a la acción de imidazoles.

De hecho, Medoff en 1983 propuso que hongos y bacterias Gram positivas son susceptibles a imidazoles porque sus membranas son precisamente ricas en su contenido de ácidos grasos libres, mientras que las células de mamífero y bacterias Gram negativas son resistentes a estas drogas a causa de sus bajos niveles de ácidos grasos libres. El ketoconazol, además, no ejerce efectos adversos sobre los efectos de los PMN (Van Rensburg, 1983) (Johnson, 1986) y se ha establecido como una alternativa eficaz de la anfotericina B para el tratamiento de individuos inmunocomprometidos.

Respecto a la muerte intracelular, los porcentajes registrados en nuestros estudios tras el tratamiento previo de *Candida albicans* con ketoconazol, probablemente sean debidos a la inhibición de la capacidad germinativa de la levadura en presencia de la droga, lo cual implica una mayor facilidad de los PMN para eliminar células de *C. albicans*. Estos resultados no concuerdan con los de Johnson (1986) quien encontró que ni el ketoconazol ni el itraconazol afectaban

la fagocitosis o la muerte intracelular de *C. albicans*, tanto si las drogas se usaban para pretratar los hongos o los leucocitos, como si se añadían a una mezcla de ambos tipos celulares.

Por el contrario, De Brabender (1980) halló que la adición de bajas concentraciones de ketoconazol a incubaciones mixtas de *C. albicans* y PMN, aumentaba extraordinariamente la muerte intracelular de la levadura, hecho que posteriormente confirmaron Farkas en 1983 y Cockayne en 1984. Este último observó que el ketoconazol afectaba claramente la morfología del hongo, pudiendo quedar alteradas, de este modo, características superficiales importantes en la resistencia de *C. albicans* al ataque de los PMN. Además, -como nosotros- también halló una reducción en la tasa de crecimiento del hongo, lo que permitió una fagocitosis y muerte intracelular más eficiente por parte de los PMN.

Todos estos hechos pueden explicar la diferencia de actividad del ketoconazol encontrada *in vitro* e *in vivo* (Odds, 1980).

### **DISCUSION DEL EFECTO INDIRECTO DEL FLUCONAZOL SOBRE *CANDIDA ALBICANS***

La mayoría de los nuevos agentes antifúngicos que han aparecido durante los últimos 15 años han sido derivados imidazólicos o triazólicos N-sustituídos. Los compuestos que pertenecen a este tipo químico generalmente poseen un amplio espectro en su actividad antifúngica, pero su actividad *in vitro* es más difícil de demostrar que su actividad *in vivo*. Así, el fluconazol representa un nuevo extremo en términos de su relativa inactividad *in vitro* y su alta potencia *in vivo*.

Para la incubación durante 6 horas hemos utilizado la concentración de 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  ya que la vida media del fluconazol en suero es de al menos 6 horas (Rogers, 1986). Respecto a la concentración utilizada, aunque el límite máximo seguro alcanzable en suero es de 25  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ , nos hemos decantado por el uso de 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  ya que es una concentración fácilmente obtenible (por ejemplo, tras una dosis de 100 mg/día) (Tucker, 1988).

Tras este pretratamiento, lo primero que se observó en el crecimiento de *Candida albicans* fue un retraso en la recuperación de las levaduras tratadas respecto de las control en ausencia de PMN, siendo del 72% a la primera hora, del 60% a la segunda y del 55% a la tercera. Este efecto se debió exclusivamente al quimioterápico ya que el suero -con cualquiera de los antifúngicos empleados en la realización de esta Memoria- no tuvo ningún efecto fungicida apreciable.

El efecto del fluconazol se ha estudiado en una gran variedad de procesos metabólicos como la síntesis de ergosterol, síntesis proteica, síntesis de ácidos nucleicos, etc; el ergosterol es el esteroide que se encuentra en mayor cantidad en las membranas de hongos y levaduras. La inhibición de tal síntesis puede tener numerosos efectos, incluyendo uno sobre la actividad de las enzimas de membrana (Vanden Bossche, 1983), (Vanden Bossche, 1985), (Vanden Bossche, 1986).

Se cree que todos los triazoles podrían tener un modo de acción más directo sobre los fosfolípidos de membrana y también podrían inhibir la oxidación del citocromo c y las enzimas peroxidasa, provocando, por tanto, un aumento en la generación de peróxidos intracelulares (De Nollin, 1977), (Shigematsu, 1982), (Uno, 1982).

Con respecto a la interacción del fluconazol con los mecanismos de defensa del huésped, Van't Wout trató ratones normales y neutropénicos infectados con *Candida albicans* con diferentes concentraciones de fluconazol (2,5 a 20 mgr/kg) y no encontró diferencias en su efectividad (Van't Wout, 1989); Abruzzo, al incubar neutrófilos con fluconazol observó un descenso en la producción de quimioluminiscencia (Abruzzo, 1987), mientras que Roilides no halló ningún defecto de interferencia del fluconazol sobre las funciones de los PMN (Senior, 1988), (Roilides, 1990). Van Etten estudió el efecto intracelular del fluconazol en macrófagos infectados por *Candida albicans* y no detectó ningún efecto (Van Etten, 1991), pese a que este triazol tiene una buena penetración intracelular (Wildfeuer, 1990); ni tan siquiera el previo tratamiento de *C. albicans* durante 30 minutos, aumentó la actividad intracelular posterior.

En nuestro estudio, vimos un efecto potenciador de la sensibilidad de *Candida albicans* a la acción fungicida de los PMN; éste duró una hora tras 6 de preincubación con 4  $\mu\text{gr/ml}$  de fluconazol (se incrementó un 43,8% en relación a su control). Este resultado coincide, en parte, con los de Wildfeuer (1990), quien encontró que las células fagocíticas actuaban sinérgicamente con fluconazol en la reducción de la supervivencia intracelular de *C. albicans*.

Una posible explicación puede ser que *Candida albicans* tras el tratamiento con fluconazol, sufra alteraciones morfológicas y funcionales y pueden ser más fácilmente opsonizadas y fagocitadas por los PMN. De hecho, se ha visto que células fúngicas expuestas al fluconazol *in vitro* e *in vivo* presentan típicos engrosamientos irregulares de la pared celular y una acumulación anómala de vesículas membranosas y de lípidos intracelulares (Gull, 1986), (Troke, 1987). Una vez en su interior, serían destruidas por la mieloperoxidasa, una enzima lisosomal (Schultz, 1962), produciéndose un aumento del consumo de oxígeno y una generación de peróxidos de hidrógeno (Schultz, 1962), (Paul, 1968).

Estos hechos podrían explicar parcialmente las diferencias de efecto entre las pruebas de susceptibilidad *in vitro* y los resultados terapéuticos reales, ya que es posible que la terapia antifúngica complemente los mecanismos de defensa del hospedador implicados en el control local o sistémico de las infecciones fúngicas.

#### **DISCUSION DEL EFECTO INDIRECTO DE LA FLUCITOSINA SOBRE *CANDIDA ALBICANS***

La 5-fluorocitosina, una pirimidina fluorada, es el único agente antimicótico usado en la clínica que se comporta como un verdadero antimetabolito; debe su actividad antimicótica al hecho de que las enzimas de los hongos son, hasta cierto punto, incapaces de distinguir entre la pirimidina fluorada y análogos naturales.

Por otra parte, existen diferentes medios de cultivo que contienen en su composición citosina, hipoxantina y adenina, moléculas que compiten con la flucitosina en su unión a la citosín permeasa fúngica y posterior entrada en la

célula. Por ello, al realizar las pruebas de susceptibilidad se usó como medio el Yeast Nitrogen Base tamponado y suplementado con el 1% de glucosa (bYNB-gl) (Polak, 1980).

En nuestro estudio, hemos tratado previamente *Candida albicans* con 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de flucitosina durante 6 horas antes de exponerla a la acción fungicida de los neutrófilos. En principio se podría pensar que tal concentración pudiera ser demasiado baja para el tratamiento ya que los valores normales de la flucitosina alcanzables en suero son de 35-70  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  tras un tratamiento standard (Bodey, 1988).

Nosotros hemos dado prioridad en nuestro estudio al hecho de que se pueden inducir PAFEs (Efectos Postantifúngicos) prolongados sobre *Candida albicans* con concentraciones de flucitosina considerablemente menores (0,1-3,2  $\mu\text{gr}/\text{mL}$ ) que aquellas que normalmente se alcanzan en suero (Scalarone, 1992).

Además, 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  es una concentración de la cual se puede disponer permanentemente durante la vida media de la flucitosina en suero (aprox. 6 horas).

El tratamiento de *C. albicans* con 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de 5-fluorocitosina durante 6 horas produjo un retraso en el crecimiento que tuvo su máximo valor a la primera hora de haberse retirado el quimioterápico. Este retraso en el crecimiento, que perduró a lo largo del experimento, probablemente se deba a los efectos de la droga sobre la síntesis de ácidos nucleicos fúngicos, ya que el trastorno en la síntesis de DNA conduce a una división celular defectuosa y la disfunción del RNA acarrea la incorrecta síntesis proteica.

La gran sensibilidad de *Candida albicans* encontrada en este estudio *in vitro* contrasta fuertemente con la existencia de cepas de *C. albicans* altamente resistentes a la flucitosina -que lo son incluso antes del contacto con la droga- y que limitan su utilidad clínica.

Por ello, la flucitosina se usa clínicamente en combinación con la anfotericina B, ya que ésta altera la membrana celular fúngica de tal manera que potencia la entrada de aquélla al interior celular, permitiéndola, de este modo, actuar con independencia de la existencia de la citosín permeasa (cuya ausencia de la

membrana celular fúngica se considera como un factor de resistencia).

El efecto fungicida registrado con la flucitosina fue el máximo de todos los hallados con los antifúngicos estudiados, siendo a la primera hora del 122% y disminuyendo al 90% y al 77% a la segunda y tercera horas, respectivamente.

Dichos resultados coinciden con los de Hoeplich (1975), quien encontró que la flucitosina era más activa que la anfotericina B frente a una misma cepa de *Candida albicans* e igualmente activa que la anfotericina B frente a *Cryptococcus neoformans*.

Además, existen varios estudios en los que se ponen de manifiesto las modificaciones ultraestructurales que la flucitosina provoca: formación de pliegues en la superficie de las levaduras (Ansëhn, 1974) y tumefacción de los núcleos con aparición de partículas filamentosas intranucleares (Arai, 1977), entre otras. Tales modificaciones, creemos, influyen determinadamente en la habilidad de los PMN para destruir intracelularmente *Candida albicans* con la eficacia anteriormente hallada.

**CONCLUSIONES**

## **CONCLUSIONES**

1. La exposición de *Candida albicans* ATCC 10231 a varias concentraciones de anfotericina B y 5-fluorocitosina en ausencia de suero durante 12 horas indujo PAFE positivos.

2. La exposición de *Candida albicans* ATCC 10231 a varias concentraciones de ketoconazol y fluconazol en ausencia de suero durante 12 horas no indujo PAFE positivos.

3. La exposición de *Candida albicans* ATCC 10231 a varias concentraciones de anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol y fluconazol en presencia de suero durante 12 horas indujo PAFE positivos en todos los casos.

4. La reexposición de *Candida albicans* ATCC 10231 a concentraciones de anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol y fluconazol menores que aquellas con las que anteriormente había sido expuesta la levadura, prolongan en todos los casos el PAFE que previamente había sido inducido.

5. La incubación de *Candida albicans* ATCC 10231 durante 6 horas con varias concentraciones de anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol y fluconazol produjo un retraso, en todos los casos, que perduró durante las 3 horas siguientes a la retirada de la droga del medio de incubación.

6. La incubación previa de *Candida albicans* ATCC 10231 con 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de anfotericina B y 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de 5-fluorocitosina durante 6 horas, aumentó su susceptibilidad a la muerte intracelular por PMN humanos durante tres horas tras la eliminación del quimioterápico.

7. La previa incubación de *Candida albicans* ATCC 10231 con 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de ketoconazol durante 6 horas, aumentó su susceptibilidad a la muerte intracelular por PMN humanos durante las tres horas siguientes a la eliminación del quimioterápico; y la previa incubación de la levadura con 4  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  de fluconazol durante 6 horas sólo pudo aumentar su susceptibilidad durante la primera hora tras la eliminación del quimioterápico.

**BIBLIOGRAFIA**

ABRUZZO, G.K.; FROMTLING, R. A.; TURNBULL, T. A.; GILTINAN, D.M.; (1987). "Effects of bifonazole, fluconazole, itraconazole and terbinafine on the chemiluminescence response of immune cells". J. Antimicrob. Chemother. 28: 61-68.

AERTS, F.; DE BRABENDER, M.; VAN DEN BOSSCHE, H.; VAN CUTSEM, J.; BORGERS, M.; (1980). "The activity of ketoconazole in mixed cultures of fungi and human fibroblasts". Mykosen 3: 53-67.

AL-BASSAM, T.; POULAIN, D.; GINMELLY, P.; LEMATRE, J.; BONALY, R.; (1985). "Chemical and antigenic alterations of *Candida albicans* cell walls related to the action of amphotericin B subinhibitory doses". J. Antimicrob. Chemother. 15: 263-269.

ALTMAN, L.C.; (1978). "Chemotactic limphokines: a review." In: Gallin, J.J.; Quie, P.G. (Eds.): "Leukocyte chemotaxis ". Raven Press, New York, 267-287.

ANNAISIE, E.; BODEY, G.P.; RINALDI, M.G. (1989). "Emerging fungal pathogens". Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8: 323-330.

ANSÉHN, S.; BOQUILT, L.; SCHÖNEBECK, J.; WINBLAD, B.; (1974). "Effect of antimycotics on the surface morphology of *Candida albicans*". Castellania 2: 41-44.

ÅNSÉHN, S.; NILSON, L.; (1984). "Direct membrane-damaging effect of ketoconazole and tioconazole on *Candida albicans* demonstrated by bioluminescent assay of ATP". Antimicrob. Agents Chemother. 26: 22-25.

ARAI, T.; MIKAMI, T.; YOHOYSMA, K.; KAWATA, T.; NARUDA, K.; (1977). "Morphological changes in yeasts as a result of the action of 5-fluorocytosine". Antimicrob. Agents Chemother. 12: 255-260.

ARNOLD, R.R.; BREWER, M.; GAUTHIER, J.J.; (1980). "Bacterial activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms". Infect. Immun. 28: 893-898.

ARNAOUT, M.A.; PITT, J.; COHEN, H.J.; MELAMED, J.; ROSEN, F.S.; COLTEN, H.R.; (1982). "Deficiency of a granulocyte-membrane glycoprotein (GP-

150) in a boy with recurrent bacterial infections". *New Engl. J. Med.* 306: 693-699.

BABIOR, B.M.; (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes". *New Engl. J. Med.* 298: 659-668, 721-725.

BAINTON, D.F.; (1977). "Differentiation of human neutrophilic granulocytes: Normal and Abnormal. In: Greenwalt, T.J.; Jamieson, G.A. (Eds.): " The granulocyte: Function and clinical utilization". Alan, R.; Liss, Inc., New York, 1-27.

BANNATYNE, R.M.; CHEUNG, R.; (1978). "Susceptibility of *Candida albicans* to miconazole". *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 1040-1041.

BASSARIS, H.P.; LIANON, P.E.; VOTTA, E.G.; PAPAVALIIOU, J.Th.; (1984). "Effects of subinhibitory concentrations of cefotaxime on adhesion and polymorphonuclear leukocyte function with gram negative bacteria". *J. Antimicrob. Chemother.* 14 (suppl. B): 91-96.

BELCHER, R.W.; CARNEY, J.F.; MONAHAN, F.G.; (1973). "An electron microscopic study of fagocytosis of *Candida albicans* by polymorphonuclear leukocytes". *Lab. Invest.* 29: 620-627.

BENNETT, J.E.; (1977). "Flucytosine". *Ann. Intern. Med.* 86: 319-322.

BERGAN, T.; ENGESET, A.; OLSZEWSKI, W.; OSTBY, N.; SOLBERG, R.; (1986). "Extravascular penetration of highly protein-bound flucloxacillin". *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 729-732.

BERGAN, T.; (1991). "Tissue penetration of antibiotics". En: *Medical Masterclasses-Tissue penetration of antibiotics. Vol. 1 n°1, pags, 2-14.*

BERLINER, S.; WEINBERGER, M.; BEN-BASSAT, M.; LAVIE, G.; WEINBERGGER, A.; GILLER, S.; PINKHAS, J.; (1985). "Amphotericin B causes aggregation of neutrophils and enhances pulmonary leukostasis". *Am. Rev. Respir. Dis.* 132: 602-605.

BIGGER, J.W.; (1944). "The bactericidal action of penicillin on *S. pyogenes*". *Irish J. Med. Sci.* 22: 533-568.

BISHOP, C.R.; ATHENS, J.W.; BOGGS, D.R.; WARNER, H.R.; CARTWRIGHT, G.E.; WINTROBE, M.M.; (1968). "Leukokinetic studies. XIII. A non-

steady-state kinetic evaluation of the mechanism of cortisone-induced granulocytosis". J. Clin. Invest. 47: 249-260.

BLOCK, E.R.; JENNINGS, A.E.; BENNETT, J.E.; (1973). "Variables influencing susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to 5-fluorocytosine". Antimicrob. Agents. Chemother. 4: 392-395.

BLOCK, E.R.; BENNETT, J.E.; LIVOTI, L.G.; KLEIN, W.J.; MACGREGOR, R.R.; HENDERSON, L.; (1974). "Flucytosine and amphotericin B: Hemodialysis effects on the plasma concentration and clearance, studies in man". Ann. Intern. Med. 80: 613-617.

BODEY, G.P.; (1988). "Topical and systemic antifungal agents". Med. Clin. North Am. 72: 637-659.

BORGERS, M.; VAN DEN BOSSCHE, H.; DE BRABENDER, M.; VAN CUTSEM, J.; (1979). "Promotion of pseudomycelium formation of *Candida albicans* in culture: a morphological study of the effects of miconazole and ketoconazole". Postgrad. Med. J. 55: 687-691.

BORGERS, M.; VAN DEN BOSSCHE, H.; (1982). "The mode of action of antifungal drugs". En: Ketoconazole in the management of fungal disease. (Levine, H.B.; Ed.) ASIS PRESS, Auckland; pág. 25-42.

BOUCHARA, J.P.; TRONCHIN, G.; ANNAIX, V.; ROBERT, R.; SENET, J.M.; (1990). "Laminin receptor of *Candida albicans* germ tubes". Infect. Immun. 58: 48-54.

BRAJTBURG, J.; ELBERG, S.; MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G.S.; (1981). "Increase in colony-forming units of *Candida albicans* after treatment with polyene antibiotics". Antimicrob. Agents Chemother. 19: 199-200.

BRAJTBURG, J.; KOBAYASHI, D.; MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G.S.; (1982). "Antifungal action of amphotericin B in combination with other polyene or imidazole antibiotics". J. Infect. Dis. 146: 138-146.

BRYANT, R.E.; SUTCLIFFE, M.C.; (1974). "The effect of 3',5'-adenosine monophosphate on granulocyte adhesion". J. Clin. Invest. 54: 1241-1244.

BUNDTZEN, R.W.; GERBER, A.M.; COHN, D.L.; CRAIG, W.A.; (1981).

"Postantibiotic suppression of bacterial growth". *Rev. Infect. Dis.* 3: 28-37.

CALDERONE, R.A.; LINEHAN, L.; WADSWORTH, E.; SANDBERG, A.L.; (1988). "Identification of C<sub>3</sub>d receptors on *Candida albicans*". *Infect. Immun.* 56: 252-258.

CALHOUN, D.L.; GALGIANI, J.N.; (1984). "Analysis of pH and buffer effect on flucytosine activity in broth dilution susceptibility testing of *Candida albicans* in two synthetic media". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 26: 364-367.

CALHOUN, D.L.; ROBERTS, G.N.; GALGIANI, J.N.; BENNET, J.E.; FEINGOLD, D.S.; JORGENSEN, J.; KOBAYASHI, G.S.; SHADOMY, S.; (1986) "Results of a survey of antifungal susceptibility test in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B". *B. J. Clin. Microbiol.* 23: 298-301.

CARTWRIGHT, G.E.; ATHENS, J.W.; WINTROBE, M.D. (1964). "The kinetics of granulopoiesis in normal man". *Blood* 24: 780-803.

CHILGREN, R.A.; HONG, R.; QUIE, P.G.; (1968). "Human serum interactions with *Candida albicans*". *J. Immunol.* 101: 128-1132.

CHIU, M.L.; (1993). "Actividad fagocítica de leucocitos polimorfonucleares sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* previamente tratados con quimioterápicos". Tesis de Licenciatura.

CHUNN, C.J.; STARR, P.R.; GILBERT, D.N.; (1977). "Neutrophil toxicity of amphotericin B". *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 226-230.

COCKAYNE, A.; ODDS, F.C.; (1984). "Interactions of *Candida albicans* yeast cells, germ tubes and hyphae with human polymorphonuclear leucocytes *in vitro*". *J. Gen. Microbiol.* 130: 465-471.

COLLETTE, N.; VAN DER AUWERA, P.; PASCUAL-LOPEZ, A.; HAYMANS, C.; MEUNIER, F.; (1989). "Tissue concentrations and bioactivity of amphotericin B in cancer patients treated with amphotericin B-deoxycholate". *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 362-368.

COLLINS, M.S.; PAPPAGIANIS, D.; (1973). "Effects of lysozyme and chitinase on the spherules of *Coccidioides immitis in vitro*". *Infect. Immun.* 7: 812-822.

COOK, R.A.; McINTYRE, K.A.; GALGANI, J.N.; (1990). "Effect of incubation temperature, inoculum size and medium on agreement of macro- and microdilution broth susceptibility test results for yeasts". *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1542-1545.

CRAIG, W.A.; LEGGETT, J.; TOTSUKA, J.; VOGELMAN, B.; (1988). "Key pharmacokinetic parameters of antibiotic efficacy in experimental animal infections". *J. Drug Dev.* 1 (supl 3): 7-15.

CRAIG, W.A.; EBERT, S.; LEGGETT, J.; REDINTON, J.; (1990). "Effect of neutrophils on *in vivo* potency of antibiotics against *Klebsiella pneumoniae*". En: Abstracts of the 30th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract nº 151. ASM, Washington, D.C., pág. 112.

CRAIG, W.; (1991). "Animal models in predicting antimicrobial efficacy". En: Medical Masteclasses-Tissue penetration of Antibiotics. Vol.1 nº1, págs. 40-48.

CROWLEY, C.A.; CURNUTTE, J.T.; ROSIN, R.E.; ANDRE-SCHWARTZ, J.; GALLIN, J.I.; KLEMPNER, J.I.; SNYDERMAN, R.; SOUTHWICK, F.S.; STASSEL, T.O.; BABIOR, B.M.; (1980). "An inherited abnormality of neutrophil adhesion: its genetic transmission and its association with a missing protein". *New Engl. J. Med.* 302: 1163-1168.

DANA, N.; TODD, R.F.III; PITT, J.; SPRINGER, T.A.; ARNAOUT, M.A.; (1984). "Deficiency of a surface membrane glycoprotein (MO-1) in man". *J. Clin. Invest.* 73: 153-159.

DAVIDSON, R.J.; ZHANEL, G.G.; PHILLIPS, R.; HOBAN, D.J.; (1991). "Human serum enhances the postantibiotic effect of fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 35: 1261-1263.

DAVIES, R.R.; REEVES, D.S.; (1971). "5-fluorocytosine and urinary candidiasis". *Br. Med. J.* 1: 577-579.

DE BRABENDER, M.; AERTS, F.; VAN CUTSEN, J.; VAN DEN BOSCHE, H.; BORGERS, M.; (1980). "The activity of ketoconazole in mixed cultures of leukocytes and *Candida albicans*". *Saboraudia* 18: 197-210.

DE NOLLIN, S.; VAN BELLE, H.; GOOSSENS, F.; THONE, F.; BORGERS, M.; (1977). "Cytochemical and biochemical studies of yeasts after *in vitro* exposure to miconazole". *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 500-513.

DIAMOND, R.D.; KRZESICKI, R.; JAO, W.; (1978). "Damage to pseudohyphal forms of *Candida albicans* by neutrophils in the absence of serum *in vitro*". *J. Clin. Invest.* 61: 349-359.

DIASO, R.B.; BENNETT, J.F.; MEYERS, C.E.; (1978). "Mode of action of 5-fluorocytosine". *Biochem. Pharmacol.* 27: 703-707.

DIXON, D.; SHADOMY, S.; SHADOMY, H.J.; ESPINEL-INGROFF, A.; KERKERING, M.; (1978). "Comparison of the *in vitro* antifungal activities of miconazole and a new imidazole, R-41,400". *J. Infect. Dis.* 138: 245-248.

DOERN, G.V.; TUBERT, T.A.; CHAPIN, K.; RINALDI, M.G.; (1986). "Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts". *J. Clin. Microbiol.* 24: 507-511.

DOMER, J.E.; CARROW, E.W.; (1989). "Candidiasis". En: *Immunology of the fungal diseases*. Cox R.A. (ed.). CRC Press, Boca Raton pág. 57-92.

DOUGHERTY, R.W.; NIEDEL, J.E.; (1986). "Cytosilic calcium regulates phorbol diester binding affinity in intact phagocytes". *J. Biol. Chem.* 261: 4097-4100.

DRAZIN, R.E.; LEHRER, R.I.; (1977). "Fungicidal properties of a chymotrypsin-like cationic protein from human neutrophils: adsorption to *Candida parapsilopsis*". *Infect. Immun.* 17: 382-388.

EAGLE, H.; FLEISCHMAN, R.; MUSSELMAN, A.D.; (1950). "The bactericidal action of penicillin *in vivo*: the participation of the host, and the slow recovery of the surviving organisms". *Ann. Inter. Med.* 33: 544-571.

EBDEN, P.; NEIL, P.; FARROW, P.R.; (1989). "Sputum levels of fluconazole in humans". *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 963-964.

EGGLETON, P.; GARGAN, R.; FISHER, D.; (1989). "Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers". *J. Immunol. Meth.* 121: 105-113.

FARKAS, B.; DOBOZY, A.; (1983). "The effect of ketoconazole on the phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by polymorphonuclear leukocytes". *Mykosen* 26: 22-26.

FELIU, E.; (1983). "Enfermedades infecciosas". *Vol 1-6* Nov-Dic.

FROMTLING, R.A.; (1984). "Imidazoles as medically important antifungal agents: an overview". *Drugs Today* 20: 325-349.

GADEBUSCH, H.H.; JOHNSON, A.G.; (1966). "Natural host resistance to infection with *Cryptococcus neoformans* IV. The effect of some cationic proteins on the experimental disease". *J. Infect. Dis.* 116: 551-565.

GALE, E.F.; (1986). "Nature and development of phenotypic resistance to amphotericin B in *Candida albicans*". *Adv. Microb. Physiol.* 27: 278-320.

GALGIANI, J.N.; STEVENS, D.A.; (1976). "Antimicrobial susceptibility testing of yeasts: a turbidimetric technique independent of inoculum size". *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 721-726.

GALGIANI, J.N.; STEVENS, D.A.; (1978). "Turbidimetric studies of growth inhibition of yeasts with three drugs: an inquiry into inoculum-dependent susceptibility testing, time of onset of drug effect, and implications for current and newer methods". *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 249-254.

GALGIANI, J.N.; YTURRALDE, C.A.; DUGGER, K.O.; (1986). "Susceptibility of *Candida albicans* to flucytosine when tested in different formulations of Yeast Nitrogen Base broth". *Diag. Microbiol. Infect.* 5: 273-276.

GALGIANI, J.N.; (1987). "Antifungal susceptibility tests". *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1867-1870.

GANZ, T.; SELSTED, M.E.; SZKLAREK, D.; HARWIG, S.S.L.; DAHER, K.; BAINTON, D.F.; LEHRER, R. (1985). "Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils" *J. Clin. Invest.* 76: 1427-1435.

GARGAN, R.A.; BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J.M.T.; (1989). "Failure of water to lyse polymorphonuclear neutrophils completely". *J. Immunol. Meth.* 124: 289-291.

GELFAND, J.A.; KIMBALL, K.; BURKE, J.F.; DINARELLO, C.A.; (1988). "Amphotericin B treatment of human mononuclear cells *in vitro* results in secretion of tumor necrosis factor and interleukin-1". Clin. Res. 36: 456A.

GEORGOPAPADAKOU, N.H.; DIX, B.A.; SMITH, S.A.; FREUDENBERG, J.; FUNKE, P.T.; (1987). "Effect of antifungal agents on lipid biosynthesis and membrane integrity in *Candida albicans*". Antimicrob. Agents Chemother. 31: 46-51.

GERBER, A.U.; CRAIG, W.A.; (1981). "Growth kinetics of respiratory pathogens after short exposures to ampicillin and erythromycin *in vitro*". J. Antimicrob. Chemother. 8: S81-S89.

GERBER, A.U.; WIPRACHTIGER, P.; STETTLER-SPICHIGER, V.; LEBEK, G.; (1982). "Constant infusions *versus* intermittent doses of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa in vitro*". J. Infect. Dis. 145: 554-560.

GHEBREHIWET, B.; MÜLLER-EBERHARD, H.J.; (1979). "C<sub>3</sub>e: an acidic fragment of human C<sub>3</sub> with leukocytosis-inducing activity". J. Immunol. 123: 616-621.

GRAYBILL, J.R.; (1989). "New antifungal agents". Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8: 402-412.

GRESHAM, H.D.; CLEMENT, L.T.; LEHMEYER, J.E.; GRIFFIN, F.M.; VOLANAKIS, J.E.; (1986). "Stimulation of human neutrophil F<sub>c</sub> receptor-mediated phagocytosis by a low molecular weight cytokine". J. Immunol. 137: 868-875.

GRIFFIN, F.M.; GRIFFIN, J.A.; (1980). "Augmentation of macrophage complement reception function *in vitro*". II. Characterization of the effects of a unique lymphokine upon the phagocytic capabilities of macrophages". Antimicrob. Agents Chemother. 21: 241-247.

GRISHAM, M.B.; JEFFERSON, M.M.; MELTON, D.F.; THOMAS, E.L.; (1984). "Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines". J. Biol. Chem. 259: 1404-1413.

GUDMUNDSSON, S.; CRAIG, W.A.; (1991). "The postantibiotic effect". En: Antibiotics in Laboratory Medicine. 3ª Ed. (Lorian, V.; Ed.) Williams and Wilkins, Baltimore, págs. 403-431.

GULL, K.; MARRIOT, M.S.; (1986). "The effect of fluconazole on the morphology and ultrastructure of *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo*". 26th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract, New Orleans. Sep-29, Oct-1.

HARLAN, J.M.; KILLEN, P.D.; SENEAL, F.M.; SCHWARTZ, B.R.; YEE, E.K.; TAYLOR, R.F.; BEATTY, P.G.; PRICE, T.H.; OCHS, H.D.; (1985). "The role of neutrophil adherence membrane glycoprotein GP-150 in neutrophil adherence to endothelium *in vitro*". Blood 66: 167-178.

HAWKINS, S.; ALFORD, R.; (1980). "Human serum inhibition of ketoconazole activity against *Histoplasma capsulatum* in liquid culture". 20th Interscience conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, Louisiana, Estados Unidos. 22-24 de Septiembre.

HAZEN, K.C.; PLOTKIN, B.J.; KLIMAS, D.M.; (1986). "Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*". Infect. Immun. 54: 269-271.

HAZEN, K.C.; HAZEN, B.W.; (1987). "A polystyrene microsphere assay for detecting surface hydrophobicity variations within *Candida albicans* populations", J. Microbiol. Meths. 6: 289-299.

HAZEN, B.W.; HAZEN, K.C.; (1988). "Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*". Infect. Immun. 56: 2521-2525.

HAZEN, K.C.; (1989). "Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells". Infect. Immun. 57: 1894-1900.

HENSEN, M.T.; PITSAKIS, P.G.; LEVISON, M.E.; (1989). "Postantibiotic effect of penicillin plus gentamicin versus *Enterococcus faecalis* *in vitro* and *in vivo*". Antimicrob. Agents Chemother. 33: 608-611.

HOEPRICH, P.D.; INGRAHAM, J.L.; KLEKER, E.; WINSHIP, M.J.; (1974). "Development of resistance to 5-fluorocytosine in *Candida parapsilopsis* during therapy". J. Infect. Dis. 130: 112-118.

HOEPRICH, P.D.; HUSTON, A.C.; (1975). "Susceptibility of *Coccidioides immitis*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* to Amphotericin B, Flucytosine, and Clotrimazole". J. Infect. Dis. 132: 133-141.

HORN, N.; WONG, B.; KIEHN, T.E.; ARMSTRONG, D.; (1985). "Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset, and results of therapy". Rev. Infect. Dis. 7: 646-654.

HORNE, D.; TOMASZ, A.; (1981). "Hypersusceptibility of penicillin-treated group B *Streptococci* to bacterial activity of human polymorphonuclear leukocytes". Antimicrob. Agents Chemother. 19: 745-753.

HUBER, H.; FUDENBERG, H.H.; (1968). "Receptor sites of human monocytes for IgG". Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 34: 18-31.

HUGHES, C.E.; BENNET, R.L.; TUNA, I.C.; BEGGS, W.H.; (1988). "Activities of fluconazole (UK-49,858) and ketoconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans*". Antimicrob. Agents Chemother.

JENSEN, M.S.; BAINTON, D.F.; (1973). "Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear neutrophilic leukocyte". J. Cell Biol. 56: 379-388.

JOHNSON, B.; WHITE, R.J.; MERRY, J.M.; WILLIAMSON, G.M.; (1978). "Factors influencing the susceptibility of *Candida albicans* to the polyenic antibiotics nystatin and amphotericin B". J. Gen. Microbiol. 104: 325-333.

JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W.; RICHARDSON, M.D.; DOUGLAS, C.J.; (1986). "*In-vitro* effect of itraconazole, ketoconazole and amphotericin B on the phagocytic and candidacidal function of human neutrophils". J. Antimicrob. Chemother. 18: 83-91.

JUND, R.; LACROUTE, F.; (1970). "Genetic and physiological resistance to 5-fluoropyrimidines in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol. 130: 112-118.

KAMPSCHMIDT, R.F.; UPCHURCH, H.F.; (1980). "Neutrophil release after injections of endotoxin or leukocytic endogenous mediator into rats". J Reticuloendothel. Soc. 28: 191-201.

KAPLAN, A.P.; KAY, A.B.; AUSTEN, K.F.; (1972). "A prealbumin activator of prekallikrein III ; Appearance of chemotactic activity for human neutrophils by the conversion of human prekallikrein to kallikrein". J. Exp. Med. 135: 81-97.

KAPLAN, A.P.; GOETZEL, E.J.; AUSTEN, K.F.; (1973). "The fibrinolytic pathway of human plasma II. The generation of chemotactic activity by activation of plasminogen proactivator". J. Clin. Invest. 52: 2591-2599.

KIMURA, L.H.; PEARSALL, N.N.; (1980). "Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells". Infect. Immun. 28: 464-468.

KIRKPATRICK, C.H.; GREEN, I; RICH, R.R.; SCHADE, A.L.; (1971). "Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis". J. Infect. Dis. 124: 539-544.

KNAYSI, G.; (1935). "A microscopic method of distinguishing dead from living bacterial cells". J. Bacteriol. 30: 193-206.

KOLDIN, M.H.; MEDOFF, G.; (1983). "Antifungal chemotherapy". Pediatr. Clin. North Am. 30: 49-61.

KURODA, S.; UNO, J.; ARAI, T.; (1978). "Target substances of some antifungal agents in the cell membrane". Antimicrob. Agents Chemother. 13: 454-459.

KWON-CHUNG, K.J.; LEHMAN, D.; GOOD, C.; MAGEE, P.T.; (1985). "Genetic evidence for a role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*". Infect. Immun. 49: 571-578.

LETONTURIER, P.H.; (1981). "Manual de inmunología general". Masson (ed.) Barcelona-Méjico.

LEHRER, R.I.; CLINE, M.J.; (1969a). "Interactions of *Candida albicans* with human leukocytes and serum". J. Bacteriol. 98: 996-1004.

LEHRER, R.I.; CLINE, M.J.; (1969b). "Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection". J. Clin. Invest. 48: 1478-1488.

LIN, H.; MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G.S.; (1977). "Effects of amphotericin B on macrophages and their precursor cells". Antimicrob. Agents Chemother. 11: 154-160.

LOGAN, D.A.; (1988). "Regulation of intracellular carboxypeptidase activity in *Candida albicans*". Exp. Mycol. 12: 386-390.

LOURIA, D.B.; BRAYTON R.G.; FINKEL, G.; (1963). "Studies on the pathogenesis of experimental *Candida albicans* infections in mice". Sabouraudia 2: 271-283.

LOURIA, D.B.; BRAYTON, R.G.; (1974). "Behaviour of *Candida* cells within leukocytes". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115: 93-96.

LUTWICK, L.; GALGANI, J.; JOHNSON, R.; STEVENS, D.; (1976). "Visceral fungal infections due to *Petrialidium boydii* (*Allescheria boydii*). *In vitro* drug sensitivity studies". Am. J. Med. 61: 632-640.

MACDONALD, F.; ODDS, F.C.; (1983). "Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant". J. Gen. Microbiol. 129: 431-438.

MACGREGOR, R.R.; (1976). "The effect of anti-inflammatory agents and inflammation on granulocyte adherence". Am. J. Med. 61: 319-326.

MACKERROW, S.D.; MERRY, J.M.; HOEPRICH, P.D.; (1987). "Effect of buffer on testing of *Candida* species susceptibility to flucytosine". J. Clin. Microbiol. 25: 885-888.

MARMER, D.J.; FIELDS, B.T.; FRANCE, G.L.; STEELE, R.W.; (1981). "Ketoconazole, amphotericin B and amphotericin B methylester: comparative *in vitro* and *in vivo* toxicological effects on neutrophil function". Antimicrob. Agents Chemother. 20: 660-665.

MARRIOTT, M.S.; RICHARDSON, K.; (1987). "The discovery and mode of action of fluconazole". En: Recent Trends in the Discovery, Development and

Evaluation of Antifungal Agents. R.A. Fromtling (Ed.) J.R. Prous Science Publishers, S.A.

MCCUTCHEON, M.; (1946). "Chemotaxis in leukocytes". *Physiol. Rev.* 26: 319-326.

MC DONALD, P.J.; CRAIG, W.A.; KUNIN, C.M.; (1977). "Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time". *J. Infect. Dis.* 135: 217-223.

MC DONALD, P.J.; WETHERALL, B.L.; PRUUL, H.; (1981). "Postantibiotic leukocyte enhancement: Increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotic to the activity of leukocytes". *Rev. Infect. Dis.* 3: 38-44.

MCGUILLEN, J.; PATTERSON, R.; PHAIR, J.P.; (1980). "Adherence of polymorphonuclear leukocytes to nylon: Modulation by Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), corticosteroids, and complement activation". *J. Infect. Dis.* 141: 382-388

MCINTYRE, K.A.; GALGANI, J.N.; (1989). "*In vitro* susceptibilities of yeasts to a new antifungal triazole, SCH 39304: Effects of test conditions and relation to *in vivo* efficacy". *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1095-1100.

MECHLINSKI, W.; SCHAFFNER, C.P.; GANIS, P.; AVITABILE, G.; (1970). "Structural and absolute configuration of the polyene macrolide amphotericin B". *Tetrahedron Letters* 44: 3873-3876.

MEDOFF, G.; VALERIOTE, F.; RYAN, J.; TOLEN, S.; (1977). "Response of transplanted AKR leukemia to combination therapy with amphotericin B and 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea-dose and schedule dependency". *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 949.

MEDOFF, G.; BRAJTBURG, J.; KOBAYASGI, G.S.; (1983). "Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 303-330.

MERSON-DAVIES, L.A.; ODDS, F.C.; (1989). "A morphology index for characterization of cell shape in *Candida albicans*". *J. Clin. Microb.* 135: 3143-52.

METCALF, J.A.; GALLIN, J.I.; NAUSEF, W.M.; ROOT, R.K.; (1986). "Preparation of cells and material for functional assays". En "Laboratory Manual of

Neutrophil Function". Raven Press. New York.

MEUNIER, F.; LAMBERT, C.; VAN DE AUWERA, P.; (1990). "*In-vitro* activity of SCH-39304 in comparison with amphotericin B and fluconazole". J. Antimicrob. Chemother. 25: 227-236.

MINAGAWA, H.; KITAWRA, K.; NAKAMIZO, N.; (1983). "Effect of pH on the activity of ketoconazole against *Candida albicans*". Antimicrob. Agents Chemother. 23: 105-107.

MINGUEZ, F.; CHIU, M.L.; PRIETO, J.; (1993a). "Efecto postantifúngico". Rev. Esp. Quimioterap. 6(1): 33-35.

MINGUEZ, F.; PRIETO, J.; (1993b). "Efecto postantibiótico". Enf. Infecc. y Microbiol. Clín. 11 (3): 147-155.

MINGUEZ, F.; RAMOS, C.; LOSCOS, A.; CHIU, M.L.; PRIETO, J.; (1993c). "*In vitro* killing kinetics and postantibiotic effect of josamycin and other macrolides on several bacteria". Chemother. 39: 163-168.

MINGUEZ, F.; CHIU, M.L.; ÑIQUE, R.; LIMA, E.J.; PRIETO, J.; (1994). "Activity of fluconazole: postantifungal effect, effects of low concentrations and of pretreatment on the susceptibility of *Candida albicans* to leucocytes". J. Antimicrob. Chemother. 34: 93-100.

MITCHELL, L.; SOLL, D.R.; (1979). "Septation during synchronous mycelium and bud formation in released stationary phase cultures of *Candida albicans*". Exp. Mycol. 3: 298-309.

NELSON, R.D.; SHIBATA, N.; PODZORSKI, R.P.; HERRON, M.J.; (1991). "*Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action". Clin. Microb. Rev. 4: 1-19.

NORMAK, S.; SCHONEBECK, J.; (1972). "*In vitro* studies of 5-fluorocytosine resistance in *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata*". Antimicrob. Agents Chemother. 2: 114-121.

NUGENT, K.M.; COUCHOT, K.R.; (1986). "Effects of sublethal concentrations of amphotericin B on *Candida albicans*". J. Infect. Dis. 154: 665-9.

NUGENT, K.M.; COUCHOT, K.R.; GRAY, L.D.; (1987). "Effect of *Candida* morphology on amphotericin B susceptibility". *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 335-336.

ODDS, F.C.; (1979a). "*Candida* and candidosis". Leicester University Press. Pg.382.

ODDS, F.C.; (1979b). "Morphogenesis in *Candida*, with special reference to *C. albicans*. In *Candida and Candidosis*", pp. 29-41. Leicester University Press, Leicester.

ODDS, F.C.; MILNE, L.J.R.; GENTLES, J.C.; BALL, E.H.; (1980). "The activity *in vitro* and *in vivo* of a new imidazole antifungal, ketoconazole". *J. Antimicrob. Chemother.* 6: 97-104.

ODDS, F.C.; (1982). "Interactions among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, and miconazole against pathogenic fungi *in vitro*". *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 763-770.

ODDS, F.C.; CHEESMAN, S.L.; ABBOT, A.B.; (1985). "Suppression of ATP in *Candida albicans* by imidazole and derivative antifungal agents". *Sabouraudia* 23: 415-424.

ODDS, F.C.; CHEESMAN, S.L.; ABBOTT, A.B.; (1986). "Antifungal effects of fluconazole (UK-49,858), a new triazole antifungal, *in vitro*". *J. Antimicrob. Chemother.* 18: 473-478.

ODDS, F.C.; (1988). "*Candida* and candidosis: a review and bibliography". Baillière Tindall. London.

ODEBERG, H.; PELSSON, I.; (1975). "Antibacterial activity of cationic proteins from human granulocytes". *J. Clin. Invest.* 56: 1118-1124.

ODENHOLT, I.; HOLM, S.E.; CARS, O.; (1988). "An *in vivo* model for evaluation of the postantibiotic effect". *Scand. J. Infect. Dis.* 20: 97-103.

ODENHOLT, I.; HOLM, S.E.; CARS, O.; (1989). "Effects of benzylpenicillin on *Streptococcus pyogenes* during the postantibiotic phase *In vitro*". *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 147-156.

ODENHOLT, I.; HOLM, S.E.; CARS, O.; (1990). "Effects of supra and sub-MIC benzylpenicillin concentrations on group A  $\beta$ -haemolytic *streptococci* during the postantibiotic phase *in vivo*". J. Antimicrob. Chemother. 26: 193-201.

PAGE, S.; ODDS, F.C.; (1988). "Binding of plasma proteins to *Candida* species *in vitro*". J. Gen. Microbiol. 134: 2693-2702.

PAUL, B.; SBARRA, A.J.; (1968). "The role of the phagocyte in host-parasite interactions. XIII. The direct quantitative estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in phagocytizing cells". Biochem. Biophys. Acta 156: 168-178.

PETROU, M.A.; ROGERS, T.R.; (1991). "Interactions *in vitro* between polyenes and imidazoles against yeasts". J. Antimicrob. Chemother. 27: 491-506.

PLATZER, E.; WELTE, K.; LU, L.; GABRILOVE, J.L.; LEVI, E.; MERTELSMANN, R.; MOORE, M.A.S.; (1985). "Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 1526-1530.

POBER, J.S.; BEVILACQUA, M.P.; MENDRICK, D.L.; LAPIERRE, L.A.; FIERS, W.; GIMBRONE, M.A. Jr.; (1986). "Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cell lines". J.Immunol. 136: 1680-1687.

POLAK, A.; SCHOLER, H.J.; (1980). "Mode of action of 5-fluorocytosine". En: Chemotherapy, vol 6, ed. J.D. Williams y A.M. Geddes. Plenum Press, New York Pgs. 137-142.

PORTILLO, F.; GANCEDO, C.; (1986). "Purification and properties of three intracellular proteinases from *Candida albicans*". Bioch. Biophys. Acta 881: 229-235.

PRUUL, H.; MC DONALD, P.J.; (1979). "Enhancement of leukocyte activity against *Escherichia coli* after brief exposure to chloramphenicol". Antimicrob. Agents Chemother. 16: 695-700.

PRUUL, H.; WETHERALL, B.L.; MC DONALD, P.J.; (1981). "Enhanced susceptibility of *Escherichia coli* to intracellular killing by human polymorphonuclear

leukocytes after *in vitro* incubation with chloramphenicol". *Antimicrob. Agents Chemother.* 19: 945-951.

QUIE, P.J.; (1972). "Bactericidal function of human polymorphonuclear leukocytes". *Pediatrics* 50: 264-270.

RAST, D.M.; BARTNICKI-GARCIA, S.; (1981). "Effects of amphotericin B, nystatin and other polyene antibiotics on chitin synthase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2233-2236.

RAY, T.L.; PAYNE C.D.; (1982). "Characterization of an acid protease produced by *Candida albicans* and related species". *Clin. Res.* 30 (Abstract): 801A.

REMOLD, H.; STAIB, F.; FASOLD, H.; (1968). "Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*". *Bioch. Biophys. Acta* 167: 399-406.

RENNENBERG, J.; WALDER, M.; (1988). "A mouse model for simultaneous pharmacokinetics and efficacy studies of antibiotics at sites of infection". *J. Antimicrob. Chemother.* 22: 51-60.

REUBEN, A.; ANASSIE, E.; NELSON, P.E.; HASHEM, R.; LEGRAND, C.; HO, D.H.; BODEY, G.P.; (1989). "Antifungal susceptibility of 44 clinical isolates of *Fusarium* species determined by using a broth microdilution method". *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1647-1649.

RICHARDSON, K.; COOPER, K.; MARRIOT, M.S.; (1988). "Design and evaluation of a systemically active agent, fluconazole". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 544: 4-11.

ROGERS, T.J.; BALISH, E.; (1980). "Immunity to *Candida albicans*". *Microbiol. Rev.* 44: 660-682.

ROGERS, T.E.; GALGANI, J.N.; (1986). "Activity of fluconazole (UK-49,858) and ketoconazole against *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo*". *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 418-422.

ROILIDES, E.; WALSH, T.J.; RUBIN, M.; VENZON, D.; PIZZO, P.A.; (1990). "Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils *in vivo*". *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 196-201.

ROOT, R.K.; METCALF, J.A.; (1977). "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from human granulocytes during phagocytosis". J. Clin. Invest. 60: 1266-1279.

RÜCHEL, R.; BÖNING-STUTZER, B.; MARI, A.; (1988). "A synoptical approach to the diagnosis of candidosis, relying on serological antigen and antibody tests, on culture, and on evaluation of clinical data". Mycoses 31: 87-106.

RYLEY, J.F.; WILSON, R.G.; BARRETT-BEE, K.J.; (1984). "Azole resistance in *Candida albicans*". Sabouraudia 22: 53-63.

SAWYER, D.W.; DONOWITZ, G.R.; MANDELL, G.L.; (1989). "Polymorphonuclear neutrophils: An effective antimicrobial force". Rev. Infect. Dis. Vol II (suppl.) Nov.- Dec.

SCALARONE, G.M.; MIKANI, J.; KURITA, N.; YAZAWA, K.; MIYAJI, M.; (1992). "The postantifungal effect of 5-fluorocytosine on *Candida albicans*". J. Antimicrob. Chemother. 29: 129-136.

SCHÖNEBECK, J.; POLAK, A.; FERNEX, M.; (1973). Pharmacokinetic studies on the oral antimycotic agent 5-fluorocytosine in individuals with normal and impaired kidney function". Chemotherapy 18: 321-336.

SCHULTZ, J.; KAMINKER, K.; (1962). "Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. I. Content and localization". Arch. Biochem. Biophys. 96: 465-467.

SENIOR, D.S.; SHAW, J.T.B.; (1988). "*In vitro* effect of fluconazole (UK-49,858) and ketoconazole on mouse lymphocyte proliferation and on *Candida* blastospore destruction by human polymorphonuclear leukocytes". Int. J. Immunopharmacol. 10: 169-173.

SEOW, W.K.; SEYMOUR, G.J.; THONG, Y.H.; (1987). "Direct modulation of human neutrophil adherence by coaggregating periodontopathic bacteria". Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 83: 121-128.

SHADOMY, S.; (1970). "Further *in vitro* studies with 5-fluorocytosine". Infect. Immun. 2: 484-488.

SHEPHERD, M.G.; POULTER, R.T.; SULLIVAN, P.A.; (1985). "*Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity". Annu. Rev. Microbiol. 39: 579-614.

SHIGEMATSU, M.L.; UNO, J.; ARAI, T.; (1982). "Effect of ketoconazole on isolated mitochondria from *Candida albicans*". *Antimicrob. Agents Chemother.* **21**: 919-924.

SOBEL, J.D.; MULLER, G.; BUCKLEY, H.R.; (1984). "Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis". *Infect. Immun.* **44**: 576-580.

SOLL, D.R.; (1986). "The regulation of cellular differentiation in the dimorphic yeast *Candida albicans*". *Bioassays* **5**: 5-11.

SOLL, D.R.; SLUTSKY, B.; MACKENZIE, S.; LANGTIMM, C.; STAEBELL, M.; (1987). "Switching systems in *Candida albicans* and their possible roles in oral candidiasis". En: Mackenzie, J.; Squier, C.; Dabelsteen, E.; (eds.) "Oral mucosa diseases: biology, etiology and therapy". Laegeforeningens Forlag Denmark, págs. 52-59.

SOLL, D.R.; (1988). "High-frequency switching in *Candida albicans* and its relations to vaginal candidiasis". *Am. J. Obstet. Gynecol.* **154**: 997-1001.

SOLL, D.R.; (1990). "Dimorphism and high frequency switching in *Candida albicans*". En: Kirsch, D.R.; Kelly, R.; Kurtz, M.B. (eds) "The genetics of *Candida*". CRC Press. Boca Raton, págs. 147-176.

SOLL, D.R.; ANDERSON, J.; BERGEM, M.; (1991). "The developmental biology of the white-opaque transition in *Candida albicans*". En: Prasad, R. (ed.) "The molecular biology of *Candida albicans*". Springer-Verlag, Berlin, págs. 20-45.

STAIB, F.; (1965). "Serum proteins as nitrogen source for yeastlike fungi". *Sabouraudia.* **4**: 187-193.

STANLEY, V.C.; HURLEY, R.; (1969). "The growth of *Candida* species in cultures of mouse peritoneal macrophages". *J. Pathol.* **97**: 357-366.

SUD, I.J.; CHOU, D.L.; FEINGOLD, D.L.; (1979). "Effects of free fatty acids on liposome susceptibility to imidazole antifungals". *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**: 660-663.

SUGAR, A.M.; GOLDANI, L.Z.; PICARD, M.; (1991). "Treatment of murine invasive candidiasis with amphotericin B and cilofungin: Evidence for enhanced

activity with combination therapy". *Antimicrob. Agents Chemother* 35: 2128-2130.

SWAMY, K.H.S.; SIRSI, M.; RAO, G.R.; (1974). "Studies on the mechanism of action of miconazole: effect of miconazole on respiration and cell permeability of *Candida albicans*". *Antimicrob. Agents Chemother.* 5: 420-425.

SWEET, S.P.; DOUGLAS, L.J.; (1991). Effect of iron deprivation on surface composition and virulence determinants of *Candida albicans*". *J. Gen. Microbiol.* 137: 859-865.

TASCHDJIAN, C.L.; BURCHALL, J.J.; KOZZIN, P.J.; (1960). "Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substituted". *Amer. J. Dis. Child.* 99: 212-215.

TAUBER, M.G.; ZAK, O.; SCHELD, W.M.; HENGSTLER, B.; SANDE, M.A.; (1984). "The postantibiotic effect in the treatment of experimental meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in rabbits". *J. Infect. Dis.* 149: 575-584.

THOMAS, E.L.; GRISHAM, M.B.; JEFFERSON, M.M.; (1986). "Cytotoxicity of chloramines". *Methods Enzymol.* 132: 585-593.

THOMAS, E.L.; LEHRER, R.I.; REST, R.F.; (1988). "Human antimicrobial activity". *Rev. Infect. Dis.* 10: 450-456.

TOTSUKA, K.; SHIMIZU, K.; LEGGETT, J.; VOGELMAN, B.; CRAIG, W.A.; (1988). "Correlation between the pharmacokinetic parameters and the efficacy of combination therapy with an aminoglycoside and a  $\beta$ -lactam". In Proceedings of the International Symposium on Netilmicin, Ueda, J., editor. Professional Postgraduate Services, Tokyo, Japan, págs. 41-48.

TROKE, P.F.; SMITH, M.J.; (1987). "The *in vitro* and *in vivo* activity of fluconazole against *Cryptococcus neoformans*". 27th Intenscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract, New York. Oct 4-7.

TRONCHIN, G.; BOUCHARA, J.P.; ROBERT, R.; SENET, J.M.; (1988). "Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: Ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins". *Infect. Immun.* 56: 1987-1993.

TUCKER, R.M.; WILLIAMS, P.L.; ARATHOON, E.G.; LEVINE, B.E.; HARSTEIN, A.I.; HANSON, L.H.; STEVENS, D.A.; (1988). "Pharmacokinetics of fluconazole in cerebrospinal fluid and serum in human coccidioidal meningitis". *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 369-373.

TURNIDGE, J.D.; GUDMUNDSON, S.; CRAIG, W.A.; (1982). "Postantibiotic effect (PAE) of antifungal agents against common pathogenic yeasts". En: Program and Abstracts of the Twenty-second Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemother. Abstrac 491. ASM, Washington, D.C., pág. 152.

UNO, J.; SHIGEMATSU, M.L.; ARAI, T.; (1982). "Primary site of action of ketoconazole on *Candida albicans*". *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 912-924.

UTZ, C.; SHADOMY, S.; (1976). "New medium for *in vitro* susceptibility studies with amphotericin B". *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 776-777.

VANDEN BOSSCHE, H.; WILLEMDENS, G.; COOLS, W.; MARICHAL, P.; LAUWERS, W.; (1983). "Hypothesis on the molecular basis of the antifungal activation on N-substituted imidazoles and triazoles". *Biochem. Soc. Trans.* 11: 665-667.

VANDEN BOSSCHE, H.; (1985). "Biochemical targets for antifungal azole-derivates. Hypothesis of the mode of action". *Curr. Top. Med. Mycol.* 1: 313-351.

VANDEN BOSSCHE, H.; BELLENS, D.; COOLS, W.; GORRENS, J.; MARICHAL, H.; VERHOEVEN, C.; WILLEMSSENS, G.; DE COSTER, R.; BEERENS, D.; HAELTERMAN, C.; COENE, M.C.; LAUWERS, W.; LE JEUNE, L.; (1986). "Cytochrome P-450: target for itraconazole". *Drug Dev. Res.* 8: 287-298.

VAN DER AUWERA, P.; CEUPPENS, A.M.; HEYMANS, C.; MEUNIER, F.; (1986). "*In vitro* evaluation of various antifungal agents alone and in combination by using an automatic turbidimetric system combined with viable count determinations". *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 997-1004.

VAN DER AUWERA, P.; MEUNIER, F.; (1989). "*In vitro* effects of cilofungin (LY 121019), amphotericin B and amphotericin B-deoxycholate on human polymorphonuclear leukocytes". *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 747-763.

VAN DER AUWERA, P.; (1991). "Interactions of antibiotics and phagocytic kill of bacteria". En: Medical Masterclasses-Tissue penetration of antibiotics". Vol. 1 n° (1). pags. 27-39.

VAN ETTEN, E.W.M.; VAN DE RHEE, N.E.; VAN KAMPEN, K.M.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. (1991). ; "Effect of amphotericin B and fluconazole on the extracellular and intracellular growth of *Candida albicans*". Antimicrob. Agents Chemother. 35: 2275-2281.

VAN RENSBURG, C.E.J.; ANDERSON, R.; JOONE, G.; VAN DER MERVE, M.F.; EFTYCHIS, H.A.; (1983). "The effects of ketoconazole on cellular and humoral immune functions". J. Antimicrob. Chemother. 11: 49-55.

VAN'T WOUT, J.W.; MATTIE, H.; VAN FURTH, R.; (1989). "Comparison of the efficacies of amphotericin B, fluconazole and itraconazole against a systemic *Candida albicans* infection in normal and neutropenic mice". Antimicrob. Agents Chemother. 33: 147-151.

VAN'T WOUT, J.W.; MEYHAAR, I.; LINDE, I.; POELL, R.; MATTIE, H.; VAN FURTH, R.; (1990). "Effect of amphotericin B, fluconazole and itraconazole on intracellular *Candida albicans* and germ tube development in macrophages". J. Antimicrob. Chem. 25: 803-811.

VOGELMAN, B.; GUDMUNDSSON, S.; TURNIDGE, J.; LEGGETT, J.; CRAIG, W.A.; (1988). "*In vivo* postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice". J. Infect. Dis. 157: 287-298.

VUDDHAKUL, V.; MCCORMACK, J.G.; KIM SEOW, W.; SMITH, S.E.; THONG, Y.H.; (1988). "Inhibition of adherence of *Candida albicans* by conventional and experimental antifungal drugs". J. Antimicrob. Chemother. 21: 755-763.

WALSH, T.J.; PIZZO, P.; (1988). "Treatment of systemical fungal infections: recent progress and current problems". Eur. J. Clin. Microbiol. 7: 460-475.

WALSH, T.J.; LEE, J.; AOKI, S.; MECHINAUD, F.; BACHER, J.; LECCIONES, J.; THOMAS, V.; RUBIN, M.; PIZZO, P.A.; (1990). "Experimental basis for use of fluconazole for preventive or early treatment of disseminated candidiasis in granulocytopenic host". Rev. Infect. Dis. 12 (suppl. 3): 307-327.

WARD, P.A.; LE POW, I.H.; NEWMAN, L.J.; (1968). "Bacterial factors chemotactic for polymorphonuclear leukocytes". Amer. J. Pathol. 52: 725-736.

WARD, P.A.; BECKER, E.L.; (1977). "Biology of leukotaxis". Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 77: 125-148.

WASHINGTON, J.A.; BARRY, A.L.; (1974). "Dilution test procedures". En: Manual of Clinical Microbiology. Vol 1, págs. 410-417. 2nd ed. (Lennette, E.H.; Spaulding, E.H.; Truant, J.P.; eds.) American Society for Microbiology. Washington D.C.

WEISSMAN, G.; SMOLEN, J.E.; KORCHAK, H.M.; (1980). "Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils". New Engl. J. Med. 303: 27-34.

WILDFEUER, A.; LAUFEN, H.; HAFERKAMP, O.; (1990). "Interaction of fluconazole and human phagocytic cells". Arzneim-Forsch Drug Res. 40: 1044-1047.

WILKINSON, P.C.; (1974). "The role of chemotaxis in inflammatory reactions". En "Chemotaxis and Inflammation". Churchill Livingstone. London, págs. 148-166.

XHONNEUX, B.; JANSEN, T.; BORGERS, M.; ODDS, F.C.; (1992). "Effects of itraconazole on phagocytosis and killing of *Candida glabrata* by polymorphonuclear leukocytes from guinea pigs". J. Antimicrob. Chem. 30: 181-188.

YAMAGUCHI, H.; UCHIDA, K.; KAWASAKI, K.; MATSUNAGA, T.; (1989). "*In vitro* activity of fluconazole, a novel bistriazole antifungal agent". Jap. J. Antibiot. 42: 1-16.

ZAKIREH, B.; BLOCK, L.H.; ROOT, R.K.; (1979). "Neutrophil function and host resistance". Infection 7: Nr.2.

ZINSSER, H.; (1971). "Microbiología". 4ª Edición en Español. Unión tipográfica. Editorial Hispano-Americana.