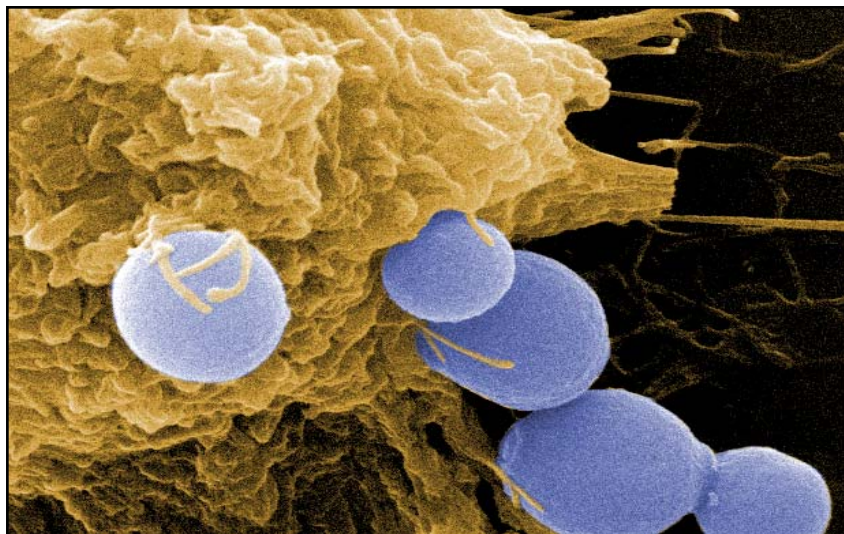


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



Interacción de *Candida famata* con células en cultivo
y animales de experimentación



Tesis doctoral
Maria Pacheco Santos
Madrid 2006



Dña. Ángeles Juarranz de la Fuente, Profesora Titular de Biología Celular de la UAM y D. Luis Carrasco Llamas, Catedrático de Microbiología de la UAM, certifican que Dña. Maria Pacheco Santos ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: "Interacción de *Candida famata* con células en cultivo y animales de experimentación".

Revisado el presente trabajo, consideran que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Dña. Ángeles Juarranz
de la Fuente

D. Luis Carrasco Llamas

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer su dedicación y el otorgarme la posibilidad de realizar este trabajo a mis directores, el profesor Luís Carrasco Llamas y a la profesora Ángeles Juarranz de la Fuente, en especial a esta última por su preocupación tanto a nivel profesional como personal, por darme ánimos constantemente para continuar y llegar al final, por no dejarme abandonar. Asimismo agradecer a la Organización Nacional de Ciegos (ONCE) la financiación de este estudio.

A los "jefes" Ángeles Villanueva y Magdalena Cañete por sus apariciones estelares con su increíble humor ácido que tanto me ha hecho reír así como su ayuda y sus consejos, Santi por los desayunos de café y tostadas...fueron buenos momentos, Francisco Sanz por su paciencia corrigiendo este trabajo y por las aportaciones al mismo y Juan Carlos Stockert quien en el fondo es el jefe y profesor de todos los celulares.

Agradecerle también al Dr. Javier Regadera y en especial a Carmen Sánchez Palomo su inestimable ayuda en el procesamiento y análisis de los tejidos. Así como a los Doctores Burgos y Larrauri del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la UAM y a todas las personas que nos donaron desinteresadamente muestras para este estudio.

Así mismo, quería agradecer a todos los componentes de la Unidad de Citología: los profesores Rosario Armas Portela, Pedro del Castillo Escassi, M^a José Hazen de San Juan, M^a del Carmen Iglesias de la Cruz, Jesús Page Utrilla, Julio Sánchez Rufas, José Ángel Suja Sánchez y a los ayudantes y becarios el trato siempre agradable que me han dado, así como la ayuda facilitada.

Gracias también a las "chicas del Cv206" a Rebeca y Diana por los cientos de "preinoculitos" que me han preparado durante todos estos años, a Marta por los cafés y desahogos de después, a Patricia por ser la proveedora de los compuestos antifúngicos, a Susana por intentar inculcarme paciencia y a todas en general por miles de favorcitos que habéis hecho durante estos años. También agradecer la ayuda prestada al Servio de Microscopía Electrónica del CBM y en especial a M^a Teresa Rejas Marco.

A todos mis compañeros de laboratorio A115 y los "adosados habituales" que han hecho que mis años aquí sean "toda una experiencia". Gracias por estar conmigo tanto en mis buenos momentos como en los malos y ayudarme en mi trabajo y ser buenos amigos fuera de él. Gracias a Yelo por los mimitos y los abrazos y por ser el

mas cómodo, a Vanessa por las constantes risas y por ser una amiga, a Javi por meterse con nosotras como un "maridito" cualquiera, por las competiciones a los juegos y los muchos "momentos surrealismo", a Alfonso y Bego por su interminable ternura y los cientos de cafés en los momentos precisos, a Pilar por los secretos y los cotilleos y las impresiones compartidas en tantos momentos, a Evita por sus visitas que tanto nos alegran y, a Sergio que aún estando tan lejos se te siente cerca.

Ante todo quiero agradecerle a mi madre, hermanos Dani y Raquel, a Jaime, mis primos alicantinos Amor, Abel y Sory y Norberto, mis tíos Amor y Norberto y a mi "Abue" que siempre estén ahí dándome un punto de referencia a partir del cual construir mi vida, apoyándome y dándome buenos consejos, gracias por hacerme ser mejor persona.

Por último quiero agradecerles a mis amigos (Merce, Cristina, compis de piso, alicantinos, vanesseros, doñareros... todos aquellos que ya sabéis a quienes me refiero) el hacerme reír y desconectar un poco cuando mas lo necesitaba y darme palmadas de ánimo en los últimos momentos de tesis donde tan necesario es el apoyo de tu gente, y en especial a Nestor simplemente por ser tu...mi hogar.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ADN: ácido desoxiribonucleico

Anti-IgG: anticuerpo frente a inmunoglobulina G

AO: naranja de acridina

AT: azul de toluidina

BFA: brefeldina A

BSA: albumina de suero bobino

CA: *C. albicans*

cAMP: adenosin monofosfato cíclico

CFA: *C. famata*

CFAQ: *C. famata* tratada con calor

CFL: calcofluor

CG: *C. glabrata*

CGQ: *C. glabrata* tratada con calor

CR: receptores de complemento

D21: antisuero de conejo frente a *C. famata*

D36: antisuero de conejo frente a *C. albicans*

D51: antisuero de conejo frente a *C. glabrata*

DAB: diaminobencidina

D.E.: desviación estándar

DEMEM: Dulbecco´s Modified Eagle´s Médium

ERK: proteína quinasa regulada por señal extracelular

dNTP: deoxinucleotidos

D.O.: densidad óptica

EDTA: ácido etilenediamotetracético

F25: frascos de 25 cm² de superficie

FcR: receptores tipo inmunoglobulina

FITC: isotiocianato de fluoresceína

H-33258: Hoechst 33258

IL: interleuquina

I.M.: índice mitótico

INF- γ : interferón- γ

IP: yoduro de propídio

i.p.: inyección intraperitoneal

ITS: secuencias intermedias
i.v.: inyección por vía intravenosa
MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEK: proteína quinasa de MAP y ERK
MFs: microfilamentos de actina
MNZ: miconazol
MR: receptores de manosa
MTs: microtúbulos
NF-κB: factor de necrosis-κB
NIST: nistatina
pb: pares de bases
PBS: tampón fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PFA: paraformaldehído
PKA: proteína quinasa A
RNS: especies reactivas de nitrógeno
ROS: especies reactivas de oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
RPMI – 1640: medio de cultivo con Glutamax-1
Saps: proteinasa de aspártico secretada
SBP: esteptavidina-biotina-peroxidasa
SEM: microscopía electrónica de barrido
SFB: suero fetal bovino
TAE: tampón tris-acetato-EDTA
TEM: microscopía electrónica de transmisión
TLRs: receptores tipo Toll
TNF-α: factor de necrosis tumoral-α
TRITC: tetrametil-rodamina
UFC: unidad formadora de colonia
wt: fenotipo salvaje
YPD: yeast extract-peptona-dextrosa

ÍNDICE



INDICE

Abreviaturas	i
Resumen	iii
1. Introducción	1
1.1. Los hongos	1
1.2. Características generales del género <i>Candida</i>	2
1.2.1. Estructura general	3
1.2.2. Reproducción	6
1.2.3. Infectividad	7
1.3. Mecanismo de infección	9
1.3.1. Plasticidad morfológica	9
1.3.2. Producción de enzimas líticas	11
1.3.3. Adhesión a las células del huésped	12
1.3.4. Activación de las células del huésped	13
1.3.5. Entrada de <i>Candida</i> en las células del huésped	14
1.4. <i>Candida albicans</i>	17
1.5. <i>Candida glabrata</i>	19
1.6. <i>Candida famata</i>	21
1.7. Modelos de estudio	21
2. Hipótesis y objetivos	23
3. Material y métodos	24
3.1. Levaduras y condiciones de cultivo	24
3.2. Líneas celulares	24
3.3. Reactivos y anticuerpos	25
3.4. Cinéticas de crecimiento y caracterización morfológica de las levaduras	26
3.5. Infección de células de mamífero en cultivo	27
3.5.1. Cuantificación de la adhesión	28
3.5.2. Entrada de <i>Candida</i> en las células de mamífero	28
3.6. Tratamientos con diversos compuestos	29
3.7. Inmunofluorescencia en levaduras	29

3.8. Determinación de elementos del citoesqueleto	30
3.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	31
3.10. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	31
3.11. Análisis mediante PCR	32
3.11.1. Extracción del ADN	32
3.11.2. Realización de la PCR y electroforesis de ADN	33
3.12. Citometría de flujo	33
3.13. Determinación de la viabilidad celular	34
3.13.1. Viabilidad de células de mamífero	34
3.13.2. Viabilidad de las levaduras	34
3.14. Capacidad infectiva en ratones	35
3.14.1. Animales, mantenimiento e infección con <i>C. famata</i>	35
3.14.2. Cultivo de las levaduras procedentes de sangre y tejidos	37
3.14.3. Determinación de la presencia de levaduras en sangre	37
3.14.4. Procesamiento de los tejidos para análisis su histológico	37
3.14.5. Inmunohistoquímica	38
3.15. Análisis de muestras humanas	39
3.15.1. Selección de las muestras	39
3.15.2. Procesamiento de las muestras	40
3.16. Observaciones microscópicas y análisis estadístico	40
4. Resultados	42
4.1. Morfología de las levaduras	42
4.2. Adhesión de las levaduras a células en cultivo	44
4.2.1. <i>C. famata</i> se adhiere diferencialmente a los distintos tipos celulares	44
4.2.2. La capacidad de adhesión de <i>C. glabrata</i> y <i>C. albicans</i> es mayor que la de <i>C. famata</i>	46
4.3. Entrada de <i>C. famata</i> en las células de mamífero	48
4.4. Participación de los microfilamentos de actina en el proceso de adhesión y entrada	50
4.5. Alteración de los microtúbulos de las células infectadas	52
4.6. Adhesión y entrada de <i>C. famata</i> analizada por microscopía electrónica	54

4.7. Efectos de los diferentes tratamientos en la interacción y entrada de las levaduras	56
4.8. Variaciones en el ciclo celular ocasionadas por el proceso infeccioso ...	58
4.9. Viabilidad de las células en cultivo y de <i>C. famata</i> tras la infección	62
4.10. Capacidad infectiva en ratones	63
4.11. Presencia de levaduras en tejidos humanos	68
5. Discusión	71
5.1. Infección de células en cultivo	71
5.1.1. Transición dimórfica	72
5.1.2. Capacidad de adhesión	73
5.1.3. Entrada de <i>Candida</i> en los diferentes tipos celulares	75
5.1.4. Alteraciones en el ciclo y muerte de la célula huésped	77
5.1.5. Modificaciones en el citoesqueleto por la adhesión y la entrada de <i>Candida</i>	80
5.2. Estudios <i>in vivo</i> . Modelos animales	83
6. Conclusiones	90
7. Bibliografía	92

RESUMEN

Resumen

Candida albicans es la principal causante de infecciones fúngicas, especialmente en individuos hospitalizados e inmunodeprimidos. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado la incidencia de infecciones debidas a otras especies *diferentes de C. albicans*. Dentro de estas nuevas especies se encuentra *C. famata*, la cual ha sido descrita como responsable de varios tipos de infecciones, tanto en humanos como en animales. Por esta razón, resulta de gran interés analizar la capacidad infectiva de esta nueva especie oportunista tanto en sistemas celulares *in vitro*, como en modelos animales murinos y compararla con otras especies patógenas como *C. albicans* y *C. glabrata*.

Los resultados obtenidos con cultivos celulares indican que *C. famata* es capaz de adherirse a las diferentes líneas celulares en cultivo como: HeLa (carcinoma de útero humano), HaCaT (queratinocitos humanos), Pam-212 (queratinocitos de ratón), 3T6 (fibroblastos de ratón), HT-1080 (fibroblastos humanos) y THP-1 (monocitos humanos). No obstante, *C. famata* presenta mayor afinidad por los monocitos THP-1 y menor por las células de origen epitelial, incluyendo HeLa. Los análisis mediante SEM, TEM e inmunofluorescencia indirecta demuestran que todas las células son susceptibles de incorporar la levadura, encontrándose en el interior de las mismas ya a partir de 1-3 h de infección. La entrada de la levadura ocasiona alteraciones en el patrón de ciclo celular. Así mismo, tanto el citoesqueleto de actina como los microtúbulos participan en el proceso de infección, a juzgar por las alteraciones sufridas en los mismos durante dicho proceso. Una vez en el interior de las células, la mayoría de las levaduras son digeridas; sin embargo, *C. famata* permanece viable durante al menos 72 h después de la infección, indicando que resiste al proceso de degradación y ocasionando un bajo porcentaje de muerte celular (<10%). Tanto la adhesión como la entrada de *C. famata* son procesos activos, ya que las levaduras vivas se adhieren y entran en mayor medida que las inactivadas mediante calor o por tratamiento con compuestos antifúngicos.

Por otro lado, también se ha estudiado la capacidad infectiva de *C. famata* en ratones (Balb/C), tanto inmunocompetentes como inmunosuprimidos (nu/nu), analizándose: la mortalidad ocasionada, la presencia ó ausencia de levaduras en sangre y los órganos diana en los que preferentemente se localiza. Los resultados obtenidos muestran que *C. famata* no ocasiona la muerte de los ratones infectados. No obstante, tanto en los ratones inmunocompetentes como en los inmunosuprimidos, se determinó la presencia de la levadura en bazo, riñón, hígado, intestino, encéfalo y pulmón mediante inmunohistoquímica. En el hígado, además se observaron granulomas de pequeño tamaño, dispersos por el parénquima, semejantes a los inducidos por la infección con *C. glabrata*, particularmente en los ratones inmunosuprimidos. Estas estructuras se originan y permanecen en el parénquima hepático como consecuencia del proceso infectivo. Así mismo, se analizó la presencia de *C. famata* en tejidos procedentes de individuos con determinadas patologías en los que se han observado levaduras del género *Candida*. En concreto, se determinó que *C. famata* se encontraba presente en 3 de las 7 muestras intestinales analizadas procedentes de pacientes diagnosticados con enfermedad de Crohn. Los resultados obtenidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, demuestran que la capacidad infectiva de *C. famata* es inferior a la de *C. glabrata* y de *C. albicans*, pero esta levadura también es susceptible de adherirse, entrar y dañar a células humanas y murinas. Estos resultados contribuyen, sin duda, a incrementar el conocimiento sobre el mecanismo de acción de esta levadura emergente.

Abstract

Candida albicans is considered to be the main pathogenic yeast causing a multitude of infections in humans, particularly in immunocompromised and hospitalized patients. In the recent years, new yeasts have emerged that are now being recognised as potential human pathogens. In this sense, *C. famata* is regarded as a new pathogenic yeast, being the responsible for several types of infections in humans and animals. For this reason, to analyze the infective ability of this emerging yeast in both, *in vitro* cellular system, as well as in *in vivo* murine models, in comparison with the better known pathogen species *C. albicans* and *C. glabrata*, should be of interest.

The results obtained with cell cultures indicate that *C. famata* is able to interact with different cell lines, such as: HeLa (human carcinoma), HaCaT (human keratinocytes), Pam-212 (mouse keratinocytes), 3T6 (mouse fibroblasts), HT-1080 (human fibrosarcoma) and THP-1 (human monocytes). However, the affinity of the yeast for the cells varies, being higher with THP-1 and lower with the epithelial cell lines, such as HeLa. Indirect immunofluorescence using antiserum for *C. famata*, as well as the SEM and TEM analysis, revealed that all the cell lines studied are able to internalize the yeast at early times (1-3 h) after infection. In addition, the entry of the yeast induces changes in the cell cycle, determined by flow cytometry, as well as changes in the actin cytoskeleton and microtubules; this result indicating that both cytoskeletal elements could be important in the infection processes. Once inside the cells, while most of the yeast seemed to be degraded, some remained viable for at least 72 h after infection and was capable of inducing a low cell lethality (<10%). Both, cell adhesion and entry, are active processes, since prior inactivation of the yeast by heating or by antifungal compounds (miconazole) significantly decreases the adhesion and internalization rates to the cells.

In addition, the infection ability of *C. famata* in immunocompetent and immunosuppressed mice has been analysed, in particular: the lethality induced, the presence or absence of yeast in the blood and the target organs where it mainly locates. The results obtained indicate that *C. famata* is not able to kill the animals. However, in both, immunocompetent and immunosuppressed mice, the yeast was found to be present in relevant organs, such as: spleen, intestine, lung, liver and brain, as determined by immunohistochemistry. In the liver, it was also possible to observe granulomas of small size dispersed within the parenchyma, similar to those induced by infection with *C. glabrata*, particularly in the immunosuppressed mice. These structures originate and remain in the liver as a consequence of the infective process. In addition, the presence of *C. famata* in tissues belonging to specimens with pathologies in which yeasts of the *Candida* species have been identified was also analysed. In particular, it was determined that *C. famata* was present in 3 of the 7 intestine samples analysed, from patients with diagnosed Crohn disease. Results obtained in *in vitro* and *in vivo* conditions show that the infective capacity of *C. famata* is lower than that of *C. glabrata* and *C. albicans*, but this yeast is also capable of adhering, entering and damaging human and murine cells. The results of this work contribute to enhance the knowledge in the action mechanisms of new emerging yeasts.

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Los hongos

Se han descrito más de 100.000 especies de hongos, aunque sólo unas 200 pueden ser consideradas como patógenas para el hombre, pudiendo ocasionar un amplio espectro de enfermedades. En muchos casos afectan a individuos inmunosuprimidos, por lo que la mayor parte de ellos son catalogados como patógenos oportunistas (van Burik y Magee, 2001). No obstante, en los últimos años se ha detectado un claro incremento en el número de especies fúngicas causantes de micosis invasivas, habiéndose aislado nuevos hongos patógenos difíciles de diagnosticar y de tratar (van Burik y Magee, 2001; Carlile y col., 2001; Kullberg y Oude Lashof, 2002).

Los hongos que presentan mayor importancia médica pueden encontrarse bien como levaduras o formas unicelulares o bien formando redes de micelios o hifas formadas por asociaciones celulares (Sudbery y col., 2004; Wendland, 2001). Algunos hongos pueden pasar del estado de levadura al de hifa y viceversa en función de las condiciones ambientales. Estos hongos reciben el nombre de dimórficos. Muchos hongos patógenos son dimórficos y experimentan cambios reversibles entre la fase de levadura y la de hifa o micelio. La transición morfogenética entre estas dos fases se ve a menudo estimulada por el crecimiento e invasión en el propio huésped. En cualquier caso, las diferentes formas fúngicas confieren propiedades que les son ventajosas en cada estadio y en cada lugar de infección (Carlile y col., 2001; Gow y col., 2002; Sudbery y col., 2004).

Las infecciones fúngicas pueden ser adquiridas por inhalación de esporas o directamente por penetración en la piel y mucosas, y pueden ser invasivas o no invasivas. Todas aquellas infecciones que no quedan relegadas a la piel y a las membranas mucosas son referidas como invasivas e incluyen la infección sistémica y la infección de un órgano interno. En muchos casos, la infección en su fase inicial es asintomática y puede permanecer latente, reactivándose posteriormente para ocasionar infecciones sistémicas diseminadas. Las características clínicas de la infección fúngica en el hombre dependen de la especie y de la función inmunológica del huésped. Hay, sin embargo, varios aspectos comunes a dichas infecciones: la mayor parte de las mismas se presentan como subagudas o crónicas y solo son invasivas si no son contenidas por el sistema inmunológico del huésped; los hongos crecen despacio (más lentamente que las bacterias) y no producen endotoxinas que puedan

causar colapso cardiovascular; por último, mientras que los antibióticos pueden curar las infecciones bacterianas en un individuo inmunodeprimido, muchas de las infecciones fúngicas vuelven a aparecer después de finalizado el tratamiento.

Las infecciones fúngicas en el hombre son causadas principalmente por organismos pertenecientes principalmente a los géneros *Aspergillus* y *Candida* y también, aunque en menor medida, por los géneros *Fusarium* y *Bipolaris*. Otros hongos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* y *Sporothrix schenckii*, también se han asociado a infecciones importantes, principalmente en pacientes inmunodeprimidos (Coleman y col., 1998; Kullberg y Oude Lashof, 2002; Carlile y col., 2001). Las infecciones ocasionadas por *Aspergillus* incluyen formas no invasivas y formas invasivas. Mientras que las primeras pueden pasar desapercibidas al no requerir, en muchas ocasiones, tratamientos específicos, las invasivas, más graves, se diseminan por lo general de forma rápida a través del torrente circulatorio (Kullberg y Oude Lashof, 2002). En los últimos años se ha observado un notable incremento de las aspergilosis invasivas siendo la causa principal de mortalidad de pacientes con enfermedades hematológicas. Se estima que la aspergilosis invasiva afecta entre el 10-25% de pacientes con leucemia ocasionando la mortalidad del 80-90% de los mismos (Kullberg y Oude Lashof, 2002). El principal agente patógeno de este género es *A. fumigatus*, responsable del 80-90% de las infecciones ocasionadas por *Aspergillus*, aunque nuevas especies están cobrando importancia (Denning, 1998; Lin y col., 2001).

Como en el caso del género *Aspergillus*, también las infecciones ocasionadas por *Candida* están aumentando en los últimos años, lo que explica el interés creciente que ha cobrado el estudio de estas especies como agentes infecciosos.

1.2. Características generales del género *Candida*

Las especies del género *Candida*, a pesar de ser comensales comunes, son también responsables de la mayor parte de los casos de infecciones hospitalarias, las cuales se han incrementado notablemente en la última década. Por ejemplo, en EEUU, la candidemia es la cuarta causa más frecuente de infecciones hospitalarias, con costes anuales que se estiman en 1 billón de dólares. Los cálculos aproximados indican que en la población americana (300 millones) ocurren aproximadamente unas 10.000 muertes al año debido a infecciones ocasionadas por *Candida* (Edmond y col., 1999). Aunque las cifras en Europa no son tan elevadas, también se ha visto un incremento notable de los individuos afectados (Coleman y col., 1998; Krcmery y Barnes, 2002;

Kullberg y Oude Lashof, 2002; Sudbery y col., 2004; Carlile y col., 2001; Edmond y col., 1999)

La clasificación de las especies de *Candida* es complicada y discutida debido al gran polimorfismo que presentan. En principio, responden a las características de las levaduras *Ascomycetes* u hongos perfectos. Sin embargo, al no conocerse los procesos de reproducción sexual, algunos autores las engloban dentro de la clase *Deuteromycetes*, donde se incluyen todas las especies de hongos que carecen de este tipo de reproducción. No obstante, en los últimos años han aparecido algunas publicaciones en las que se describe la aparición de esporas, propias de la reproducción sexual, en cultivos de candidas sometidos a ciertas condiciones, lo que dificulta aun más su clasificación dentro de una clase u otra.

En condiciones normales son organismos aerobios y tienen una gran capacidad de adaptación para vivir en diversos medios líquidos, en frutos, néctar de flores, leche, etc.; en general, en todo tipo de sustratos ricos en azúcares ya que son fermentadoras de glúcidos. Aparentemente son incoloras si bien, cuando se cultivan en medios sólidos artificiales, forman colonias de color crema, blanco o pardo.

1.2.1. Estructura general

Morfológicamente, la forma de levadura o de blastoconidio de las especies *Candida* es variable. Pueden ser esféricas, ovoides o alargadas (3.7-5.0 x 2.7-4.7 μm). También pueden encontrarse reunidas en pequeñas cadenas formando pseudomicelios y/o micelios o hifas. Los pseudomicelios son cadenas de levaduras en las que la separación entre la célula madre y la hija no ha ocurrido durante el proceso de división. Estas cadenas pueden ser relativamente estrechas de diámetro y presentan constricciones en las regiones de unión entre las células. En los micelios o hifas, las células hijas también quedan unidas unas a otras pero separadas por septos, dando el aspecto de tubos largos y delgados con diámetros y longitudes variables (5-10 x 40-100 μm) que ocasionalmente pueden ramificarse. Todas estas diferentes formas les permiten adaptarse a distintos ambientes (Carlile y col., 2001).

Las candidas, al igual que el resto de las levaduras, poseen básicamente la misma estructura subcelular que la de células animales y de vegetales (Fig. 1 A). Presentan núcleo con membrana nuclear normal, retículo endoplásmico, mitocondrias, inclusiones y membrana plasmática como cualquier célula eucariótica. Además,

contienen una gran vacuola que suele situarse en uno de los polos y que puede considerarse como un lisosoma con un amplio rango de enzimas líticas (proteasas, nucleasas, fosfatasas) en un ambiente ácido. La vacuola, además, almacena agua, metabolitos y cationes, pudiendo actuar como reguladora del pH y de la homeostasis iónica celular.

La pared es la única estructura de la levadura de la que carecen las células animales, está situada en la superficie externa de la célula, es responsable de la morfología celular y juega un importante papel en el transporte de materiales entre la célula y el exterior y en la protección frente a agresiones físicas, químicas y biológicas (Fig. 1 B).

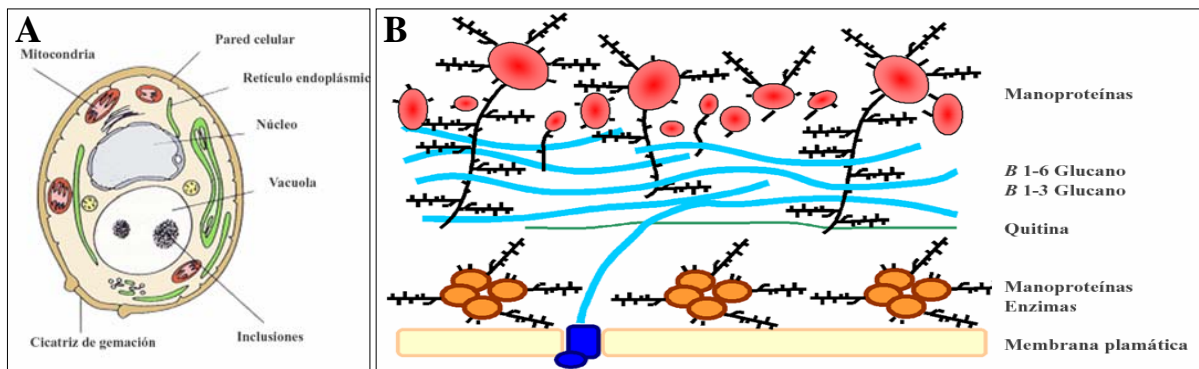


Figura 1.- Esquema de los componentes celulares de *Candida* (A) y de la estructura de su pared (B). La pared celular esta formada por al menos tres capas, la más externa rica en proteínas que se encuentran unidas a cadenas de glucanos (manoproteínas), la media formada por una red de glucanos y quitina y, por último, la interna, que ocupa una posición periplasmática y en la que hay abundancia de enzimas. B: esquema modificado de Chaffin y col., 1998 y de Carlile y col., 2001.

Durante una infección fúngica, la pared es la responsable del contacto y la adhesión al huésped, por lo que juega un papel muy importante en la capacidad patógena de la levadura. Es por todo ello por lo que la pared constituye una diana fundamental de muchos agentes antifúngicos. Su estructura básica es muy semejante en todos los hongos, estando constituida por lípidos (1-7%), proteínas (6-25%) y carbohidratos (80-90%) (Chaffin y col., 1998; Osumi, 1998; Ruiz-Herrera y col., 2006).

Los carbohidratos son los principales componentes de las paredes de las levaduras. Son sintetizados como polímeros encontrándose principalmente:

- (1) β -glucanos: polímeros ramificados de glucosa con enlaces β -1,3 y β -1,6 que se estructuran en forma de hélices simples o triples (Fig. 2 A). Estos,

parecen jugar un papel muy importante en la infección por levaduras al ser capaces de inhibir la acción de monocitos y de linfocitos T. Así mismo, parece que en la transición de levadura a hifa en *C. albicans* podría estar implicada la acción de ciertos receptores para β -glucanos.

- (2) Quitina: formada por polímeros no ramificados de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) con enlaces β -1,4 que se asocian entre ellos en grupos de 20-400 mediante puentes de hidrogeno (Fig. 2 B).

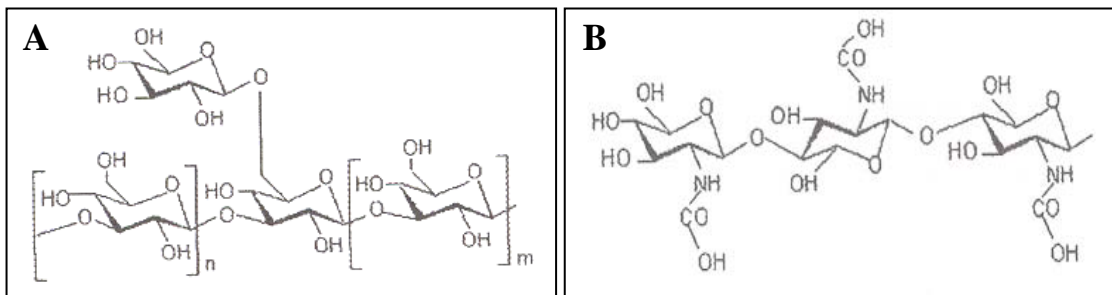


Figura 2. A: Estructura molecular de un β -glucano. **B:** Estructura molecular de la quitina. Esquemas modificados de Chaffin y col., 1998.

- (3) Mananos: asociados a proteínas o a lípidos. Los glico(manano)-proteínas son polímeros de manosa (mananos) unidos covalentemente a proteínas, normalmente ricas en serina y treonina, mediante O-glicosilación o N-glicosilación. Presentan una estructura rígida que protruye de la pared a modo de antena. Dentro de este grupo se encuentran las adhesinas, que están estrechamente relacionadas con la unión de la levadura al huésped (Klis y col., 2001; Sundstrom, 2002). Dentro de los mananos unidos a lípidos son de destacar los fosfolipomananos implicados en procesos de adhesión (Ruiz-Herrera y col., 2006).

Los polímeros microfibrilares formados por β -glucanos y quitina, constituyen los componentes estructurales de la pared al formar el esqueleto rígido que proporciona las propiedades físicas a la célula. Los β -glucanos suponen el 40-60% del peso de la pared, mientras que la quitina solo el 0.6-9%, si bien ésta es muy importante, particularmente en los septos entre los diferentes compartimentos (por ejemplo, en el anillo de constricción entre las células madre e hija). Por su lado, los polímeros de mananos que se encuentran asociados a proteínas o a lípidos, representan aproximadamente el 40% del total de la pared. Aunque la composición de las

diferentes formas de los hongos (levaduras, pseudomicelios o hifas) es la misma, los porcentajes pueden variar; así, las hifas suelen contener unas tres veces más de quitina que las formas de levaduras (Osumi, 1998; Carlile y col., 2001).

Estos componentes se disponen formando varias capas, reconocibles al microscopio electrónico de transmisión. Aunque los diferentes autores indican que existe un número variable de capas en función de la especie y la morfología (levadura, pseudomicelio o hifa), lo normal es encontrar principalmente tres (Calderone y Braun, 1991; Chaffin y col., 1998). La capa externa aparece como una densa red con aspecto fibrilar y la interna con numerosas proyecciones que conectan con la membrana plasmática. Los polisacáridos microfibrilares de glucano y quitina, componentes que dan resistencia a la pared, parecen concentrarse principalmente en la parte interna, en contacto con la membrana plasmática. Por el contrario, las proteínas y las manoproteínas se situarían en la parte externa, algunas de las proteínas podrían unirse covalentemente a glucanos. En la parte externa de la pared pueden aparecer proyecciones radiales de aproximadamente 5 nm de diámetro llamadas fimbrias que se extienden unos 100-300 nm. Las fimbrias presentan un alto contenido en manoproteínas y son las que mediarían la adherencia de *Candida* a los receptores de glicosfingolípidos de las células humanas. El principal componente estructural de la fimbria es una proteína con gran similitud al colágeno, la cual parece estar muy conservada entre los hongos, aunque podrían existir diferentes clases de fimbrias que mediarían la adhesión a diferentes tipos de receptores (Chaffin y col., 1998; Osumi, 1998).

1.2.2. Reproducción

En general, las especies *Candida*, se dividen por escisión o gemación (Osumi, 1998). El proceso de división comienza con la acumulación de vesículas bajo la membrana plasmática en los puntos de gemación (Fig. 2 A). La pared celular de ese punto se evagina formando una yema mediante síntesis de "novo". El núcleo hijo se sitúa dentro de la yema en formación y los orgánulos se reparten entre la célula madre y la hija. Por último comienza la aparición de un septo que se lleva a cabo en dos pasos. En primer lugar aparece el septo primario compuesto de quitina, el cual se completa por la aparición del septo secundario de glucanos. Las dos células resultantes pueden separarse recibiendo el nombre de blastosporas o blastoconidios o permanecer unidas formando el pseudomicelio. Cada célula es capaz de dar un número

determinado de divisiones, presentando una cantidad límite de cicatrices de gemación, con una estructura similar a un cráter (Fig. 2 B).

Ocasionalmente se han detectado algunas especies del género *Candida* que son capaces de formar ascosporas, tal y como ocurre en otras levaduras como en *Sacharomyces* y típicas de la reproducción sexual de los *Ascomycetes*. La formación de ascosporas ocurre mediante la meiosis de un núcleo en un asca en la reproducción sexual. También se pueden reproducir de forma asexual por gemación. Así, las formas sexuales de las especies del género *Candida* reciben el nombre de teleomórficas mientras que las formas asexuales se denominan anamorfos. De esta forma los hongos imperfectos o *Deuteromicetes* que no son capaces de reproducirse sexualmente, serían el anamorfo de las *Ascomycetes* que si pueden llevar a cabo la reproducción sexual (Carlile y col., 2001).

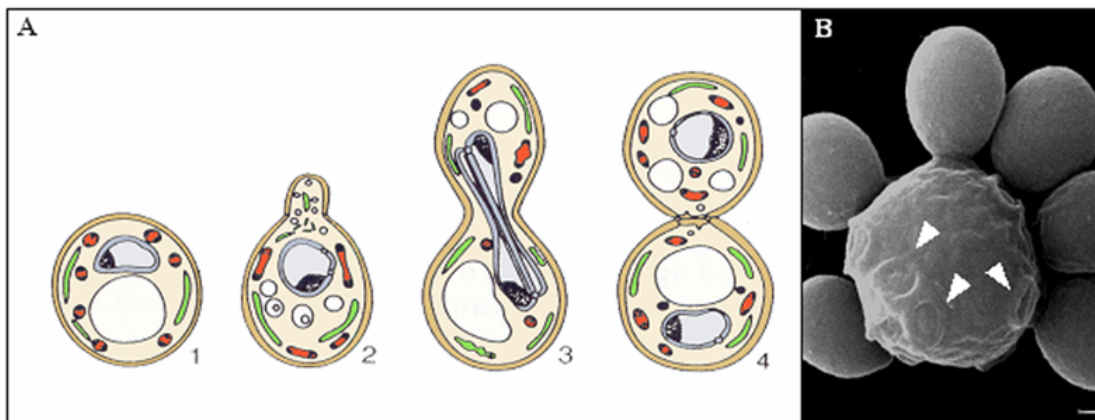


Figura 3.- Proceso de división en *Candida*. **A:** esquema de la gemación de *Cándida*; **1**, estructura antes de la división celular. **2**, acumulación de vesículas en el punto de gemación. **3**, migración del núcleo hijo y orgánulos a la célula en formación. **4**, aparición del septo de división. **B:** imagen de microscopía electrónica de barrido donde se muestra las cicatrices de gemación (flechas). Barra de escala: 0,5 μ m.

1.2.3. Infectividad

Las especies de *Candida* son colonizadores habituales de los tractos gastrointestinal y genitourinario de los seres humanos. Sin embargo, pueden ser patógenos importantes que pueden causar un gran número de desórdenes infecciosos, incluyendo infecciones superficiales en la vagina, en la boca, esófago, en pacientes inmunodeficientes (SIDA), y en pacientes de cáncer sometidos a quimioterapia, siendo consideradas como patógenos oportunistas. Así mismo pueden diseminarse vía

sistémica originando en este caso una infección generalizada (invasiva) que conduce a una elevada tasa de mortalidad (aproximadamente del 50%) (Sudbery y col., 2004).

En el caso humano, se han descubierto nuevas infecciones producidas por levaduras y hay al menos 17 especies del género *Candida* implicadas en diferentes enfermedades. Las nuevas modalidades de tratamiento de cáncer, el incremento en el uso de catéteres venosos, la explosión de agentes antibacterianos, el incremento de la esperanza de vida, el aumento de la población con enfermedades inmunodeficientes, resistencia a tratamientos con compuestos antifúngicos como los azoles, entre otras causas, han contribuido a que la lista de levaduras potencialmente patógenas vaya en aumento (Casadevall y Pirofski, 2001; Coleman y col., 1998; Hazen, 1995; Fries y Casadevall, 2001).

Dentro de este género la levadura que principalmente aparece en cultivos de sangre es *C. albicans*, la cual es responsable de un 60% de los casos de infecciones, especialmente de las hospitalarias. Las especies no-*albicans* están implicadas en el 35-65% de los casos, si bien se está observando un incremento en la aparición de infecciones producidas por dichas especies (Krcmery y Barnes, 2002). Las especies que más frecuentemente se encuentran en los procesos infecciosos son *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. stellatiodea*, *C. norvegensis* y *C. famata*, presentando unos porcentajes de incidencia que oscilan entre el 1% y el 40% (ver tabla 1) (Borg-von Zepelin y col., 1993; Hazen, 1995).

<i>Candida</i>	INCIDENCIA	CAUSAS
<i>C. parapsilosis</i>	20-40%	catéteres, infecciones neonatales e hiperalimentación
<i>C. tropicalis</i>	10-30%	neutropenia, trasplantes de médula ósea y cáncer
<i>C. kusei</i>	2-25%	inmunodepresión y neutropenia
<i>C. glabrata</i>	5-40%	catéteres y profilaxis azólica
<i>C. lusitaniae</i>	2-8%	cáncer
<i>C. guilliermondii</i>	1-5%	cáncer, post-operatorios y pacientes en cuidados intensivos
<i>C. kefyr</i>		quemaduras
<i>C. rugosa</i>		
<i>C. stellatiodea</i>		cáncer
<i>C. norvegensis</i>		catéteres, trasplantes de médula ósea y post-operatorios
<i>C. famata</i>	1%	

Tabla 1. Levaduras no-*C. albicans* implicadas en infecciones fúngicas. La tabla muestra el porcentaje de incidencia y los principales factores de riesgo.

El diagnóstico clínico de estas infecciones suele ser muy complicado ya que presentan una sintomatología inespecífica. Las técnicas más habitualmente utilizadas son el análisis microscópico, diagnóstico en hemocultivos y biopsias, técnicas inmunológicas con anticuerpos, tanto generales como específicos de cada especie, y detección de ácidos nucleicos. A las dificultades de su aislamiento se añade que muchas de estas especies no-albicans presentan mayor resistencia frente a los compuestos antifúngicos, particularmente en infecciones sistémicas, incluidos los polienos (anfotericina B) y azoles (itraconazol o fluconazol y miconazol), como es el caso de *C. krusei* y *C. glabrata* (Fries y Casadevall, 2001).

1.3. Mecanismo de infección

El mecanismo por el que se produce la infección por especies del género *Candida* no es bien conocido, por lo que hay un interés creciente en los estudios dedicados a analizar los posibles factores que determinan su grado de virulencia. En líneas generales y como ya se ha comentado anteriormente, la candidiasis puede ser clasificada en tres tipos en función de su gravedad: superficial, subcutánea y sistémica. Mientras en el primer tipo, los hongos solo afectan a los tejidos del huésped de forma superficial, en la sistémica, hay diseminación del mismo a través de la sangre.

El desarrollo de uno u otro tipo de infección depende de numerosos factores. Aspectos tales como: capacidad de crecer a valores fisiológicos de pH y temperatura, la transición entre la forma más infectiva (invasiva) y menos infectiva (no invasiva), producción de enzimas líticas que faciliten la degradación de los tejidos, mecanismos de evasión del sistema de defensa del huésped y presencia de proteínas de adhesión (adhesinas) específicas, que permitan su adhesión a tejidos determinados del huésped, son características de gran importancia en el proceso de infección tisular y celular (Casadevall y Pirofski, 2001). A continuación se analizan algunos de los factores más relevantes en relación a la virulencia y el proceso infectivo del género *Candida*.

1.3.1. Plasticidad morfológica

Muchos hongos patógenos, entre los que se incluye *C. albicans*, sufren cambios morfológicos que le permiten adaptarse al huésped durante la invasión. La capacidad de adaptación se debe a la existencia de un conjunto de señales conservadas que regulan el cambio fenotípico (Gow y col., 2002; Romani y col., 2003; Rooney y Klein, 2002; Sudbery y col., 2004). Son numerosas las evidencias que relacionan la capacidad dimórfica de los hongos con su grado de virulencia. Así, en modelos de ratón, se ha comprobado que mutaciones en *C. albicans* que le impiden formar hifas son menos infectivas y son más sensibles a la fagocitosis por macrófagos que las normales que sí forman micelios o pseudomicelios (Marcil y col., 2002). El extremo de la hifa es el lugar de secreción de enzimas para degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, facilitando la invasión en los tejidos. La hifa de hongos patógenos también presenta el fenómeno de guía por contacto, permitiéndoles desplazarse sobre determinadas superficies y alcanzando lugares susceptibles de ser invadidos (Gow, 1997; Gow y col., 2002; Rooney y Klein, 2002).

Sin embargo, hay evidencias que sugieren que la forma de levadura es fundamental para iniciar la invasión y el daño. En este sentido, la forma de levadura constituye la morfología invasiva de numerosos patógenos dimórficos, tales como *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *P. marneffeii* y otros. Incluso en *C. albicans*, cuya conversión a hifa siempre se ha visto como un factor esencial para la invasión (Gow y col., 2002; Rooney y Klein, 2002).

Un aspecto importante en la interacción con el huésped y que presenta implicaciones directas en la patogénesis, es el potencial de las diferentes formas de *Candida* para modular la respuesta inmune. Los componentes de la pared de levaduras y de hifas, como los glucanos, quitina y manoproteínas, poseen diferente capacidad para activar o reprimir el sistema inmunitario del huésped. Mananos y manoproteínas ocasionan una fuerte actividad inmunomoduladora, siendo capaces de regular la acción de todas las armas del sistema inmune. Tanto las levaduras como las hifas poseen diferentes propiedades bien definidas para la invasión y para la evasión del sistema inmune. Así, la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas por las células fagocíticas del sistema inmune parece ser diferente en función de la estimulación por levaduras o por hifas y ocurriría después de la activación de determinados receptores. Estas células contribuirían a la patogenicidad de *Candida* facilitando tanto la supervivencia como la virulencia del hongo, probablemente mediante un mecanismo de adhesión al macrófago dependiente de glicosilfosfatidilinositol, inhibiendo o activando sus mecanismos de muerte apoptótica (Ibata-

Ombetta y col., 2003; Richard y col., 2002). Lo mismo sucede con los neutrófilos, que parecen responder de manera diferente a las levaduras y a las hifas, en relación a la producción de citoquinas (Romani y col., 2003).

En cualquier caso, y a pesar de lo anterior, la correlación entre las formas de levadura, pseudomicelio e hifa, el grado de virulencia y la resistencia a la muerte no está clara y parece depender de las enfermedades (Gow y col., 2002; Rooney y Klein, 2002).

1.3.2. Producción de enzimas líticas

La pared celular de las especies de *Candida* no es una estructura inerte, sino un orgánulo complejo y dinámico, con una variedad de enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas, fosfolipasas, estererasas y fosfatasas, cuya actividad es fundamental durante los procesos invasivos (Luo y col., 2001; Naglik y col., 2004). Las enzimas hidrolíticas tales como las proteinasas de aspartico secretadas ("secreted aspartic proteinases", Saps) constituyen un factor básico de virulencia, estando implicadas en las primeras y más relevantes etapas de la patogenicidad, adhesión y entrada de *Candida*, principalmente a nivel de mucosa vaginal y de cavidad oral. Las Saps facilitan la invasión de los tejidos del huésped, degradando moléculas de superficie celular y de la matriz extracelular, tales como el estrato córneo en la piel, colágeno, laminina, fibronectina y mucina (Calderone y Fonzi, 2001; Naglik y col., 2003). Las Saps se conocen especialmente en *C. albicans*, aunque también se han descrito en *C. parasilopsis* y *C. tropicalis*, entre otras. También hay evidencias de que las enzimas hidrolíticas son capaces de digerir células y moléculas del sistema inmune del huésped facilitando la resistencia de *Candida* a la actividad antimicrobiana de esas células (Naglik y col., 2003).

Así mismo, las enzimas hidrolíticas parecen tener un papel importante como agentes hemolíticos durante la diseminación de la *Candida* por vía sanguínea. En este sentido y aunque la mayor parte de la literatura se centra de nuevo en *C. albicans* (Manns y col., 1994) y son pocos los trabajos que demuestran capacidad hemolítica en especies no *albicans*, parece haber una clara relación entre dicha capacidad y el grado de virulencia de las diferentes especies. Las diferencias entre estas capacidades hemolíticas podrían estar relacionadas con el tipo de enzimas (factores hemolíticos: hemolisinas) producidas por las diferentes especies del género *Candida*, cuya naturaleza no es bien conocida. Hay autores que sugieren la existencia de factores

específicos, hemolisinas, mientras que otros indican que dicha capacidad hemolítica es el resultado de fosfolipasas producidas por estos organismos (Luo y col., 2001; Manns y col., 1994).

1.3.3. Adhesión a las células del huésped

La adhesión es el resultado de una interacción estrecha entre *Candida* y la célula huésped y constituye una etapa fundamental en la infección y un prerrequisito para la colonización. En la invasión de *C. albicans*, la adhesión generalmente se produce a nivel de células mucocutáneas. Así mismo, la adhesión es un factor crítico en la salida del hongo del torrente sanguíneo para colonizar diferentes órganos del huésped (Sundstrom, 2002; (Whiteway y Oberholzer, 2004). *Candida* puede adherirse a diferentes tipos celulares (células del sistema inmune, epiteliales y endoteliales, entre otras), factores solubles, matrices extracelulares y materiales inertes situados en el cuerpo del huésped (Gruenheid y Finlay, 2003). Los mecanismos utilizados en la adhesión son múltiples, si bien las interacciones físicas del hongo con el huésped son mediadas por componentes específicos de la pared celular. Aunque dentro de los componentes de la pared de la levadura, la quitina, los β -glucanos, mananos, lípidos y glicolípidos pueden participar en los procesos de adhesión, las proteínas, las manoproteínas y los manolípidos (Poulain y Jouault, 2004) son los componentes más importantes en la interacción con la célula/tejido del huésped. Son de destacar las adhesinas (proteínas y manoproteínas de superficie implicadas en adhesión (Klis y col., 2001; Sundstrom, 2002) y otros receptores proteicos que interaccionan con integrinas, laminina, fibronectina, entactina, vitronectina, colágeno del huésped, así como los fosfolipomananos. No son muchas las adhesinas que se han aislado de *C. albicans*, en concreto se conocen tres: Hwp1, Ala1p/Als5p y Als1p (Fu y col., 1998; (Gaur y col., 1999; Hoyer y col., 1998). Lo mismo sucede con otros hongos patógenos, como *C. glabrata* de la que sólo se ha aislado una, Epa1p (Alberti-Segui y col., 2004; Cormack y col., 1999; Poulain y Jouault, 2004). Los ligandos del huésped reconocidos por *Candida* que participarían en el reconocimiento y defensa frente a hongos son también diversos. Dentro de éstos se han descrito, receptores para varios sistemas de complemento (CR), los receptores Fc (FcR) y receptores tipo Toll (TLR), receptores de manosa (MR) y de β -glucanos, entre otros, (Alberti-Segui y col., 2004; Chaffin y col., 1998; Hostetter, 1994; Poulain y Jouault, 2004; Santoni y col., 2002).

En relación a las células del sistema inmune, *Candida* interacciona con células dendríticas (poblaciones que se desarrollan en la médula ósea, como las células de Langerhans y las dérmicas de la piel (Buentke y Scheynius, 2003) y con las fagocíticas del sistema inmune (como macrófagos y neutrófilos). Ambos conjuntos celulares constituyen la primera línea de defensa contra la infección por *Candida* ocasionando una rápida respuesta inmunológica necesaria para sobrevivir a la infección (Roeder y col., 2004).

Los hongos son reconocidos por los macrófagos o por las células dendríticas a través de determinados receptores. Dentro de los diferentes receptores de las células del sistema inmune, la familia de receptores tipo Toll son esenciales en el reconocimiento de organismos microbianos y en la respuesta inflamatoria inmediata (Roeder y col., 2004). Los diferentes TLRs reconocen un amplio espectro de componentes microbianos. Los TLR2 y TLR4 están implicados en la defensa frente a *C. albicans* y son activados por glucanos y mananos presentes en la pared del hongo. Otro receptor descubierto recientemente en neutrófilos y macrófagos es Dectina-1, una lectina que reconoce β -glucanos y participaría junto con los TLR en la respuesta inmunológica a *Candida* (Brown y col., 2002). De hecho se ha visto que Dectina-1 y TLR2 colaboran en coordinar la respuesta mediante la secreción de factores tales como citoquinas y producción de ROS. La activación de Dectina-1 iniciaría la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y de IL2 en macrófagos y células dendríticas en respuesta a la activación de TLR2 por glucanos (Brown y col., 2003). Así mismo, Dectina-1 parece estar implicada en el proceso de fagocitosis de *C. albicans* (Brown y col., 2003; Fradin y col., 2000).

Además de los TLR, se han descrito otros receptores que también participarían en el reconocimiento y defensa frente a hongos, como los receptores de manosa (MR) y los receptores Fc (Romani y col., 2002). Los MR son proteínas transmembrana que reconocen ligandos con residuos terminales de manosa que han sido descritos en macrófagos y que son fundamentales para la fagocitosis de las levaduras. También se han observado en queratinocitos humanos, los cuales también expresan TLR2 y TLR4 (Pivarcsi y col., 2003; Szolnoky y col., 2001).

1.3.4. Activación de las células del huésped

La interacción de *Candida* con los diferentes receptores activa numerosas cascadas de señales. Una de esas rutas de señalización es la de las proteínas quinasas

activadas por mitógenos (MAPK) que, a su vez, actúan sobre un número determinado de factores de transcripción (NF- κ B), implicados en la regulación de la expresión de mediadores inflamatorios como TNF- α , óxido nítrico sintasa, defensinas y moduladores de la muerte celular programada (McGreal y col., 2005). Así mismo, y en respuesta al estrés ocasionado por la infección, se producen compuestos tóxicos, como especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), que inducen alteraciones en la adhesión y en la fagocitosis.

Parece existir una relación entre la respuesta celular y el tipo de receptor implicado en la interacción de *C. albicans* con las células del huésped. La interacción mediante los MRs, los TLRs o los CRs induce la producción de diferentes interleuquinas. Así mismo, un factor clave de la cascada mediada por TLR es el factor citoplasmático MyD88, el cual es requerido para la fagocitosis y muerte de *C. albicans* (Marr y col., 2003; Martínez-Solano y col., 2006).

Por otro lado, no sólo las células del sistema inmune son susceptibles de producir citoquinas como respuesta a la infección por *Candida*. Así, una excelente estrategia para mejorar la resistencia ante la invasión de patógenos oportunistas, consiste en promover respuestas que involucran a interleuquinas y que protejan al huésped. En este sentido, las células de la mucosa oral son capaces de producir citoquinas en respuesta a la infección con *C. albicans* (Dongari-Bagtzoglou y Kashleva, 2003). Algunas de estas citoquinas poseen propiedades protectoras contra la infección fúngica oral al ser potentes quimioatrayentes con capacidad de promover las actividades antifúngicas de los monocitos, de mejorar la actividad candidicida de los queratinocitos e incrementar la proliferación de leucocitos, evitando la invasión en el huésped. También se ha observado producción de citoquinas en células epiteliales gastrointestinales tras la infección de diversos microorganismos (Jung y col., 1995).

1.3.5. Entrada de *Candida* en las células del huésped

Tras la unión de la levadura a su receptor, la siguiente etapa que media la infección, es la entrada en la célula huésped (Chaffin y col., 1998). Dentro de las células del sistema inmune, los macrófagos son elementos cruciales en este proceso. Cuando el macrófago reconoce la presencia de un microorganismo, lo engulle formando un fagosoma, un compartimento intracelular que contiene al microorganismo. Este compartimento madura por fusión con lisosomas para crear un fagolisosoma, un orgánulo repleto de compuestos antimicrobianos y pH ácido. La

internalización crea un ambiente hostil para el microorganismo, siendo habitualmente degradado. El fagolisosoma es una estructura precaria, a pesar incluso de poseer componentes antimicrobianos, por lo que la supervivencia dentro del fagolisosoma depende de la capacidad del microorganismo de sintetizar proteínas y otros componentes celulares necesarios para contrarrestar el efecto del contenido del orgánulo (Martinez-Solano y col., 2006).

Mientras los macrófagos disparan una gran variedad de mecanismos con el fin de destruir al organismo patógeno (de hecho, rápidamente digieren hongos no patógenos como *S. cerevisiae*), los patógenos intracelulares desarrollan estrategias que bien activan o bien inhiben el proceso de muerte por apoptosis, facilitando su diseminación en el huésped. *C. albicans* interfiere con la señal relacionada con la endocitosis y fagocitosis y puede encontrar los nutrientes necesarios, sufrir la transición hacia la forma filamentosa y bloquear dicho efecto (Lorenz y Fink, 2002). En este sentido, en sistemas celulares *in vitro* se ha descrito que la ingestión de *C. albicans* en su forma de hifa, resiste a la digestión celular y puede producir rotura y muerte de los macrófagos desde el interior de los mismos (Romani y col., 2002).

Es indudable que la fagocitosis de *C. albicans* por las células fagocíticas mononucleares es fundamental en el control de la infección. Sin embargo, esta levadura es capaz de resistir la actividad lítica de tales células (Ibata-Ombetta y col., 2001) e intenta sobrevivir a la acción de la fagocitosis inhibiendo la producción de compuestos tóxicos o evitando la fusión de fagolisosomas. Los mecanismos para evitar la fagocitosis pueden ser diversos, podrían secretar factores desconocidos que inhiban el proceso de fusión o que modulen el pH del fagosoma de forma que sea subóptimo para que las enzimas puedan destruirla (Palmer y col., 2005). En este sentido, la vacuola fúngica podría participar en ese proceso de resistencia, dado que constituye un compartimento ácido que contiene una gran variedad de enzimas hidrolíticas y que es muy importante en la adaptación a nuevos ambientes, supervivencia bajo condiciones de estrés y procesos de diferenciación celular tales como en la transición de levadura a hifa en *C. albicans* (Newman y col., 2005; (Palmer y col., 2005).

En algunos trabajos se indica que podrían existir receptores diferentes en las células de mamífero que mediarían dos procesos diferentes de entrada de la levadura, uno permitiría que actuara como agente infectivo y otro que llevaría a la degradación de la misma. Así, se ha observado que la endocitosis de *C. albicans* por macrófagos J774 modula la señalización mediada por MEK-ERK que conduce a la activación de la proteína proapoptótica Bad ocasionando la muerte por apoptosis del macrófago. El

fosfolipomanano presente en la superficie de *C. albicans* y que participa en el contacto de la levadura con el macrófago, parece ser responsable de este efecto, pudiendo tener un importante papel en la modulación de la respuesta para evitar la fagocitosis (Ibata-Ombetta y col., 2003).

A pesar de todo lo anterior, los procesos que ocurren una vez que la levadura se encuentra en el interior de la célula, hasta el momento no son bien conocidos. Los estudios realizados por Martínez-Solano y colaboradores (2006) utilizando una línea de macrófago RAW 264.7 han mostrado que poco después (45 min) de la infección de los mismos con *C. albicans* hay cambios en la expresión de numerosas proteínas implicadas en diferentes funciones: anti-inflamatorias, señalización celular, organización del citoesqueleto, respuesta a estrés y biosíntesis de proteínas. Una de las proteínas que aumenta es la anexina I, la cual está implicada en procesos de fagocitosis, señalización celular y proliferación. También aumentan determinadas proteínas del citoesqueleto, como la L-plastina y la tropomiosina. La L-plastina se encuentra en células hematopoyéticas normales y transformadas y está implicada en la formación de enlaces cruzados entre los filamentos de actina y en la estabilización de los filamentos (Delanote y col., 2005). La tropomiosina está localizada profundamente en el cortex celular y su presencia probablemente inhibe a la cofilina (un regulador de la polimerización de la actina. En este sentido, varios patógenos (*Listeria monocytogenes*, *Shigella spp.*, *Rickettsia spp.*) son capaces de movilizarse en el interior de la célula huésped, por lo que no resulta extraño que también lo haga *C. albicans*. Estas proteínas serían por tanto muy importantes en la respuesta a *C. albicans*. También hay alteraciones en la expresión de Rho GTPasas, implicadas también en la organización del citoesqueleto de actina regulando la actividad fagocítica de los macrófagos (Tato y Hunter, 2002).

Por lo tanto, tan pronto ocurre la adhesión, la célula huésped sufre cambios intracelulares que afectan a su viabilidad y crecimiento, observándose que, con independencia del mecanismo, la adhesión del patógeno al huésped activa varias señales que convergen en la reestructuración del citoesqueleto (Larsson, 2006), principalmente del citoesqueleto de actina de las células huésped. Así, el patógeno utilizaría los microfilamentos para adherirse, entrar y moverse en el interior de la célula huésped (Sandovsky-Losica y Segal, 2006). Estudios previos realizados por otros autores han demostrado alteraciones de los microfilamentos de actina tras la adhesión de *C. albicans* a células epiteliales como las HEP2 reduciéndose la capacidad de

migración al disminuir la organización de la actina cortical (Ibrahim-Granet y col., 2003; Sandovsky-Losica y col., 2002; Tsarfaty y col., 2000).

Teniendo en cuenta que en este estudio se analizará la capacidad infectiva de la levadura emergente *C. famata* y que se comparará con la de las dos principales representante del género *Candida*, *C. albicans* y *C. glabrata*, a continuación se resumen los aspectos más relevantes en cuanto a la biología y a la capacidad infectiva de las mismas.

1.4. *Candida albicans*

La especie fúngica de mayor importancia en numerosas patologías humanas es *C. albicans*. Este hongo se encuentra como comensal en el tracto respiratorio e intestinal, en la vagina, boca y en la piel, sobre todo en la región perianal. Entre los patógenos oportunistas, *C. albicans* posee la capacidad de sobrevivir y proliferar en ambientes radicales, adaptando su crecimiento a condiciones fisiológicas extremas de pH, osmolaridad, disponibilidad de nutrientes y temperatura (Hube, 2004). Esta versatilidad es la que le permite colonizar diferentes lugares anatómicos en individuos sanos y, como patógeno, ocasionar infecciones sintomáticas en numerosos lugares en el cuerpo. Así, bajo ciertas condiciones como por ejemplo la alteración de la flora microbiana debido a tratamientos con antibióticos, esta levadura patógena oportunista, frecuentemente ocasiona infecciones superficiales invadiendo las mucosas y causando un daño considerable (van Burik y Magee, 2001). Así se ha comprobado que al menos el 75% de las mujeres padecen una vez en la vida candidiasis vulvovaginal y el 90% de los pacientes afectados de SIDA han padecido candidiasis en sus mucosas. La forma más severa de infección es la candidiasis sistémica, cuando la levadura prolifera en el sistema circulatorio e invade órganos internos (Romani y col., 2003).

Aunque el sistema inmune del huésped es el principal factor en la transición de comensal a patógeno, *C. albicans*, expresa varios atributos de virulencia como: factores de adhesión, cambio fenotípico (comportamiento dimórfico) y secreción de enzimas hidrolíticas que podrían contribuir a su patogenicidad (Calderone y Fonzi, 2001; Gow y col., 2002; Hube y Naglik, 2001; Naglik y col., 2004). En este sentido, una característica interesante de *C. albicans* es su capacidad para crecer con diferentes morfologías, desde formas unicelulares gemantes (blastocnidios), a filamentosas de longitud variable con extremos redondeados (hifas) (Gow, 1997; Gow y col., 2002; Hube y Naglik, 2001; Soll, 1992) (Fig. 4). Al microscopio óptico las formas de levaduras

aparecen como células redondeadas u ovals de 3-7 μm de diámetro con paredes finas, cuyo número de capas y estructura varia según la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento y el medio de cultivo empleado, entre otros factores. Las hifas contienen múltiples unidades celulares divididas por septos. Entre ambas formas, unicelulares y miceliales, el hongo puede presentar una variedad de morfologías de crecimiento como los pseudomicelios o pseudohifas en los que la célula hija se elonga y, después de la formación de un septo, permanece unida a la madre. Las formas de pseudomicelios han sido consideradas como etapas intermedias en la transición de la fase de levadura a la de hifa; sin embargo, parece más probable que las pseudohifas no sean más que levaduras polarizadas (Hube y Naglik, 2001; Sudbery y col., 2004). Aunque las diferentes formas de *C. albicans* pueden coexistir, la mayoritaria es la de blastoconidio, observándose incluso en los cultivos de hifas en los que casi siempre, en los extremos de las mismas, se generan algunas levaduras por gemación.

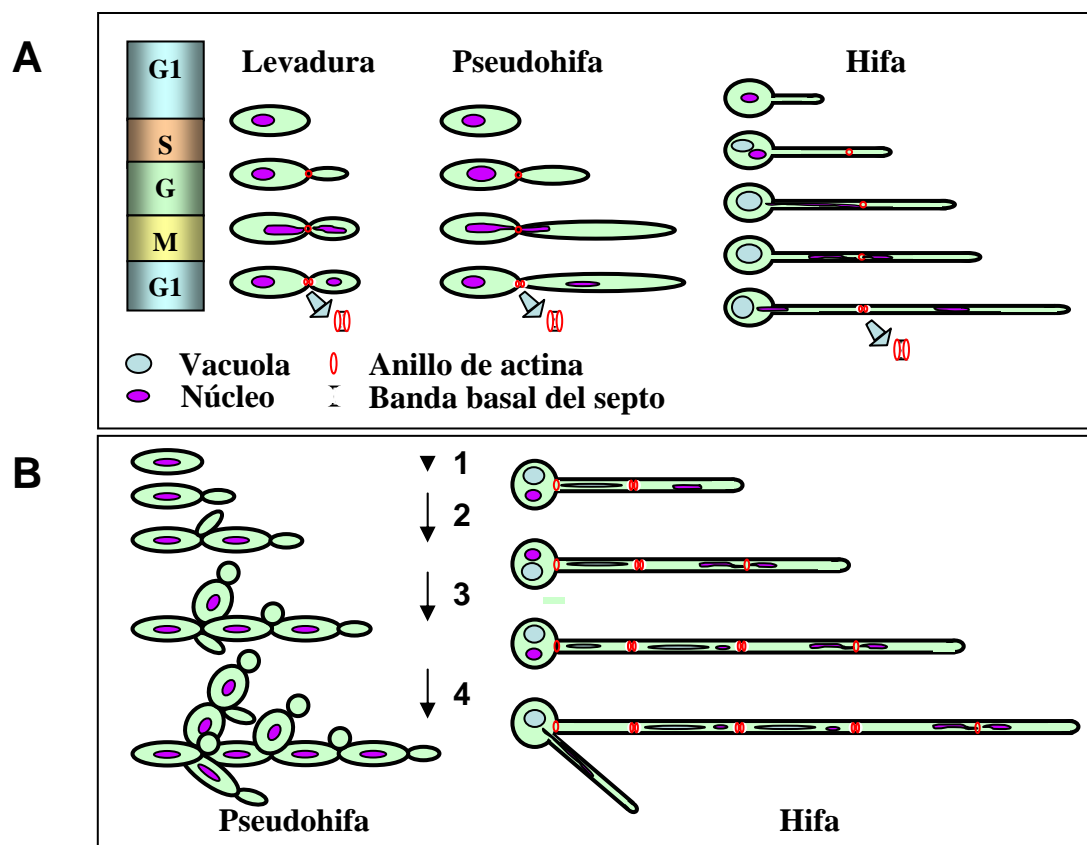


Figura 4.- A: Representación de la formación levaduras, pseudohifas e hifas y su relación con el ciclo celular. Los tubos germinales de la hifa emergen después de la transición G1/S. **B:** División secuencial de pseudohifas (derecha) y de hifas (izquierda). Esquema modificado de Sudbery y col., 2004.

La capacidad de cambio entre levadura, pseudohifa o hifa, a menudo se relaciona con la virulencia, aunque no está del todo confirmado. Tanto las hifas como las pseudohifas son invasivas, por lo que se cree que potencian la penetración tisular durante las etapas tempranas de la infección, mientras que la forma de levadura podría ser la encargada de la diseminación sistémica. La filamentosa podría ser también importante en la colonización de órganos como el riñón. Sin embargo, es importante reconocer que la mayor parte de los hongos dimórficos que son patógenos en humanos presentan crecimiento por gemación en los tejidos infectados y existen como filamentosos en el ambiente externo. Por lo tanto, el crecimiento filamentoso no está asociado necesariamente a la invasión (Hube y Naglik, 2001; Sudbery y col., 2004).

Las causas que originan el cambio morfológico pueden ser variadas. Las hifas se forman de levaduras no gemantes por la adición de suero y por el crecimiento a temperaturas por encima de 35 °C y pH neutro (Odds, 1985). Las señales que transducen los cambios ambientales que ocasionan la transición a pseudohifa o hifa se han estudiado ampliamente. Primero, una señal basada en cAMP y proteína quinasa A (PKA); segundo, una proteína quinasa activa por mitógeno (MAP) y finalmente, una respuesta mediada por cambios en pH que activa ciertos factores de transcripción (Liu, 2001; Whiteway, 2000).

C. albicans presenta una gran tendencia a formar esporas grandes de pared gruesa de 7-8 μm de diámetro denominadas clamidosporas, que siempre se sitúan en el extremo del pseudomicelio. Por último también son capaces de formar una estructura denominada tubo germinal que se define como una extensión filamentosa de una célula levaduriforme, 3 o 4 veces más larga y la mitad de ancha. La membrana plasmática presenta invaginaciones que se observan como surcos de 200 a 300 nm de longitud.

La adherencia de *C. albicans* es el primer paso en la colonización e invasión de los tejidos muco-cutáneos, la cual es probablemente mediada por la interacción de las glucoproteínas de superficie de la levadura con la célula epitelial del huésped. Posteriormente se produce la aparición de tubos germinativos, micelio o pseudomicelio que penetran directamente en la célula epitelial. La adherencia continúa con la producción de enzimas hidrolíticas como proteínasas, fosfatasas y fosfolipasas. Una vez dentro de la célula, los hongos proliferan (Romani y col., 2002). La internalización y supervivencia de la levadura en el interior celular se ha observado en sistemas "in vitro" con células dendríticas infectadas por *C. albicans* (Buentke y Scheynius, 2003).

1.5. *Candida glabrata*

Esta levadura fue clasificada como *Cryptococcus glabrata*, aunque ha recibido diferentes nombres. Actualmente se la clasifica dentro de la clase Fungi imperfecti, filum *Ascomycota*, orden Saccharomycetales, familia *Candidaceae* y género *Candida* (Fidel y col., 1999) (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html>). Son células haploides ovaladas de 2.5-5 µm x 3.5-4.5 µm que se encuentran en forma de levadura y aunque ocasionalmente pueden originar cadenas cortas de levaduras, son incapaces de formar pseudohifas o hifas. Tampoco son capaces de producir esporas. La temperatura óptima de crecimiento de las cepas de origen clínico es de 35-37 °C, pudiendo sobrevivir hasta temperaturas de 43-45 °C (Kaur y col., 2005).

El hecho de no poder formar pseudohifas o hifas en condiciones habituales de crecimiento; tan solo se ha encontrado en la literatura una cita que indica la formación de pseudomicelio en condiciones extremas de nitrógeno (Csank y Haynes, 2000) y la incapacidad para expresar ciertas adhesinas (Fidel y col., 1999) daría a entender que, en principio, es una levadura poco virulenta. No obstante, hay un aumento de candidemias producidas por ella. Su patogenicidad podría ser debida a: (1) que presenta una hidrofobicidad en su superficie similar a la de *C. albicans* asegurando la adherencia a las células del huésped (Fidel y col., 1999) y (2) secreción de proteinasas. En este sentido, esta levadura presenta la misma capacidad que *C. albicans* para secretar hidrolasas al medio (Kaur y col., 2005), lo que constituye un importante factor de virulencia. Su capacidad de adhesión ha podido ser demostrada en ensayos "in vitro" donde se estudiaron infecciones de *C. glabrata* en cultivos de células endoteliales (Cormack y col., 1999).

Dependiendo del lugar de infección, *C. glabrata* se considera el segundo o tercer agente patógeno más importante dentro del género *Candida*, después de *C. albicans* (Fidel y col., 1999; Kaur y col., 2005). Se aísla cada vez con más frecuencia en infecciones sistémicas (Kaur y col., 2005; Krcmery y Barnes, 2002), pacientes con candidiasis vaginal, pacientes ingresados en la UCI, enfermos de SIDA, enfermos inmunodeprimidos críticos y con catéteres intravenosos (Clark y Hajjeh, 2002; Krcmery y Barnes, 2002), y se la ha descrito como principal agente infeccioso en otras afecciones como: artritis (Zmierczak y col., 1999), osteomielitis vertebral (Miller y Mejicano, 2001), infecciones periprostáticas (Gaston y Ogden, 2004) e infecciones en pacientes neutropénicos (Nucci y Colombo, 2002). En general, parece haber una mayor incidencia en pacientes adultos que en niños o neonatos (Krcmery y Barnes,

2002). Los principales factores de riesgo para la adquisición de infecciones por *C. glabrata* son una hospitalización prolongada y el uso de profilaxis azólica (Fidel y col., 1999; Krcmery y Barnes, 2002). Este último es el factor de riesgo más importante debido a la gran resistencia a los antifúngicos azólicos que presenta esta levadura (Fidel y col., 1999).

1.6. *Candida famata*

C. famata forma parte del grupo de 17 nuevas levaduras patógenas. Taxonómicamente se la incluye, como a otras levaduras no comunes, en el filum *Ascomycota*. Esta especie se caracteriza porque no es capaz de formar hifas verdaderas, ni en cultivo ni en los tejidos que parasita, pero puede llegar a formar estructuras semejantes a pseudomicelios. Originariamente fue aislada en Japón por Saito en 1922 y descrita como *Torula candida* (Nishikawa y col., 1996). Sin embargo, los numerosos nombres recibidos: *Debaryomyces hansenii*, *D. kloeckeri*, *D. subglobosus*, *D. nicotianae*, *Torulopsis candida*, *Torulopsis famata* y *Pichia polimorfa* (Krcmery y Kunova, 2000; Nishikawa y col., 1996; Rao y col., 1991), denotan el gran desconocimiento existente sobre su biología.

C. famata se encuentra habitualmente en ciertos alimentos, incluyendo frutas y productos fermentados (Andrighetto y col., 2000; Gardini y col., 2001) y aunque se la ha aislado en ciertas lesiones de piel y vagina, ha sido considerada como contaminante y raramente se la ha relacionado con infección en humanos. No obstante, actualmente es considerada como patógena, siendo responsable de aproximadamente el 0,2-2% de las candidiasis ocurridas en el hombre. Se la ha descrito asociada a infecciones oculares crónicas (Rao y col., 1991), catéteres intravenosos (St-Germain y Laverdiere, 1986; Carrega y col., 1997), peritonitis (Quindos y col., 1994), candidiasis de mediastino (Ahmed y col., 2005), en neonatos (Heljic y col., 2005) y fungicemia general (Krcmery y Barnes, 2002; Krcmery y Kunova, 2000). Además, es capaz de afectar al tejido óseo (Wong y col., 1982) y al sistema nervioso central (Prinsloo y col., 2003). Más recientemente se la ha implicado en ciertas retinopatías humanas (Carrasco y col., 2005). Sin embargo, se conoce muy poco sobre los patrones de susceptibilidad a este organismo patógeno.

1.7. Modelos de estudio

Teniendo en cuenta la complejidad del proceso de infección y dado que los organismos patógenos pueden interactuar con numerosos tipos de células huésped, son muchos los estudios que se han realizado en sistemas *in vitro*. Estos sistemas constituyen una excelente herramienta al permitir analizar el proceso de adhesión y entrada en células de mamífero de *Candida* bajo condiciones bien definidas y controladas. Además, hay que tener en cuenta que son numerosos los tipos celulares que potencialmente podrían interactuar con las levaduras durante el proceso de infección, incluyendo a células epiteliales y a células de defensa. Las células epiteliales constituyen la primera barrera frente a especies del género *Candida* y, las segundas, juegan un papel crítico en la colonización/infección ocasionada por el hongo. Ambos tipos celulares son componentes esenciales en la resistencia a la infección, confinando al agente potencialmente patógeno al lugar de infección/colonización, e impidiendo la invasión del mismo a tejidos más profundos y evitando su entrada en el torrente sanguíneo. Por ello, el análisis de la interacción de la levadura emergente *C. famata* con diferentes tipos celulares, pero principalmente con células epiteliales, como son las células HeLa de carcinoma de útero humano, y monocitos como los THP-1, podría ayudar a comprender el mecanismo de acción de este nuevo hongo patógeno en comparación con el de *C. albicans* y *C. glabrata*, ambos con mayor capacidad infectiva aunque con diferentes posibilidades morfológicas. Mientras la primera es capaz de sufrir transición desde la forma de levadura a la de hifa, pasando por pseudohifa, la segunda tan sólo se la conoce en su forma levaduriforme. Así mismo, los estudios realizados en sistemas experimentales *in vitro* idealmente deberían ser complementados en modelos animales. En este sentido, los modelos murinos están ampliamente aceptados para estudiar la capacidad infectiva y de diseminación de organismos patógenos al permitir analizar diferentes condiciones de infección, restringida o diseminada por vía sanguínea, constituyendo una excelente aproximación a la situación infectiva en humanos, tanto en individuos sanos como inmunodeprimidos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

C. famata ha sido considerada durante muchos años como una levadura no infectiva en humanos. Sin embargo, hay evidencias que la señalan como la principal causante de ciertas micosis en individuos inmunodeprimidos, lo que hace importante su estudio e inclusión en la lista de nuevas levaduras emergentes.

En este sentido, el **objetivo general** del trabajo consiste en estudiar la capacidad de *C. famata* de adherirse y entrar en diferentes tipos celulares humanos y murinos *in vitro*, principalmente en células epiteliales y de defensa, así como analizar los efectos producidos en las mismas a consecuencia de dicha interacción. Así mismo, se pretende sentar las bases experimentales que permitan analizar la capacidad infectiva de esta levadura en sistemas *in vivo*, con ratones inmunocompetentes e inmunodeprimidos. La capacidad de adhesión, entrada e infectiva de *C. famata* se comparará con la de *C. albicans* y *C. glabrata*, principales responsables de las micosis ocasionadas por *Candida* en el hombre.

Para alcanzar dicho objetivo general, se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar la capacidad de *C. famata* para adherirse y entrar en las líneas celulares seleccionadas.
2. Comparar la capacidad de adhesión y entrada de *C. famata* con la de *C. glabrata* y *C. albicans* en los tipos celulares modelos (HeLa y THP-1).
3. Analizar los cambios ocasionados en los elementos del citoesqueleto en las células en cultivo: microfilamentos de actina y microtúbulos durante el proceso de adhesión y entrada de las levaduras.
4. Caracterizar los cambios ocasionados en el ciclo celular de las células en cultivo por la infección con las levaduras.
5. Analizar la capacidad infectiva de *C. famata* en ratones (Balb/C), tanto inmunocompetentes como inmunosuprimidos, determinando la mortalidad ocasionada, la presencia ó ausencia de levaduras en sangre y los órganos diana en los que preferentemente se localiza.

MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Levaduras y condiciones de cultivo

La levadura objeto de este estudio ha sido *Candida famata* cuya capacidad infectiva se ha comparado con la de *Candida glabrata* y *Candida albicans*. *C. famata* fué aislada y caracterizada de un paciente diagnosticado de retinopatía Azoor (Carrasco y col., 2005); *C. albicans* (SC5314) fue obtenida a partir de un aislado clínico (Gillum y col., 1984) y cedida por el Dr. C. Nombela (Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid) y *C. glabrata* (MCYC 2267) procedía de la colección española de cultivo tipo (CECT) de la Universidad de Valencia.

Las levaduras se cultivaron sobre soporte sólido para su mantenimiento o en suspensión para las infecciones celulares de acuerdo a procedimientos habituales. Los cultivos en soporte sólido se realizaron en placas de Petri que contenían medio YPD ("yeast extract-peptona-dextrosa", con 10% de extracto de levadura, 20% de bactopectona y 20% glucosa) a las que se añadió 20% de agar (YPD-agar). Los cultivos se mantuvieron a 30 °C hasta la aparición de colonias que se conservaron, durante cortos periodos de tiempo en las placas de Petri a 4 °C, o a largo plazo a -70 °C en medio YPD con 15% de glicerol. Los cultivos en suspensión se realizaron en medio YPD al que se añadió cloranfenicol (30 ng/ml), ciprofloxacina (50 ng/ml) y ampicilina (100 µg/ml) para evitar contaminación bacteriana y se mantuvieron en baño a 30 °C bajo agitación continua.

3.2. Líneas celulares

Para los estudios sobre la capacidad infectiva de *C. famata*, *C. glabrata* y *C. albicans* se utilizaron las siguientes líneas celulares murinas y humanas:

- Pam-212: queratinocitos de ratón Balb/c (Yuspa y col., 1980).
- 3T6: fibroblastos embrionarios de ratón Swiss Albino (Todaro y Green, 1963).
- HaCaT: queratinocitos humanos (Boukamp y col., 1988).
- HeLa: carcinoma de útero humano (Scherer y col., 1953).
- HT-1080: fibrosarcoma humano (Rasheed y col., 1974).
- THP-1: monocitos de leucemia aguda humana (Tsuchiya y col., 1980).

Las líneas celulares: Pam-212, 3T6, HT-1080 y HeLa se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) y las células THP-1 en medio RPMI-1640 (Medium with Glutamax-1). Ambos medios fueron complementados con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y un 5% de antibióticos (Penicilina-G-sulfato de estreptomicina; 10.000 U/ml-10.000 U/ml) para evitar la contaminación bacteriana. Los cultivos se mantuvieron en un incubador Steri Cult 200 (Hucoa-Erloss) a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂ en frascos de 25 cm² de superficie (F25). Para llevar a cabo las diferentes infecciones, las células se cultivaron directamente sobre placas de Petri de 6 o 24 pocillos, o bien sobre cubreobjetos de cristal situados en ellos.

3.3. Reactivos y anticuerpos

El **medio de cultivo** para levaduras YPD así como el extracto de bactopectona se obtuvieron de la casa comercial BDA, la glucosa de Panreac y el agar de Pronadisase. Los antibióticos: ciprofloxacina, cloranfenicol y ampicilina eran de la casa Sigma. Todos los medios de cultivo para células de mamífero (DMEM y RPMI-1640), el SFB, la tripsina, la penicilina y el sulfato de estreptomicina se obtuvieron de Gibco. Todo el material de plástico empleado en los cultivos se obtuvo de Costar.

Los **colorantes** utilizados fueron: azul de toluidina (AT) de Merck, Hoechst 33258 (H-33258) de Riedel-de Haën, calcofluor (CFL) de Sigma, naranja de acridina (AO) de BDH y las soluciones de May-Grünwald y de Giemsa de Sigma. Para la estimación de la **viabilidad celular** se usó el colorante azul tripán de Sigma.

Los **tampones, soluciones salinas y reactivos en general** se prepararon con productos de las casas comerciales: Sigma, Merck, Panreac, Bio-Rad y Gibco. Otros compuestos químicos usados fueron: Mowiol 40-88 (Aldrich), paraformaldehído (PFA, BDH), xilol (Merck), Triton X-100 (Sigma), DePeX (Serva), glutaraldehído y tetróxido de osmio (Taab), poli-L-lisina (Sigma), estreptavidina conjugada con peroxidasa (Zymed), Diaminobencidiba (DAB, sigma), resina epoxi (TAAB 812 resin, Taab) y lowicryl HM20 (Polysciences).

En los ensayos de **inhibición de la infección celular** por las levaduras estudiadas se emplearon los compuestos antifúngicos: miconazol (MNZ) y nistatina (NIST) y el inhibidor del tráfico vesicular brefeldina A (BFA), todos ellos de Sigma.

En los estudios de **inmunohistoquímica** se emplearon los siguientes anticuerpos: monoclonal de ratón anti- α tubulina de Sigma y antisueros de conejo

frente a *C. famata* (D21), *C. glabrata*, (D51) o *C. albicans* (D36), que se obtuvieron a partir de extractos de cultivos de las levaduras que se inyectaron en conejos de acuerdo al protocolo estandarizado en el laboratorio (Carrasco y col., 2005). Los anticuerpos secundarios usados fueron: anti-IgG de conejo acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma), anti-IgG de conejo acoplado a Alexa-488 o a Alexa-594 (Sigma) y anti-IgG de ratón biotinilado (Zymed). Los anticuerpos se prepararon en PBS-BSA (0.5%) y se utilizaron a las concentraciones indicadas por las casas comerciales. Para la determinación de actina se utilizó faloidina conjugada a tetrametilrodamina (TRITC) de Sigma.

3.4. Cinéticas de crecimiento y caracterización morfológica de las levaduras

Las cinéticas de crecimiento de las levaduras se determinaron de acuerdo a procedimientos estándar. Para ello, se tomaron muestras de las colonias de levaduras crecidas en placas de YPD-agar, se diluyeron en medio YPD y se cultivaron en baño a 30 °C bajo agitación continua durante toda la noche. Posteriormente, se determinó la turbidez de la suspensión a 600 nm utilizando para ello un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1601 de doble haz de luz). A continuación, la suspensión se ajustó a valores relativos de densidad óptica (D.O.) de 0.2 con medio YPD y de nuevo se dejó crecer en condiciones estándar de temperatura y agitación tomando muestras de los cultivos (1 ml de suspensión) cada 1-2 h y determinando los valores de absorción en el espectrofotómetro. La relación existente entre los diferentes valores de D.O. obtenidos y el número de levaduras por ml, se calculó tomando un volumen determinado (100 µl) de cada una de las suspensiones de levaduras, sembrándolo en placas YPD-agar y estimando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) 48 h después de la siembra. En este sentido, se determinó que valores de D.O. de 0.2 correspondían a $6 \pm 3 \times 10^6$ UFC/ml.

La caracterización morfológica de las levaduras en las diferentes fases de crecimiento se realizó utilizando AT para morfología general, H-33258 para morfología nuclear, CFL para la determinación de la pared celular o AO para la determinación de compartimentos ácidos. Para ello, se tomaron muestras de levaduras, crecidas en suspensión, en fase exponencial o estacionaria (1 ml de suspensión celular), las cuales fueron centrifugadas durante 10 min a 1.200 rpm. Después de eliminar el sobrenadante, las levaduras se resuspendieron en PBS centrifugándose de nuevo en las mismas condiciones y fijándose posteriormente en 95% etanol (-20 °C) durante 5

min. A continuación, las muestras se centrifugaron de nuevo para eliminar los restos de etanol, se resuspendieron en agua y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización. Los extendidos celulares se realizaron tomando 20 µl de las suspensiones en agua que se depositaron sobre portaobjetos y se dejaron secar al aire. Para morfología general, los extendidos fueron teñidos con 0.05% AT en agua destilada durante 1 min, lavados abundantemente con agua destilada y secados al aire. Previo a su montaje en DePeX, las preparaciones se pasaron brevemente por xilol. Para microscopía de fluorescencia las células se tiñeron durante 3 min con H-33258 (5 µg/ml en agua destilada) o 2 min con CFL (1 µg/ml en PBS), se lavaron, se dejaron secar al aire y se montaron en DePeX como en el caso anterior. La determinación de compartimentos ácidos se realizó mediante tinción vital con AO de levaduras sin fijar (Canete y col., 2001); Kasten, 1981). Para ello, las levaduras en suspensión en medio YPD se centrifugan 10 min a 1.200 rpm y el precipitado se resuspendió en 100 µl de AO (5 x 10⁻⁴ M en PBS). A continuación, se tomó una muestra de la suspensión de levaduras para su análisis inmediato en el microscopio.

3.5. Infección de células de mamífero en cultivo

Las células murinas y humanas se cultivaron bien adheridas a placas de cultivo, sobre cubreobjetos de cristal, o bien en suspensión (THP-1) hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Paralelamente, las suspensiones de las diferentes levaduras se cultivaron toda la noche a 30 °C en medio YPD, se ajustaron a una D.O. de 0.2 y se mantuvieron durante 3 h adicionales en condiciones estándar de acuerdo a lo descrito anteriormente.

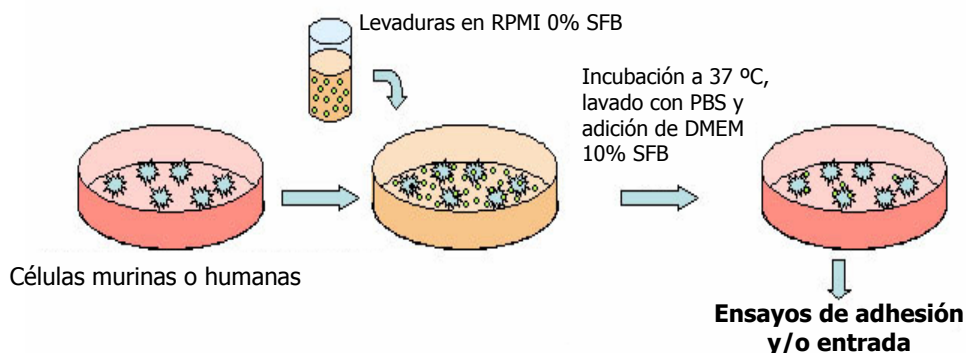


Figura 5.- Esquema del proceso experimental para la realización de la infección de las células de mamífero con las diferentes levaduras.

A continuación, las levaduras se centrifugaron durante 10 min a 1.200 rpm para eliminar el medio YPD y se resuspendieron en medio RPMI-1640 sin SFB para proceder a la infección celular. Las infecciones se llevaron a cabo añadiendo aproximadamente 10^7 levaduras/ml a cada placas de cultivo de 3.5 cm de diámetro en las que se encontraban bien las células adherentes (HeLa, HaCaT, Pam-212, 3T6, HT-1080) o en suspensión (THP-1).

3.5.1. Cuantificación de la adhesión

La cuantificación de la adhesión de *Candida* a las diferentes líneas celulares se realizó mediante microscopía óptica. A tiempos concretos después de la infección, las células crecidas en cubreobjetos (HeLa, HaCaT, Pam-212, 3T6, HT-1080) se lavaron abundantemente en PBS (5 veces) para eliminar las levaduras no adheridas, se fijaron en metanol a -20 °C durante 7 min, se dejaron secar al aire y se teñieron bien con AT o bien con H-33251. En el caso de los monocitos THP-1, su interacción con las levaduras ocasionó la diferenciación de las mismas hacia células de tipo macrófago, las cuales aparecían adheridas a la placa de cultivo. Estas células fueron fijadas y teñidas como el resto de las células adherentes, mientras que las células THP-1 que no se diferenciaban y permanecían en suspensión, se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 min y se fijaron en suspensión durante 6 min en metanol (-20 °C). A continuación, se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones anteriores, se resuspendieron en PBS y se procedió a la realización de extendidos celulares sobre portaobjetos que se dejaron secar al aire para finalmente teñirlas, como en el caso anterior, con AT o H-33258. La tasa de adhesión de las levaduras a las células en cultivo en función del tiempo de incubación, se determinó estimando el número de células que presentaban adheridas en su superficie al menos una levadura. Todos los experimentos se realizaron por triplicado empleándose tres placas de cultivo para cada tiempo de infección. Se estimaron al menos 1000 células en cada condición experimental.

3.5.2. Entrada de *Candida* en las células de mamífero

Para analizar la entrada de las levaduras, las células de mamífero crecidas en monocapa o en suspensión fueron expuestas a *C. famata*, *C. glabrata* o *C. albicans* durante tiempos variables (15 min a 3 h) a 37 °C en RPMI sin suero, tal y como se describe en el apartado anterior. A continuación, se lavaron en PBS con objeto de

eliminar las levaduras no adheridas, y se dejaron crecer en medio completo a 37 °C durante tiempos variables entre 6 y 48 h, en el caso de las células adherentes, y de hasta 6 días en la caso de la línea celular THP-1. A continuación, las células fueron fijadas bien en metanol y teñidas con AT o con H-33258, bien procesadas para inmunofluorescencia o microscopía electrónica, o bien fueron sometidas a extracción de ADN para PCR.

3.6. Tratamientos con diversos compuestos

Con objeto de determinar si la adhesión y entrada de las levaduras era o no dependiente de su viabilidad, se procedió a inactivarlas mediante calor o mediante tratamiento con compuestos antifúngicos. En el primer caso, antes de la infección celular, las suspensión de levaduras cultivadas en YPD, en fase exponencial, se sometieron a choque térmico durante 15 min a 90 °C; añadiéndose posteriormente a los diferentes cultivos celulares. Por el contrario, los compuestos antifúngicos: miconazol (MNZ) y nistatina (NIST) fueron administrados durante el proceso de infección (Pfaller y col., 2003). Así mismo, la endocitosis fue bloqueada utilizando el inhibidor específico brefeldina A (BFA). En estos tratamientos, las levaduras se centrifugaron para retirar el YPD, se resuspendieron en RPMI sin suero al que se le añadió los diferentes compuestos a una concentración final de 5 µg/ml. Las células fueron expuestas a las levaduras en el medio con los diferentes compuestos (MNZ, NIST o BFA) durante 3 h, se lavaron 5 veces con PBS y se procesaron para los ensayos de adhesión o se volvieron a incubar en medio completo (con los compuestos antifúngicos o con el inhibidor de endocitosis) durante tiempos variables (6-24 h) a 37 °C para los estudios de análisis de entrada de levaduras en las células en cultivo.

3.7. Inmunofluorescencia en levaduras

Las características de la pared de las levaduras sometidas a las diferentes condiciones experimentales, así como la determinación de la adhesión o entrada de las mismas en las células murinas y humanas, se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta (Carrasco y col., 2005). Para ello, los extendidos de levaduras, se fijaron 6 min con metanol a -20 °C, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% en PBS. Posteriormente, se incubaron con los diferentes antisueros de conejo frente a *C. famata* (D21), *C. glabrata* (D51), y *C. albicans* (D36) (1:1000 en PBS-BSA

2%) durante 1 h a 37 °C. A continuación, las levaduras se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugado con FITC, 1:200 en PBS-BSA o acoplado a Alexa-488, 1:500 en PBS-BSA) 1 h a 37 °C. Seguidamente, los extendidos se lavaron en PBS, se contratiñeron con H-33258, se lavaron de nuevo en agua destilada, se dejaron secar al aire y se montaron en definitivo en DePeX o en Mowiol.

En el caso de las células adherentes, a tiempos concretos después de las infecciones, las células se lavaron abundantemente en PBS para eliminar las levaduras no adheridas y se fijaron en 3.5% de PFA en PBS durante 15 min. A continuación, las células se permeabilizaron en 0.5% Triton X-100 durante 10 min y se incubaron con los correspondientes antisueros como en el caso anterior. Respecto a la línea celular THP-1, las células adheridas tipo macrófago se fijaron también en PFA y se procesaron de la misma forma que las líneas adherentes, mientras que las células en suspensión se centrifugaron (10 min a 1.200 rpm) y los sedimentos se resuspendieron en 100 µl de PBS con los correspondientes antisueros (anti-*C. famata*, anti-*C. glabrata* o anti-*C. albicans*) incubándose durante 1 h a 37 °C bajo agitación continua. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS mediante centrifugación (10 min a 1.200 rpm) y los sedimentos se resuspendieron en 100 µl de anti-IgG unido a Alexa-488 (1:500 en PBS) durante 1 h a 37 °C. Por último, las células se lavaron mediante centrifugación y se tiñeron con H-33258. Las observaciones se realizaron en microscopía de fluorescencia tomando muestras de las diferentes suspensiones depositadas en portaobjetos.

3.8. Determinación de elementos del citoesqueleto

Los efectos en los microfilamentos de actina (MFs) ocasionados por el proceso de infección se analizaron mediante tinción con faloidina-rodamina. A tiempos concretos después de la infección, las células de mamífero se fijaron en 3.5 % PFA en PBS, se lavaron y se procesaron para inmunofluorescencia de las levaduras como se indica en el apartado anterior. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, las preparaciones se lavaron con PBS y brevemente con Tritón X-100 y incubaron con faloidina unida a tetrametil-rodamina (TRITC) (1:500 en PBS-BSA) durante 30 min a 37 °C.

Las posibles alteraciones en los microtúbulos (MTs) de las células de mamífero y su relación con las levaduras se caracterizaron mediante la realización de una doble inmunofluorescencia indirecta (para las levaduras y para MTs). Para ello, a tiempos

concretos después de la infección, las células se fijaron 6 min con metanol a -20 °C, se lavaron en PBS y se incubaron con los diferentes antisueros para las levaduras (concentraciones anteriormente indicadas) y con el anticuerpo primario frente a α -tubulina (1:200) durante 1 h a 37 °C. A continuación, se lavaron de nuevo con PBS y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios (anti-IgG de ratón acoplado a FITC, 1:200 en PBS-BSA para el α -tubulina y anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 594, 1:500 en PBS-BSA para los antisueros) 1 h a 37 °C. Finalmente, todas las muestras se lavaron abundantemente con PBS, se contratiñeron con H-33258 y se montaron con Mowiol.

3.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para los estudios de SEM, las células adherentes se cultivaron sobre cubreobjetos de cristal redondos de 12 mm de diámetro y se sometieron a la infección con *C. famata*. A tiempos concretos después de la misma, las células se lavaron con PBS y se fijaron en 3% de glutaraldehído en PBS durante 1 h. Posteriormente, las células se fijaron de nuevo en 1% de tetróxido de osmio, se lavaron en PBS y se deshidrataron en series crecientes de etanol-agua destilada (50%, 75%, 90%, 95% y 3 x 100%, 5-10 min en cada paso a 4 °C). Por último, las muestras se recubrieron con oro mediante un Sputter Coater SC502 y se analizaron en el servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid.

3.10. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En los estudios de TEM, las células murinas y humanas adherentes sometidas a infección con *C. famata*, *C. glabrata* o *C. albicans* se lavaron en tampón cacodilato 0.1 M (pH 6.8) y se fijaron durante 2 h a temperatura ambiente con una solución de 4% PFA-2% de glutaraldehído en tampón cacodilato (0.1 M, pH 6.8). Posteriormente, las células se lavaron abundantemente con tampón cacodilato (3 veces, 10 min) y se fijaron de nuevo en 1% tetróxido de osmio-1% de ferrocianuro potásico durante 1 h a 4°C. Tras lavar abundantemente en tampón cacodilato, se añadió 1 ml de PBS-BSA 1% por cada F25, raspándose a continuación la monocapa celular. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 1.000 rpm, se retiró el fijador, se lavaron de nuevo en tampón cacodilato y se deshidrataron en series crecientes de etanol (50%, 75%, 90%,

95% y 3 x 100%, 5-10 min cada paso a 4°C). Las células se incluyeron en resina Epon a 60 °C y las secciones se tiñeron con acetato de uranilo (2% en agua destilada).

Para la inmunodetección en TEM, las células se lavaron en tampón fosfato (0.1 M pH 7.4) y se fijaron durante 2 h en 4% PFA-0.1% glutaraldehído en tampón fosfato. Posteriormente, las muestras se rasparon y lavaron como en el caso anterior y se incluyeron en gelatina al 10%. Las piezas gelificadas se infiltraron gradualmente en sacarosa (de 0.1 a 2 M) a 4 °C y posteriormente se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido. Por último, se procedió a una criosustitución en metanol durante 50 h a -85 °C, tras lo cual se incluyeron en Lowicryl HM20 (Polysciences). La polimerización se realizó usando luz ultravioleta durante 1-2 días a -45 °C y durante otros 2-3 días a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con el antisuero de conejo frente a *C. famata* a una dilución 1:4000, se lavaron en tampón cacodilato y se incubaron con anti-IgG de cabra acoplado a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro. Finalmente, las secciones se lavaron y se contrastaron con acetato de uranilo. En algunos casos, la inmunodetección también se realizó sobre secciones de células incluidas en Epon.

3.11. Análisis mediante PCR

Además de las técnicas morfológicas de tinción con AT y de inmunofluorescencia, la presencia de la levadura después de la infección también se determinó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en el sistema celular HeLa. Después de la infección con *C. famata*, las células se lavaron 5 veces con PBS y posteriormente se incubaron en los medios correspondientes, en condiciones estándar durante 24 o 48 h. Antes de la extracción del ADN, las células se lavaron de nuevo 5 veces con PBS y dos veces más con 0,05 M de EDTA en PBS, para eliminar las levaduras adheridas y finalmente se resuspendieron en PBS.

3.11.1. Extracción del ADN

El ADN fue obtenido a partir de extractos celulares procedentes de los cultivos infectados con *C. famata* de acuerdo a procedimientos estándar (Sambrook y col., 1989). Para ello, las células se rasparon en PBS, se centrifugaron, se resuspendieron en 200 µl de PBS y se calentaron a 95 °C durante 10 min, para inactivar las DNAsas. Seguidamente, a cada muestra se le añadió 50 µl de zimolasa (20 mg/ml), para degradar la pared de la levadura, durante 1 h a 37 °C en agitación y posteriormente

100 µl proteinasa K (10 mg/ml) incubándose de nuevo a 58 °C. A continuación, las muestras se calentaron 10 min a 95 °C en Tris-Tween (Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), MgCl₂ 1 mM, NP40 0.5% y Tween-20 0.5%), se trataron con fenol:cloroformo (1:1) y se lavaron 3 veces con éter etílico hidratado (1:1). Una vez evaporado el éter se les añadió 900 µl de etanol absoluto frío y se almacenaron a -20 °C hasta la precipitación del ADN. Posteriormente, se centrifugaron y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente, resuspendiéndose finalmente en 50 µl de H₂O tridestilada estéril. La concentración de ADN se determinó espectrofotométricamente (GeneQuant pro GE-Amersham). Finalmente, las muestras se conservaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

3.11.2. Realización de la PCR y electroforesis de ADN

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 µl que contenía tampón Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM, KCl 50 mM, gelatina al 0.01 % (p/v), 0.5 µM de cada oligonucleótido iniciador, 200 µM de cada dNTP MgCl₂ 25 mM, 2.5 unidades de DNA polimerasa Taq (Perkin Elmer) y 4 µl de muestra. Se seleccionaron oligonucleótidos que hibridan con regiones terminales de ARN ribosomales (5.8 s 3' ATCCGTTGTTGAAAG5' y 18 s 5' CCTGCGGAAGGATCA3') y amplifican secuencias intermedias (ITS) específicas de cada levadura (Nishikawa y col., 1999; Li y col., 2003). Ello, nos permitió no solo detectar la presencia de ADN de levadura, sino identificar la especie de la que se trataba. Así, se obtuvieron bandas de 237 pb correspondiente a *C. famata*, de 434 pb en el caso *C. glabrata*, de 177 para *C. albicans*.

El producto amplificado obtenido de la PCR fue separado en geles de agarosa del 1.5% (p/v). Las muestras se resuspendieron en tampón de carga para ADN (bromofenol al 0.25%, xilén cianol al 0.25 % y Ficoll al 15%). El electrolito empleado fue TAE 1X (tris base 2M, ácido acético glacial al 5.7 % y EDTA (pH 8) (TAE 50X)). La electroforesis se realizó a 130 V y las bandas de ADN se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio (5 mg/L) y posterior iluminación con luz ultravioleta. Las PCRs realizadas en este estudio se llevaron a cabo en un termociclador iCycler™ Thermal Cycler de la casa comercial Biorad.

3.12. Citometría de flujo

La citometría de flujo nos permitió analizar los cambios ocasionados en el ciclo de las células sometidas a infección con *C. famata* o *C. glabrata*. Para ello, las células se cultivaron en frascos F25, se infectaron con las levaduras durante 3 h y posteriormente se lavaron varias veces con PBS. Por último, se volvieron a incubar en medio completo durante 6, 18 ó 48 h a 37 °C. En los tiempos indicados, después de las infecciones, las células se tripsinizaron y se resuspendieron en 70% de etanol frío durante 30 min. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 5 min a 1.200 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de PBS con RNAsa-A (concentración final: 100 µg/ml), incubándose 30 min a 37 °C. Por último, a cada muestra se le añadió 50 µl de IP 1 mg/ml para teñir el ADN, manteniéndose a 4 °C hasta el momento de su análisis. Los análisis se realizaron en un Citómetro Coulter EPICS XL. La citometría de flujo también nos permitió analizar los efectos ocasionados en la supervivencia de las células sometidas a infección con *C. famata* o *C. glabrata*.

3.13. Determinación de la viabilidad celular

3.13.1. Viabilidad de células de mamífero

La viabilidad de las células en cultivo sometidas a infección con las levaduras se determinó empleando el método de exclusión con el colorante azul tripán. En el caso de las líneas adherentes, las células infectadas y no infectadas se despegaron de la placa de cultivo utilizando tripsina-EDTA. Una vez tripsinizadas, las células se centrifugaron para eliminar los restos de tripsina durante 10 min a 1.200 rpm y se resuspendieron en 300 µl de PBS al que se le añadió 200 µl del colorante azul tripán (1:10 solución comercial). Seguidamente se estimó el porcentaje de células muertas (azules) en relación al de células vivas (sin teñir) utilizando para ello una cámara de Neubauer. En el caso de la línea THP-1, las células en suspensión se pasaron a tubos de centrífuga de 10 ml, las adheridas tipo macrófago se tripsinizaron, se incorporaron al tubo de centrífuga y todas (adheridas y no adheridas) se centrifugaron y procesaron como en el caso anterior.

3.13.2. Viabilidad de las levaduras

Los posibles efectos de las células de mamífero sobre la viabilidad de *C. famata* fue evaluada mediante la obtención de lisados de las células de mamífero y

crecimiento de los mismos en medio YPD. Para ello, a tiempos concretos después de la infección con *C. famata* (inmediatamente después, 3, 24 y 48 h) las células HeLa, se lavaron abundantemente con PBS (5 veces) y se lisaron en 0.1% de Triton X-100 en PBS (1 ml/F25) durante 10 min. Los lisados se diluyeron en PBS (1:1000), se sembraron (50 µl) en placas de YPD-agar y se dejaron crecer a 30 °C. 48 h después, se determinó el número de UFC que crecieron sobre las placas de agar. Como controles se utilizaron levaduras en fase exponencial en YPD, tratadas con Triton X-100, resuspendidas en PBS, sembradas en placas de agar y cultivadas en las mismas condiciones que los lisados celulares sometidos a infección. Es necesario señalar que este tratamiento con Triton X-100 no afectó a la viabilidad de las levaduras crecidas en YPD.

3.14. Capacidad infectiva en ratones

3.14.1. Animales, mantenimiento e infección con *C. famata*

El estudio de la capacidad infectiva de *C. famata in vivo* se inició con 18 ratones albinos Balb/C normales (wt) de 12 semanas de edad que se distribuyeron en grupos de 6. Los animales se mantuvieron y alimentaron en animalario de acuerdo con las condiciones habituales, teniendo acceso continuo al agua y a dieta estandarizada. Para las infecciones, las levaduras se cultivaron de manera rutinaria, se centrifugaron para eliminar el YPD y se resuspendieron en PBS estéril. Los animales recibieron mediante inyección intraperitoneal (i.p.):

- 0.5 ml de 5×10^6 (Grupo 1)
- 0.5 ml de 2×10^8 (Grupo 2)
- 0.5 ml de PBS (Grupo 3, control)

Los ratones se sacrificaron en cámara de CO₂, 3 de cada grupo 24 h después de las infecciones para los estudios a corto plazo y los 3 restantes 90 días después para los estudios a largo plazo. Una vez sacrificados, los ratones se pasaron a cabina estéril de flujo laminar para la extracción de sangre mediante punción cardíaca y de los siguientes órganos: pulmón, riñones, hígado, intestino delgado, intestino grueso, bazo y encéfalo. Las diferentes muestras se procesaron para los análisis morfológicos y para la determinación de crecimiento de levaduras en medio YPD (Fig. 6).

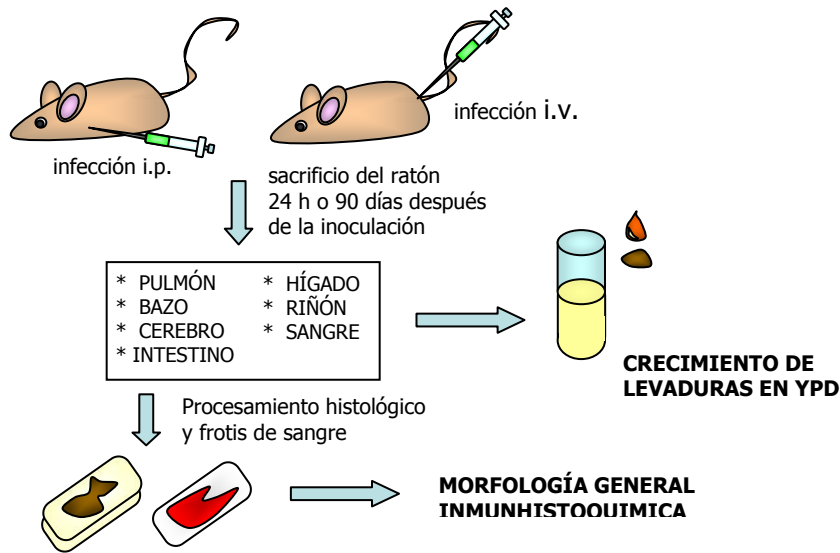


Figura 6.- Protocolo seguido en los ensayos de infectividad de *Candida* en ratones. La inoculación de la levadura se realizó por vía intraperitoneal (i.p.) o intravenosa (i.v.) a través de la vena de la cola.

Los estudios de infectividad de *C. famata* se continuaron en ratones inmunosuprimidos (nu/nu) que fueron infectados con la levadura (5×10^6 ó 2×10^8 UFC) bien por vía intraperitoneal (i.p.) o bien por vía intravenosa (i.v.) a través de la vena de la cola. Con fines comparativos se establecieron dos grupos de ratones nu/nu que fueron infectados con 2×10^8 UFC de *C. glabrata* por vía i.v.. Para estos estudios, se utilizaron tres ratones por condición experimental. También en estos casos, los ratones fueron sacrificados 24 h o 3 meses después de las infecciones y los tejidos fueron analizados como en el caso de los wt. La tabla 2 recoge la nomenclatura empleada para los diferentes ratones en función de las condiciones de infección.

Grupo	levadura	vía	UFC	tiempo de infección	
CFA 1 (i.p.)	<i>C. famata</i>	intraperitoneal (i.p.)	5×10^7	24 h	
CFA 2 (i.p.)			2×10^8		
CFA 1 (i.v.)		intravenosa (i.v.)	5×10^7		90 días
CFA 2 (i.v.)			2×10^8		
CFA 3 (i.v.)	5×10^7				
CFA 4 (i.v.)	2×10^8				
CG 2 (i.v.)	<i>C. glabrata</i>	intravenosa (i.v.)	2×10^8	24h	
CG 3 (i.v.)			5×10^7	90 días	
CG 4 (i.v.)			2×10^8		

Tabla 2.- Nomenclatura asignada a cada ratón inmunosuprimido (nu/nu) empleado en el estudio de infección con *C. famata* (CFA) o con *C. glabrata* (CG). Los ratones fueron infectados bien por i.v. o i.p. con diferentes UFC y se evaluaron 24 h o 90 días después de la infección. En la tabla no se recogen los controles correspondientes a cada situación experimental.

3.14.2. Cultivo de las levaduras procedentes de sangre y de tejidos

De cada uno de los órganos extraídos procedentes de los ratones wt o nu/nu e infectados por vía i.p. o i.v., se separó aproximadamente 1 mm³ de tejido que se sumergió en 5 ml de medio YPD para determinar la presencia de levaduras. De la misma forma se diluyó una gota de sangre de cada uno de los animales en YPD. Estas muestras se mantuvieron a 30 °C bajo agitación continua durante 72 h observándose el aumento de la turbidez debida al crecimiento de las levaduras. La presencia de levaduras en el medio YPD se confirmó mediante tinción con AT (ver apartado 3.4.).

3.14.3. Determinación de la presencia de levaduras en sangre

Paralelamente al crecimiento en YPD, se determinó la presencia de levaduras en sangre 24 h o 90 días después de las infecciones mediante la realización de extendidos. Para ello, se extrajo una muestra de sangre de cada uno de los ratones, incluidos los controles, con las que se realizaron los extendidos en portaobjetos que se fijaron inmediatamente con metanol a -20 °C durante 6 min y se secaron al aire hasta su procesamiento. Para la morfología general, los frotis de sangre se tiñeron con May-Grünwald-Giemsa, para lo cual se añadió 1 ml de solución May-Grünwald durante 2 min. Posteriormente, se lavaron con abundante agua destilada, tras lo cual se añadió 1 ml de Giemsa (1% en agua corriente) durante 15 min. Tras lavar abundantemente, las preparaciones se dejaron secar y se montaron con DePeX.

Así mismo, los frotis se procesaron mediante inmunofluorescencia indirecta para lo cual, una vez fijados, se incubaron 1 h con el antisuero frente a *C. famata* o *C. glabrata* a 37 °C, lavándose posteriormente con PBS. A continuación, las muestras se incubaron con anti IgG de conejo conjugado con Alexa-594 o Alexa-488 durante 1 h a 37 °C. Por último, los extendidos se lavaron en PBS y se montaron en Mowiol.

3.14.4. Procesamiento de los tejidos para su análisis histológico

Para los estudios morfológicos, tanto mediante tinción general con hematoxilina/eosina como mediante inmunohistoquímica, los órganos se fijaron en formaldehído-PBS al 3.5 % durante 72 h, se lavaron abundantemente en agua destilada, procediéndose a su inclusión de forma rutinaria en parafina. A continuación, se realizaron secciones histológicas de 4-5 µm de espesor que se montaron sobre

portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina con el fin de conseguir una buena adherencia del tejido. Los cortes fueron desparafinados pasándolos dos veces por xilol durante 30 min y se hidrataron en series de alcoholes a concentraciones decrecientes (100 %, 96 % y 70 %). Para morfología general, las secciones se tiñeron con hematoxilina férrica durante 2 min, se lavaron con abundante agua corriente y se contratiñeron con eosina alcohólica durante 5 min. Finalmente, las secciones se deshidrataron y se montaron con DePeX.

3.14.5. Inmunohistoquímica

La determinación de la presencia de las levaduras *in situ* en los tejidos de los ratones infectados se realizó mediante inmunohistoquímica. El método inmunohistoquímico utilizado fue el de estreptavidina-biotina-peroxidasa (SBP) y se basó en la técnica de Hsu y col. (1981). Las secciones se incubaron a 60 °C durante toda la noche y a continuación se desparafinaron en xilol (15 min) y se hidrataron por inmersión en alcoholes de concentraciones decrecientes (etanol 100 %, 96 %, 70 %). Posteriormente, se realizó la inhibición de la actividad de peroxidasa endógena, incubando las muestras con H₂O₂ al 3% en agua destilada durante 10 min a 37 °C, tras lo cual se lavaron abundantemente en PBS. Seguidamente, los cortes se bloquearon con suero no inmune durante 20 min a temperatura ambiente y se incubaron las muestras con el antisuero frente a *C. famata* o *C. glabrata* durante toda la noche a 4 °C y en oscuridad en cámara húmeda. A continuación, los tejidos se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (antisuero biotinilado, solución comercial) durante 20 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (solución comercial) durante 20 min en cámara húmeda, se lavaron de nuevo con PBS y se revelaron con DAB (5 mg en 10 ml de PBS) durante 10 min. Por último, las muestras se contratiñeron levemente durante 30-60 segundos con hematoxilina de Harris, se lavaron en agua destilada, se deshidrataron, se aclararon en xilol y se montaron en DePeX.

En el caso de la inmunofluorescencia, los tejidos se desparafinaron y rehidrataron de la misma forma que en el caso anterior. Para eliminar la posible autofluorescencia y desenmascarar el antígeno, las muestras se hirvieron durante 2 min en buffer citrato 0.01 M (pH 6), se bloquearon e incubaron con el antisuero frente a *C. famata* o *C. glabrata*, tal y como ya se ha comentado. Posteriormente, las muestras se lavaron abundantemente con PBS y se incubaron con anti-IgG de conejo

acoplado a Alexa-488 o Alexa-594, durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda y en oscuridad. Finalmente, las preparaciones se lavaron con PBS, se contratiñeron con H-33258 y se montaron con Mowiol.

3.15. Análisis de muestras humanas

3.15.1. Selección de las muestras

La presencia de levaduras y en concreto de *C. famata*, se analizó en muestras, tanto frescas como incluidas en parafina, obtenidas por biopsia de pacientes diagnosticados con enfermedad de Crohn procedentes del Servicio de Anatomía Patológica de los hospitales: Gregorio Marañón (Madrid), La Paz (Madrid) y Hospital General (León). Como controles negativos se emplearon muestras procedentes de individuos con patologías intestinales diferentes a Crohn. Como control positivo se empleó un exudado conjuntival procedente de un individuo afectado de retinopatía Azoor del que se aisló *C. famata* (Carrasco y col., 2005) (Tabla 3).

Caso	Tipo de muestra	Procedencia	Patología	Estado de la muestra al recibirla		
LC	Exudado conjuntival	particular	Retinopatía AZOOR	Tomadas en el laboratorio		
C1	Biopsia de colon	Hospital Gregorio Marañón (Madrid)	Crohn	Fresca en PBS estéril		
C2				Fresca en RPMI		
C3	Biopsia intestinal (Ileon)	Hospital General (León)	Crohn	Fresca en PBS estéril		
C4				Frescas en PBS		
C5						
IC1			Sano			
IC2						
C6			Hospital de la Paz (Madrid)		Crohn	Secciones histológicas incluidas en parafina
C7						
C8						
C9						
C10						
C11	Sano					
IC3						

Tabla 3.- Nomenclatura empleada para las diferentes muestras analizadas. En la tabla se indica la procedencia y la patología diagnóstica, así como el estado en el que se recibieron las biopsias. C: casos, IC: individuos controles.

3.15. 2. Procesamiento de las muestras

Con objeto de determinar presencia o ausencia de levadura, las biopsias frescas se dividieron en varios trozos con los que (1) se efectuaron secciones por microtomía de congelación para su análisis morfológico o (2) se realizó la PCR. Para la realización de las secciones por congelación, las piezas de tejido se congelaron en nieva carbónica procediéndose a la obtención de secciones de 15-20 μm de espesor en un criotomo. Los cortes se recogieron en PBS, se depositaron sobre portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina, se fijaron durante 5 min con metanol (-20 °C) y se tiñeron con 0,5 % AT (5 min) o se sometieron a inmunofluorescencia para *C. famata* de acuerdo al protocolo utilizado con las células adheridas (ver: apartado 3.7. de esta sección). Para la realización de la PCR se procedió en primer lugar a la extracción de ADN mediante homogenización de la muestra utilizando utilizando DNAzol® (Progenetics) conteniendo zimolasa y proteinasa K (ver: apartado 3.11.1. de esta sección). El ADN se precipitó a partir del lisado con etanol y se conservó a -80 °C hasta el momento de su utilización. La PCR se efectuó de acuerdo al protocolo anteriormente descrito.

Por otro lado, las secciones histológicas de las biopsias intestinales incluidas en parafina (1) se tiñeron con hematoxilina-eosina para morfología general, (2) se sometieron a inmunofluorescencia para la determinación de la levadura o (3) bien se desparafinaron y se procesaron para PCR previa extracción del ADN de acuerdo al protocolo anteriormente descrito.

Por su parte, los exudados se obtuvieron directamente del paciente diagnosticado de Azoor utilizando torundas estériles con las que se frotó el interior del párpado inferior. Las torundas bien se sumergieron en PBS, realizándose extendidos sobre portaobjetos que se fijaron 5 min con metanol (-20 °C) para su posterior análisis en microscopía óptica o bien se incluyeron en Epon para su observación en TEM siguiendo el mismo protocolo que el utilizado en los cultivos celulares (ver: apartado 3.10. de esta sección).

3.16. Observaciones microscópicas y análisis estadístico

La microscopía de fluorescencia se realizó utilizando un microscopio Olympus BX61 acoplado a una cámara de captura digital Olympus DP50, empleando luz de excitación ultravioleta (filtro de excitación BP 360-370 y filtro de barrera BA 420) para

H-33258 y CFL, de excitación azul (filtro de excitación BP 460-490 y filtro de barrera BA 520IF) para FITC y AO o de excitación verde (filtro de excitación DM 570 y filtro de barrera BA 590) para TRITC.

Las muestras de TEM se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1010 con un voltaje de aceleración de 80 kV. Las imágenes se tomaron con una cámara digital Bioscan792 (Gatan, Inc. 5933 Coronado Lane. Pleasanton, CA 94588).

Las preparaciones de SEM, se observaron utilizando un microscopio electrónico de barrido Phillips XL30 con un voltaje de aceleración de 20 kV.

El tratamiento y análisis estadístico de los datos se realizó empleando los programas informáticos Microsoft Excell 2000 y SPSS 11.0 para Windows. Las herramientas estadísticas utilizadas fueron el análisis de la varianza (ANOVA) y el contraste de igualdad de medias utilizando la t de Student. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a partir de $P < 0.05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Morfología de las levaduras

La figura 7 A muestra la curva de crecimiento de *C. famata* obtenida mediante espectrofotometría en condiciones estándar de crecimiento: en suspensión, a 30 °C, en medio YPD y bajo agitación continua. Como puede observarse, la fase de latencia era relativamente corta (unas dos horas), la fase exponencial comenzaba a las 2-4 h de crecimiento, mientras que la estacionaria se alcanzaba entre las 8-10 h después de iniciar el cultivo. La tasa de crecimiento de *C. glabrata* y *C. albicans* fue superior a la de *C. famata* durante las primeras horas de cultivo, alcanzando la fase estacionaria a las 6-8 h de incubación. De acuerdo con esta curva, el tiempo de generación (tiempo que necesario para duplicar la densidad óptica en la fase exponencial) fue de aproximadamente 180 min. La relación existente entre la D.O. a 600 nm y el número de levaduras por mililitro de suspensión se determinó estimando el número de UFC en placas de YPD-agar. En la figura 7 B se muestra la tabla con los valores obtenidos para *C. famata*, así como para *C. glabrata* y *C. albicans*. El tiempo de generación para *C. glabrata* y *C. albicans* fue aproximadamente de 180 min y de 210 min, respectivamente. Estos resultados permitieron determinar el número de levaduras con las que se infectaron los cultivos de células de mamífero en cada experimento.

Teniendo en cuenta que las infecciones de las células de mamífero se realizaron en medio DMEM con 10% de SFB a 37 °C y 5% de CO₂, también se determinaron las curvas de crecimiento de las levaduras en dichas condiciones. Así, el crecimiento de *C. famata* en las condiciones de infección fue menor que el estimado en medio YPD a 30°C, no observándose un incremento significativo en la tasa de crecimiento en función del tiempo de incubación. Por el contrario, tanto *C. albicans* como *C. glabrata* mostraron un crecimiento gradual en DMEM a 37 °C, aunque inferior al determinado en YPD (Fig. 7 C-D).

La morfología de *C. famata* en las distintas fases de crecimiento del cultivo mostró cierta variabilidad tal y como se observó en microscopía de campo claro mediante tinción con AT (Fig. 8 Aa), en fluorescencia utilizando H-33258 (Fig. 8 Ab), CFL (Fig. 8 Ac) o AO (Fig. 8 Ad), mediante inmunofluorescencia empleando un antisuero de conejo frente a *C. famata* (Fig. 8 B) o en TEM (Fig. 8 C).

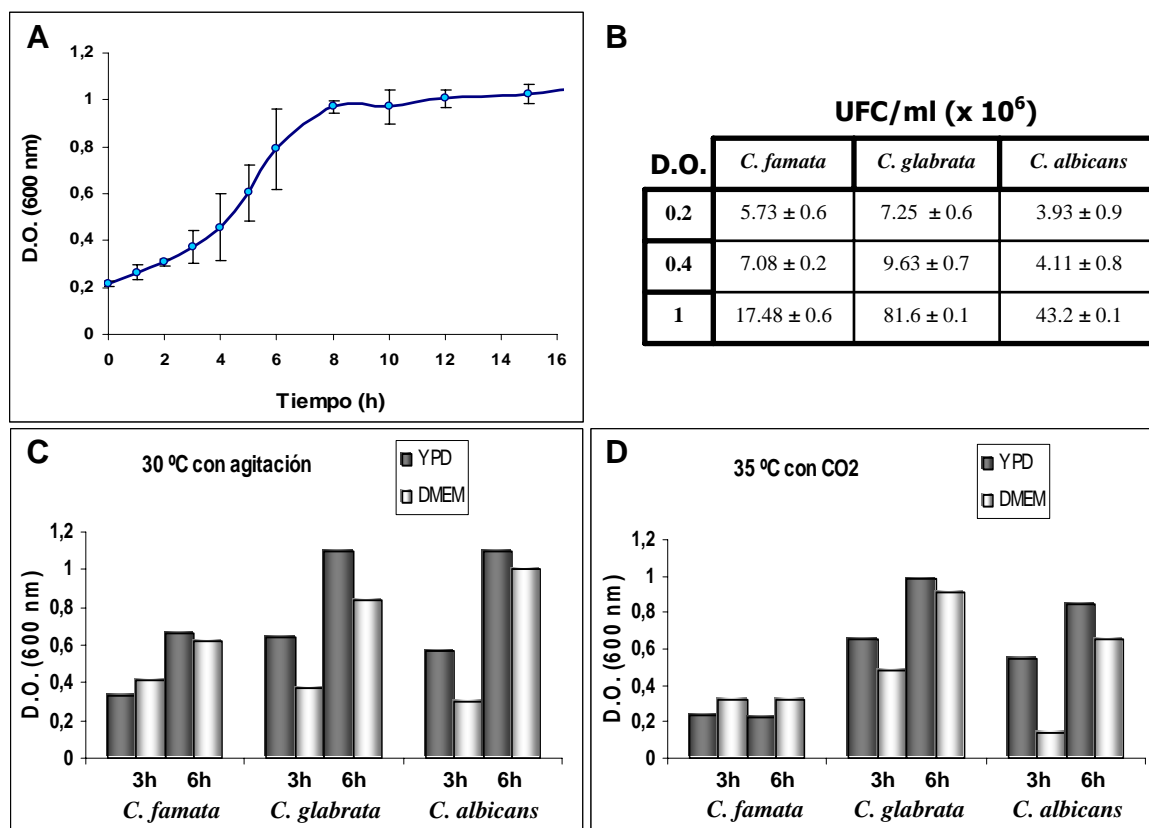


Figura 7.- A: Crecimiento de *C. famata* en medio de cultivo YPD a 30 °C y bajo agitación continua. La determinación de la tasa de crecimiento se realizó mediante espectrofotometría a 600 nm. **B:** relación entre la densidad óptica (D.O.) y el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por ml de cada una de las levaduras estudiadas: *C. famata*, *C. glabrata* y *C. albicans*. **C y D:** tasa de crecimiento de *C. famata*, *C. glabrata* y *C. albicans* a 30 °C bajo agitación o a 35 °C sin agitación y en presencia de CO₂. En ningún caso se determinaron valores de desviación estándar (DE) superiores a 0.05.

En la fase exponencial las formas unicelulares y/o en proceso de división son las más abundantes, también se observaron complejos semejantes a pseudomicelios constituidos por pocas células unidas unas a otras, que podrían estar ramificados o no. Por el contrario, en las fases de latencia y estacionaria, las células tienden a formar estructuras apretadas, con aspecto en mosaico, y en ellas se observa un mayor número de cadenas pseudomiceliales. La tinción con CFL permitió la observación de las cicatrices de gemación, resultantes de la división celular y separación de las células hijas (Fig. 8 Ac). La tinción con AO puso de manifiesto la fluorescencia anaranjada de la vacuola de carácter ácido, la cual se encuentra localizada en uno de los polos en la mayor parte de las levaduras o dispersa en el citoplasma de las levaduras en división (Fig. 8 Ad). El análisis en TEM permitió observar en detalle la estructura característica de *C. famata* (Fig. 8 C). La pared presenta tres zonas bien definidas, la región externa muestra gran densidad a los electrones, mientras que la media y la interna son más

claras. Esta estructura se altera en las zonas de contacto entre las células, en las que la región media, rica en quitina, es más ancha (Fig. 8 C, estacionaria). Por su parte, el citoplasma es denso y en él es posible distinguir la vacuola, ciertos orgánulos (mitocondrias) y el núcleo.

Por otro lado, las características morfológicas de *C. glabrata* y *C. albicans*, cultivadas en condiciones estándar en YPD a 30 °C o en DMEM a 37 °C, se muestran en la figura 9. Tanto la tinción con AT como la inmunofluorescencia indirecta con los antisueros de conejo correspondientes para *C. glabrata* o *C. albicans*, reveló que las formas de levadura de ambas especies eran similares a las de *C. famata* (Fig. 9 A-A', B). También se observaron formas semejantes a pseudomicelios en *C. albicans* (Fig. 9 B') pero no en *C. glabrata*. Además, *C. albicans* sufrió transición a la forma alargada micelial (hifa) a partir de 1 h de incubación en DMEM, originando redes filamentosas de rápido crecimiento (Fig. 9 C-C').

A partir de los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento, así como las morfologías determinadas en las distintas etapas de proliferación, se seleccionaron las condiciones de crecimiento exponencial para la realización de los estudios de infectividad de *C. famata*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Dichas condiciones consistieron en: 3 h de crecimiento en medio YPD a 30 °C bajo agitación continua previo a la infección. Se utilizaron estas mismas condiciones en todos los estudios en los que se comparó la capacidad infectiva de *C. famata* con *C. glabrata* y *C. albicans*.

4.2. Adhesión de las levaduras a células en cultivo

4.2.1. *C. famata* se adhiere diferencialmente a los distintos tipos celulares

La tabla 4 muestra la adhesión de *C. famata* a dos de las líneas celulares utilizadas en el estudio: HeLa y HT-1080 en presencia o en ausencia de SFB. Como puede observarse, en ambos casos y en los tiempos analizados (30 min, 1 y 3 h), no se encontraron diferencias significativas en la adhesión de la levadura a las células de mamífero cuando la infección se realizó en medio de cultivo con o sin SFB. No obstante y de acuerdo a los estudios realizados por otros autores (Cormack y col., 1999), las infecciones a corto plazo (tiempos inferiores a 3 h) se realizaron en ausencia de SFB, mientras que en los estudios a largo plazo, como en el caso de THP-1 (hasta 6 días), las infecciones se efectuaron en presencia de SFB con el fin de no alterar el crecimiento y división de las células en cultivo.

Células	30 min (% ± DE)		1 h (% ± DE)		3 h (% ± DE)	
	SFB	-	SFB	-	SFB	-
HeLa	11.1 ± 5	13 ± 7	14.8 ± 8	15.8 ± 10	11.9 ± 8	16.1 ± 9
HT-1080	18.7 ± 7.5	12.7 ± 9	18.8 ± 10	18.7 ± 12	20.8 ± 9	22.8 ± 9

Tabla 4: Adhesión de *C. famata* a células HeLa y HT-1080 en DMEM con suero fetal bovino (SFB, 10%) y sin suero.

La figura 10 muestra la adhesión de *C. famata* a los distintos tipos celulares: epiteliales: HeLa, HaCaT y Pam-212, fibroblastos: HT-1080 y 3T6 y monocitos humanos THP-1. A tiempos concretos después de la infección, las células fueron fijadas con metanol y teñidas bien con AT o bien con H-33258 a fin de observar el estado de las levaduras y el del núcleo de las células del cultivo, respectivamente. La adhesión a células en interfase o en división ocurría tempranamente, y ya a los 15 min muchas células presentaron un número variable de levaduras adheridas a sus membranas, tanto en la forma unicelular como multicelular (cadenas de tipo pseudomicelio). La adhesión fue menor en la línea epitelial murina Pam-212, la cual forma colonias celulares apretadas, en comparación con HeLa y HaCaT que aunque también son epiteliales, las células se disponen de forma más laxa. Por el contrario, los fibroblastos 3T6, con morfología estrellada, aparentemente mostraron una mayor tasa de adhesión. En el caso de THP-1, la mayor parte de las células en suspensión presentaron muy pocas levaduras asociadas y sus morfologías eran redondeadas y similares a las de los controles. Sin embargo, los monocitos adheridos a la placa mostraron un elevado número de levaduras adheridas y, algunos de ellos, presentaron una morfología tipo macrófago, con un número variable de prolongaciones citoplasmáticas. 3 h después de la infección, se observó un claro deterioro en la morfología de todas las líneas celulares estudiadas manifestado por un incremento en la vacuolización del citoplasma, especialmente patente tras la tinción con AT (Fig. 10 B), y por la aparición de alteraciones en la morfología nuclear, detectado en microscopía de fluorescencia tras la tinción con H-33258 (Fig. 10 C, ver: HaCaT). No obstante, la mayor parte de las células de todas las líneas recuperaron la morfología característica de los controles a partir de las 48 h de infección.

Las cinéticas de adhesión que se recogen en la figura 11, se determinaron estimando el número de células que mostraban al menos una levadura adherida en su superficie. Como puede observarse, la adhesión ocurre a tiempos cortos (15 min) y se mantiene 3 h después de la infección en todos los tipos celulares.

Los valores de adhesión obtenidos para las diferentes líneas fueron del $50\% \pm 8.2$ para los monocitos THP-1, que fueron las células que presentaron mayor tasa de adhesión, seguida de los fibroblastos 3T6 y de la línea de fibrosarcoma HT-1080 con un $20\% \pm 2$, de las epiteliales HeLa y HaCaT con el $18\% \pm 3.8$ y por último de Pam-212, en las que tan sólo un $8\% \pm 2.6$ de las células mostraron alguna levadura adherida a su superficie.

A partir de estos resultados se seleccionó la línea celular HeLa, como ejemplo de células adherentes no fagocíticas y los monocitos THP-1, como células en suspensión y fagocíticas. Así mismo, se seleccionó el tiempo de 3 h de infección para los estudios de interacción entre las células HeLa y las levaduras a corto plazo, ya que para ese tiempo los valores de adhesión estaban estabilizados. Los estudios de adhesión y entrada a largo plazo (hasta 6 días de infección) sólo se realizaron con la línea THP-1. En esta línea se observó que la tasa de adhesión se mantenía elevada (en torno al 70%) durante los 6 días que se mantuvo la infección.

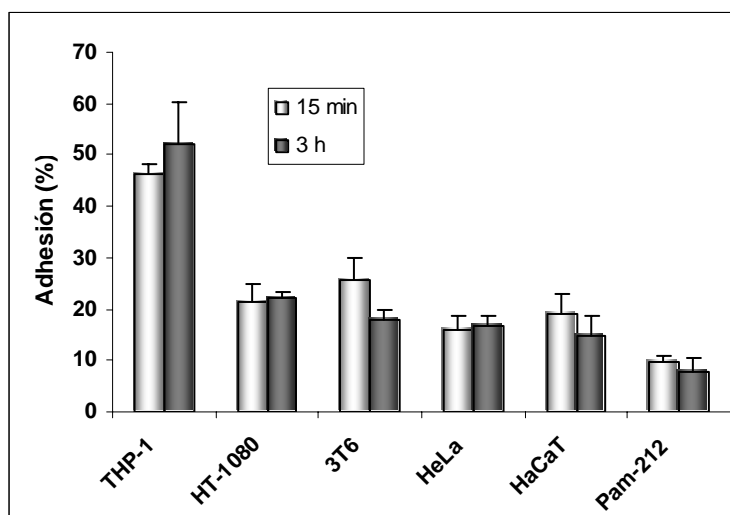


Figura 11.- Adhesión de *C. famata* a las diferentes líneas celulares utilizadas en función del tiempo de incubación. Los valores se determinaron mediante fijación en metanol (15 min y 3 h después de la infección), tinción con AT y estimación del número de células que presentaban al menos una levadura adherida en su superficie. Al menos 1.000 células fueron contadas para cada condición experimental y línea celular.

4.2.2. La capacidad de adhesión de *C. glabrata* y *C. albicans* es mayor que la de *C. famata*

La capacidad de adhesión de *C. famata* a tiempos cortos de infección (hasta 3 h) se comparó con la de *C. albicans* y *C. glabrata* en el sistema celular HeLa (Fig. 12). Mientras las tres levaduras mostraron la misma tasa de adhesión a los 15 min de iniciar

el co-cultivo, los porcentajes de células con *C. glabrata* o *C. albicans* adheridas se incrementaron notablemente a partir de los 30 min de infección ($28\% \pm 0.4$ y $34\% \pm 0.7$, respectivamente) y fueron superiores a las determinadas para *C. famata* ($15\% \pm 0.1$). Las tasas de adhesión de las tres levaduras se estabilizaron 1-3 h después de iniciada la infección, alcanzándose valores del $79\% \pm 0.7$ para *C. albicans*, del $68\% \pm 0.8$ para el caso de *C. glabrata* y del $17\% \pm 0.1$ con *C. famata*. No obstante, es necesario señalar que en el caso de *C. albicans*, la estimación de la capacidad de adhesión en la forma de levadura se complicó a partir de 1 h de la infección por la formación de hifas. Por ello, los valores representados en la figura 12 correspondientes a las 3 h incluyen las células que presentan adheridas tanto formas de levaduras como células con pseudohifas o hifas.

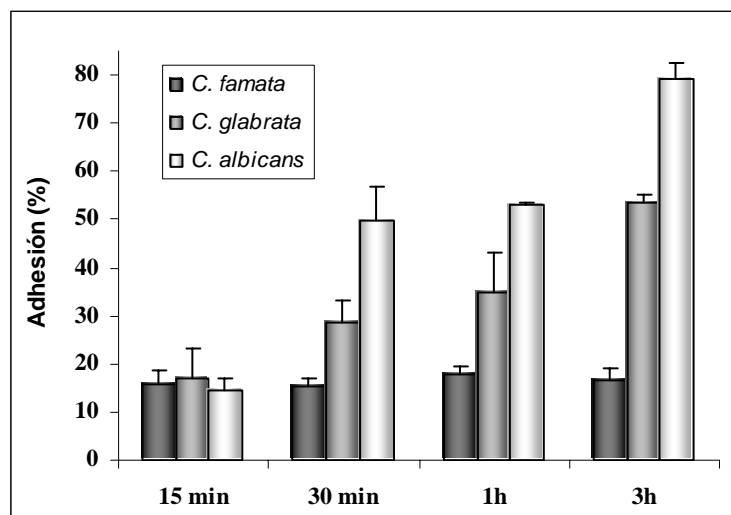


Figura 12.- Adhesión de *C. famata*, *C. glabrata* y *C. albicans* a la línea celular HeLa en función del tiempo de incubación. Los valores se determinaron mediante estimación del número de células que presentaban como mínimo una levadura adherida en su superficie. Al menos 1000 células fueron contadas por cada punto experimental.

Así mismo, a tiempos cortos de infección (inferiores a 3 h), *C. albicans* y *C. glabrata* ocasionaron cambios morfológicos, semejantes a los inducidos por *C. famata* tales como: vacuolización citoplasmática y retracción celular (Fig. 13). No obstante, estas alteraciones fueron especialmente llamativas 24 h y 48 h después de la infección, observándose un elevado número de células retraídas que presentaban deformaciones en sus membranas, características típicas del proceso de muerte celular. El daño ocasionado por *C. albicans*, que sufre transición del estado de levadura al miceliar durante la primera hora de infección, fué mayor que el inducido por *C. glabrata*, a

juzgar por el deterioro morfológico y progresivo mostrado por las células a consecuencia de la infección. 24 h después de la infección, prácticamente la totalidad de las células se encontraban muertas y presentaban numerosas deformaciones a modo de burbujas en sus membranas, amplia vacuolización citoplasmática y núcleos fuertemente picnóticos (Fig. 13 B´´).

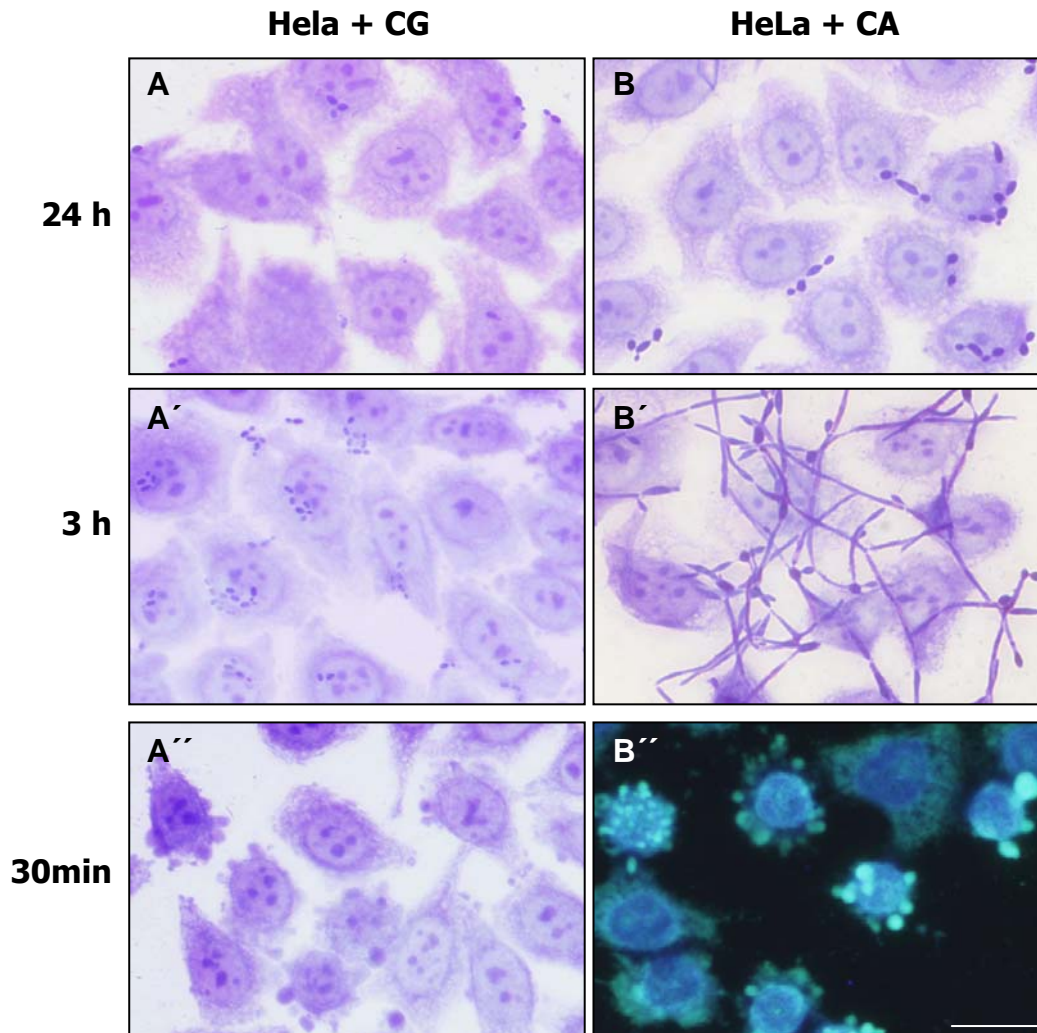


Figura 13.- Morfología de células HeLa teñidas con AT (A-A´´, B-B´) o con H-33258 (B´´) infectadas con *C. glabrata* (CG) o con *C. albicans* (CA) durante 30 min, 3 h ó 24 h. La capacidad infectiva de ambas especies es elevada y ocasionan alteraciones morfológicas profundas, especialmente patentes 24 h después de la infección (A´´, B´´). Barra de escala: 20 µm.

4.3. Entrada de *C. famata* en las células de mamífero

La siguiente etapa a la adhesión de la levadura en el proceso de infección celular es la entrada de la misma en la célula de mamífero. Los estudios de inmunofluorescencia indirecta indicaron un incremento en el número de levaduras en el citoplasma de las células con el tiempo transcurrido después de la infección, que se

manifestaba por la aparición de señales punteadas fluorescentes no uniformes, en el interior de las células estudiadas ya a partir de las 3 h de infección (Fig. 14).

Los valores obtenidos de entrada, 3 h después de la infección de la levadura, eran coincidentes con los de adhesión. Las células THP-1 tipo macrófago (adheridas a la placa de cultivo) fueron las que presentaron las tasas de entrada más elevadas ($54.3\% \pm 5$), seguidas de los fibroblastos 3T6 ($22.9\% \pm 4$), de las HeLa ($18.4\% \pm 0.5$); y por último, de los queratinocitos HaCaT ($5.6\% \pm 0.98$) y Pam-212 ($2.7\% \pm 0.26$). Así mismo, la señal fluorescente desaparecía conforme avanzaba el tiempo transcurrido después de la infección y 48 h después, sólo un bajo porcentaje de las células ($< 3\%$) presentaron señales fluorescentes en su citoplasma. Estos resultados indican que *C. famata* posee capacidad para entrar, de forma diferencial, en todas las líneas estudiadas.

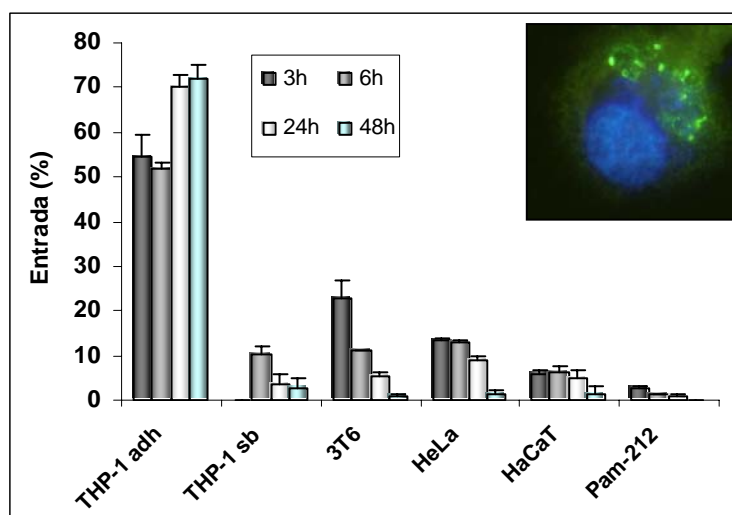


Figura 14.- Entrada de *C. famata* a las diferentes líneas celulares en función del tiempo de incubación. Los valores se determinaron mediante estimación del número de células con señal positiva al antisuero frente a *C. famata* en su citoplasma. Al menos un total de 600 células fueron contadas para cada tiempo.

La capacidad de entrada de *C. famata* se comparó solamente con la de *C. glabrata* en el sistema de ensayo de células HeLa, pero no con *C. albicans*, ya que esta última, en las condiciones de cultivo forma hifas y pseudohifas, lo que no hizo posible comparar los resultados con los obtenidos con *C. famata* y *C. glabrata*. La figura 15 muestra que la entrada de *C. glabrata* en células HeLa, evaluada por inmunofluorescencia indirecta, era mayor que la de *C. famata*. 3 h después de la infección, el porcentaje de células que mostraban reacción positiva en el citoplasma al antisuero para *C. glabrata* era del 25.86% frente al $13.4\% \pm 0.05$ estimado para *C. famata*. 48 h después de la infección, aproximadamente el 40% de las células del

cultivo presentaban numerosas levaduras adheridas e incorporadas en el citoplasma y se encontraban en evidente proceso de muerte a juzgar por las características morfológicas que mostraban (Fig. 15).

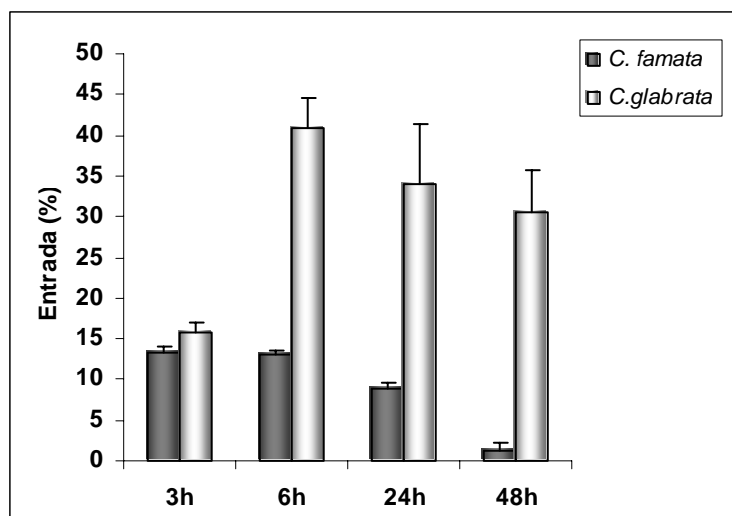


Figura 15.- Entrada de *C. famata* y *C. glabrata* a la línea celular HeLa en función del tiempo transcurrido después de la infección. Los valores se determinaron mediante estimación del número de células adheridas a la placa de cultivo, con señal positiva en el citoplasma para los diferentes antisueros. Al menos un total de 600 células fueron contadas para cada punto. Se muestra en contraste de fases (fotografía superior) y en fluorescencia (fotografía inferior, tinción con IP) la morfología apoptótica característica de la mayor parte de las células con levaduras adheridas o incorporadas en el citoplasma.

4.4. Participación de los microfilamentos de actina en el proceso de adhesión y entrada

Teniendo en cuenta el elevado número de proyecciones citoplasmáticas formadas alrededor de las levaduras adheridas a las células en cultivo y el importante papel que juegan los microfilamentos (MFs) en los procesos de fagocitosis, se procedió a analizar los cambios ocasionados en la distribución de este elemento del citoesqueleto durante el proceso de adhesión y entrada en las células en cultivo. Después de la infección, las células fueron fijadas, teñidas con faloidina-TRICT y analizadas en microscopía de fluorescencia y confocal. La figura 16 recoge la adhesión de la levadura a las diferentes líneas celulares (HeLa, HaCaT, HT-1080 y 3T6) y en la que se aprecia la fluorescencia verde de la pared de *C. famata* destacando sobre los MFs, que fluorescen en rojo. La unión de las levaduras a las células en cultivo pareció afectar a la estabilidad de los MFs, los cuales aparecieron parcialmente desorganizados, especialmente en los sitios de adhesión (Fig. 16 B HeLa). Las

levaduras incorporadas por las células presentaron una menor intensidad de fluorescencia en su pared y se encontraban rodeadas de un anillo de MFs. En tiempos más avanzados, la señal apareció como puntos fluorescentes dispersos por el citoplasma (Fig. 16 C).

La entrada de *C. famata* se analizó mediante microscopía confocal en los queratinocitos de ratón Pam-212. Estas células presentan la ventaja de poseer una cierta altura lo que facilita la realización de secciones y reconstrucciones tridimensionales permitiéndonos situar las levaduras en el interior de las células (Fig. 17). En células sin infectar, los microfilamentos de actina se disponen preferentemente bajo la membrana plasmática, en las regiones de contacto entre las células y en las regiones basales, facilitando la adhesión entre células y con el sustrato, respectivamente (Fig. 17 A). Las levaduras adheridas presentaban una intensa fluorescencia homogénea y continua a nivel de pared (Fig. 17 A'), mientras que las que se encontraban en el interior de las células aparecían con fluorescencia irregular y discreta (Fig. 17 A''). La reconstrucción tridimensional se realizó mediante microfotografías obtenidas de secciones a lo largo del eje Z. A partir de una imagen promedio de estas secciones se obtuvo una representación ortogonal que demuestra la entrada de la levadura en las células Pam-212. La imagen obtenida a nivel del plano focal Z, presenta a la levadura (fluorescencia verde) intercalada con el citoesqueleto de actina (fluorescencia roja). Así mismo, se realizaron planos ortogonales en los que se obtuvo una clara señal de fluorescencia roja debida a la faloidina-TRICT unida a la actina, tanto por encima como por debajo de la señal verde de las levaduras (Fig. 17 B-B')

Resultados semejantes, en cuanto a alteraciones de los MFs, fueron observados tras la infección de la línea celular HeLa con *C. albicans* y *C. glabrata* a tiempos cortos de infección (inferiores a 1 h y 3 h, respectivamente). En este caso, el proceso de infección ocasionó despolimerización de los MFs ya detectable 3 h ó 6 h después de la infección con *C. albicans* o *C. glabrata*, respectivamente, ocasionando modificaciones más llamativas que las observadas con *C. famata*. En la figura 17 (C'-C'') se puede observar como los MFs tienden a distribuirse a modo de tubos, rodeando a las levaduras y pseudohifas (en *C. albicans*) en el proceso de entrada.

4.5. Alteración de los microtúbulos de las células infectadas

Dada la estrecha relación existente entre los microfilamentos y los microtúbulos (MTs), se decidió analizar el efecto de la infección sobre estos otros elementos del citoesqueleto. El estudio se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo para α -tubulina. Las células control en interfase presentan una red microtubular bien desarrollada que se extiende desde la región perinuclear hacia la periferia de la célula, mientras que las células en división poseen husos organizados tal y como se aprecia en la figura 18 A. La adhesión de *C. famata* no ocasionó cambios llamativos ni en la estructura ni en la distribución de los MTs interfásicos de las células HeLa (Fig. 18). Sin embargo, sí se observó cierto engrosamiento y reestructuración de los MTs de las células en interfase que presentaban levaduras en su interior a partir de las 3 h de infección (Fig. 18). Así mismo, se apreció un incremento del número de metafases que mostraban los husos alterados, especialmente 6 h después de la infección. No obstante, 24 h después, el porcentaje de células en división era semejante al de los controles pero no el porcentaje de células con husos mitóticos alterados (Tabla 5).

	3 h		6 h		24 h	
	metafases	alteradas	metafases	alteradas	metafases	alteradas
HeLa	1.68%±0.2	5.33%±2	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	1.30%±0.1	19.05%±2	2.07%±0.5	35.71%±5	1.58%±0.1	16.67%
<i>C. glabrata</i>	1.06%±0.2	40.00%±4	0.52%±0.1	63.64%±6	0.00%	0.00%
<i>C. albicans</i>	1.51%±0.3	44.44%±6	0.89%±0.1	87.50%±0.2	0.00%	0.00%

Tabla 5: Variación en el porcentaje de células en metafases presentes en los cultivos de células HeLa en función del tiempo transcurrido después de la infección. Así mismo, se muestran los porcentajes de esas metafases que presentan los husos alterados. Al menos se estimaron 100 metafases para cada tiempo evaluado.

De la misma manera que lo observado después de las infecciones con *C. famata*, tanto *C. glabrata* como *C. albicans* ocasionaron alteraciones variables de los MTs interfásicos y dependientes del tiempo transcurrido después de la infección. Mientras la red microtubular de las células HeLa apenas si se alteró en tiempos inferiores a 3 h, se apreciaron importantes modificaciones en la misma 24 y 48 h después de la infección con *C. glabrata* o con *C. albicans*, observándose numerosas células con MTs engrosados y otras con MTs despolimerizados (Fig. 18 B',C'). Así mismo, las

alteraciones producidas en las células en división fueron mucho mayores que las observadas después de la infección con *C. famata*, de tal forma que el 63.6% y el 87.5%, de las metafases presentaban husos mitóticos aberrantes 6 h después de la infección con *C. glabrata* o *C. albicans*, respectivamente (Fig. 18 C recuadro). El índice mitótico disminuyó progresivamente hasta la práctica desaparición de células en división 24 h después de la infección, coincidiendo en ambos casos, con la elevada tasa de muerte celular ocasionada por estas especies *Candida* (Tabla 5).

Las alteraciones ocasionadas por las levaduras en los MTs de los monocitos THP-1 fueron mayores que las observadas en células HeLa (Fig. 19). Las células THP-1 eran susceptibles de incorporar un elevado número de levaduras, tanto de *C. famata* como *C. glabrata* y *C. albicans*, ocasionando llamativas deformaciones en su red microtubular (Fig. 19 D), especialmente en aquellas células adheridas, tipo macrófago, con levaduras en su interior. Así mismo, la población adherida presentó un claro descenso en el número de células en división, las cuales desaparecieron casi por completo 6 h después de la infección con *C. famata*, o 3 h después de la infección con *C. glabrata* o con *C. albicans*. Los monocitos interfásicos en suspensión también mostraron modificaciones en sus MTs que fueron dependientes tanto del tiempo transcurrido después de la infección como de la levadura utilizada. A medida que avanzaba la infección, las alteraciones eran más llamativas pudiendo estar relacionadas con la muerte celular ocasionada por la infección, a juzgar por las morfologías nucleares propias de células necróticas y apoptóticas, que se observaron tras la tinción con H-22358 (Fig. 19). En estas células, se apreciaron agregados perinucleares de MTs que reaccionaban fuertemente al anticuerpo frente a α -tubulina (Fig. 19). Así mismo, fue posible observar células carentes por completo de MTs (Fig. 19 C').

El índice mitótico de las células en suspensión también descendió progresivamente y sólo en el caso de *C. famata*, las células se recuperaron 24-48 h después de la infección, alcanzando valores similares a las de los controles no infectadas (Tabla 6).

	Adheridas			En suspensión	
	Control	CFA, 3h	CFA, 6h	Control	CFA, 24h
I.M.	1.5%±0.2	1.1%±0.1	0.0%±0.2	1.2%±0.2	1.1%±0.3

Tabla 6: Porcentaje de células THP-1 en división, controles e infectadas con *C. famata*, en función del tiempo transcurrido después de la infección. I.M.: índice mitótico. Cada valor se obtuvo de la estimación de al menos 1000 células.

4.6. Adhesión y entrada de *C. famata* analizada por microscopía electrónica

Los resultados obtenidos mediante tinción con AT e inmunofluorescencia fueron corroborados con los estudios realizados en SEM y TEM. Los ensayos de SEM se realizaron con células HeLa infectadas con *C. famata* y permitieron analizar en detalle el proceso de adhesión y entrada de la levadura (Fig. 20). La adhesión ocurría tanto en células en interfase como en células en división (Fig. 20 A-A'). Las células desarrollaban proyecciones citoplasmáticas finas o amplias a modo de filopodios y lamelipodios, respectivamente. Estas proyecciones van rodeando paulatinamente a las levaduras a medida que progresaba la infección (Fig. 20 B-B'), siendo posible observar deformaciones en la membrana de las células HeLa relacionadas con la entrada de *C. famata* (Fig. 20 C,D).

El análisis en TEM se realizó tanto en células HeLa como en los monocitos THP-1 (Fig. 21). La pared de las levaduras presentaba numerosas protrusiones (fimbrias) (Chaffin y col., 1998) que durante la adhesión parecen interaccionar con la membrana plasmática. En los lugares de unión a la levadura, la membrana plasmática aparecía más gruesa y densa a los electrones que en el resto de la célula (Fig. 21 A'-A'').

El siguiente paso a la adhesión es la entrada de la levadura en las células en cultivo y fue en la línea monocítica THP-1 donde mejor se observó este proceso debido a que el porcentaje de adhesión y entrada era mayor que en el modelo epitelial HeLa. Muchas de las células THP-1 presentaban en su citoplasma estructuras típicas de fagocitos con una o varias levaduras en su interior (Fig. 21 C-C'). La estructura de las levaduras situadas en el interior de las células era variable: mientras algunas aparecían con morfologías semejantes a la de los controles (Fig. 21 C), otras presentaban signos evidentes de estar siendo degradadas dentro del fagocito (Fig. 21 D).

Por otro lado, estos estudios mostraron un claro deterioro de algunas de las células infectadas, las cuales presentaban una intensa vacuolización citoplasmática siendo posible observar células muertas con características de células necróticas o apoptóticas (Fig. 21 D'). Así mismo, la morfología de la mayor parte de las levaduras no adheridas o incorporadas por las células no presentaron alteraciones visibles en las primeras horas de la infección. Sin embargo, a medida que progresó la infección muchas levaduras sufrieron cambios morfológicos definidos principalmente por: retracción intensa de la membrana plasmática, vacuolización del citoplasma y

deformaciones en la pared. Estos tipos de levaduras se detectaron especialmente a partir de los 2-3 días después de la infección de las células THP-1 (no mostrado).

La evolución de las levaduras en el interior de las células HeLa o THP-1 se estudió mediante inmunocitoquímica utilizando el antisuero frente a *C. famata* que se reveló con anticuerpo secundario unido a oro coloidal (Fig. 22). Poco después de la entrada de la levadura se pudo determinar un abundante punteado en la superficie de *C. famata*, principalmente a nivel de pared y de membrana plasmática (Fig. 22 A-A'). Con el tiempo transcurrido después de la infección se observaron en el interior tanto de las células HeLa como de las THP-1, regiones positivas al antisuero (agrupaciones de oro coloidal) sin estructura determinada, que no mostraban características morfológicas de levadura (Fig. 22 B-B'). También se observaron, vesículas marcadas con oro coloidal que podrían corresponder a productos de la degradación de *C. famata* (Fig. 22 C-C') y que coincidirían con la señal punteada observada mediante inmunofluorescencia en el citoplasma de las células infectadas (Fig. 22 D-D').

De la misma manera, se analizaron mediante TEM los cambios morfológicos ocasionados por la infección con *C. glabrata* o con *C. albicans* en la línea celular THP-1 (Fig. 23). Tanto la adhesión de *C. glabrata* como de *C. albicans* a los monocitos originó engrosamientos en la membrana de los mismos similares a los observados tras la infección con *C. famata* (Fig. 23 A'). Dichos engrosamientos parecen originarse en los puntos de contacto de las levaduras con las células THP-1 durante las etapas tempranas de adhesión (Fig. 23 A-A'). Así mismo, la infección con *C. glabrata* ocasionó alteraciones importantes en la morfología de las células infectadas que se reflejan en una amplia vacuolización del citoplasma (Fig. 23 C') y que podrían conducir de forma progresiva a la muerte de los monocitos. A partir de las 24 h de infección, se observó un elevado número de células con características propias de muerte por necrosis y apoptosis (Fig. 23 C''). Por su parte, *C. albicans* es capaz de adherirse y entrar en los monocitos tanto en su forma de levadura como de hifa o pseudohifa (Fig. 23 D', E-E'). Al igual que con *C. glabrata*, los monocitos sufrieron daños significativos, apareciendo importantes deformaciones en la membrana plasmática y una extensa vacuolización citoplasmática detectable ya a partir de la primera hora de infección. 3-6 h después de iniciado el co-cultivo con *C. albicans*, la mayoría de los monocitos mostraron morfologías necróticas (Fig. 23 F-F').

4.7. Efectos de los diferentes tratamientos en la adhesión y entrada de las levaduras

Con el fin de determinar la especificidad de la interacción de *C. famata* con las células en cultivo, la levadura fue tratada con calor (CFAQ), con compuestos antifúngicos como el miconazol (MNZ) y la nistatina (NIST) o con el inhibidor del tráfico vesicular de células eucarióticas, brefeldina A (BFA). Todos estos compuestos fueron mantenidos en el medio de cultivo durante todo el proceso de infección. Los compuestos antifúngicos MNZ y NIST son ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones fúngicas, así como la BFA que es un antibiótico capaz de desorganizar el aparato de Golgi tanto en levaduras como en células de mamífero (Donaldson y col., 1992; Miller y col., 1992). Las infecciones con *C. famata* inactivada se realizaron tanto sobre células HeLa como con la línea celular THP-1.

Los resultados obtenidos mostraron que en el caso de las células HeLa, la inactivación de *C. famata* por cualquiera de los métodos descritos, conlleva una disminución de la adhesión (Fig. 24). Se obtuvieron valores de adhesión de: $35\% \pm 1.5$ para las levaduras tratadas con calor, $32\% \pm 1.7$ para tratamiento con MNZ, $28\% \pm 1.6$ para NIST y $81\% \pm 1.5$ para BFA, en relación a los controles (infecciones realizadas con levaduras no tratadas). Sin embargo, la entrada de la levadura sólo disminuyó en el caso de las levaduras tratadas con calor (hasta un $63\% \pm 2.2$) antes de la infección, pero no por el tratamiento con MNZ, NIST o BFA. Los resultados fueron más llamativos en los monocitos THP-1, en los que se observó un descenso del porcentaje de adhesión del $79\% \pm 0.3$ en el caso de las levaduras inactivadas con calor, del $87\% \pm 0.5$ para el MNZ, del $27\% \pm 0.8$ con la NIST y del $72\% \pm 0.2$ para BFA. Además, en estas células todos los diferentes tratamientos utilizados, ocasionaron una disminución en las tasas de entrada de *C. famata*, obteniéndose valores de inhibición de entrada del $89\% \pm 0.1$ para el tratamiento con calor, del $88\% \pm 0.4$ para MNZ, $88\% \pm 0,2$ para NIST y del $96\% \pm 0,1$ en el caso de la adición de BFA. Estos resultados indican que, al menos en las condiciones de estudio, tanto la adhesión como la capacidad de entrada de *C. famata* en ambos tipos celulares (HeLa y THP-1) parece ser un proceso activo y dependiente de la viabilidad de la levadura, ya que su inactivación mediante los diferentes tratamientos analizados inhibe ambos procesos.

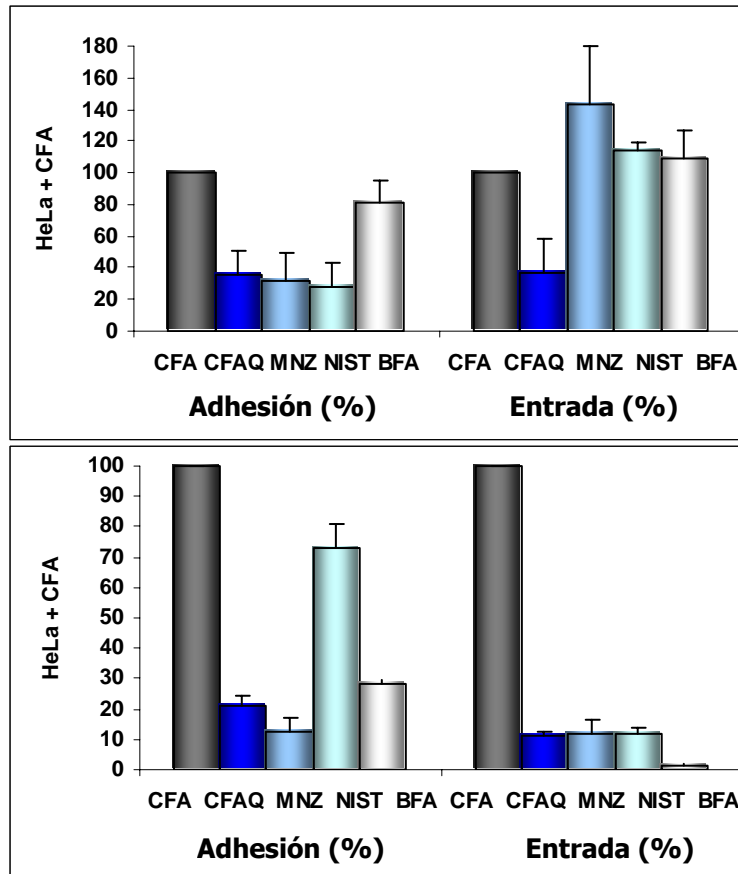


Figura 24.- Efectos de diferentes tratamientos sobre la adhesión y entrada de *C. famata* en las líneas celulares HeLa y THP-1. Los valores de adhesión se estimaron 3 h después de la infección, mientras que los de entrada se determinaron a las 24 h. Los valores de adhesión se establecieron mediante estimación del número de células que presentaban al menos una levadura adherida en su superficie mediante tinción con AT. La entrada se determinó mediante inmunofluorescencia utilizando antisuero de conejo para *C. famata*. Al menos 800 células fueron contadas para cada condición experimental.

Estos resultados se compararon con los obtenidos de las infecciones en células HeLa y THP-1 con *C. glabrata*. Tanto la adhesión como la entrada de *C. glabrata* a ambos tipos celulares se inhibía cuando la levadura era tratada con calor previo al ensayo de adhesión y entrada (Fig. 25). Es necesario señalar que *C. albicans* fue descartada para este estudio ya que al ser tratadas con los diferentes compuestos antifúngicos y con el tratamiento por calor perdía la capacidad de generar hifas lo que hacía imposible relacionar los resultados de infección con los de adhesión y con los controles (levaduras sin tratar).

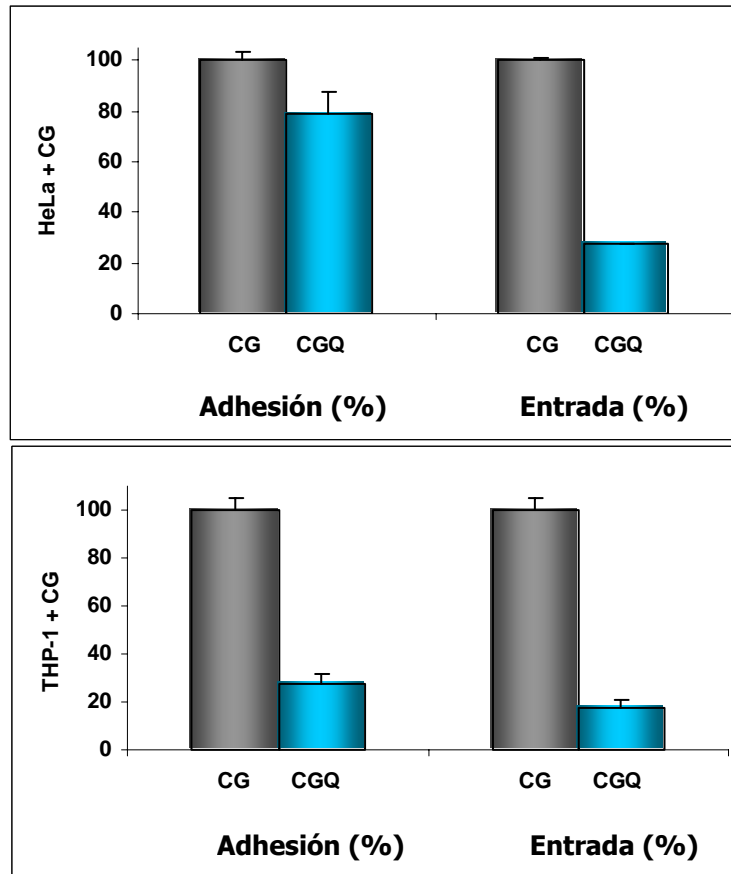


Figura 25.- Efectos del tratamiento por calor con *C. glabrata* sobre la adhesión y entrada en las líneas celulares HeLa y THP-1. Al menos 800 células fueron contadas para cada condición experimental.

4.8. Variaciones en el ciclo celular ocasionadas por el proceso infectivo

Las alteraciones en los husos mitóticos de las células HeLa infectadas así como el drástico descenso del número de células en división observado en los monocitos THP-1 ocasionados por la infección con *C. famata* y *C. glabrata*, nos llevaron a estudiar los efectos en el ciclo celular mediante citometría de flujo.

En el caso de las células HeLa infectadas con *C. famata* (Fig. 26) se pudo observar que el ciclo celular no sufrió cambios sustanciales 6 h después de la infección. 18 h después, tanto el porcentaje de células en G1 (56.3%) disminuyó levemente respecto al control (60.1%), al igual que el de G2-M (17.8% *v.s.* 12%). Sin embargo, el porcentaje de células en fase S era mayor en las infectadas (29.0%) que en los controles sin infectar (21.4%). Esta situación se mantuvo 48 h después de la infección para las células en fase G1 y en S, mientras que, por el contrario, el porcentaje de células en el periodo G2-M se incrementó (14.2%) en relación con el control (8.7%).

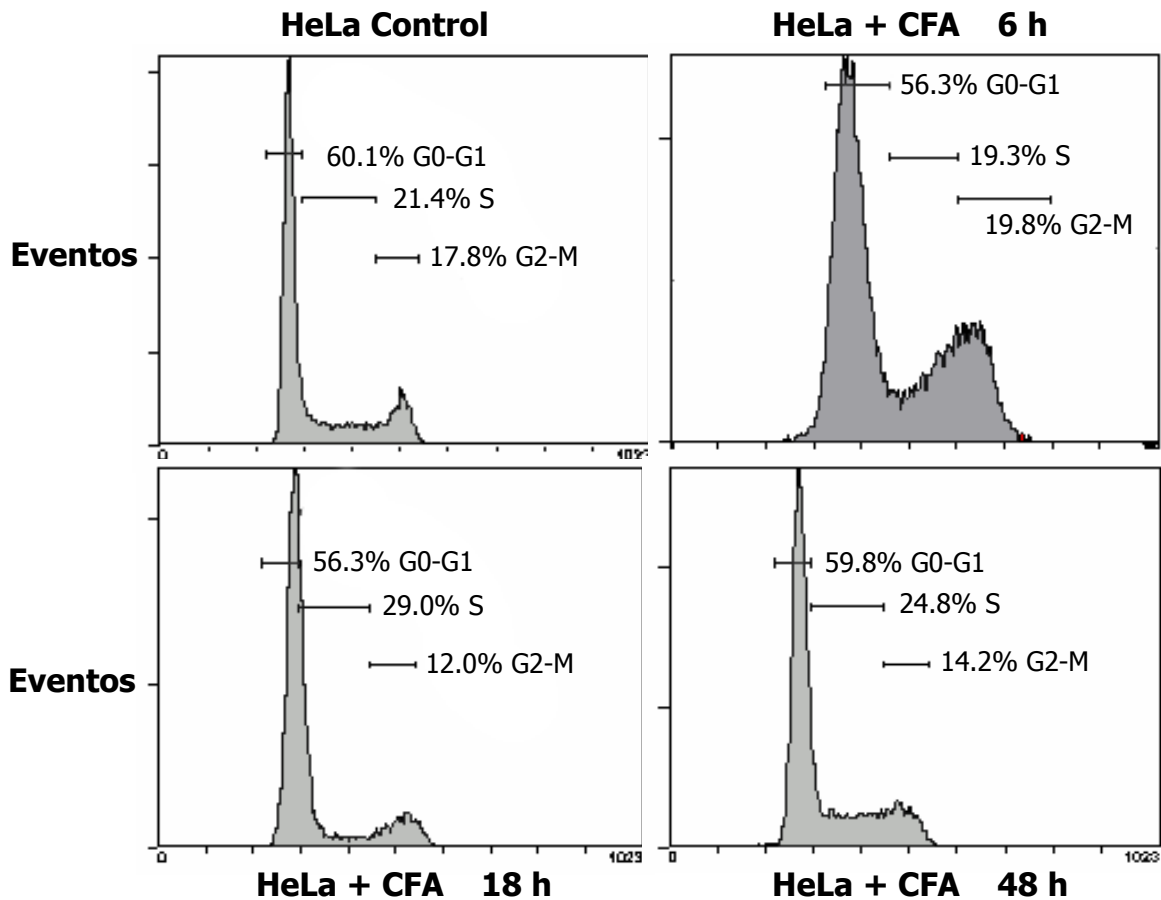


Figura 26.- Variaciones en el ciclo de células HeLa, control e infectadas con *C. famata*, y analizadas mediante citometría de flujo 6, 18 y 48 h después de la infección. Las gráficas mostradas son representativas de los experimentos realizados.

En relación a las células THP-1, la citometría de flujo nos permitió distinguir las dos poblaciones celulares determinadas morfológicamente: la primera, con las características de tamaño y complejidad propias de monocitos (células en suspensión y redondeas) y la segunda con características de células similares a macrófagos (células adheridas a la placa de cultivo con algunas proyecciones citoplasmáticas). Como se puede observar en la figura 27, la población de monocitos es la mayoritaria siendo la de tipo macrófago prácticamente inexistente en los cultivos control, no infectados, en todos los tiempos analizados (6, 24 y 48 h). No obstante, la población tipo macrófago aumentó significativamente en función del tiempo de infección con *C. famata*. Así, 6 h después, la población celular con características de macrófago era del 16.9% incrementándose al 40% a partir de las 18 h de infección. Concomitantemente, la

fracción de células con características de monocitos disminuyó con el tiempo transcurrido de infección.

La distribución en el ciclo celular de cada una de las fracciones también varió con el tiempo de infección. En este sentido, la población de monocitos en el periodo S del ciclo celular aumentó progresivamente, pasando del 18.76% en los controles al 43%, 48 h después de la infección. Paralelamente, el porcentaje de células en fase G1 o en G2-M disminuyó progresivamente, determinándose porcentajes del 19.5% en G1 y del 5.7% en G2-M, 48 h después de iniciada la infección; los cuales eran significativamente inferiores a los de los controles (60.7% y 15.5%, respectivamente). Estos resultados indicarían una brusca parada de las células en fase S y en G2-M y estarían de acuerdo con los bajos índices mitóticos estimados en esta línea celular. Así mismo, el porcentaje de la fracción celular tipo macrófago era muy pequeño en los controles por lo que no se pudo determinar adecuadamente en el citómetro la distribución de las mismas en el ciclo celular. Sin embargo, la distribución de esta población en las células infectadas presentaba un perfil aparentemente normal, sin cambios sustanciales en los tiempos de infección analizados.

Los resultados obtenidos de las infecciones con *C. famata* se compararon con *C. glabrata* (Fig. 28). Sin embargo, estos estudios no pudieron realizarse con *C. albicans* debido a que la formación de hifas, de longitud variable, impidió su análisis en el citómetro. Al contrario de lo observado tras la infección con *C. famata*, la infección con *C. glabrata* ocasionó cambios importantes en el ciclo celular de HeLa. 6 h después de la misma se pudo observar un notable incremento en el porcentaje de células en fase S (25.3%) así como una disminución de la fracción G2-M (13.3%) en relación a los valores controles (13.5% y 25.1%, respectivamente), mientras que el porcentaje de células en G1 se mantuvo en valores semejantes al de los controles (55.6%). Así mismo, el porcentaje de células en división (G2-M) disminuyó de forma notable con el tiempo después de la infección y 48 h después prácticamente no se apreciaron células en división en los cultivos. Paralelamente, el porcentaje de células muertas se incrementó, determinándose un 52.9% de muerte 48 h después de la infección. La morfología característica de células muertas fue fácilmente observable tras la tinción con IP, asemejándose a muerte por apoptosis y por necrosis.

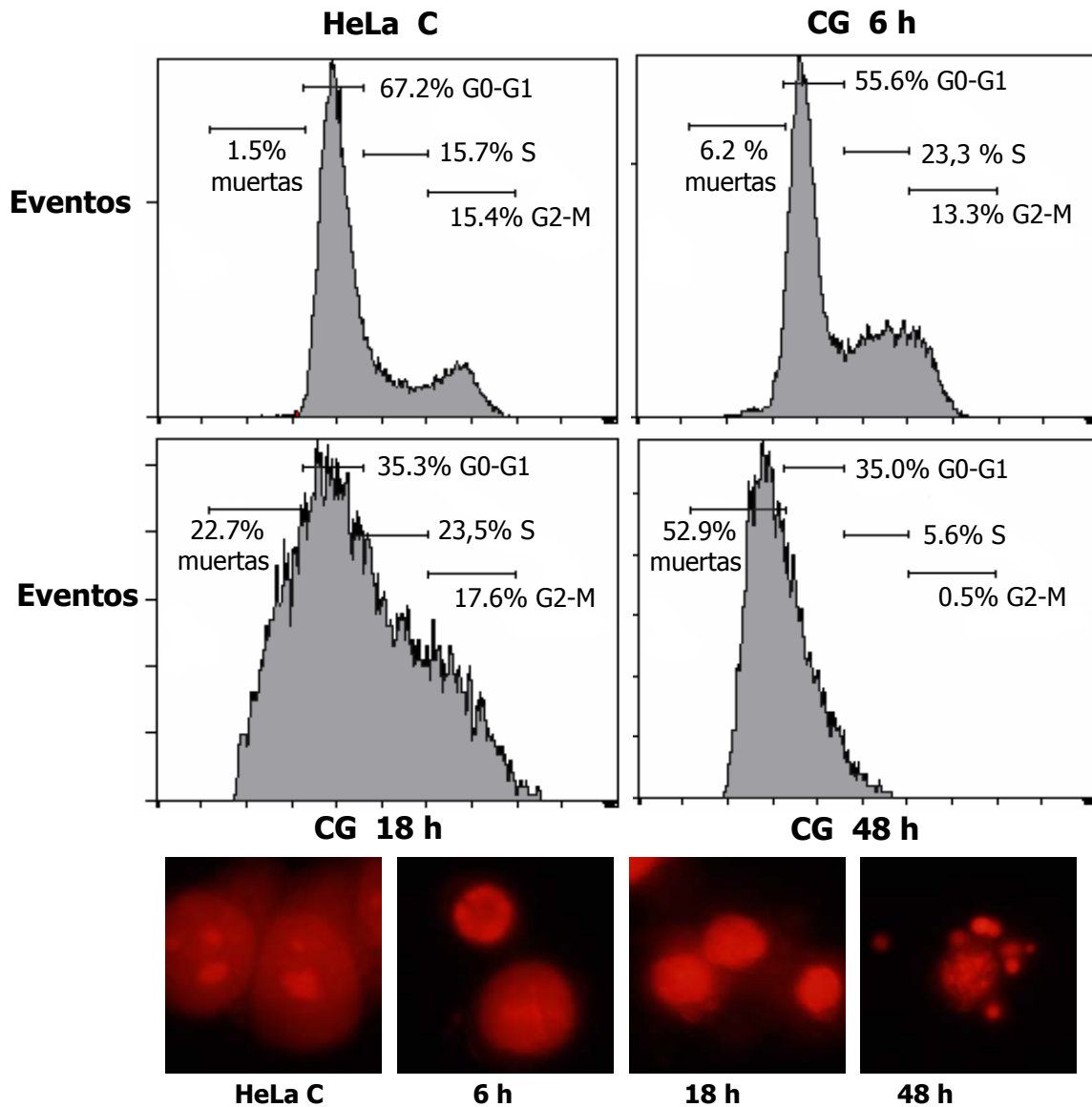


Figura 28.- Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo de células HeLa control o sometidas a infección con *C. glabrata*. 3 h. 6 h, 18 h y 48 h después de la infección, las células fueron fijadas y teñidas con IP para su evaluación en el citómetro. Las imágenes inferiores muestran la morfología nuclear con IP de las poblaciones de células analizadas. Las gráficas mostradas son representativas de los experimentos realizados.

El ciclo celular de los monocitos THP-1 también se alteró de forma importante por la infección con *C. glabrata*. Dichas alteraciones eran mayores que los descritos en esta misma línea celular tras la infección con *C. famata* (Fig. 29). *C. glabrata* ocasionó un incremento progresivo con el tiempo de infección de la población tipo macrófago, concomitantemente con la disminución de la fracción de monocitos. El incremento de la población tipo macrófago se estabilizó 18 h después de iniciado el co-cultivo, alcanzando valores muy similares a los determinados para *C. famata* (macrófagos: 34%, monocitos: 60.3%). La distribución de dichas fracciones celulares en el ciclo se modificó notablemente con el tiempo transcurrido después de iniciar la infección. En la

fracción de monocitos, el porcentaje de células en división disminuyó progresivamente, desapareciendo casi por completo 18 h después. Así mismo, se observó un paulatino incremento de células muertas llegando al 73.2% de la población 48 h después del comienzo de la infección. La fracción celular tipo macrófago, al contrario de lo observado en las infecciones con *C. famata*, presentó un ciclo alterado y desplazado hacia regiones de tamaño y complejidad correspondiente a las células muertas (Fig. 29). Estos resultados indican el profundo daño que ocasiona *C. glabrata* sobre en estos tipos celulares, tanto en los monocitos como en las células tipo macrófago.

4.9. Viabilidad de las células en cultivo y de *C. famata* tras la infección

Los estudios morfológicos revelaron un claro deterioro de las células humanas y murinas durante las primeras horas después de la infección con *C. famata*. Sin embargo, bajo las condiciones analizadas y con el método de evaluación de la supervivencia celular del azul tripán, la letalidad celular estimada nunca fue superior al 10% en ninguno de los tiempos estudiados. Por el contrario, *C. glabrata*, ocasionó una elevada tasa de muerte en este tipo celular, y 48 h después de la infección se determinaron valores del 60% de muerte celular (Fig. 30). Así mismo, la infección con *C. albicans* ocasionó la muerte progresiva de las células HeLa y 48 h después de la infección no se observaron células vivas en los cultivos (no mostrado).

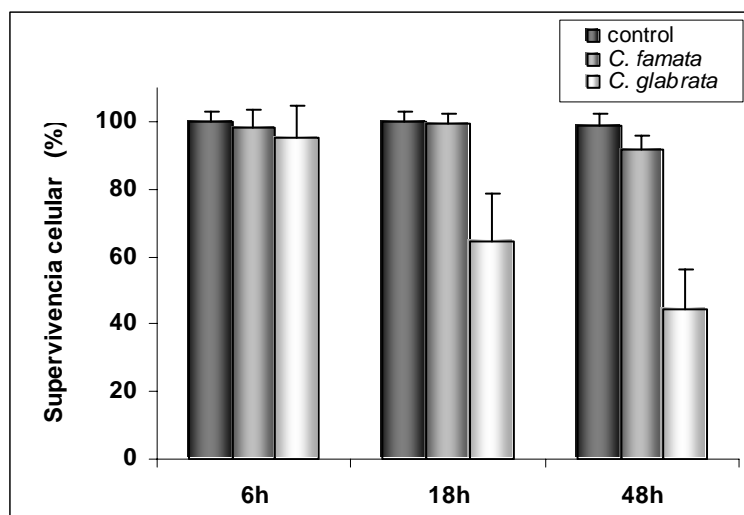


Figura 30.- Cinética de supervivencia de células HeLa control e infectadas con *C. famata* y *C. glabrata*. La estimación de la supervivencia se realizó mediante el método de exclusión del azul tripán 6, 18 y 48 h después de la infección. Al menos se estimaron 400 células por condición experimental.

Por otro lado y dado que el análisis mediante inmunofluorescencia permitió observar a *C. famata* solamente hasta 48 h después de la infección, se empleó la

técnica de PCR con objeto de determinar la presencia de la levadura en el interior de las células a largo plazo: 2, 3 y 6 días después de la infección. Los resultados obtenidos mostraron que, además de las bandas correspondientes a β globina (amplifica ADN de mamífero) y a los ITS (amplifica ADN de levadura), se observó la presencia de ADN de 237 pb que corresponde a *C. famata*, 2 y 3 días después de realizada la infección, pero no 6 días después (Fig. 31 A).

Paralelamente, se determinó la viabilidad de *C. famata* en el cultivo de células HeLa en función del tiempo transcurrido después de la infección. 2, 3 y 6 días después de la infección, las células se trataron con Tritón X-100, procediéndose posteriormente a la siembra de los lisados en placa de agar para la determinación de colonias. Los resultados obtenidos, mostraron que las levaduras permanecían viables durante los primeros 2-3 días h después de la infección, a juzgar por el incremento de la turbidez observado en el medio YPD, mientras que no se observó crecimiento alguno 6 días después (Fig. 31 B). Estos resultados indicarían que las levaduras presentes en los cultivos y determinadas, tanto por inmunofluorescencia indirecta como por PCR, permanecían viables al menos durante los primeros 3 días de infección en las células HeLa.

4.10. Capacidad infectiva en ratones

Los primeros experimentos realizados "in vivo" se llevaron a cabo con ratones albinos Balb/C normales (wt) infectados con *C. famata* (5×10^7 ó 2×10^8 UFC por animal) por vía intraperitoneal (i.p.). 24 h y 90 días después de la inoculación, a cada animal se le extrajo una muestra de sangre con la que se realizó, un extendido y el ensayo de crecimiento de levaduras, previa dilución en YPD, manteniéndolas en condiciones estándar de crecimiento (30 °C y agitación continua) durante 48 h. La fijación y tinción con AT de dicho medio nos permitió confirmar que la turbidez se debía a la presencia de levaduras en el YPD. Así mismo, 24 h o 90 días después de la infección, los ratones fueron sacrificados y a cada uno se le extrajeron los siguientes órganos: pulmones, riñones, hígado, intestino delgado, intestino grueso, bazo y encéfalo. De cada uno de los órganos, se tomó una muestra con la que se realizó el ensayo de crecimiento de levaduras en YPD y el resto se incluyó en parafina para los análisis histológicos.

Los estudios efectuados en la sangre de los ratones infectados revelaron que 24 h después de la infección, tan sólo hubo crecimiento de *C. famata* y por tanto aumento

de turbidez en medio YPD, en una de las muestras procedente de uno de los tres ratones infectados con el mayor número de UFC (2×10^8). La tinción de May-Grünwald-Giemsa, así como la inmunofluorescencia indirecta para *C. famata*, de los extendidos sanguíneos del ratón con crecimiento positivo, permitieron determinar la presencia de levaduras en la sangre del animal (Fig. 32). En los extendidos, se observaron tanto levaduras aparentemente intactas entre las células sanguíneas (Fig. 32 A,A'), como parcialmente digeridas en el interior de leucocitos (Fig. 32 A''). 90 días después de la infección, no hubo crecimiento de levaduras en las muestras sanguíneas de ninguno de los animales analizados. Sin embargo, en los extendidos sanguíneos de los diferentes animales teñidos con May-Grünwald-Giemsa, se observaron ciertas estructuras redondeadas situadas entre las células, con tamaño superior al de las plaquetas (Fig. 32 B).

Por otro lado, no se determinó crecimiento de *C. famata* en medio YPD de ninguno de los fragmentos obtenidos de los órganos de los ratones controles o infectados, ni 24 h ni 90 días después de la infección ni con 5×10^7 ó 2×10^8 UFC. Así mismo, el estudio histopatológico mostró que, con excepción del hígado de los ratones infectados con 2×10^8 UFC, los órganos no presentaron alteraciones patológicas evidentes en los tiempos evaluados después de la infección (no mostrado). En el hígado de los ratones infectados con el mayor número de UFC, se observó la presencia de un bajo número de pequeños nódulos o granulomas constituidos principalmente por un infiltrado inflamatorio de linfocitos y ciertos macrófagos (preferentemente en la periferia de los mismos), que se encontraron dispersos en el parénquima hepático (ver: Fig. 34).

Así mismo, los estudios de las secciones histológicas mediante inmunohistoquímica (inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia), utilizando el antisuero correspondiente para *C. famata*, confirmaron la ausencia de levaduras en todos los tejidos analizados con excepción del intestino de ratones infectados con 2×10^8 UFC. En este órgano, tanto 24 h como 90 días después de la infección, se apreció un punteado en el interior de células del epitelio intestinal, principalmente en aquellas situadas en el fondo de las criptas de Lieberkühn, a nivel del ileon. Dicho punteado no se observó en los intestinos de los ratones controles no infectados (Fig. 32).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se realizaron estos mismos ensayos pero con una muestra de 9 ratones inmunosuprimidos (nu/nu) infectados con *C. famata*, por inyección tanto i.p. como i.v. (5×10^7 ó 2×10^8 UFC por animal). A fin de comparar nuestros resultados en relación a levaduras más patógenas, se incluyeron

en el estudio 2 ratones que se infectaron con *C. glabrata* de forma i.v. (5×10^7 ó 2×10^8 UFC). Los ratones fueron sacrificados 24 h o 90 días después de la infección y los órganos fueron extraídos procesados como en el estudio realizado con los ratones wt.

La tabla 7 muestra los resultados obtenidos en relación al crecimiento en medio YPD tanto de las muestras de sangre como de los fragmentos tisulares procedentes de cada animal.

Ratones	Sangre		Pulmón		Riñón		Hígado		Bazo		Encéfalo		Intestino	
	YPD	IF	YPD	IF	YPD	IF	YPD	IF	YPD	IF	YPD	IF	YPD	IF
24 h de Infección														
CFA 1 (i.p.)	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	NE	NE
CFA 2 (i.p.)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	NE	NE
CFA 1 (i.v.)	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	NE	NE
CFA 2 (i.v.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NE	NE
CG 2 (i.v.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	NE	NE
C (i.p.)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C (i.v.)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90 días de Infección														
CFA 3 (i.v.)	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
CFA 4 (i.v.)	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CG 3 (i.v.)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CG 4 (i.v.)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
C (i.v.)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7: Crecimiento en medio de cultivo YPD e inmunofluorescencia de *C. famata* (CFA) o de *C. glabrata* (CG). Los símbolos (+) indican bien crecimiento positivo evaluado 48 h después de iniciado el cultivo en medio YPD o bien presencia de levaduras determinada mediante inmunofluorescencia. Se inocularon 5×10^7 (1 y 3) ó 2×10^8 (2 y 4) UFC de CFA o de CG por vía intraperitoneal (i.p.) o intravenosa (i.v.). Todas las muestras, de sangre o tejidos, procedentes de los ratones controles (C) dieron negativo al ensayo de crecimiento de levaduras en YPD y a la inmunofluorescencia para CFA o CGA.

Como puede observarse, 24 h después de la inoculación, en todas las muestras de sangre se obtuvo un aumento de la turbidez del medio, mientras que de los fragmentos tisulares el crecimiento fue variable y dependiente tanto de la vía de inoculación como del número de UFC inoculadas. Así, se observó crecimiento en medio YPD de todos los órganos analizados de los ratones infectados con 2×10^8 UFC tanto por vía i.p. como i.v., mientras que sólo hubo crecimiento en riñón e hígado cuando se inocularon 5×10^7 UFC de *C. famata*. Es necesario señalar que los resultados obtenidos, en cuanto a crecimiento de *C. famata* en medio YPD, 24 h después de la

infección eran totalmente comparables a los obtenidos con *C. glabrata* en esas mismas condiciones.

90 días después de la infección, con independencia de la levadura, del número de UFC inoculadas y de la vía de infección, no se observó crecimiento de levaduras a partir de las muestras sanguíneas de ninguno de los ratones. Por el contrario, sí se determinó crecimiento en YPD a partir de tejidos procedentes de ratones infectados i.v. con 2×10^8 UFC, bien de *C. famata* (pulmón, bazo y encéfalo) o bien de *C. glabrata* (pulmón, riñón, hígado y bazo).

La tinción de May-Grünwald-Giemsa, así como la inmunofluorescencia indirecta en los extendidos sanguíneos demostró la presencia de levaduras en todas las muestras sanguíneas estudiadas procedentes de los diferentes animales (Tabla 7, Fig. 33). De la misma forma que en los ratones wt, se observó un punteado discreto en el citoplasma de algunos leucocitos (Fig. 33 A,B,C'-C'''), muchos de los cuales mostraron morfologías aberrantes con deformaciones en la membrana (Fig. 33 A',B',C') y cierta vacuolización citoplasmática (Fig 33 A,B,C). También en este caso se observaron las mismas estructuras redondeadas situadas entre las células sanguíneas similares a plaquetas (Fig. 33 A'',B'',C''). La mayor parte del punteado observado tras la tinción con May-Grünwald-Giemsa reaccionó positivamente al antisero para *C. famata* (Fig 33 D-D'') o para *C. glabrata* (no mostrado). Es necesario señalar que no se apreciaron diferencias en cuanto a las morfologías observadas en los extendidos sanguíneos de los ratones infectados con *C. famata* o *C. glabrata*, si bien la reactividad de los mismos a los correspondientes antiseros fue mayor en el caso de *C. glabrata*.

Los estudios histopatológicos, e inmunohistoquímicos (inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia) se realizaron con todos los tejidos aislados, tanto con aquellos en los que hubo crecimiento de levaduras en el medio YPD (riñón, hígado, bazo y pulmón) como los que dieron negativo (intestino delgado y grueso y encéfalo) de los ratones infectados bien con *C. famata* o bien con *C. glabrata*. Como en el caso de los ratones wt, la mayor parte de los órganos analizados, con excepción del hígado y del bazo, presentaron una estructura histológica similar a la de los controles. En el hígado, 24 h después de la infección se observaron importantes acúmulos linfoides alrededor de los vasos sanguíneos, los cuales eran de mayor tamaño en el caso de los ratones infectados con *C. glabrata* en comparación con los infectados con *C. famata* (Fig. 34 A,C). 90 días después de la infección se apreció la presencia de granulomas dispersos en el parénquima hepático, cuyo tamaño y número también resultó ser variable, siendo

inferiores en tamaño y número los de los ratones infectados con *C. famata* que los ocasionados por *C. glabrata* (Fig. 34 A'-A'',B'-B''). Muchos de los granulomas mostraron abundancia de fibras y células gigantes en su interior, característica de infecciones crónicas (Fig. 34 B'-B''). El análisis mediante inmunofluorescencia del tejido hepático confirmó la presencia de levaduras (*C. famata* o *C. glabrata*) tanto 24 h como 90 días después de la infección. Sin embargo, mientras que a tiempos cortos se observaron levaduras aparentemente intactas en el parénquima hepático (Fig. 34 B',D'), 90 días después la señal observada correspondía a punteado intracelular (Fig. 34 B'',D''). Así mismo, la señal determinada mediante inmunohistoquímica (inmunofluorescencia), no necesariamente se correspondía con regiones en las que había concentración de células linfoides o en los granulomas (Fig. 34 B'').

En el caso del bazo, se observó hipertrofia del mismo en los ratones infectados con el mayor número de UFC de ambas cándidas que se manifestó por el incremento de folículos linfoides (mayor en el bazo del ratón infectado con *C. glabrata* que en el de *C. famata*) en relación al bazo control. De la misma manera que en el caso del hígado, los bazos procedentes de los ratones infectados durante 24 h o 90 días, resultaron positivos a los correspondientes antisueros (Fig. 35 A-A'').

El análisis mediante inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia realizado en el resto de los órganos (pulmón, intestino, riñón y encéfalo) mostraron reactividad variable en función de la levadura, del número de unidades inoculadas y del tiempo de infección (Tabla 7 y Fig. 35). Como en el caso del hígado y del bazo, 24 h después de la infección se observó señal punteada intracelular de forma perinuclear, o extracelular dispersa por la matriz extracelular, en la mayor parte de los ratones infectados con *C. famata* y en todos los inoculados con *C. glabrata*. La señal punteada era más abundante en los ratones a los que se les inoculó un mayor número de UFC por vía i.v. y aún más evidentes en el ratón infectado con *C. glabrata* que en los infectados con *C. famata*. 90 días después de la inoculación, la señal fluorescente quedó restringida a ciertos órganos como pulmón e intestino en el caso de los ratones infectados *C. famata* por vía i.v. (Fig. 35 B-B''), o con pulmón y riñón en los de *C. glabrata* (Fig. 35 C-C'').

Los resultados obtenidos en relación a crecimiento de levaduras y a reactividad mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia podrían indicar que la capacidad de infección es dependiente tanto de la levadura inoculada, como del número de UFC y de la vía de infección.

4.11. Presencia de levaduras en muestras en tejidos humanos

Teniendo en cuenta el aumento de enfermedades en las que las especies del género *Candida* podrían tener un papel importante, nos planteamos la posibilidad de determinar su presencia en tejidos procedentes de individuos con patologías en las que, de acuerdo a la bibliografía existente, se han observado levaduras del género *Candida*. En este sentido y de acuerdo a los resultados que obtuvimos en ratones, analizamos la presencia de levaduras y en concreto de *C. famata*, en muestras intestinales tanto frescas como incluidas en parafina, de pacientes diagnosticados con enfermedad de Crohn y comparamos los resultados con los obtenidos con individuos sanos. Así mismo, como control positivo se empleó un exudado conjuntival procedente de un individuo afectado de retinopatía Azoor a partir del cual se aisló *C. famata* (Carrasco y col., 2005).

La Tabla 8 recoge los ensayos realizados y los resultados obtenidos con las diferentes muestras.

Muestras		Procesamiento		PCR
		AT	IF	Tejido
Exudado	LC	+	+	+ (CF)
Pacientes de Crohn	C1	+	+	-
	C2	-	+	-
	C3	+	+	-
	C4	-	+	+ (CF)
	C5	-	+	+ (CF)
Controles	IC1	-	-	-
	IC2	-	+	-

Tabla 8: Los símbolos + indican presencia de estructuras levaduriformes en la tinción con AT, de señal positiva en inmunofluorescencia, o de positividad a la PCR. En el caso de positividad a la PCR se analizó el tamaño de la banda obtenida con objeto de determinar la especie. CF: *C. famata*.

Como se puede observar y de acuerdo a lo esperado, el exudado conjuntival resultó positivo a los ensayos de (1) tinción con azul de toluidina, (2) inmunofluorescencia y (3) PCR (Carrasco y col., 2005). En relación a los pacientes diagnosticados de Crohn, se analizaron varias muestras frescas intestinales (región del Ileon) con las que se realizaron secciones por congelación. La presencia de levadura se determinó mediante tinción con AT, inmunofluorescencia indirecta utilizando el

antisuero correspondiente para *C. famata* y mediante PCR a partir del ADN de la levadura. El análisis mediante TEM de las diferentes muestras estudiadas confirmó la presencia de levaduras en los tejidos indicados. La figura 36 muestra la morfología de levaduras situadas tanto en el interior (Fig. 36 A-A´´, B-B´) como en el exterior (Fig 36 B´´) de células procedentes del exudado conjuntival del paciente con Azoor. Los estudios de TEM e inmunofluorescencia realizados con las muestras de Cronh nos permitieron comprobar también la presencia de estructuras semejantes a levaduras y que se correspondían en gran medida a lo observado en el paciente con Azoor (Fig. 36 C-C´´). No obstante, el análisis de las muestras de los pacientes de Cronh mediante TEM, resultó complicado ya que en tejido se encontraba mal preservado. Así mismo, se confirmó mediante PCR la presencia de levadura en algunas de las muestras que dieron positivas a la inmunofluorescencia indirecta.

Por otro lado, a partir de las muestras intestinales incluidas en parafina se realizaron los correspondientes estudios de inmunohistoquímica, (inmunoperoxidasa y/o nmunofluorescencia) y de PCR a fin de determinar, como en los casos anteriores, presencia de levadura. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 9 y el la figura 37. Tres de los siete casos analizados dieron reacción positiva al anticuerpo para *C. famata* tanto por inmunohistoquímica y de ellos, a su vez, dos dieron positivo al ensayo de PCR.

Pacientes	IF/IP	PCR
C6	+	?
C7	+	(+)
C8	+	(+)
C9	?	?
C10	-	-
C11	-	-
C12	-	(+)
IC3	-	-

Tabla 9: Presencia o ausencia de *C. famata*, determinada mediante inmunofluorescencia (IF) o inmunoperoxidasa (IP) y PCR, en secciones histológicas de intestino de diferentes pacientes diagnosticados de Crohn (C6-C12) y de un individuo control (IS). Los símbolos (+), (-) o (?) indican señal positiva, negativa o dudosa al antisuero para *C. famata* o para la PCR.

La figura 37 recoge las secciones histológicas de intestino (Ileon) de un individuo control y de los pacientes con enfermedad de Crohn que resultaron positivos a la

inmunohistoquímica para *C. famata*. Mientras el individuo control presentaba una morfología de la mucosa intestinal (región el Ileon) completamente normal (Fig. 37 A-A''), la de los pacientes afectados de Crohn presentaron evidentes signos de inflamación con acúmulos linfoides dispersos en la mucosa (Fig. 37 B-B''). Así mismo, las secciones histológicas del intestino del individuo control no presentaron reactividad al antisuero para *C. famata* (Fig. 37 A''), mientras que las de los individuos (C6, C7 y C8) afectados de Crohn mostraron una reactividad variable (C-C'', D-D'', E-E''). La reactividad al antisuero para *C. famata* se localiza principalmente alrededor de las células caliciformes (Fig 37 C', D''') y en la base de las vellosidades intestinales (Fig 37 E''). Estos resultados son coincidentes con lo observado en los ratones Balb/C (wt y nu/nu) infectados con *C. famata*. Así mismo, se observó que en el resto de las muestras intestinales de Crohn, no hubo reacción positiva al antisuero para *C. famata* en inmunohistoquímica (no mostrado).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES:

1.- *C. famata* es capaz de adherirse a células murinas y humanas en cultivo, tanto en la forma de levadura como formando pseudomicelios. La adhesión es rápida en todos los tipos celulares analizados. No obstante, *C. famata* presenta mayor afinidad por los monocitos THP-1 y menor por las células de origen epitelial, incluyendo HeLa. Además, la capacidad de adhesión de *C. famata* es significativamente inferior a la de *C. glabrata* y *C. albicans* a estos mismos tipos celulares.

2.- El análisis mediante microscopía electrónica de transmisión, de barrido e inmunofluorescencia indirecta demuestra que *C. famata* es susceptible de entrar en todas las líneas celulares estudiadas. La entrada de la levadura es mayor en las células THP-1 y menor en las células HeLa.

3.- Tanto la adhesión como la entrada de *C. famata* son procesos activos, ya que las levaduras vivas se adhieren y entran en mayor medida que las inactivadas mediante calor o por tratamiento con compuestos antifúngicos.

4.- La infección de células HeLa y THP-1 ocasiona alteraciones en el citoesqueleto de actina y en los microtúbulos. Dichas modificaciones implican reorganización de los microfilamentos de actina alrededor de la levadura y despolimerización de los MTs interfásicos, así como formación de husos mitóticos aberrantes.

5.- El ciclo celular de HeLa y THP-1 infectadas con *C. famata* se ve alterado, produciéndose una parada en fase S y una disminución de células en fase G2-M. El bloqueo en fase S es mayor y además se observa un notable incremento de la población correspondiente a células muertas en el caso de *C. glabrata*.

6.- La infección con *C. famata* de ratones Balb/C, inmunocompetentes o inmunosuprimidos, no ocasiona la muerte de estos animales. En todos los ratones inmunosuprimidos y en sólo uno inmunocompetente se observó *C. famata* en sangre 24 h después de la inoculación. Se observaron levaduras íntegras entre las células sanguíneas, así como levaduras en proceso de degradación en el interior de los leucocitos a las 24 h y 90 días después de la infección.

7.- Se observó presencia de levadura en diversos órganos de ratones inmunosuprimidos, mientras que sólo se observó infección en el intestino de ratones inmunocompetentes. La presencia de infección en los distintos órganos dependió de la especie de levadura, *C. famata* o *C. glabrata*, de la cantidad del inóculo y de su vía de inoculación.

8.- La infección con *C. famata* ocasiona hipertrofia del bazo y presencia de granulomas en el hígado 90 días después de la infección. Estas alteraciones son mucho más evidentes en los ratones infectados con *C. glabrata* que, además, produce alteraciones en el riñón.

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- Abrahams, G. L., Muller, P., and Hensel, M., (2006) Functional Dissection of SseF, a Type III Effector Protein Involved in Positioning the Salmonella-Containing Vacuole, *Traffic*.
- Ahmed, I.M., Gupta, A., Gould, K. and Clark, S.C. (2005) A fatal fungus. *Ann Thorac Surg*, **80**, 723-724.
- Alberti-Segui, C., Morales, A.J., Xing, H., Kessler, M.M., Willins, D.A., Weinstock, K.G., Cottarel, G., Fechtel, K. and Rogers, B. (2004) Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. *Yeast*, **21**, 285-302.
- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G. and Lombardi, A. (2000) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett Appl Microbiol*, **30**, 5-9.
- Andriole, V. T. (1998) Current and future therapy of invasive fungal infections. *Curr Clin Top Infect Dis* **18**, 19-36.
- Arendrup, M., Horn, T., and Frimodt-Moller, N. (2002) In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* **30**, 286-91.
- Armstrong, N., Schurr, M., Helgerson, R., and Harms, B. (1998) Fungal sacral osteomyelitis as the initial presentation of Crohn's disease of the small bowel: report of a case. *Dis Colon Rectum* **41**, 1581-4.
- Bacci, A., Montagnoli, C., Perruccio, K., Bozza, S., Gaziano, R., Pitzurra, L., Velardi, A., d'Ostiani, C. F., Cutler, J. E., and Romani, L. (2002) Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. *J Immunol* **168**, 2904-13.
- Benedek, O., Nagy, G., and Emody, L. (2004) Intracellular signalling and cytoskeletal rearrangement involved in *Yersinia pestis* plasminogen activator (Pla) mediated HeLa cell invasion. *Microb Pathog* **37**, 47-54.
- Blanchoin, L., Pollard, T. D., and Hitchcock-DeGregori, S. E. (2001) Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr Biol* **11**, 1300-4.
- Borg-von Zepelin, M., Eiffert, H., Kann, M. and Ruchel, R. (1993) Changes in the spectrum of fungal isolates: results from clinical specimens gathered in 1987/88 compared with those in 1991/92 in the University Hospital Gottingen, Germany. *Mycoses*, **36**, 247-253.

- Boyle, E. C., and Finlay, B. B. (2003) Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 633-9.
- Brieland, J., Essig, D., Jackson, C., Frank, D., Loebenberg, D., Menzel, F., Arnold, B., DiDomenico, B., and Hare, R. (2001) Comparison of pathogenesis and host immune responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in systemically infected immunocompetent mice. *Infect Immun* **69**, 5046-55.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S. and Gordon, S. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, **197**, 1119-1124.
- Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martinez-Pomares, L., Wong, S.Y. and Gordon, S. (2002) Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med*, **196**, 407-412.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, **106**, 761-771.
- Buentke, E. and Scheynius, A. (2003) Dendritic cells and fungi. *Apmis*, **111**, 789-796.
- Calderone, R.A. and Braun, P.C. (1991) Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*, **55**, 1-20.
- Calderone, R.A. and Fonzi, W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, **9**, 327-335.
- Cañete, M., Juarranz, A., Lopez-Nieva, P., Alonso-Torcal, C., Villanueva, A. and Stockert, J.C. (2001) Fixation and permanent mounting of fluorescent probes after vital labelling of cultured cells. *Acta Histochem*, **103**, 117-126.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W. (2001) The fungi. 2^o edition Academic Press. San Diego, San Francisco, New York.
- Carrasco, L., Ramos, M., Galisteo, R., Pisa, D., Fresno, M. and Gonzalez, M.E. (2005) Isolation of *Candida famata* from a patient with acute zonal occult outer retinopathy. *J Clin Microbiol*, **43**, 635-640.
- Carrega, G., Riccio, G., Santoriello, L., Pasqualini, M. and Pellicci, R. (1997) *Candida famata* fungemia in a surgical patient successfully treated with fluconazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **16**, 698-699.
- Casadevall, A. and Pirofski, L. (2001) Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis*, **184**, 337-344.

- Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martinez, J.P. (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 130-180.
- Chen, S. H., Stins, M. F., Huang, S. H., Chen, Y. H., Kwon-Chung, K. J., Chang, Y., Kim, K. S., Suzuki, K., and Jong, A. Y. (2003) *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* **52**, 961-70.
- Clark, T.A. and Hajjeh, R.A. (2002) Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr Opin Infect Dis*, **15**, 569-574.
- Cole, N. B., and Lippincott-Schwartz, J. (1995) Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 55-64.
- Coleman, D.C., Rinaldi, M.G., Haynes, K.A., Rex, J.H., Summerbell, R.C., Anaissie, E.J., Li, A. and Sullivan, D.J. (1998) Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol*, **36 Suppl 1**, 156-165.
- Cormack, B.P., Ghori, N. and Falkow, S. (1999) An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science*, **285**, 578-582.
- Csank, C. and Haynes, K. (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett*, **189**, 115-120.
- Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: critical control points, *Cell* **116**, 205-19.
- de Repentigny, L., Phaneuf, M., and Mathieu, L. G. (1992) Gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in intact and immunocompromised mice. *Infect Immun* **60**, 4907-14.
- Delanote, V., Vandekerckhove, J. and Gettemans, J. (2005) Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. *Acta Pharmacol Sin*, **26**, 769-779.
- Denning, D.W. (1998) Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, **26**, 781-803; quiz 804-785.
- Donaldson, J. G., Finazzi, D., and Klausner, R. D. (1992) Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* **360**, 350-2.
- Dongari-Bagtzoglou, A. and Kashleva, H. (2003) *Candida albicans* triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells. *Microb Pathog*, **34**, 169-177.

- Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N. and Wenzel, R.P. (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*, **29**, 239-244.
- Eissenberg, L. G., Goldman, W. E., and Schlesinger, P. H. (1993) Histoplasma capsulatum modulates the acidification of phagolysosomes. *J Exp Med* **177**, 1605-11.
- Elsayed, S., and Read, R. (2006) Mycobacterium haemophilum osteomyelitis: case report and review of the literature. *BMC Infect Dis*. **6**, 70.
- Espinel-Ingroff, A. (1998) In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol* **36**, 198-202.
- Felman M, Friedman LS, Sleisenger MH. (2004) Enfermedades gastrointestinales y Hepáticas. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Sleisenger y Fordtran. 7ª edición, tomo 2. Ed. Médica Panamericana.
- Fidel, P.L., Jr., Vazquez, J.A. and Sobel, J.D. (1999) Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans. *Clin Microbiol Rev*, **12**, 80-96.
- Fradin, C., Poulain, D. and Jouault, T. (2000) beta-1,2-linked oligomannosides from Candida albicans bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun*, **68**, 4391-4398.
- Fries, BC., Casadevall, A. (2001) Fungal infections in humans. Encyclopedia of life sciences. Nature Pub. Group, 1-9.
- Filler, S. G., Pfunder, A. S., Spellberg, B. J., Spellberg, J. P., and Edwards, J. E., Jr. (1996) Candida albicans stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun* **64**, 2609-17.
- Filler, S. G., Swerdloff, J. N., Hobbs, C., and LUCKETT, P. M. (1995) Penetration and damage of endothelial cells by Candida albicans. *Infect Immun* **63**, 976-83.
- Finlay, B. B., Ruschkowski, S., and Dedhar, S. (1991) Cytoskeletal rearrangements accompanying salmonella entry into epithelial cells. *J Cell Sci* **99**, 283-96.
- Fromtling, R. A., Abruzzo, G. K., and Giltinan, D. M. (1987) Candida tropicalis infection in normal, diabetic, and neutropenic mice. *J Clin Microbiol* **25**, 1416-20.
- Fu, Y., Rieg, G., Fonzi, W.A., Belanger, P.H., Edwards, J.E., Jr. and Filler, S.G. (1998) Expression of the Candida albicans gene ALS1 in Saccharomyces cerevisiae induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun*, **66**, 1783-1786.

- Garcia-del Portillo, F., Foster, J. W., Maguire, M. E., and Finlay, B. B. (1992) Characterization of the micro-environment of Salmonella typhimurium-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol Microbiol* **6**, 3289-97.
- Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M.A., Andrighetto, C., Schirone, M. and Tofalo, R. (2001) A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Res*, **1**, 161-167.
- Gasparoto, T. H., Gaziri, L. C., Burger, E., de Almeida, R. S., and Felipe, I. (2004) Apoptosis of phagocytic cells induced by Candida albicans and production of IL-10. *FEMS Immunol Med Microbiol* **42**, 219-24.
- Gaston, G. and Ogden, J. (2004) Candida glabrata periprosthetic infection: a case report and literature review. *J Arthroplasty*, **19**, 927-930.
- Gaur, N.K., Klotz, S.A. and Henderson, R.L. (1999) Overexpression of the Candida albicans ALA1 gene in Saccharomyces cerevisiae results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to those of Candida albicans. *Infect Immun*, **67**, 6040-6047.
- Ghoneum, M., Grewal, I., Brown, J., Osborne, R., Elembabi, H., and Gill, G. (2003) Phagocytosis of candida albicans by lymphatic tumour cells in vitro. *Acta Histochem* **105**, 127-33.
- Gillum, A.M., Tsay, E.Y. and Kirsch, D.R. (1984) Isolation of the Candida albicans gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of S. cerevisiae ura3 and E. coli pyrF mutations. *Mol Gen Genet*, **198**, 179-182
- Gouin, E., Gantelet, H., Egile, C., Lasa, I., Ohayon, H., Villiers, V., Gounon, P., Sansonetti, P. J., and Cossart, P. (1999) A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria Listeria monocytogenes, Shigella flexneri and Rickettsia conorii. *J Cell Sci* **112**, 1697-708.
- Gow, N.A. (1997) Germ tube growth of Candida albicans. *Curr Top Med Mycol*, **8**, 43-55.
- Gow, N.A., Brown, A.J. and Odds, F.C. (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 366-371.
- Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-911.
- Gruenheid, S. and Finlay, B.B. (2003) Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*, **422**, 775-781.
- Gruenheid, S., Sekirov, I., Thomas, N. A., Deng, W., O'Donnell, P., Goode, D., Li, Y., Frey, E. A., Brown, N. F., Metalnikov, P., Pawson, T., Ashman, K., and Finlay, B.

- B. (2004) Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **51**, 1233-49.
- Hazen, K.C. (1995) New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev*, **8**, 462-478.
- Heljic, S., Hukic, M., Dzinovic, A., Dozic, M. and Babic, M. (2005) [Fungal colonization of newborn in neonatal intensive care unit: a prospective study]. *Med Arh*, **59**, 211-213.
- Hostetter, M.K. (1994) Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev*, **7**, 29-42.
- Hoyer, L.L., Payne, T.L. and Hecht, J.E. (1998) Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol*, **180**, 5334-5343.
- Hube, B. (2004) From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 336-341.
- Hube, B. and Naglik, J. (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*, **147**, 1997-2005.
- Hugot, J. P., Alberti, C., Berrebi, D., Bingen, E., and Cezard, J. P. (2003) Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* **362**, 2012-5.
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, **29**, 577-580.
- Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P.A., Poulain, D. and Jouault, T. (2003) Role of phospholipomannan in *Candida albicans* escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of bad phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci*, **1010**, 573-576.
- Ibata-Ombetta, S., Jouault, T., Trinel, P.A. and Poulain, D. (2001) Role of extracellular signal-regulated protein kinase cascade in macrophage killing of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol*, **70**, 149-154.
- Ibrahim-Granet, O., Philippe, B., Boleti, H., Boisvieux-Ulrich, E., Grenet, D., Stern, M. and Latge, J.P. (2003) Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun*, **71**, 891-903.
- Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S.K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E. and Kagnoff, M.F. (1995) A distinct array of proinflammatory cytokines is

- expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest*, **95**, 55-65.
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M.L. and Cormack, B.P. (2005) A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol*, **8**, 378-384.
- Kasten F.H. (1981) Methods for fluorescence microscopy, In: Clerrk G (Ed) Staining procedures. 4th edn. Williams & Wilkins, Baltimores MA, pp 39-103.
- Khan, Z. U., Misra, V. C., Randhawa, H. S., and Damodaran, V. N. (1980) Pathogenicity of some ordinarily harmless yeasts for cortisone-treated mice. *Sabouraudia* **18**, 319-27.
- Kuhle V, Jackel D, Hensel M. (2004) Effector proteins encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2 interfere with the microtubule cytoskeleton after translocation into host. *cells.Traffic.*, **5**, 356-70
- Klis, F.M., de Groot, P. and Hellingwerf, K. (2001) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol*, **39 Suppl 1**, 1-8.
- Klotz, S. A., Drutz, D. J., Harrison, J. L., and Huppert, M. (1983) Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. *Infect Immun* **42**, 374-84.
- Kopecko, D. J., Hu, L., and Zaal, K. J. (2001) *Campylobacter jejuni*--microtubule-dependent invasion. *Trends Microbiol* **9**, 389-96.
- Krcmery, V. and Barnes, A.J. (2002) Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect*, **50**, 243-260.
- Krcmery, V. and Kunova, A. (2000) *Candida famata* fungemia in a cancer patient: case report. *J Chemother*, **12**, 189-190.
- Kullberg, B.J. and Oude Lashof, A.M. (2002) Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res*, **7**, 183-191.
- Larsson, C. (2006) Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal*, **18**, 276-284.
- Lorenz, M.C. and Fink, G.R. (2002) Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell*, **1**, 657-662.
- Lorenz, M.C., Bender, J.A. and Fink, G.R. (2004) Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell*, **3**, 1076-1087.
- Li, D., Bernhardt, J., and Calderone, R. (2002) Temporal expression of the *Candida albicans* genes *CHK1* and *CSSK1*, adherence, and morphogenesis in a model of

- reconstituted human esophageal epithelial candidiasis. *Infect Immun* **70**, 1558-65.
- Limper, A. H., and Standing, J. E. (1994) Vitronectin interacts with *Candida albicans* and augments organism attachment to the NR8383 macrophage cell line. *Immunol Lett* **42**, 139-44.
- Lin, C. S., Aebersold, R. H., Kent, S. B., Varma, M., and Leavitt, J. (1988) Molecular cloning and characterization of plastin, a human leukocyte protein expressed in transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biol* **8**, 4659-68.
- Lin, S.J., Schranz, J. and Teutsch, S.M. (2001) Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis*, **32**, 358-366.
- Liu, H. (2001) Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 728-735.
- Lorenz, M.C. and Fink, G.R. (2002) Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell*, **1**, 657-662.
- Luo, G., Samaranayake, L.P. and Yau, J.Y. (2001) *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol*, **39**, 2971-2974.
- Manns, J.M., Mosser, D.M. and Buckley, H.R. (1994) Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun*, **62**, 5154-5156.
- Marcil, A., Harcus, D., Thomas, D.Y. and Whiteway, M. (2002) *Candida albicans* killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of *Candida* genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment. *Infect Immun*, **70**, 6319-6329.
- Marr, K.A., Balajee, S.A., Hawn, T.R., Ozinsky, A., Pham, U., Akira, S., Aderem, A. and Liles, W.C. (2003) Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens. *Infect Immun*, **71**, 5280-5286.
- Martinez-Solano, L., Nombela, C., Molero, G. and Gil, C. (2006) Differential protein expression of murine macrophages upon interaction with *Candida albicans*. *Proteomics*, **6 Suppl 1**, S133-144.
- McFadden, D. C., and Casadevall, A. (2001) Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* **39**, 19-30.
- McGreal, E.P., Miller, J.L. and Gordon, S. (2005) Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol*, **17**, 18-24.
- Miller, S. G., Carnell, L., and Moore, H. H. (1992) Post-Golgi membrane traffic: brefeldin A inhibits export from distal Golgi compartments to the cell surface but not recycling. *J Cell Biol* **118**, 267-83.

- Miller, D.J. and Mejicano, G.C. (2001) Vertebral osteomyelitis due to *Candida* species: case report and literature review. *Clin Infect Dis*, **33**, 523-530.
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O. and Hube, B. (2004) *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*, **6**, 915-926.
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J. and Hube, B. (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 400-428, table of contents.
- Navarre, W. W., and Zychlinsky, A. (2000) Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol* **2**, 265-73.
- Newman, S. L., Gootee, L., Kidd, C., Ciraolo, G. M., and Morris, R. (1997) Activation of human macrophage fungistatic activity against *Histoplasma capsulatum* upon adherence to type 1 collagen matrices. *J Immunol* **158**, 1779-86.
- Newman, S. L., and Tucci, M. A. (1990) Regulation of human monocyte/macrophage function by extracellular matrix. Adherence of monocytes to collagen matrices enhances phagocytosis of opsonized bacteria by activation of complement receptors and enhancement of Fc receptor function. *J Clin Invest* **86**, 703-14.
- Newman, S. L., and Holly, A. (2001) *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infect Immun* **69**, 6813-22.
- Newman, S.L., Bhugra, B., Holly, A. and Morris, R.E. (2005) Enhanced killing of *Candida albicans* by human macrophages adherent to type 1 collagen matrices via induction of phagolysosomal fusion. *Infect Immun*, **73**, 770-777.
- Nielsen, S. E., Nielsen, O. H., Vainer, B., and Claesson, M. H. (2002) Inflammatory bowel disease--do microorganisms play a role?. *Ugeskr Laeger* **164**, 5947-50.
- Nikawa, H., Jin, C., Fukushima, H., Makihira, S., and Hamada, T. (2001) Antifungal activity of histatin-5 against non-*albicans* *Candida* species. *Oral Microbiol Immunol* **16**, 250-2.
- Nishikawa, A., Tomomatsu, H., Sugita, T., Ikeda, R. and Shinoda, T. (1996) Taxonomic position of clinical isolates of *Candida famata*. *J Med Vet Mycol*, **34**, 411-419.
- Nucci, M. and Colombo, A.L. (2002) Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. *Braz J Infect Dis*, **6**, 124-128.
- Odds, F.C. (1985) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol*, **12**, 45-93.

- Oelschlaeger, T. A., Guerry, P., and Kopecko, D. J. (1993) Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6884-8.
- Osumi, M. (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*, **29**, 207-233.
- Pagani, R., Portoles, M. T., De La Vina, S., Melzner, I., and Vergani, G. (2003) Alterations induced on cytoskeleton by *Escherichia coli* endotoxin in different types of rat liver cell cultures. *Histol Histopathol* **18**, 837-48.
- Palmer, G.E., Kelly, M.N. and Sturtevant, J.E. (2005) The *Candida albicans* vacuole is required for differentiation and efficient macrophage killing. *Eukaryot Cell*, **4**, 1677-1686.
- Panagio, L. A., Felipe, I., Vidotto, M. C., and Gaziri, L. C. (2002) Early membrane exposure of phosphatidylserine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from an HIV-infected individual. *J Med Microbiol* **51**, 929-36.
- Peppoloni, S., Mancianti, S., Volpini, G., Nuti, S., Ruggiero, P., Rappuoli, R., Blasi, E., and Del Giudice, G. (2002) Antibody-dependent macrophage-mediated activity against *Helicobacter pylori* in the absence of complement. *Eur J Immunol* **32**, 2721-5.
- Pfaller, M. A., and Diekema, D. J. (2002) Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol* **40**, 3551-7.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Messer, S.A., Boyken, L., Hollis, R.J. and Jones, R.N. (2003) In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol*, **41**, 78-83.
- Pivarcsi, A., Bodai, L., Rethi, B., Kenderessy-Szabo, A., Koreck, A., Szell, M., Beer, Z., Bata-Csorgoo, Z., Magocsi, M., Rajnavolgyi, E., Dobozy, A. and Kemeny, L. (2003) Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol*, **15**, 721-730.
- Poulain, D. and Jouault, T. (2004) *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 342-349.

- Pope, L. M., and Cole, G. T. (1982) Comparative studies of gastrointestinal colonization and systemic spread by *Candida albicans* and nonlethal yeast in the infant mouse. *Scan Electron Microsc*, 1667-76.
- Prinsloo, B., Weldhagen, G.F. and Blaine, R.W. (2003) *Candida famata* central nervous system infection. *S Afr Med J*, **93**, 601-602.
- Quindos, G., Cabrera, F., Arilla, M.C., Burgos, A., Ortiz-Vigon, R., Canon, J.L. and Ponton, J. (1994) Fatal *Candida famata* peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis who was treated with fluconazole. *Clin Infect Dis*, **18**, 658-660.
- Rao, N.A., Nerenberg, A.V. and Forster, D.J. (1991) *Torulopsis candida* (*Candida famata*) endophthalmitis simulating *Propionibacterium acnes* syndrome. *Arch Ophthalmol*, **109**, 1718-1721.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P. and Gardner, M.B. (1974) Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, **33**, 1027-1033.
- Rello, S., Stockert, J. C., Moreno, V., Gamez, A., Pacheco, M., Juarranz, A., Canete, M., and Villanueva, A. (2005) Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* **10**, 201-8.
- Richard, M., Ibata-Ombetta, S., Dromer, F., Bordon-Pallier, F., Jouault, T. and Gaillardin, C. (2002) Complete glycosylphosphatidylinositol anchors are required in *Candida albicans* for full morphogenesis, virulence and resistance to macrophages. *Mol Microbiol*, **44**, 841-853.
- Roeder, A., Kirschning, C.J., Rupec, R.A., Schaller, M. and Korting, H.C. (2004) Toll-like receptors and innate antifungal responses. *Trends Microbiol*, **12**, 44-49.
- Romani, L., Bistoni, F. and Puccetti, P. (2002) Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol*, **10**, 508-514.
- Romani, L., Bistoni, F. and Puccetti, P. (2003) Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Microbiol*, **6**, 338-343.
- Romani, L., Montagnoli, C., Bozza, S., Perruccio, K., Spreca, A., Allavena, P., Verbeek, S., Calderone, R. A., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2004) The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. *Int Immunol* **16**, 149-61.
- Rooney, P.J. and Klein, B.S. (2002) Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol*, **4**, 127-137.

- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M.V., Valentin, E. and Sentandreu, R. (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*, **6**, 14-29.
- Sandovsky-Losica, H., Berdicevsky, I., Tsarfaty, I. and Segal, E. (2002) Effect of *Candida albicans* metabolite(s) on cellular actin. *FEMS Microbiol Lett*, **215**, 57-62.
- Sandovsky-Losica, H. and Segal, E. (2006) Infection of HEp2 epithelial cells with *Candida albicans*: adherence and postadherence events. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **46**, 470-475.
- Sanglard, D., and Odds, F. C. (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* **2**, 73-85.
- Santoni, G., Lucciarini, R., Amantini, C., Jacobelli, J., Spreghini, E., Ballarini, P., Piccoli, M. and Gismondi, A. (2002) *Candida albicans* expresses a focal adhesion kinase-like protein that undergoes increased tyrosine phosphorylation upon yeast cell adhesion to vitronectin and the EA.hy 926 human endothelial cell line. *Infect Immun*, **70**, 3804-3815.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. and Gey, G.O. (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*, **97**, 695-710.
- Soll, D.R. (1992) High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*, **5**, 183-203.
- Spreghini, E., Gismondi, A., Piccoli, M., and Santoni, G. (1999) Evidence for alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin-like vitronectin (VN) receptors in *Candida albicans* and their involvement in yeast cell adhesion to VN. *J Infect Dis* **180**, 156-66.
- St-Germain, G. and Laverdiere, M. (1986) *Torulopsis candida*, a new opportunistic pathogen. *J Clin Microbiol*, **24**, 884-885.
- Sudbery, P., Gow, N. and Berman, J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, **12**, 317-324.
- Sundstrom, P. (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol*, **4**, 461-469.
- Sweeney, J. F., Nguyen, P. K., Omann, G. M., and Hinshaw, D. B. (1998) Autocrine/paracrine modulation of polymorphonuclear leukocyte survival after exposure to *Candida albicans*. *Shock* **9**, 146-52.

- Szolnoky, G., Bata-Csorgo, Z., Kenderessy, A.S., Kiss, M., Pivarcsi, A., Novak, Z., Nagy Newman, K., Michel, G., Ruzicka, T., Marodi, L., Dobozy, A. and Kemeny, L. (2001) A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*. *J Invest Dermatol*, **117**, 205-213.
- Takemura, Y., Iwasaki, Y., Nagata, K., Yokomura, I., Tando, S., Fushiki, S., and Matsubara, H. (2005) Influence of depletion of alveolar macrophages on apoptosis in *Candida*-induced acute lung injury. *Exp Lung Res* **31**, 307-21.
- Tato, C.M. and Hunter, C.A. (2002) Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. *Infect Immun*, **70**, 3311-3317.
- Tavanti, A., Campa, D., Bertozzi, A., Pardini, G., Naglik, J. R., Barale, R., and Senesi, S. (2006) *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection. *Microbes Infect* **8**, 791-800.
- Todarò, G.J. and Green, H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*, **17**, 299-313.
- Trinel, P. A., Maes, E., Zanetta, J. P., Delplace, F., Coddeville, B., Jouault, T., Strecker, G., and Poulain, D. (2002) *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem* **277**, 37260-71.
- Tsarfaty, I., Sandovsky-Losica, H., Mittelman, L., Berdicevsky, I. and Segal, E. (2000) Cellular actin is affected by interaction with *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett*, **189**, 225-232.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. and Tada, K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, **26**, 171-176.
- van Burik, J.A. and Magee, P.T. (2001) Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol*, **55**, 743-772.
- Vidotto, V., Mantoan, B., Pugliese, A., Ponton, J., Quindos, G., Aoki, S., and Ito-Kuwa, S. (2003) Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. *Rev Iberoam Micol* **20**, 52-4.
- Watanabe, K., Kagaya, K., Yamada, T., and Fukazawa, Y. (1991) Mechanism for candidacidal activity in macrophages activated by recombinant gamma interferon. *Infect Immun* **59**, 521-8.

- Wei, B., Huang, T., Dalwadi, H., Sutton, C. L., Bruckner, D., and Braun, J. (2002) *Pseudomonas fluorescens* encodes the Crohn's disease-associated I2 sequence and T-cell superantigen. *Infect Immun* **70**, 6567-75.
- Wendland, J. (2001) Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal Genet Biol*, **34**, 63-82.
- White, T. C., Marr, K. A., and Bowden, R. A. (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**, 382-402.
- Whiteway, M. (2000) Transcriptional control of cell type and morphogenesis in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 582-588.
- Whiteway, M. and Oberholzer, U. (2004) *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 350-357.
- Willment, J.A., Gordon, S. and Brown, G.D. (2001) Characterization of the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem*, **276**, 43818-43823.
- Wingard, J. R., Dick, J. D., Merz, W. G., Sandford, G. R., Saral, R., and Burns, W. H. (1982) Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* in mice. *Infect Immun* **37**(2):833-6.
- Wong, B., Kiehn, T.E., Edwards, F., Bernard, E.M., Marcove, R.C., de Harven, E. and Armstrong, D. (1982) Bone infection caused by *debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report. *J Clin Microbiol*, **16**, 545-548.
- Yang, Y. L., Ho, Y. A., Cheng, H. H., Ho, M., and Lo, H. J. (2004) Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* **25**, 60-4.
- Yuspa, S.H., Hawley-Nelson, P., Koehler, B. and Stanley, J.R. (1980) A survey of transformation markers in differentiating epidermal cell lines in culture. *Cancer Res*, **40**, 4694-4703.
- Zamze, S., Martinez-Pomares, L., Jones, H., Taylor, P. R., Stillion, R. J., Gordon, S., and Wong, S. Y. (2002) Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* **277**, 41613-23.
- Zhao, L.J., Wang, L., Ren, H., Cao, J., Li, L., Ke, J. S., and Qi, Z. T. (2005) Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Exp Cell Res* **305**, 23-32.

Zmierczak, H., Goemaere, S., Mielants, H., Verbruggen, G. and Veys, E.M. (1999)
Candida glabrata arthritis: case report and review of the literature of Candida
arthritis. *Clin Rheumatol*, **18**, 406-409.

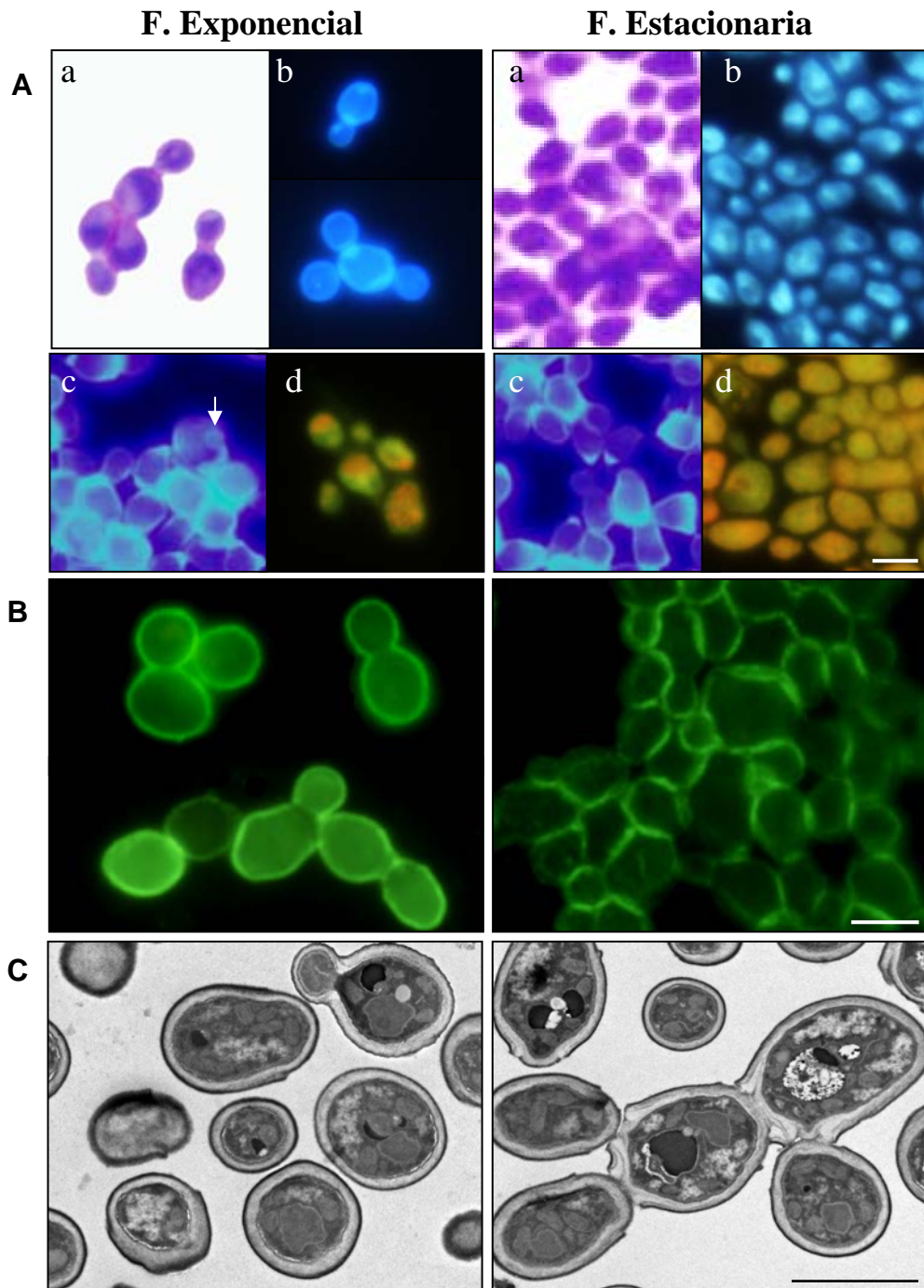


Figura 8.- Morfología de *C. famata* en suspensión en medio YPD en fase exponencial y estacionaria. **A:** tinción con AT (a), H-33258 (b), CFL (c) o AO (d); **B:** inmunofluorescencia indirecta para *C. famata*; **C:** microscopía electrónica de transmisión. Como se puede observar en la fase exponencial, la levadura aparece principalmente en forma unicelular o formando cadenas semejantes a pseudomicelios, mientras que en la estacionaria se presenta en estructuras tipo mosaico en las que las células se mantienen unidas. Barra de escala: 2µm.

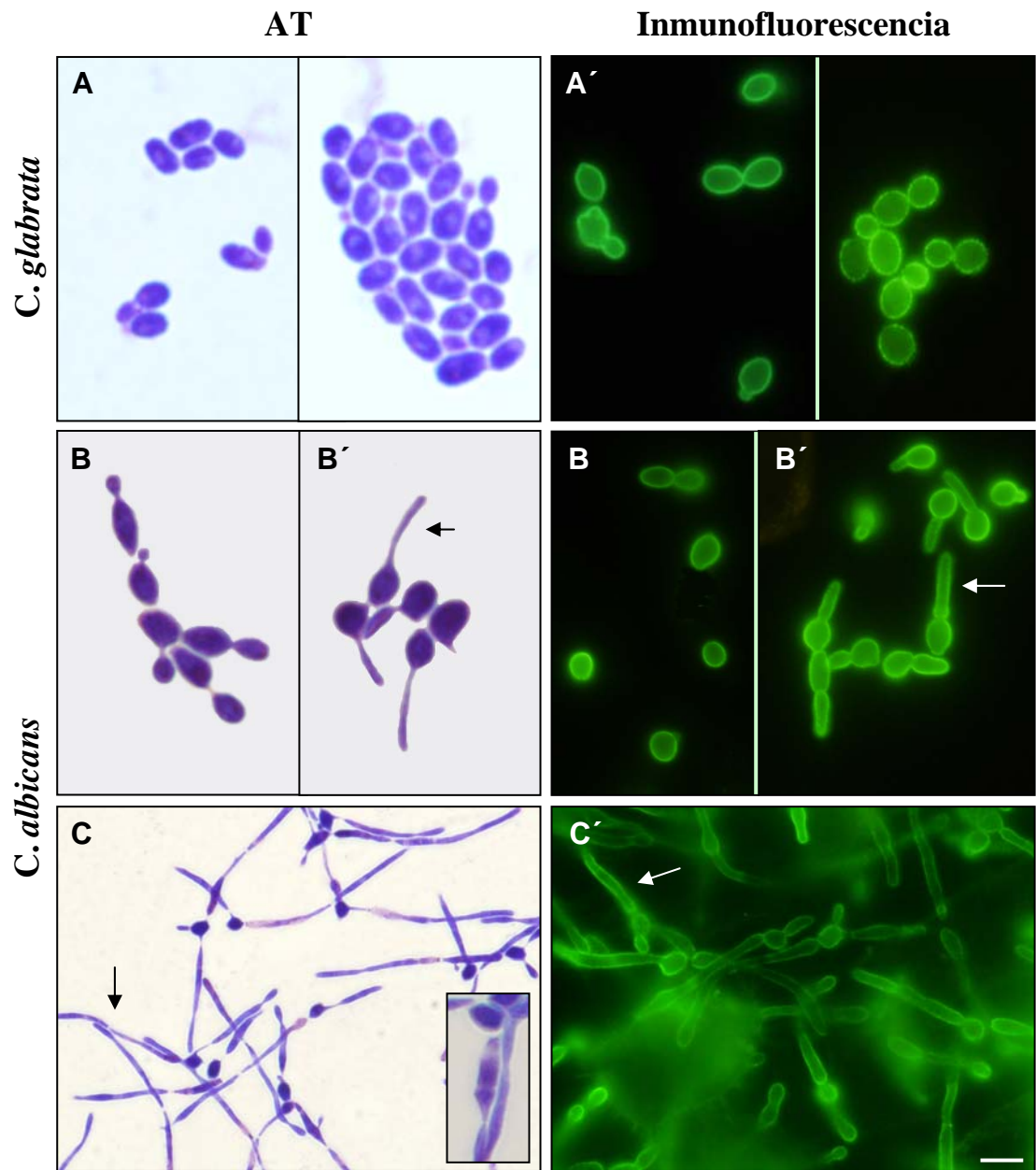


Figura 9.- Morfología de *C. glabrata* (A-A') y *C. albicans* (B,C') determinada por tinción con AT o por inmunofluorescencia indirecta. La morfología de *C. glabrata* es siempre levaduriforme con independencia de la fase o condiciones de cultivo, mientras que la de *C. albicans* varía en función del medio de cultivo: levadura en YPD (B), y pseudomicelio (B', flecha) o micelio (C', flecha) en DMEM. Barra de escala: 2µm.

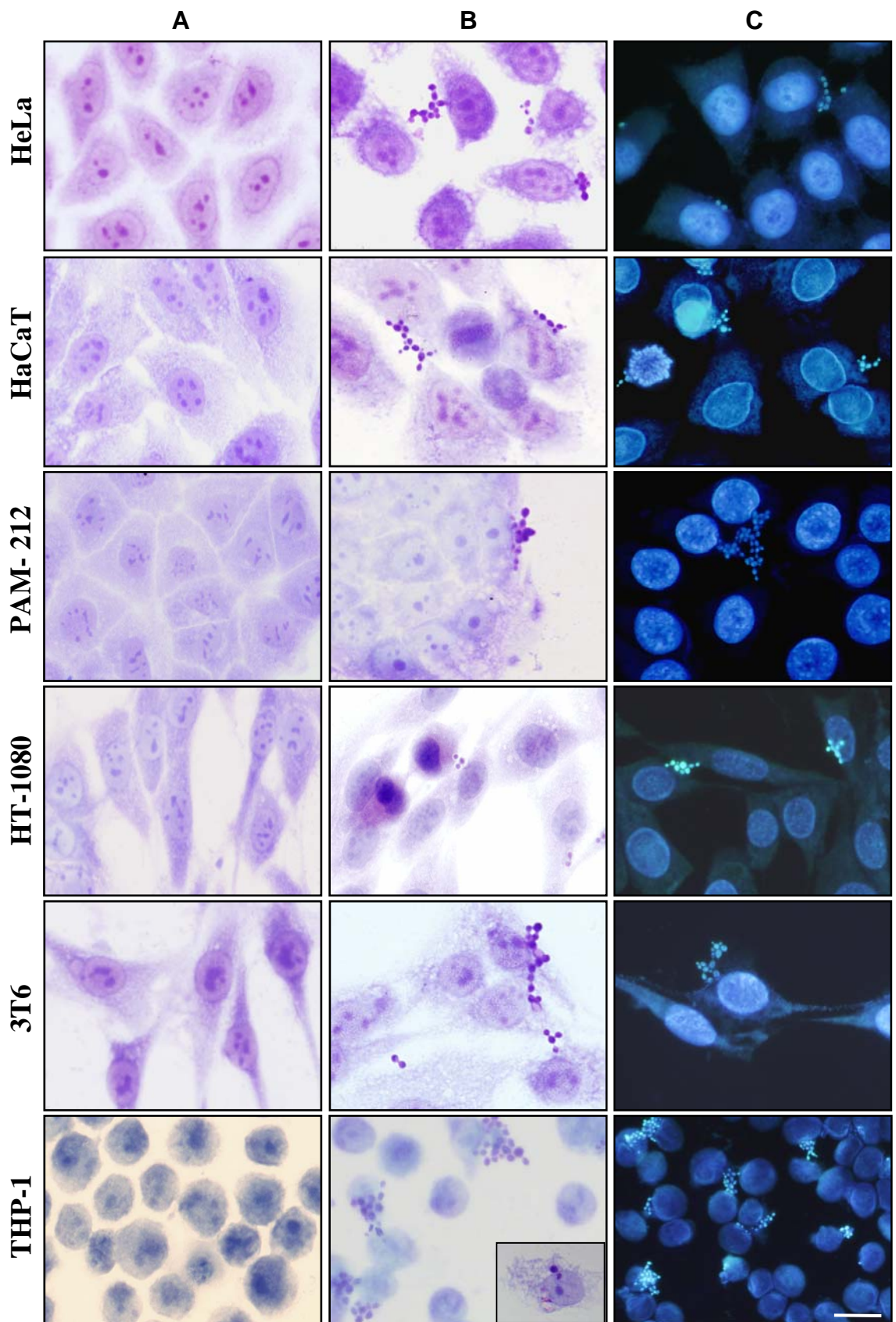


Figura 10.- Adhesión de *C. famata* a las células de mamífero en cultivo: HeLa, HaCaT, Pam-212, 3T6 y THP-1. **A:** controles sin infectar; **B** y **C:** células infectadas durante 1-3 h. A y B: tinción con AT; C: tinción con H-33258 y observadas en microscopía de fluorescencia bajo luz de excitación UV. El control de THP-1 muestra células en suspensión mientras que las infectadas son células adheridas, algunas con morfología similar a macrófagos (THP-1 B recuadro). Barra de escala: 10 μ m.

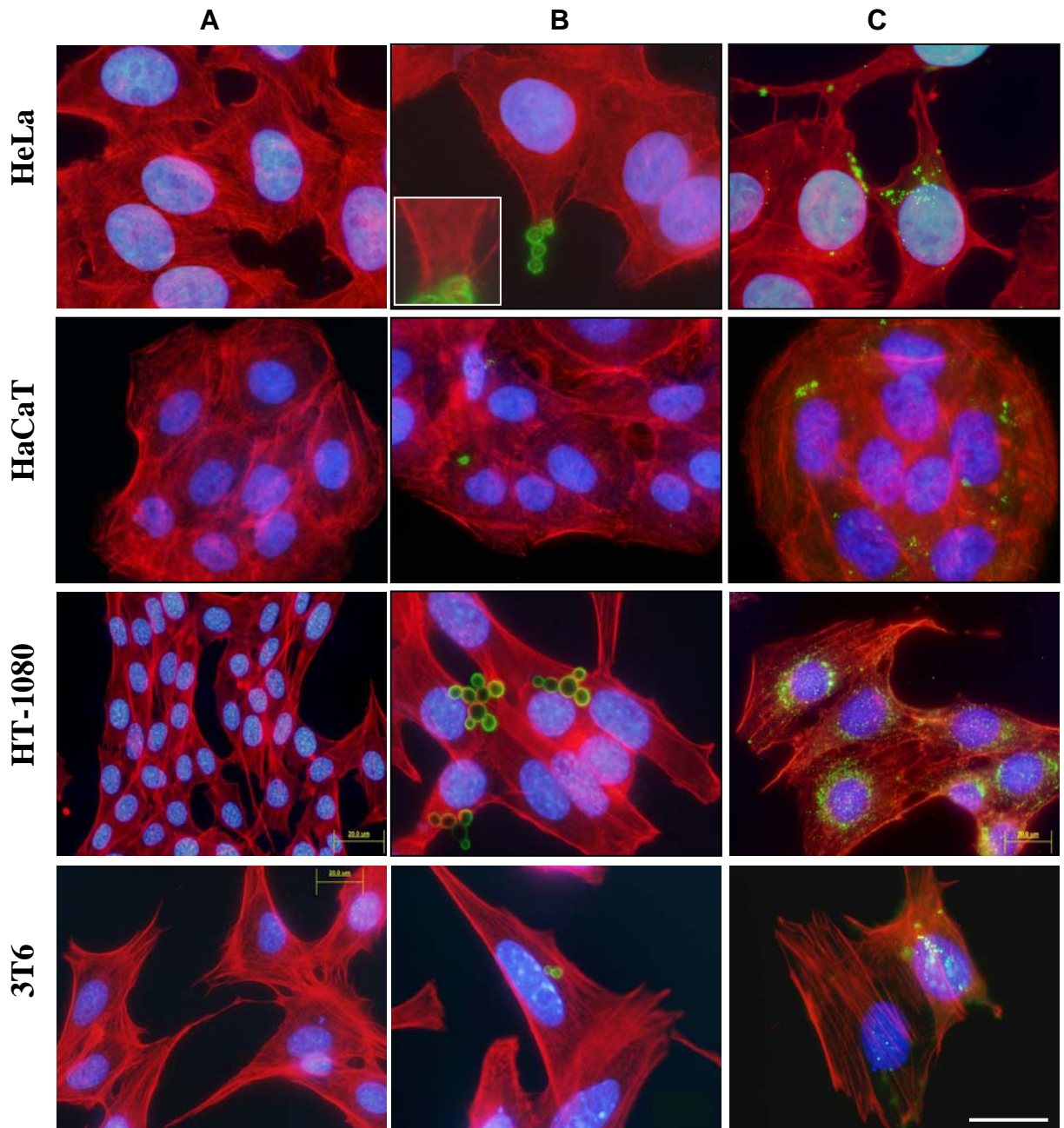


Figura 16.- Inmunofluorescencia indirecta para *C. famata* y determinación de actina filamentosa mediante faloidina-TRITC en las células de mamífero en cultivo: HeLa, HaCaT, HT-1080 y 3T6. **A:** controles sin infectar; **B** y **C:** células infectadas durante 3 h y procesadas inmediatamente ó 24 h después de la infección. Se aprecia la fluorescencia verde de las levaduras adheridas (B) e incorporadas por las células (C). La adhesión de la levadura ocasiona cambios en la organización de los MFs (B, recuadro). Barra de escala: 10 μ m.

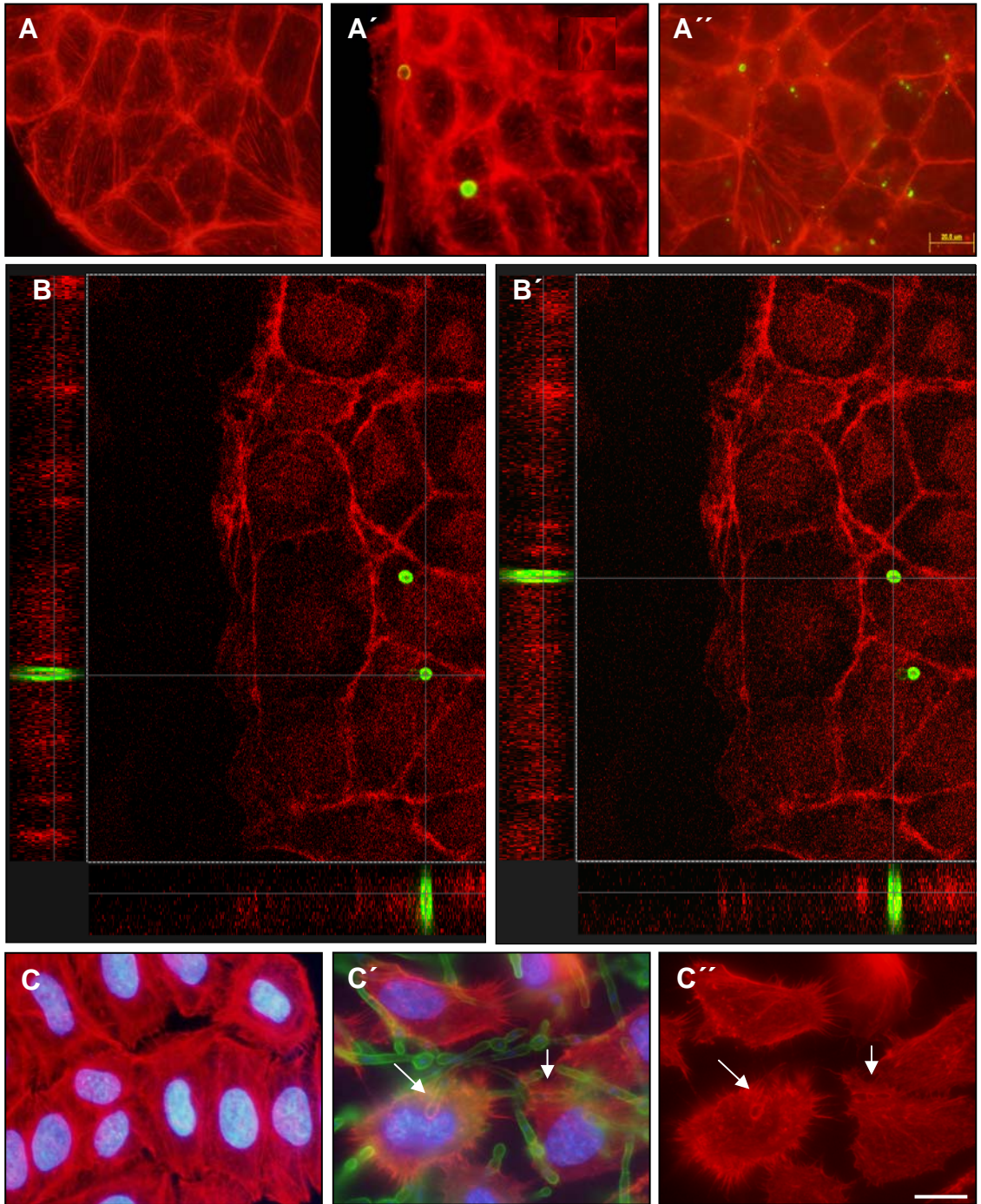


Figura 17.- Alteraciones ocasionadas en los microfilamentos de actina de queratinocitos murinos Pam-212 por *C. famata* (A,B) y de células HeLa por *C. albicans* (C) en el proceso de entrada. La determinación de los microfilamentos de actina se realizó mediante faloidina-TRITC (rojo) y de las levaduras mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando los correspondientes antisueros (verde). A: Pam-212 sin infectar. A',A'': queratinocitos infectados por *C. famata*. B,B': microscopía confocal mostrando la localización de la levadura en el interior celular. C: HeLa control. C',C'': células HeLa infectadas con *C. albicans*. Las flechas blancas muestran las alteraciones producidas en los MFs a consecuencia de la entrada de la levadura. Barra de escala: 10µm.

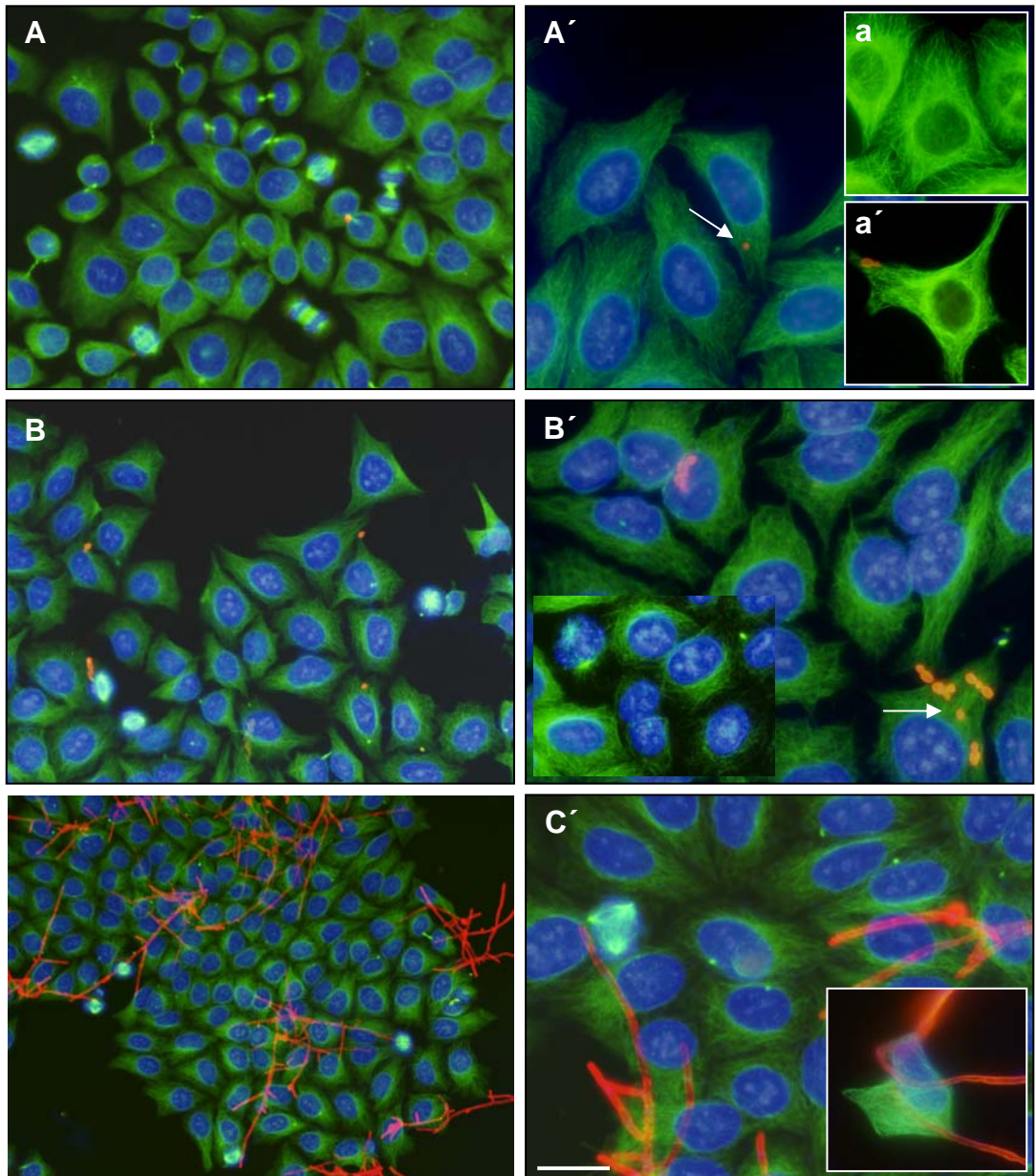


Figura 18.- Alteraciones ocasionadas en los microtubulos de células HeLa por la infección con *C. famata* (A,A´), *C. glabrata* (B,B´) o *C. albicans* (C,C´). La determinación de los microtúbulos se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina (verde). Las levaduras también se determinaron mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando los correspondientes antisueros (rojo). Los MTs interfásicos de las células HeLa presentan leves alteraciones a consecuencia de la infección y en relación a los de los controles (a´, a, respectivamente). Por el contrario, 6 h después de la infección, la mayor parte de las células en división muestran los husos alterados (B´ y C recuadro). Las flechas indican levaduras en el interior de las células. Barra de escala: 10 μ m.

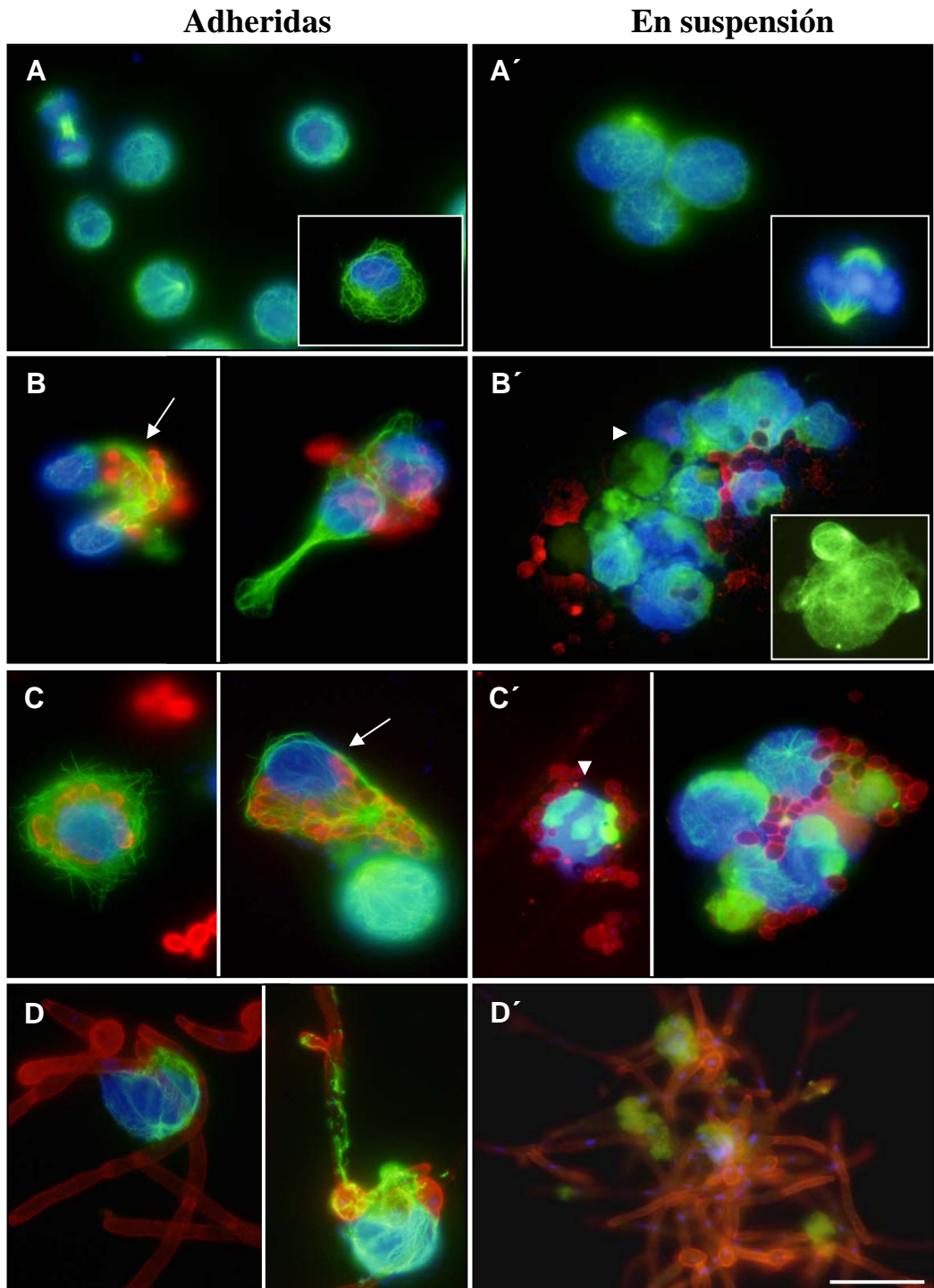


Figura 19.- Alteraciones ocasionadas en los microtúbulos de monocitos THP-1 por *C. famata* (**B,B'**), *C. glabrata* (**C,C'**) y *C. albicans* (**D,D'**) en el proceso de adhesión y entrada. La determinación de los microtúbulos se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo primario frente a α -tubulina (verde) mientras que para las levaduras se utilizaron los correspondientes antisueros (rojo). Se puede observar la ausencia total de fases en los cultivos infectados, así como las alteraciones producidas en los microtúbulos por la entrada de un gran número de levaduras en las células humanas (flechas). Se observa un elevado número de células muertas con microtubulos difusos o incluso ausentes (cabeza de flecha). Barra de escala: 10 μ m.

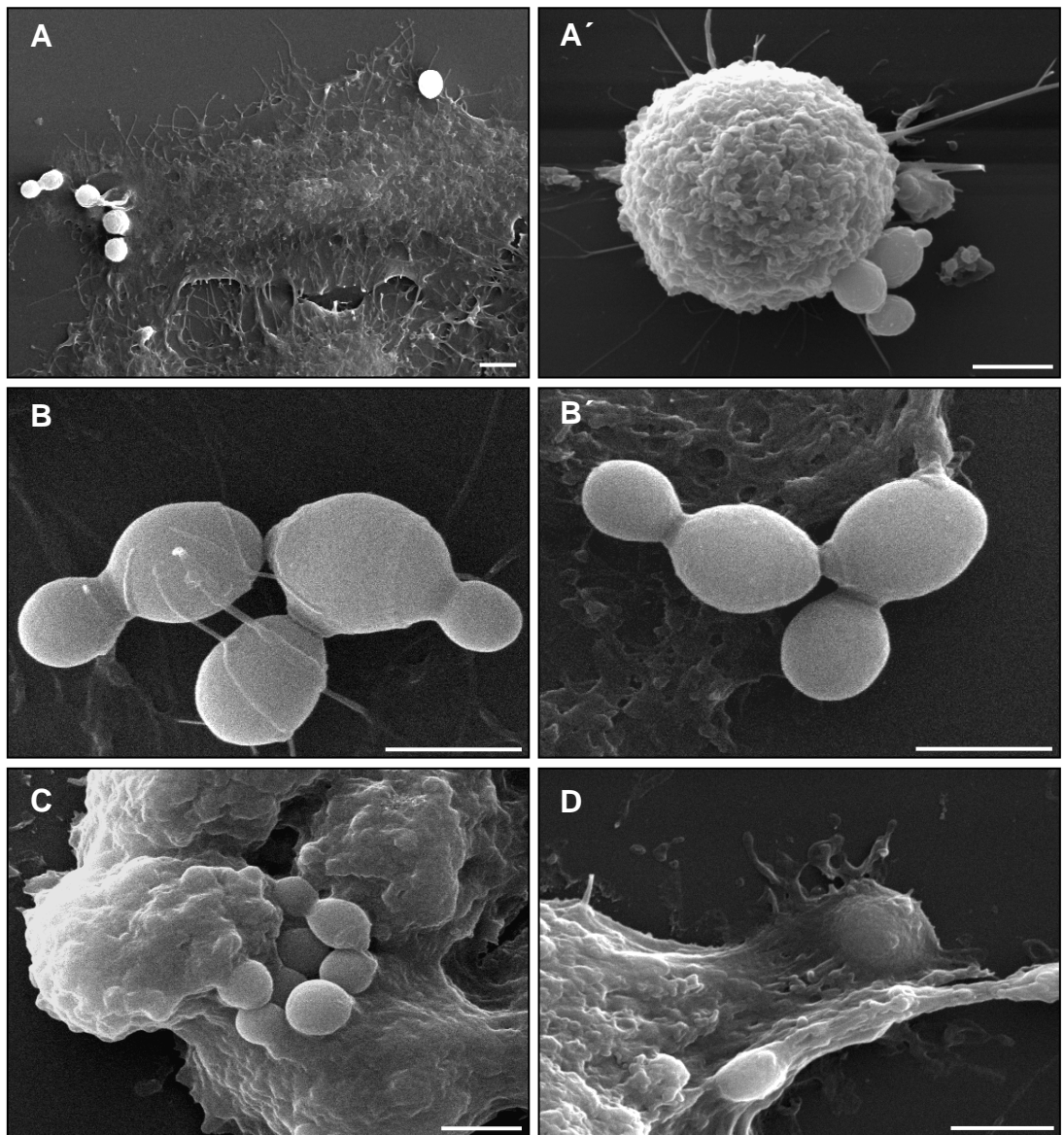


Figura 20.- Microscopía electrónica de barrido de células HeLa en interfase (**A**) o en división (**A'**) infectadas con *C. famata*. La células desarrollan numerosas proyecciones citoplasmáticas a modo de filopodios (**B**) o lamelipodios (**B'**) que participan en la adhesión y entrada de las levaduras (**C,D**). Barra de escala 2 μ .

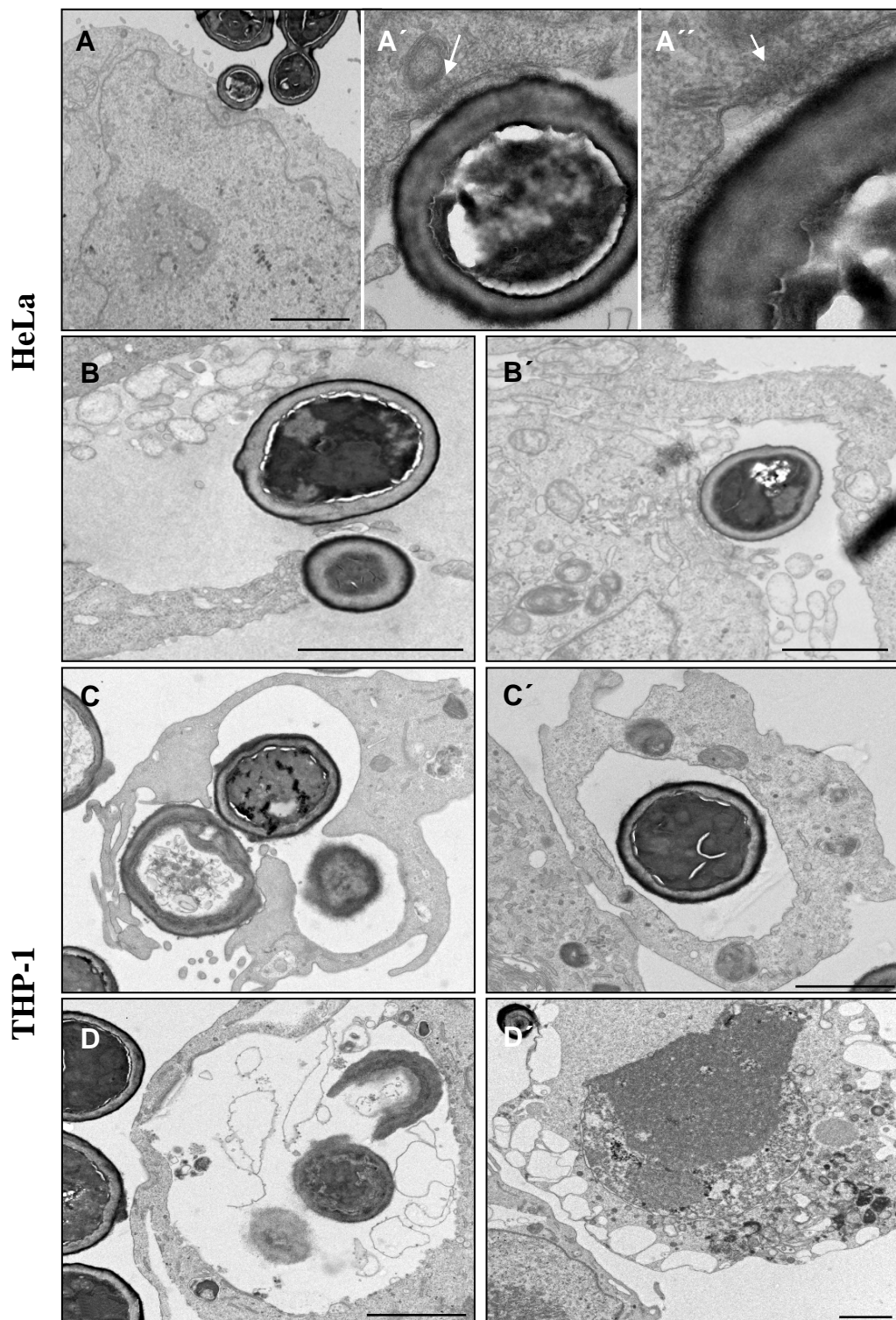


Figura 21.- Microscopía electrónica de transmisión de células HeLa. (A-B) o de THP-1 (C-D) infectadas con *C. famata*. La membrana plasmática de las células se engrosa en la zona de contacto con la levadura (A', A'', flecha). Una misma célula puede incorporar una o varias levaduras (C, C') que pueden ser degradadas (D). Células muertas por necrosis son fácilmente distinguibles (D'). Barras de escala 2 μ .

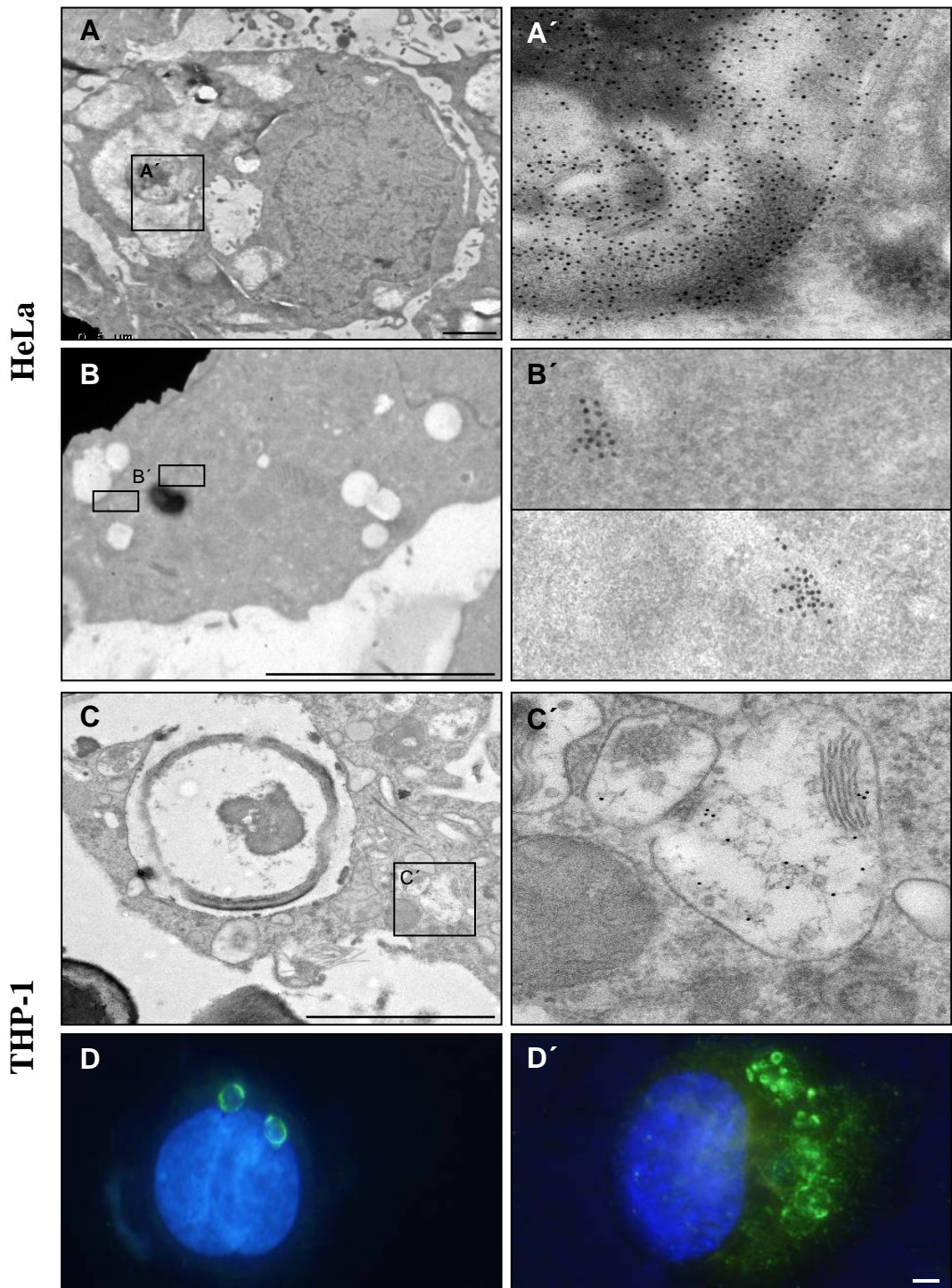


Figura 22.- Microscopía electrónica de transmisión mostrando la evolución de *C. famata* en el interior de células HeLa (A-B) o de THP-1 (C-D). La determinación de la levadura se realizó mediante inmunomarcado utilizando el anticuerpo para *C. famata* y revelado con el anticuerpo secundario acompañado a oro coloidal (A-C). En las células THP-1, el marcado con oro coloidal se correlacionó con la señal obtenida mediante inmunofluorescencia indirecta (D-D'); los núcleos fueron contrateñidos con H-33258. Barra de escala: 2 μ m.

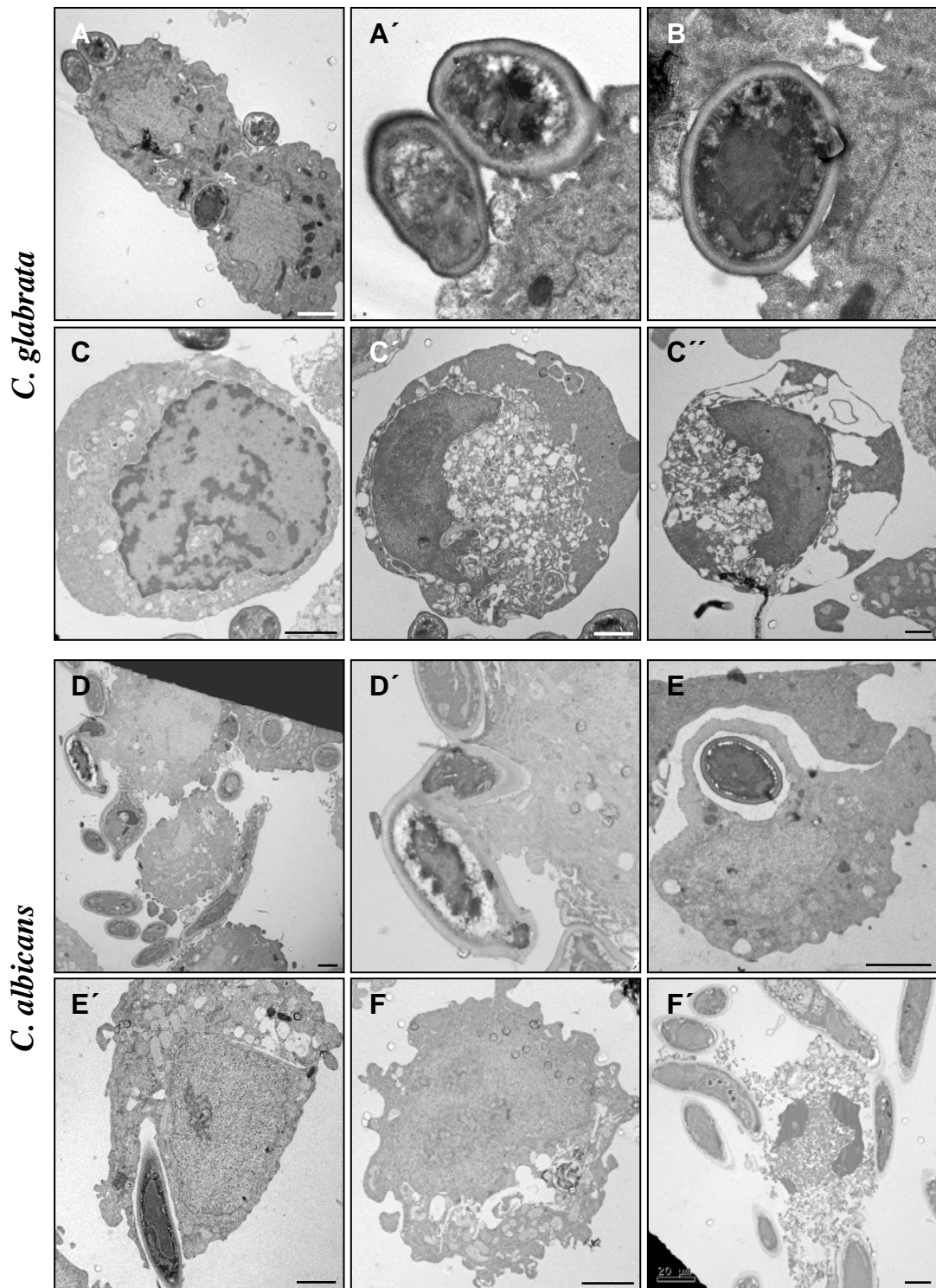


Figura 23.- Microscopía electrónica de transmisión de células THP-1 infectadas con *C. glabrata* (A-C) o *C. albicans* (C-F). Ambas levaduras son capaces de adherirse (A-A' y D-D') y de entrar tanto en células HeLa (no mostrado) como en THP-1 (B y E-E'). *C. albicans* interacciona con la célula tanto en su forma de levadura como de pseudohifa o hifa. Se aprecian el daño celular que ocasiona la infección con ambas levaduras (C-C' y F-F'). Barra de escala: 2 μ .

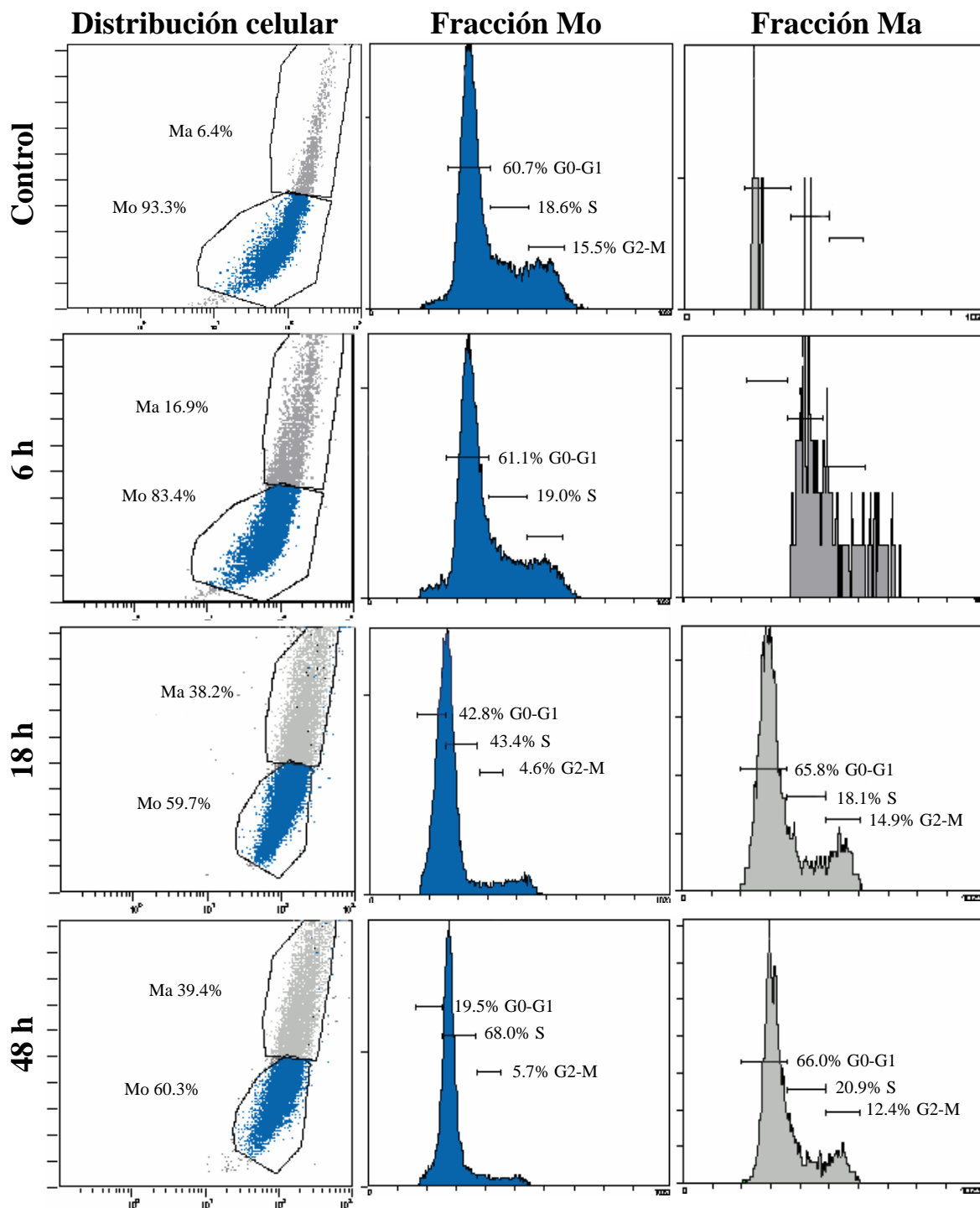


Figura 27.- Citometría de flujo de células THP-1 controles o infectadas con *C. famata* y analizadas 6, 18 o 48 h después de la infección. En la primera columna se muestran las dos poblaciones celulares: células con características de monocitos (Mo) ó de macrófagos (Ma) en células controles ó infectadas. Las columnas central e izquierda recogen la distribución del ciclo celular de la fracción Mo y de la fracción Ma, respectivamente, de un cultivo control o infectado con *C. famata*. La muestra control es representativa de los evaluados a los diferentes tiempos (6, 18 y 48 h).

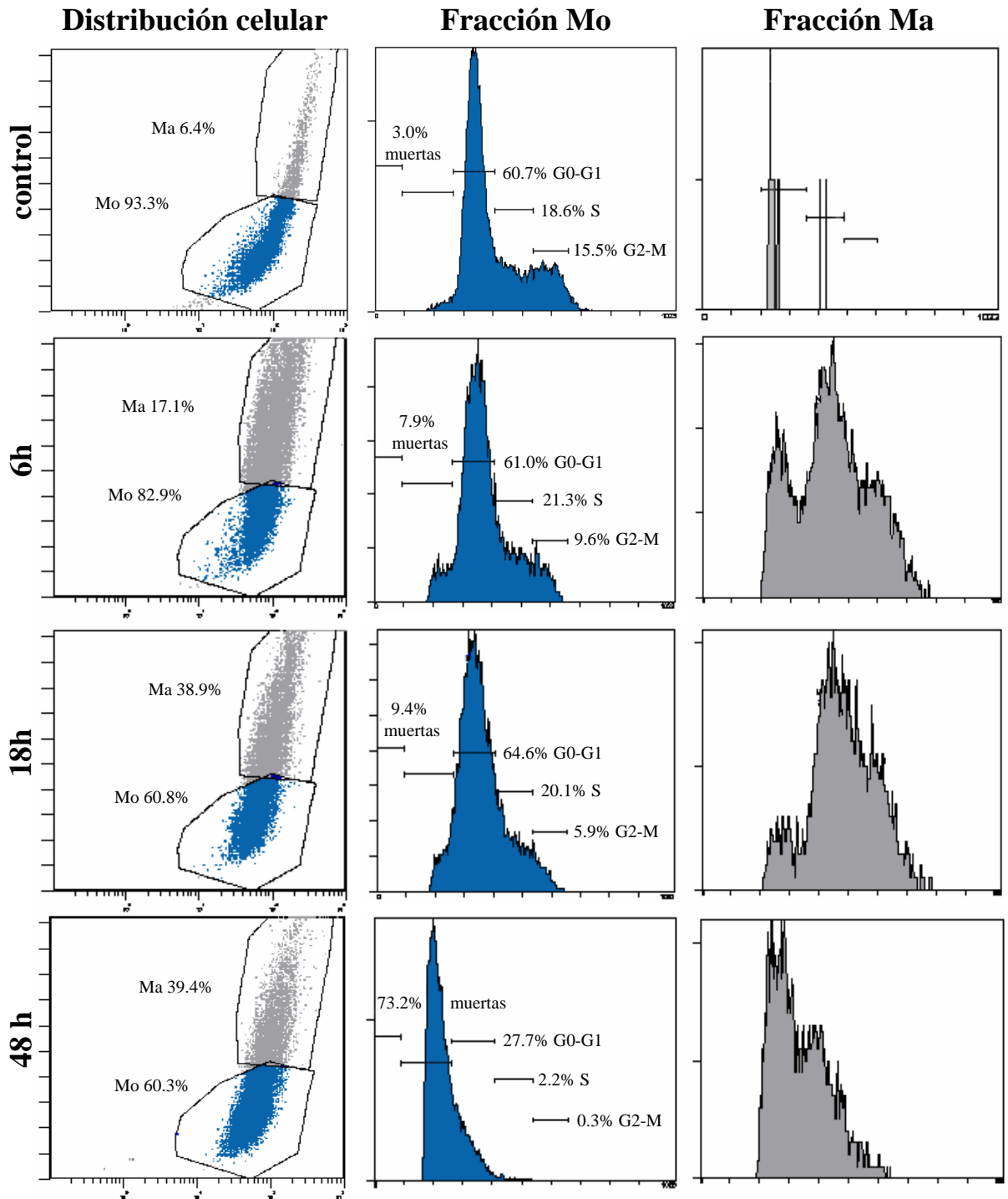
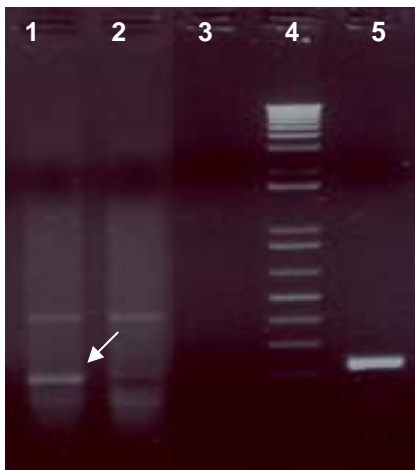
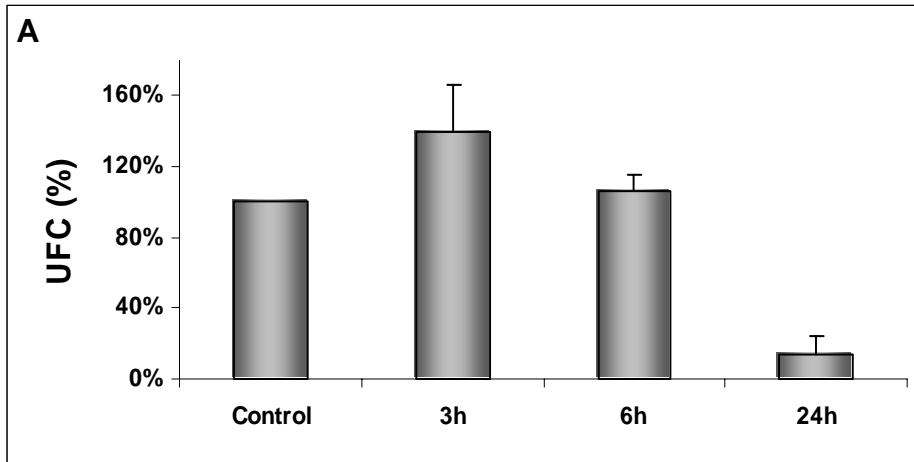


Figura 29.- Citometría de flujo de células THP-1 controles o infectadas con *C. glabrata* y analizadas 6, 18 o 48 h después de la infección. En la primera columna se muestran las dos poblaciones celulares: células con características de monocitos (Mo) o de macrófagos (Ma) en células controles o infectadas con *C. glabrata*. Las columnas central e izquierda recogen la distribución del ciclo celular de la fracción Mo y de la fracción Ma, respectivamente, de un cultivo control o infectado. La muestra control es representativa de los controles evaluados a los diferentes tiempos (6, 18 y 48 h).



Carril 1: células HeLa infectadas
Carril 2: control sin infectar
Carril 3: control negativo
Carril 4: marcadores de peso molecular conocido
Carril 5: extracto control de ADN de *C. famata*

Figura 31.- A: Presencia de ADN de *C. famata* en extractos de células HeLa expuestas durante 3 h a la levadura y procesadas para PCR 3 días después de la infección. Se puede observar una banda de 237 pb correspondiente a ADN genómico de *C. famata* (flecha). **B:** UFC (%) formadas a partir de la siembra de los lisados obtenidos a tiempos concretos después de la infección con *C. famata* de cultivos de células HeLa.

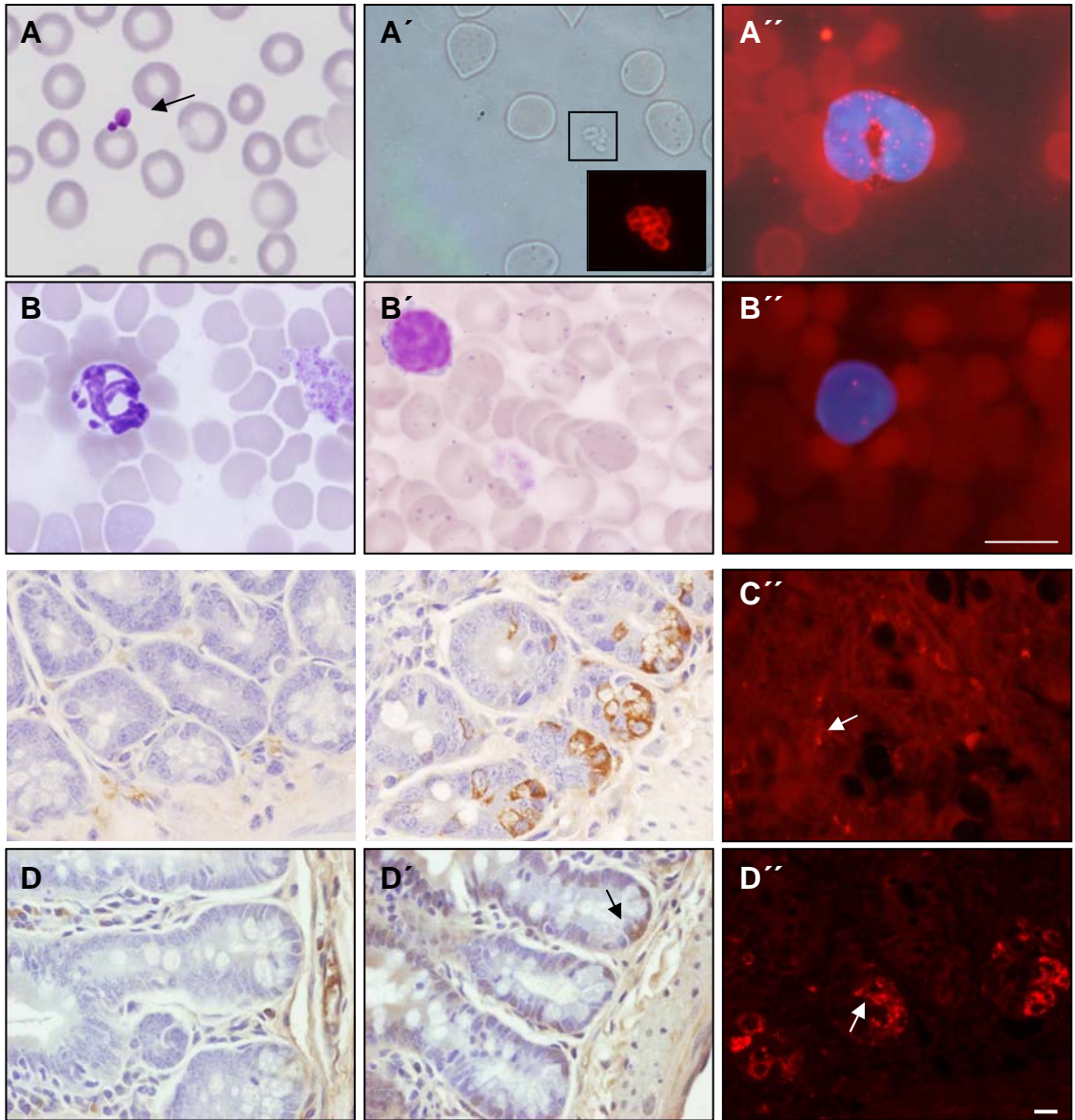


Figura 32. Ratones Balb/C infectados con 2×10^8 UFC de *C. famata* por vía i.p. y analizados 24 h (A-A'', C-C'') o 90 días (B-B'', D-D'') después de la infección. Los extendidos sanguíneos muestran levaduras bien adheridas a eritrocitos (flecha) (A) o entre las células sanguíneas (A') que reaccionan positivamente al anticuerpo para *C. famata* (A', recuadro) y estructuras similares a plaquetas pero de mayor tamaño (B). A'': neutrófilo presentando puntos discretos fluorescentes. B', B'': extendidos sanguíneos de un ratón control sin infectar. A, B, B': tinción con solución de May-Grünwald-Giemsa; A': contraste de fases; A' recuadro, A'', B'': inmunofluorescencia indirecta para *C. famata*. C-C'' y D-D'': Secciones histológicas de intestino procedentes de ratones infectados con *C. famata*. Inmunohistoquímica (C', D') e inmunofluorescencia (C'', D'') mostrando células del epitelio intestinal (flechas) que reaccionan positivamente al antisero para *C. famata*. La inmunoperoxidasa se reveló con DAB y la inmunofluorescencia con anti-IgG acompañado a Alexa-594. C, D: Controles negativos procesados para inmunohistoquímica (inmunoperoxidasa) sin anticuerpo primario. Barra de escala: 10 μ m.

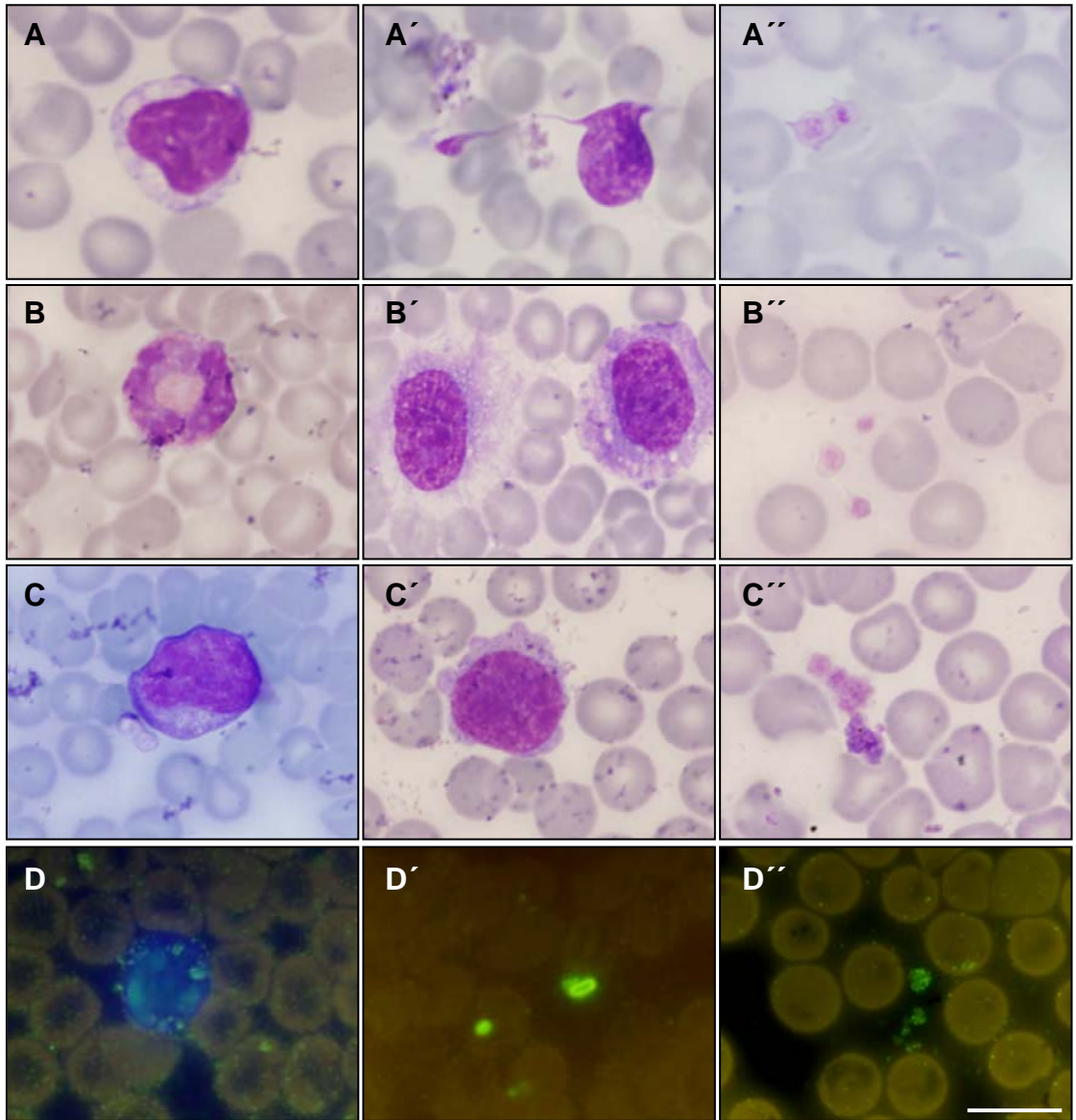


Figura 33.- Extendidos de sangre de los ratones inmunosuprimidos nu/nu infectados con *C. famata* por vía i.p. (A-A'') o i.v. (B-B'' y D-D'') o con *C. glabrata* por vía i.v. (C-C'') y sacrificados 24 h después de la inoculación. En la primera columna (A,B,C) se pueden observar leucocitos con punteado intracitoplasmático que podrían corresponder a levaduras incorporadas por dichas células. La columna central (A',B',C') muestra linfocitos y monocitos con morfologías alteradas ocasionadas por el proceso de infección. En la columna de la derecha (A'',B'',C'') se muestran estructuras similares a plaquetas que se encuentran entre los eritrocitos. D-D'': inmunofluorescencia indirecta para *C. famata* revelada con anti-IgG acompañado a Alexa-488 en la que se observan punteados discretos en el interior de los leucocitos o levaduras enteras o parcialmente degradadas adheridas a eritrocitos o dispersas entre las células sanguíneas. A-C'': tinción general con May-Grünwal-Giemsa. Barra de escala: 10 µm.

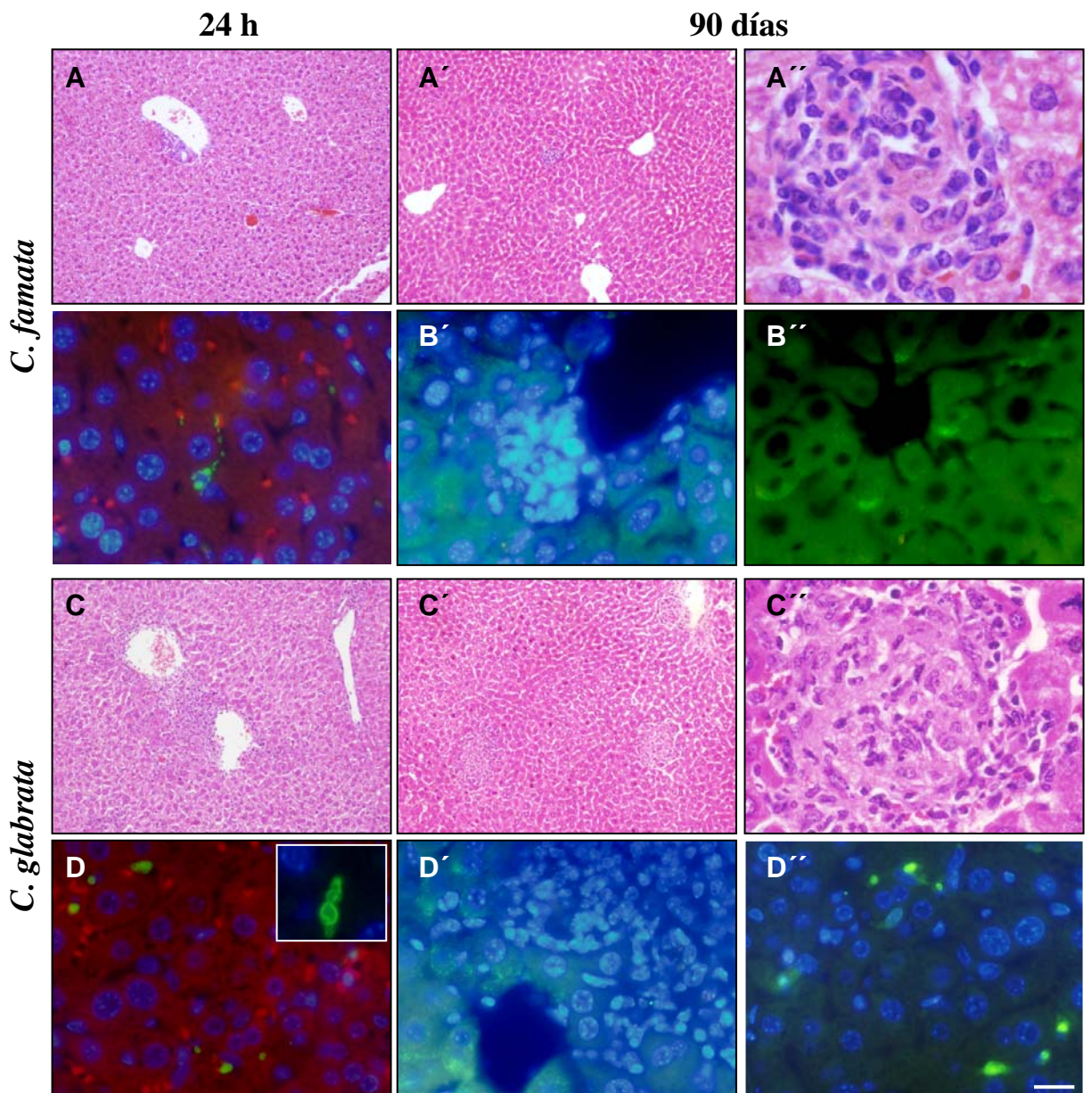


Figura 34. Secciones histológicas de hígado de ratones nu/nu infectados con 2×10^8 UFC de *C. famata* o *C. glabrata* por vía i.v. y analizados 24 h o 90 días después de la infección. La tinción con hematoxilina-eosina muestra la acumulación de células linfoides alrededor de los vasos sanguíneos 24 h después de la infección (**A, C**). También se observan de granulomas 90 días después de la infección con *C. famata* (**A'-A''**) o con *C. glabrata* (**C'-C''**). **B-B''** y **D-D''**: inmunofluorescencia indirecta para *C. famata* o *C. glabrata* revelada anti-IgG de conejo acomplejado a Alexa-498 (verde) y contrateñidas con H-33258 (azul). 24 h después de la infección se observan levaduras enteras en el parénquima hepático, mientras que sólo se aprecian puntos fluorescentes en el citoplasma de algunas células 90 días después de la infección. Barra de escala: 10 μ m.

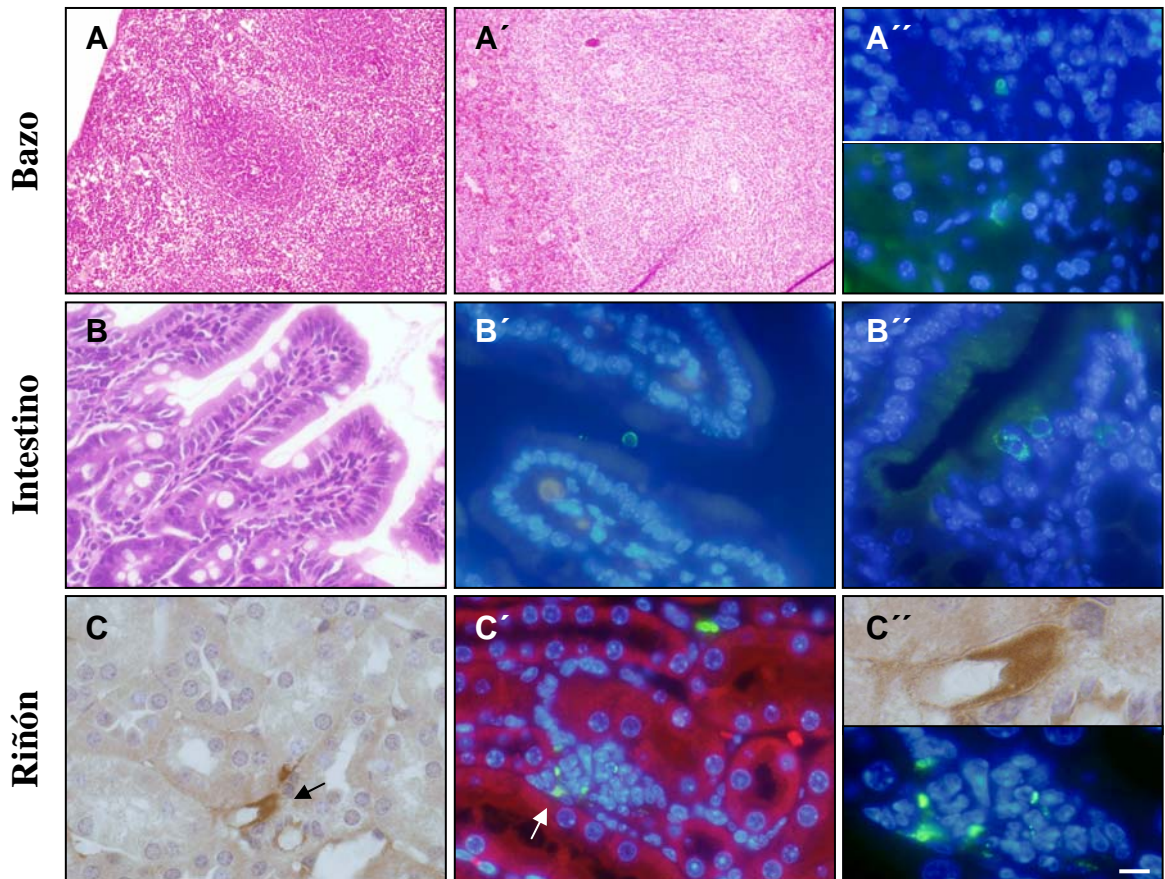


Figura 35. Secciones histológicas de tejidos de ratones nu/nu infectados con 2×10^8 UFC de *C. famata* (bazo e intestino) o *C. glabrata* (riñón) por vía i.v. y analizados 90 días después de la infección. En el bazo, se observa un elevado número de folículos linfoides (A´) respecto al de los controles (A) y en los que se aprecia reacción positiva al antisuero para *C. famata* (fluorescencia verde). El intestino de los ratones infectados muestra una estructura histológica normal (B), si bien también se observan levaduras bien adheridas a los enterocitos (B´) o en el interior de los mismos (B´´). El riñón de los ratones infectados con *C. glabrata* no presenta modificaciones histológicas visibles pero si se observan células que reaccionan positivamente al antisuero, tanto mediante inmunohistoquímica (C-C´) como en inmunofluorescencia (C´-C´´). Barra de escala: 10µm.

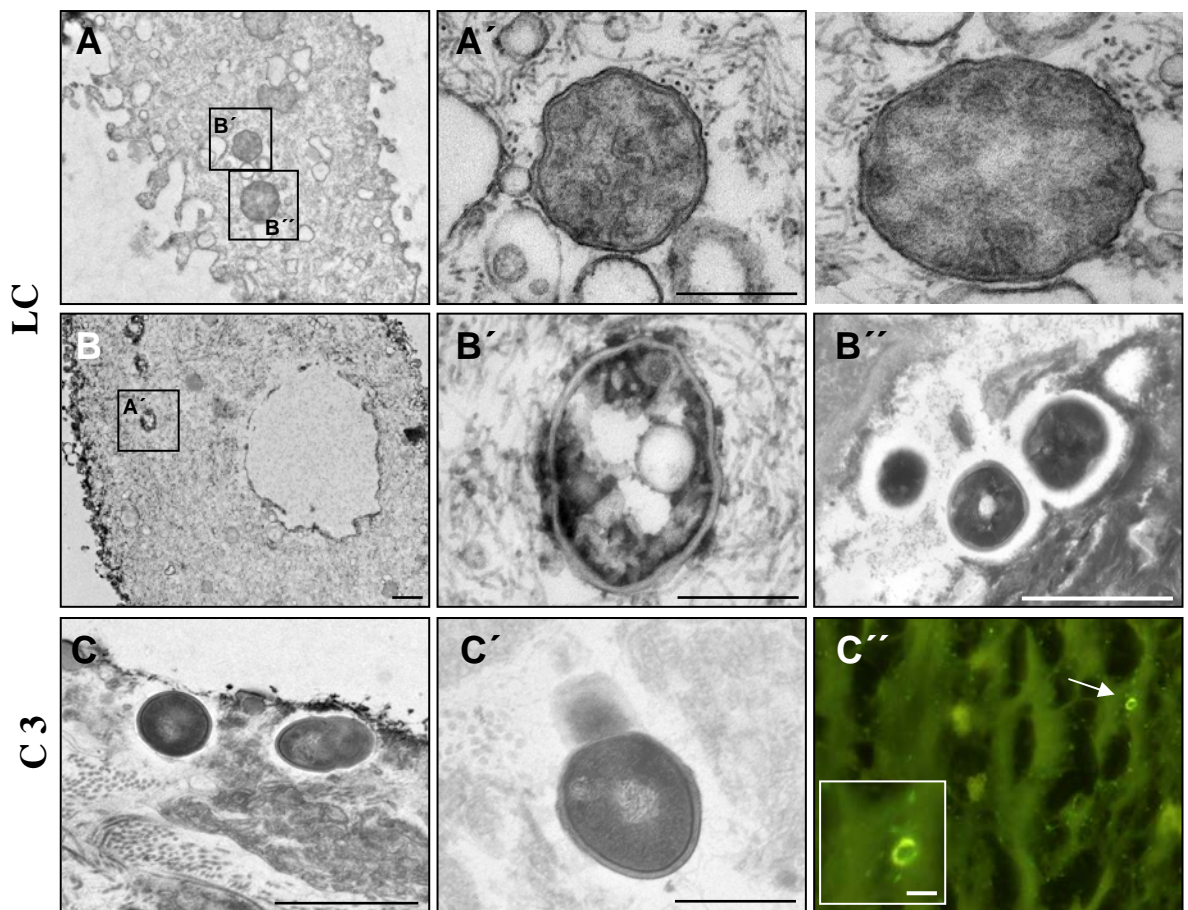


Figura 36.- Microscopía electrónica de transmisión de exudado conjuntival de un paciente diagnosticado de retinopatía Azoor (**A-A´´**, **B-B´´**) y de un paciente diagnosticado de enfermedad de Cronh (muestra C3) (**C-C´´**). Se observan células en necrosis con levaduras en su interior (**A-A´´**, **B-B´´**) y en el exterior de las células (**B´´**). Estructuras semejantes a levaduras (**C-C´´**) en TEM y en inmunofluorescencia (**C´´**). Barra de escala: 1µm.

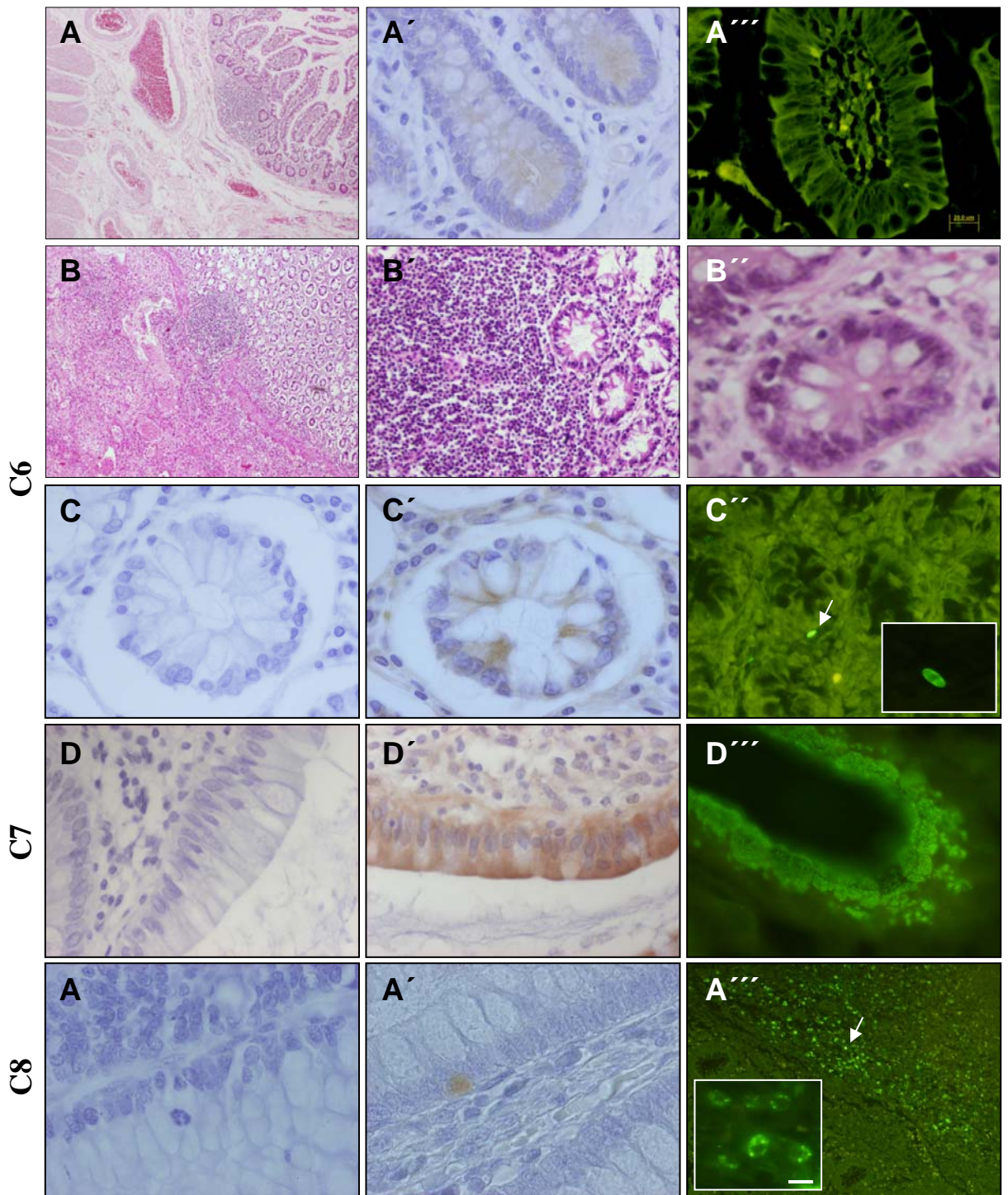


Figura 37. Secciones histológicas de intestino, región del ileon, de un individuo control (A-A') y de pacientes afectados de enfermedad de Crohn (C6, C7, C8) y en los que se aprecia una amplia inflamación de la mucosa (B-B'). En estos pacientes se observa la presencia de la levadura mediante inmunoperoxidasa (C', D', E') o inmunofluorescencia (C'', D'', E'') mientras que no se detecta en el intestino del individuo control (A'). C, D, E: controles negativos (sin antisuero para *C. famata* de los casos analizados mediante inmunoperoxidasa). Barra de escala: 10µm.