



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la salud

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Proyecto de investigación

Respuesta innata del queratinocito en la candidiasis cutánea.

Línea de investigación:

Diseño y Producción de Biológicos

Comunicación idónea de resultados para obtener el grado de Maestra en
Ciencias Farmacéuticas.

Presenta

Fernández López Silvia Elena

Comité Tutorial:

M. en C. Alejandro Palma Ramos
Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez
Dra. Laura Estela Castrillón Rivera

Diciembre 2016



Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la salud
Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Respuesta innata del queratinocito en la candidiasis cutánea.

Comité tutorial:

M. en C. Alejandro Palma Ramos _____

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez _____

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera _____

QFB. Fernández López Silvia Elena _____

2143808344



Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la salud

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Respuesta innata del queratinocito en la candidiasis cutánea.

Jurado

Presidente Dra. Julieta Luna Herrera _____

Vocal Dra. María Eugenia Castro Mussot _____

Secretario M. en C. Alejandro Palma Ramos _____

Resumen

La candidiasis es una infección causada por levaduras del género *Candida* que afecta la piel, uñas, mucosas y el tracto gastrointestinal, y en algunas ocasiones se puede manifestar de manera sistémica. Generalmente al tomar muestra de pacientes con candidiasis cutánea se aísla principalmente *Candida albicans*, pero se pueden llegar a encontrar otras especies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, etc. Aunque *C. albicans* es la especie más aislada, últimamente *C. glabrata* se aísla cada vez con mayor frecuencia ya sea en candidiasis vaginales o en micosis sistémicas graves. En México existen poco trabajos que demuestren la incidencia de *Candida* en la piel, y aunque las candidiasis superficiales no comprometen contra la vida del paciente son fáciles de tratar y son frecuentes, si pasan a ser sistémicas de evolución aguda o crónica llegan a ser infecciones graves; existe poca información sobre la expresión de receptores y citocinas asociadas a las infecciones cutáneas por *Candida*, por lo que en este trabajo se pretendió estudiar a los queratinocitos humanos infectados por *Candida albicans* y *Candida glabrata* para determinar su importancia durante la infección, debido a la importancia que tiene la resistencia innata y del papel que juegan los queratinocitos como células inmunocompetentes, se esperó que la exposición de *C. albicans* y *C. glabrata* a estas células generarán la liberación de quimiocinas CCL2 / MCP-1, CCL5 / RANTES, CXCL10 / IP-10, y CXCL8 / IL-8, y citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , GM-CSF, y TNF- α) y receptores tipo Toll (TLRs) que pueden ser mediadores y efectores en la respuesta inmunitaria al contacto con estas levaduras. Para poder medir la expresión y producción de citocinas y quimiocinas se utilizaron los métodos de RT-qPCR y ELISA, y para la detección de la estimulación de los TLRs se llevaron a cabo estudios de confocal; además se hicieron tinciones de citoesqueleto para definir si las levaduras se interiorizaban a la célula. Al momento de revisar los RT-qPCR se compararon los resultados de las gráficas de las levaduras vivas de *C. albicans* y *C. glabrata* respectivamente y se observó que hay una mayor expresión de quimiocinas MCP-1 e IL-8 en la infección, sin embargo las levaduras de *C. albicans* alcanzaron valores mucho más altos, de la misma forma se demostró que la expresión de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1- β y TGF- β) es mayor en la cepa viva de *C. albicans* para los tres casos, mientras que TGF- β no se expresa significativamente con levaduras de *C. glabrata*. Pero sucede algo interesante al momento de comparar los resultados obtenidos por medio del RT-PCR con las lecturas de concentraciones de estas citocinas y quimiocinas por medio del método de ELISA, ya que en el caso de las quimiocinas en efecto si se alcanzan concentraciones altas de IL-8 y más altas de MCP-1 en la infección, sin embargo se alcanzaron concentraciones similares de MCP-1 en las dos levaduras tanto vivas como muertas; esto puede ocurrir debido a los factores de virulencia con los que cuentan las levaduras de la familia de *Candida*. Al final del protocolo se llegó a la conclusión de que la evaluación de la expresión de los TLRs en el modelo experimental propuesto permitió reconocer el papel principal del TLR6 en la activación del queratinocito por *Candida*, además de que se observó que induce la quimiotaxis por la síntesis de IL-8 y MCP-1 favoreciendo el reclutamiento de monocitos y polimorfonucleares neutrófilos, también se producen citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β como resultado de la infección. En las tinciones de citoesqueleto se confirmó que las levaduras se internalizan en los queratinocitos, apreciándose cambios en las fibras de actina que sufren un rearrreglo en la cinética de infección.

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a:



La Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco y a la coordinación y profesores del programa de Maestría en Ciencias Farmacéuticas.



El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca para la realización de mis estudios de posgrado.



Al instituto Politécnico Nacional, concretamente a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas por su apoyo para la realización del análisis por microscopia confocal.

Dedicatoria

Papá y mamá, con todo mi amor, admiración y respeto les agradezco que siempre me motivaran y apoyaran a lograr mis sueños, incluso en los momentos en donde yo ya no veía salida, por hacer todo en la vida para que yo llegara hasta aquí, los amo y sin ustedes no hubiera logrado esto.

A mis hermanos Jorge y Javier por siempre alentarme a seguir adelante.

A mi ahora esposo Santino, gracias por siempre darme palabras de ánimo, por apoyarme en todo momento a cumplir mis metas y por hacerme reír en los momentos de desesperación, te amo.

A mi suegra Miriam, por estar al pendiente de mi en toda esta aventura, por brindarme conocimientos y experiencias únicas, y por quererme tanto.

A mis profesores Jorge, Alejandro y Laura por brindarme apoyo durante todo este proceso de aprendizaje, por aconsejarme y corregirme, y sobre todo por compartir sus conocimientos conmigo.

A mis amigos del laboratorio Gisela, Alfonso, Zukeidy y Marco, por hacerme estos dos años de posgrado más amenos, por ayudarme cada vez que los necesitaba, por las risas y las locuras que hacíamos.

A todos gracias por estar en mi vida.

Índice.....	7
Abreviaturas.....	9
Índice de gráficas.....	10
Índice de figuras.....	11
1. Introducción.....	12
2. Marco teórico.....	13
2.1 <i>Candida spp.</i>	13
2.1.1 <i>Candida albicans</i>	15
2.1.2 <i>Candida glabrata</i>	15
2.2 Pared celular de los hongos.....	16
2.3 Candidiasis.....	17
2.3.1 Candidiasis cutánea.....	18
2.4 Estructura y función de la piel.....	18
2.4.1 Epidermis.....	19
2.4.2 Dermis.....	20
2.5 Respuesta inmune innata de la piel.....	21
2.6 Los queratinocitos humanos como células participantes de la respuesta innata.....	22
2.7 Citocinas pro-inflamatorias.....	22
2.8 Receptores tipo Toll.....	23
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	24
5. Objetivos.....	25
5.1. Objetivo general.....	25
5.2. Objetivos específicos.....	25
6. Materiales y métodos.....	25
a) Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT.....	25
a.1) Tripsinización de células.....	26
b) Cultivo de microorganismo.....	26
c) Suspensión del microorganismo.....	27
d) Determinación de la fase logarítmica del crecimiento.....	27
e) Ensayo de infección celular.....	27
f) Microscopía confocal.....	27

g) Cuantificación de citocinas.....	28
h) Aislamiento de mRNA y RT-PCR para los fragmentos de los genes de citocinas proinflamatorias y receptores tipo Toll.....	28
i) Tinción de citoesqueleto.....	29
j) Interpretación de resultados.....	29
7. Resultados.....	30
a) Preparación y estandarización de las técnicas para cultivos celulares.....	30
b) Determinación de la fase logarítmica del crecimiento.....	30
c) Ensayo de infección celular, aislamiento de mRNA y RT – qPCR.....	30
d) Cuantificación de citocinas.....	37
e) Microscopia confocal.....	40
f) Tinción del citoesqueleto.....	44
8. Discusión.....	46
9. Conclusiones.....	48
10. Perspectivas del proyecto.....	49
11. Bibliografía.....	49
12. Anexos.....	55
1) 1X Regulador de recubrimiento (Coating Buffer).....	55
2) Anticuerpo de captura.....	55
3) 1X Diluyente ELISA/ELISPOT.....	55
4) Regulador de lavado (PBS-TWEEN 20 pH 7.4).....	55
5) Soluciones estándar concentradas.....	55
6) Enzima Avidina-HRP (250X).....	56
7) Anticuerpo de detección.....	56

Abreviaturas.

- ALS.....Secuencia de aglutinina
- C.....Candida
- CCL.....Ligando de quimiocina (C-C)
- CD-8.....Cluster de diferenciación 8
- cDNA.....Ácido desoxirribonucleico complementario
- CXCL.....Ligando de quimiocina (C-L-C)
- D-MEM/F12.....Modificación de medio basal medium Eagle: Mezcla Nutritional
- DC-SIGN.....Receptor de lectina tipo C en células dendríticas
- DNA.....Ácido Desoxirribonucleico
- ELISA.....Ensayo de inmunoabsorbencia ligado a enzimas
- FITC.....Isotiocianato de fluoresceína
- GM-CSF.....Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- HaCaT.....Línea celular de queratinocitos humanos conocidos inmortalizados
- Ig.....Inmunoglobulina
- IL.....Interleucina
- INF.....Interferón gamma
- IP-10.....Proteína inductora de Interferón gamma
- KD.....Kilodaltones
- MBL.....Lectina de unión a manosa
- MCP1.....Proteína quimioattractora de monocitos
- mRNA.....Ácido Ribonucleico mensajero
- NF-KB.....Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- NK.....citotóxica Natural
- PBS.....Buffer fosfato salino
- PMA.....Forbol-miristato-acetato
- RANTES.....Quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T
- RNA.....Ácido ribonucleico
- RQ.....Expresión Relativa
- RT-qPCR.....Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
- SIDA.....Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- Spp.....Especies
- TDT.....Desoxinucleotidil transferasa terminal
- TGF- βFactor de crecimiento transformante beta
- TLRs.....Receptores tipo Toll
- TNF- αFactor de necrosis tumoral alfa
- TRITC.....Isotiocianato de tetrametilrodamina

Índice de gráficas.

Gráfica 1. Curvas de crecimiento de levaduras de <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i> hasta las 24 horas en medio Sabouraud.....	30
Gráfica 2.1. Expresión relativa de quimiocinas MCP-1 y IL-8 en queratinocitos HaCaT infectados con la cepa viva de <i>C. albicans</i> ATCC 10231. Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	31
Gráfica 2.2. Expresión de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , y TGF- β en queratinocitos HaCaT infectados con la cepa viva de <i>C. albicans</i> ATCC 10231. Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	32
Gráfica 2.3. Expresión de receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) en queratinocitos HaCaT infectados con la cepa viva <i>C. albicans</i> ATCC 10231. Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	32
Gráfica 3.1. Expresión relativa de quimiocinas MCP-1 y IL-8 en queratinocitos HaCaT infectados con de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 muerta por calor. Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	33
Gráfica 3.2. Expresión de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL- 1 β , y TGF- β en queratinocitos HaCaT infectados con la cepa muerta por calor de <i>C. albicans</i> ATCC 10231. Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	33
Gráfica 3.3. Expresión de receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) en queratinocitos HaCaT infectados con la cepa muerta por calor de <i>C. albicans</i> ATCC 10231. Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	34
Gráfica 4.1. Expresión de quimiocinas MCP-1 y IL-8 en queratinocitos HaCaT infectados con la levadura viva de <i>C. glabrata</i> (aislado clínico). Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	35
Gráfica 4.2. Expresión de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL- 1 β , y TGF- β en queratinocitos HaCaT infectados con la levadura viva de <i>C. glabrata</i> (aislado clínico). Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	35
Gráfica 4.3. Expresión de receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) en la levadura muerta de viva de <i>C. glabrata</i> (aislado clínico). Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	36
Gráfica 5.1. Expresión de quimiocinas MCP-1 y IL-8 en queratinocitos HaCaT infectados con la levadura muerta por calor de <i>C. glabrata</i> (aislado clínico). Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	36
Gráfica 5.2. Expresión de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL- 1 β y TGF- β en queratinocitos HaCaT infectados con la levadura muerta por calor de <i>C. glabrata</i> (aislado clínico). Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	37
Gráfica 5.3. Expresión de receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) en queratinocitos HaCaT infectados con la levadura muerta por calor de <i>C. glabrata</i> (aislado clínico). Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.....	37
Gráfica 6.1. Cuantificación de la citocina pro-inflamatoria TNF- α en queratinocitos HaCaT infectados con las levaduras vivas y muertas de <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	38

Gráfica 6.2. Cuantificación de la citocina pro-inflamatoria IL-1 β en queratinocitos HaCaT infectados con las levaduras vivas y muertas de *C. albicans* y *C. glabrata*.....39

Gráfica 6.3. Cuantificación de la citocina pro-inflamatoria IL-6 en queratinocitos HaCaT infectados con las levaduras vivas y muertas de *C. albicans* y *C. glabrata*.....39

Gráfica 7.1. Cuantificación de la quimiocina IL-8 en queratinocitos HaCaT infectados con las levaduras vivas y muertas de *C. albicans* y *C. glabrata*.....40

Gráfica 7.2. Cuantificación de la quimiocina MCP-1 en queratinocitos HaCaT infectados con las levaduras vivas y muertas de *C. albicans* y *C. glabrata*.....40

Índice de figuras.

Figura 1. Distribución de las especies de *Candida* que producen candidemias en un estudio publicado en España.....14

Figura 2. Árbol filogenético de *C. albicans* y *C. glabrata*.....15

Figura 3. Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular de *C. albicans*...16

Figura 4. Pústulas que coalescen para formar lagos de pus en la espalda.....18

Figura 5. Estructura y tipos celulares de la epidermis.....20

Figura 6. Cultivo de queratinocitos (Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT) en medio D-MEM/ F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Ham)).....26

Figura 7. Marcaje por microscopía confocal de los receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos HaCaT infectados con levaduras vivas de *C. albicans*, de las 2 a las 10 hrs.....41

Figura 8. Marcaje por microscopía confocal de los receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos HaCaT infectados con *C. albicans* muerta por calor, de las 2 a las 10 hrs.....42

Figura 9. Marcaje por microscopía confocal de los receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos HaCaT infectados con *C. glabrata*, de las 2 a las 10 hrs.....43

Figura 10. Marcaje por microscopía confocal de los receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos HaCaT infectados con *C. glabrata* muerta por calor, de las 2 a las 10 hrs.....44

Figura 11. Rearreglo de las fibras de actina de los queratinocitos HaCaT al infectarse con levaduras vivas y muertas de *C. albicans*.....45

Figura 12. Rearreglo de las fibras de actina de los queratinocitos al infectarse con levaduras vivas y muertas de *C. glabrata*.....45

1. Introducción

La candidiasis es una infección causada por levaduras del género *Candida*, en especial *Candida albicans*, que afecta la piel, uñas, mucosas y el tracto gastrointestinal, raramente manifiesta una diseminación sistémica.¹ La especie aislada más frecuente en candidiasis cutánea es *C. albicans* otras especies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* o *C. guilliermondii* intervienen en estas infecciones.² La candidiasis se manifiesta con frecuencia en la piel, representando del 2 al 3% de las consultas dermatológicas; siendo más frecuente en la tercera y cuarta décadas de la vida y en los extremos de la misma.³

Aunque *C. albicans* sigue siendo la especie mayormente aislada de materiales clínicos, *C. glabrata* se aísla cada vez con mayor frecuencia, ya sea como agente causal de candidiasis vaginal o de micosis sistémicas graves y candidemias en los enfermos críticos, inmunodeprimidos y pacientes con neoplasias hematológicas o sólidas.⁴

En México existen pocos trabajos de investigación que demuestren la frecuencia o incidencia de *Candida* en la piel; sin embargo, Arenas y su grupo realizaron un estudio retrospectivo a 10 años con 581 pacientes geriátricos con micosis superficiales de los cuales 116 (19%) tuvieron infecciones por *Candida* y *C. albicans* fue la levadura más aislada⁵; Sobel y Chaim sugieren que el aumento de la incidencia de *C. glabrata* en la candidiasis se debe, en parte, a la resistencia que ocasiona la autoprescripción y el gran uso de tratamientos antifúngicos con compuestos azólicos, orales o tópicos de corta duración.⁶

C. albicans y *C. glabrata* son miembros de la micobiota de la piel humana, sin embargo al presentarse algunos estados de inmunodeficiencia pueden causar infecciones cutáneas⁷. *C. albicans* tiene varios atributos de virulencia para colonizar el huésped y ocasionar daño de forma directa, al activar, resistir o desviar los mecanismos de defensa del mismo.⁸ Los factores de virulencia expresados o requeridos por el microorganismo para causar infección pueden variar según el tipo, el sitio y la naturaleza de las defensas del huésped y depende del equilibrio entre el estado inmunológico del hospedador y de los factores de virulencia expresados por el hongo. Por lo que, durante una infección se establecen complejas relaciones entre el sistema inmunitario del hospedador y las diferentes especies de *Candida*, que van a determinar el desarrollo de la infección.

Los principales componentes de la respuesta inmunológica frente a *Candida spp.* son: 1) Inmunidad innata por neutrófilos y monocitos, con el reconocimiento de las levaduras, hifas y pseudohifas por una serie de receptores como los TLRs, para β -glucanos y α -mananos, desencadenando una respuesta que lleva a la destrucción de los microorganismos por mecanismos oxidativos y no oxidativos; 2) Activación del complemento por las vías clásica, alterna y de la lectina, gracias a la proteína MBL, facilitando la fagocitosis del microorganismo; 3) Fagocitosis de las esporas por parte de células dendríticas que inducen una respuesta celular Th1; las hifas

desencadenan una respuesta de los linfocitos Th2. Las células NK inducen la actividad anti-*Candida* en los fagocitos, mediante la síntesis de IFN- γ .^{9,10}

Debido a la importancia que tiene la resistencia innata y del papel que juegan los queratinocitos como células inmunocompetentes, se espera que la exposición de *C. albicans* y *C. glabrata* a estas células generen la liberación de quimiocinas CCL2 / MCP-1, CCL5 / RANTES, CXCL10 / IP-10, y CXCL8 / IL-8, y citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , GM-CSF, y TNF- α) que pueden ser mediadores y efectores en la respuesta inmunitaria al contacto con estas levaduras.¹¹

2. Marco teórico

2.1 *Candida spp.*

El género *Candida spp.* ha sido clasificado en el orden *Cryptococcales*, perteneciente al grupo de los *Deuteromycetes* u hongos imperfectos. Dicho grupo comprende un conjunto importante de hongos en los que no se ha descrito fase sexual, reproduciéndose de modo asexual mediante la formación de blastosporas.

Candida es un microorganismo presente en pequeñas cantidades en la microflora de las superficies de la mucosa y la piel de aproximadamente el 50% de huéspedes sanos.¹² Estos microorganismos generalmente son inofensivos pero pueden convertirse en patógenos en pacientes con inmunodeficiencia, tales como el SIDA, causando infecciones sistémicas potencialmente mortales.¹³

Por lo que las especies de *Candida* constituyen la segunda causa más frecuente de las infecciones por hongos en todo el mundo¹⁴, siendo así las infecciones fúngicas severas más comunes en las unidades de cuidado intensivo; por lo que las candidemias representan el cuarto agente con mayor incidencia de infecciones del torrente sanguíneo en pacientes hospitalizados en los Estados Unidos¹⁵ y por consiguiente un motivo importante de mortalidad; son un grave problema en neonatos y de adultos, y se estima que del 33-55% de todos los episodios, se producen en las unidades de cuidados intensivos. En la mayoría de los casos, las candidemias tienen un origen endógeno, siendo causada por levaduras pertenecientes a la micro flora humana, en tales casos, el tracto intestinal es el principal portal de entrada. Las condiciones más importantes que predisponen a la candidiasis invasiva y la candidemia en pacientes en el área de cuidados intensivos son la cirugía abdominal, catéteres intravasculares, insuficiencia renal aguda, nutrición parenteral, administración de antibióticos de amplio espectro, el uso de corticosteroides, la colonización de la mucosa por *Candida* y una estancia prolongada.^{16,17}

El género *Candida* incluye aproximadamente 150 especies identificadas. Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis*, de las cuales *C. albicans* es la más recurrente en un 50%.¹⁸

Durante las últimas dos décadas, la mayoría de las instituciones han informado

de un cambio progresivo de las especies de *Candida* que causan las candidemias; inicialmente la gran mayoría de los aislamientos fueron de *C. albicans*, pero en los últimos años esto a cambiado ya que cerca del 50% de episodios han sido causadas por otras especies de *Candida*.¹⁶ En la figura 1, se muestra que en el estudio realizado por Almirante et al., el 51% de los episodios de candidemias fueron causadas por *C. albicans*, el 23% por *C. parapsilosis*, el 10% en *C. tropicalis* y el resto de casos por especies tales como *C. glabrata* o *C. krusei*, en los cuales la resistencia a fluconazol es muy común.^{19,20,21} Lo que confirma, que casi el 50% de los casos son causados por otras especies de *Candida*; y es importante mencionar que la mortalidad global es mayor en los pacientes con especies diferentes a *albicans* que en aquellos con *C. albicans* en infecciones del torrente sanguíneo^{22,23}

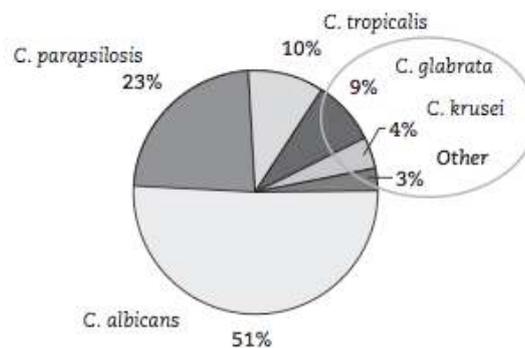


Figura 1. Distribución de las especies de *Candida* que producen candidemias en un estudio publicado por Almirante et al. de Barcelona, España.²³

Las razones en la prevalencia de especies de *Candida* no están claras, pero el comprender su heterogeneidad debido a las diferencias filogenéticas entre ellas, nos ayuda a explicarlo. Las especies más estrechamente relacionadas son *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* mientras que *C. glabrata* está más relacionada con *Saccharomyces cerevisiae*.²

Estas cepas poseen factores de virulencia tales como proteasas, fosfolipasas, aglutininas y la formación de biopelículas, que permiten la producción de organismo difundirse por vía hematológica en huéspedes susceptibles. Las biopelículas son las comunidades microbianas que se adjuntan y se encierran en una matriz de material exopolimérico y son importantes reservorios de organismos, también mantienen su patógenesis al evadir los mecanismos de la respuesta inmune del huésped y resistencia al tratamiento antifúngico. Las proteasas extracelulares producidas por *Candida* digieren o distorsionan las membranas de la célula huésped para facilitar la adhesión y la invasión de los tejidos, además de que dañan a las células y moléculas del sistema inmune del huésped para evadir o resistir el ataque anti-microbiano. Las fosfolipasas hidrolizan uno o más enlaces éster de los glicerolfosfolípidos, los cuales son componentes principales de las membranas celulares, lo que lleva a la lisis celular. La presencia de aglutininas (ALS) que favorecen la colonización tisular como factores de virulencia de la pared celular se encuentran en *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis*, pero no *C. glabrata*.^{24,25,26,27}

2.1.1 *Candida albicans*.

C. albicans normalmente colonizan los seres humanos desde su nacimiento y persiste durante el resto de su vida como comensal en la piel y las vías oral y gastrointestinal, además de la mucosa vaginal.²⁸

C. albicans es la especie más aislada de la candidiasis² y causa una gran variedad de infecciones cutáneas.³ Es un hongo patógeno oportunista de humanos, que en individuos inmunocompetentes es parte de la microbiota normal de las mucosas del organismo. Sin embargo, en condiciones de inmunosupresión temporal o permanente puede causar infecciones sistémicas que ponen en riesgo la vida de los pacientes.²⁹

La patogenicidad de *C. albicans* depende del equilibrio entre el estado inmunológico del hospedador y de los factores de virulencia expresados por el hongo. De esta forma, durante una infección se establecen relaciones complejas entre el sistema inmunitario del hospedador y *C. albicans*, que van a determinar el desarrollo de la infección. Tanto la inmunidad innata como la inmunidad adquirida están implicadas en la resistencia frente a *C. albicans*, siendo necesaria, en primer lugar, la intervención de la respuesta innata.^{3,30}

2.1.2 *Candida glabrata*.

C. glabrata es el segundo agente patógeno más frecuente en los seres humanos después de *C. albicans*, y ambas especies pueden ser aisladas de la mucosa de individuos asintomáticos sanos. En el medio ambiente, ambas especies se encuentran exclusivamente en asociación con los mamíferos, y hablando filogenéticamente, *C. glabrata* y *C. albicans* son muy diferentes (Figura 2) ya que el genoma de 12.3 Mb de *C. glabrata* se compone de 13 cromosomas que tienen un contenido de G+C del 38.8%, la cual es similar a la de *Saccharomyces cerevisiae* (38,3%)³¹, lo que ocasiona que *C. glabrata* esté filogenéticamente más relacionada con *S. cerevisiae* que a *C. albicans*, generándole un conjunto único de mecanismos de virulencia tales como el cambio fenotípico, la formación de pseudohifas, y la actividad de fosfolipasas y adhesinas.³² *C. glabrata* representa aproximadamente el 15% de las infecciones del torrente sanguíneo en todo el mundo.³¹

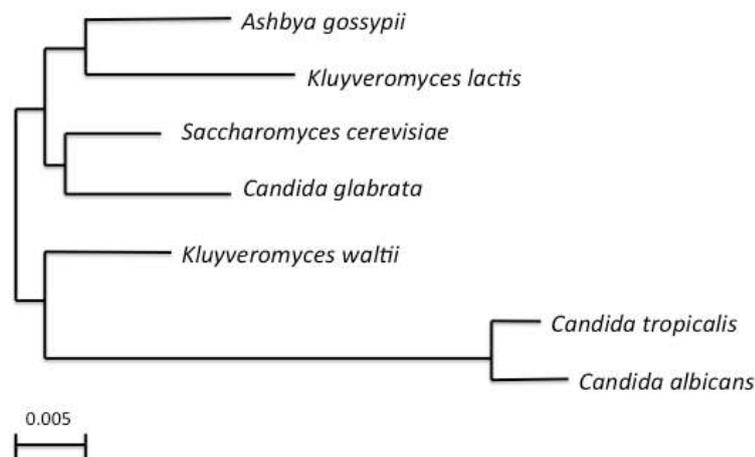


Figura 2. Árbol filogenético de *C. albicans* y *C. glabrata*.³¹

En muchos centros médicos de los Estados Unidos, la principal especie no albicans encontrada en casos de pacientes con *Candida* es *C. glabrata*, estos casos representan de una cuarta parte a un tercio de todos los casos de fungemias; dicha incidencia es multifuncional ya que se ha demostrado que la prevalencia está relacionada con factores como la ubicación geográfica, edad, la población de pacientes estudiados, y el uso de fluconazol como tratamiento antimicótico; este último factor es muy importante ya que se ha encontrado que *C. glabrata* es resistente a fluconazol y esto origina el creciente aumento de fungemias por este microorganismo.^{33,34,35,36}

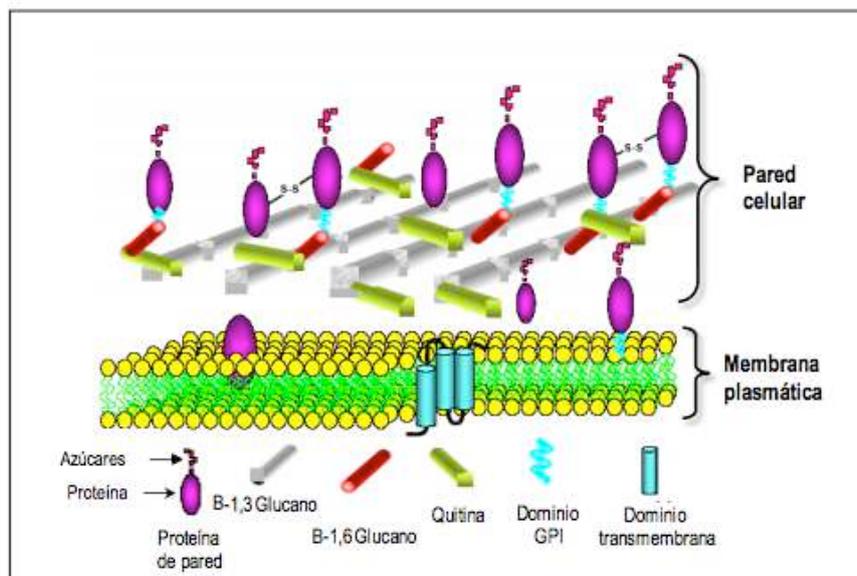


Figura 3. Modelo propuesto para la arquitectura de la pared celular de *C. albicans*.³⁷

C. glabrata es una de las principales especies de *Candida* no albicans aisladas en unidades de cuidados intensivos. En un estudio llevado a cabo en Taiwán, *C. glabrata* fue la segunda especie más común y representó el 30% de los episodios de candidemias.³⁸

2.2 Pared celular de los hongos.

La pared es una estructura esencial para los hongos y su eliminación ya que si se tienen defectos en su formación esto lleva a efectos profundos en el crecimiento y en su morfología, pudiendo causar la muerte celular por lisis. La pared fúngica está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas las cuales tienen diversas funciones, participan en el mantenimiento de la forma celular, intervienen en los procesos de adhesión, protegen a la célula de sustancias extrañas, participan en la absorción de moléculas, transmitiendo señales al citoplasma, sintetizando y remodelando los componentes de la pared. Entre los polisacáridos destacan la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano.^{39 38}

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad que protege a la célula de diferentes tipos de estrés ambiental, entre los que

destacan los cambios osmóticos. Además, la pared celular permite la interacción con el medio externo ya que algunas de sus proteínas son adhesinas, y al unirse con sus receptores, desencadenan una compleja cascada de señales en el interior de la célula. Algunos de sus componentes tienen una alta capacidad inmunogénica.^{38, 39}

2.3 Candidiasis.

Es una micosis primaria o secundaria, la cual se distribuye a nivel mundial, es ocasionada por levaduras endógenas, exógenas, o ambas, oportunistas del género *Candida*, sobre todo por *Candida albicans*; pero pueden estar implicadas otras especies como *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida famata*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, etc.^{2, 40} Este tipo de infección fúngica es la más común respecto a las originadas por hongos en todo el mundo; puede afectar la piel, las mucosas, órganos internos y llegan a producir septicemias.

Las infecciones producidas por *Candida* pueden dividirse en dos categorías: superficiales o mucocutáneas y sistémicas o diseminadas. En las candidiasis superficiales se ven afectadas las mucosas del tracto gastrointestinal, oral o vaginal, por infecciones que en ocasiones presentan un carácter crónico y que, en la mayoría de los casos, suelen resolverse tras un tratamiento antifúngico. Por el contrario, las candidiasis sistémicas o invasivas se producen cuando se encuentran microorganismos en sangre, afectando tejidos, o cuando la infección se ha diseminado y afectado a uno o varios órganos internos; aunque este tipo de infecciones aparecen fundamentalmente en pacientes inmunocomprometidos por diferentes causas.^{41,42} Las candidiasis superficiales son frecuentes, de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, en tanto que las sistémicas de evolución aguda o crónica son generalmente graves.

La distribución geográfica de esta micosis es universal y más de 70% de ellas son producidas por *C. albicans*. Aunque en los últimos años han aumentado los hallazgos de *C. krusei* y *C. glabrata* como agentes infecciosos involucrados en enfermedades sistémicas intrahospitalarias, los cuales son habitualmente resistentes a los compuestos azólicos.⁴³ La figura 4 es un ejemplo de un estudio en donde se compararon las diferentes características de los pacientes y enfermedades, en que contrajeron candidiasis, así como el tipo de *Candida* que se encontró en ellos, como resultado se vio que la mayoría de los casos se originan por *C. albicans*, pero las demás especies también tienen gran incidencia ya que de los 24 pacientes *C. glabrata* fue responsable de un 33% de los casos, *C. tropicalis* un 25%, y *C. parapsilosis* un 17%; estos casos procedían de las unidades de cuidados intensivos en un 50%, unidades de medicina 28%, y las unidades quirúrgicas 22%.⁴⁴

La importancia del estudio de las candidiasis en pacientes con enfermedades subyacente graves o enfermedades críticas radica en las altas tasas brutas de mortalidad que varían de 36% a 63% a nivel mundial.³⁵

2.3.1 Candidiasis cutánea.

La candidiasis cutánea representa del 2 al 3% de la consulta dermatológica y 10 a 15% de las micosis superficiales², se caracteriza por microabscesos epidérmicos, que se producen durante una infiltración de neutrófilos y otras células inflamatorias dentro de la epidermis¹¹. Las lesiones suelen ser pápulas escamosas que progresan a lesiones húmedas erosionadas que a menudo tienen pústulas (Figura 5).



Figura 4. Pústulas que coalescen para formar lagos de pus en la espalda.⁴⁵

En México, la candidiasis urogenital es una entidad nosológica que afecta principalmente al sexo femenino. En 2009 tuvo un índice mujer-hombre de 31:5 y se enfocó en el grupo etario de 25 a 44 años. Presentó una tasa de incidencia por cien mil habitantes a nivel nacional de 269, y las entidades más afectadas por este padecimiento fueron Nayarit con 504 (casos por cien mil habitantes), seguido de Veracruz 503 y Zacatecas 483; la menos afectada fue el DF con una tasa anual de incidencia de 98 por cien mil habitantes.⁴⁶

2.4 Estructura y función de la piel.

La piel es un órgano dinámico con una estructura compleja que da cobertura y protección a los tejidos profundos, algunos autores la definen como una barrera primaria que protege al cuerpo de los microorganismos patógenos que se encuentran en el ambiente o incluso como la interfase que protege el interior del cuerpo de los patógenos externos actuando como uno de los mecanismos protectores más importantes.^{47,48} La superficie de la piel es relativamente inhóspita para el crecimiento de hongos debido a la exposición de luz ultravioleta, las condiciones de baja humedad, y la competencia de la flora bacteriana normal de este sitio, por lo tanto actúa como una barrera a la entrada de los hongos. El estrato córneo se compone de queratina, que la mayoría de los microorganismos no pueden utilizar para la nutrición. Sin embargo, *Candida albicans* y los hongos dermatofitos producen queratinasas, que hidrolizan esta sustancia y facilitan el crecimiento de estos organismos en el propio estrato córneo.

Este sitio superficial protege a los organismos de infección por contacto directo con al menos algunas de las células efectoras del sistema inmune. Aunque los neutrófilos y pocos linfocitos son células presentes normalmente en la dermis,

éstas pueden infiltrarse a la epidermis durante la activación de un respuesta inmunitaria.⁴⁹

La piel está formada por diferentes tipos celulares que desempeñan diversos procesos biosintéticos e inmunológicos, entre estos últimos se encuentran los mecanismos de resistencia innata y adaptativa, que se activan cuando existen agresiones al tejido.⁵⁰

La piel representa el 15% del peso corporal y cubre aproximadamente 1,7 m² en el adulto promedio; desde afuera hacia dentro, se distinguen tres capas de tejido, cuyo origen embriológico es totalmente distinto, perteneciendo cada capa a una capa embriológica diferente:

- La epidermis.
- La dermis o corion.
- El tejido subcutáneo o también denominado hipodermis o subcutis.

2.4.1 Epidermis.

La epidermis, como epitelio de superficie, es un epitelio plano poliestratificado queratinizado con cuatro capas, las diferentes capas constituyen los diferentes estadios en la maduración de los queratinocitos.⁵¹ En la epidermis también existen células inmunocompetentes, como melanocitos y células de Langerhans, que se encuentran justo por encima de la capa basal de queratinocitos⁵², esta capa basal es la última capa de la epidermis y es la responsable del constante recambio de las células en la epidermis; la cual contiene solo un grupo de células epidérmicas sin diferenciar, conocidos como queratinocitos basales.

Los queratinocitos basales se diferencian y se mueven a la siguiente capa (el estrato espinoso también conocido como la capa de células espinosas) donde inicia el proceso de maduración y se divide para reponer la capa basal esto explica que la piel se encuentra en cambio constante debido a la migración de los queratinocitos desde la capa basal hasta la capa cornea.^{47,53} Las células que se mueven en el estrato espinoso cambian desde ser una forma columnar a una poligonal e inician la síntesis de queratina distinta de la capa de queratina basal. Los queratinocitos en el estrato granuloso son caracterizados por acumulaciones oscuras de material citoplasmático y estas células producen activamente, proteínas de queratina y lípidos. Otras células que se pueden encontrar en el estrato basal y el estrato espinoso son las células T, principalmente T CD8.⁵⁴ El estrato corneo, como el último producto de maduración de los queratinocitos es la capa más externa de los cuatro estratos de la epidermis, es la única que no se encuentra en otros epitelios y es altamente responsable de la función de barrera de la piel. Las células en esta capa conocidas como corneocitos son células derivadas de queratinocitos muertos que carecen de organelos⁵³ y que contienen redes de fibrinas y queratina^{47, 55}(Figura 5).

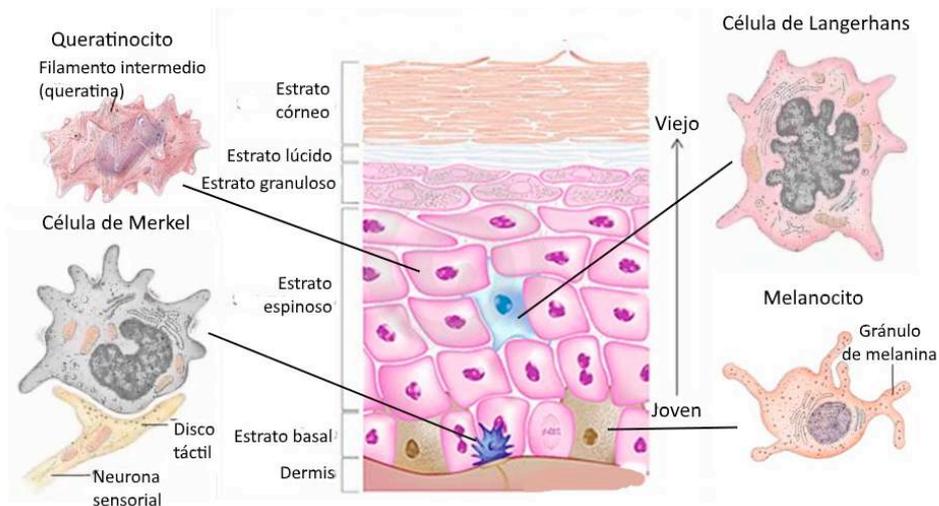


Figura 5. Estructura y tipos celulares de la epidermis

El proceso por el cual el estrato córneo se renueva continuamente a través de la queratinización de las células epidérmicas también puede representar una forma de defensa contra los organismos que infectan la piel. Las células epidérmicas basales causan un crecimiento continuo de la epidermis por división celular dando como resultado el movimiento de queratinocitos hacia la superficie. A medida que maduran y se diferencian, estas células pierden sus núcleos y se aplanan para formar las células queratinizadas. Los resultados de este proceso en continuo desprendimiento de la capa córnea, es que puede eliminar la infección de microorganismos fúngicos que residen en él. La inflamación, incluyendo la producida por las reacciones inmunes mediadas por células, parece mejorar la proliferación epidérmica de modo que la tasa de tránsito de células de la epidermis hacia el estrato córneo se incrementan. Un número de estudios han demostrado que la proliferación epidérmica es importante en la defensa contra las micosis superficial.⁴⁹

Secreciones sebáceas de las glándulas y otros lípidos epidérmicos, incluyendo la esfingosina, ácidos grasos, lípidos polares y glicoesfingolípidos, han demostrado ser fungistáticos tanto contra dermatofitos como contra *C. albicans*. La transferrina saturada es otra sustancia antimicrobiana bien conocida que parece ser activa en la piel inflamada e inhibe el crecimiento microbiano al competir por el hierro.⁴⁹

2.4.2 Dermis.

Enseguida de la epidermis se encuentra la dermis que contiene estromas de fibrina compuestas de fibras de colágeno y elastina. Existen muchos tipos diferentes de células inmunes que residen en la dermis y epidermis humanas, éstas incluyen células de Langerhans en la epidermis, macrófagos, células mieloides y dendríticas, mastocitos, linfocitos T y B, células plasmáticas y células NK en la dermis. Apéndices de la piel como las glándulas sudoríparas (endócrinas y apócrinas), glándulas sebáceas y los

folículos pilosos se extienden a través de la dermis y la epidermis para abrirse a la superficie de la piel.^{47,54,55}

Aunque la función principal de la piel radica en el recubrimiento, es claro que este como órgano protector tiene una importancia mayor debido a su capacidad de responder mediante actividades biológicas, bioquímicas y químicas que pueden ser reguladas por el aparato neuroendocrino y el sistema inmune.⁵⁶ De esta forma la piel representa un componente integral del sistema inmune a la cual se le puede considerar como la primera línea de defensa inmunológica⁵⁷, además de respaldar su función inmunológica por otros hechos como el que es el brazo efector de la respuesta inmunitaria que ocurre en los órganos linfoides secundarios y no en la sangre, o el sistema inmunitario periférico que se distingue por una dinámica comunicación entre los epitelios y los órganos linfoides secundarios.⁵⁰

2.5 Respuesta inmune innata de la piel.

Entre las funciones protectoras de la piel se encuentran: a) defensa ante las infecciones por virus, bacterias y hongos, b) La película superficial cutánea tiene efecto antimicrobiano, c) Cuando se produce una herida, se desencadena la reacción defensiva de la piel en forma de inflamación local.^{58,59}

La piel es el órgano más grande del cuerpo y por lo tanto, del sistema inmunitario. El mecanismo de resistencia a infecciones puede dividirse en respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Los componentes de la inmunidad adaptativa de la piel son una serie de mecanismos antígeno-específicos realizados por varios componentes celulares de la epidermis y la dermis.^{50,60}

La participación de la respuesta inmune innata de la piel en diferentes enfermedades cutáneas es muy relevante, por ejemplo en los trastornos inflamatorios como psoriasis, dermatitis atópica y dermatitis de contacto alérgica.⁶¹

La inmunidad innata, también conocida como natural, es la protección con la que nacemos, se considera la primera línea de defensa y está compuesta por células que reaccionan inespecíficamente contra ciertos agresores, e incluye barreras naturales como la piel y las mucosas. Este tipo de respuestas carece de memoria inmunológica y entre las células de la epidermis (queratinocitos, Langerhans, melanocitos, linfocitos T y NK) existen sistemas de reconocimiento para los microorganismos que pueden dispararse y producir o activar varios agentes anti-infecciosos, como los factores de complemento de las vías clásica y alterna, los péptidos antimicrobianos (defensinas, catelicidinas e histatinas), las citocinas, las quimiocinas y las especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico (NO).^{50,62} Cuando los microorganismos penetran, son reconocidos por un conjunto de receptores de reconocimiento de patrón expresados en la superficie y en compartimentos intracelulares de muchos tipos de células, incluyendo macrófagos y células dendríticas.⁶³ Los neutrófilos y los macrófagos se consideran como componentes centrales de la respuesta inmune innata

contra *C. albicans*, debido a su actividad fagocítica, estas células suelen reconocer a *C. albicans* a través de diferentes receptores de reconocimiento de patrones, como son los TLR-2, TLR-4, receptor de manosa, Dectin-1, Dectin-2, DC-SIGN y otros.⁶⁴

2.6 Los queratinocitos humanos como células participantes de la respuesta innata.

Los queratinocitos son las células predominantes de la epidermis, se originan en el estrato epidérmico basal y son capaces de montar una respuesta inmunitaria, inflamatoria o ambas, por medio de la secreción de citocinas y quimiocinas.

Los queratinocitos de la piel representan la primera línea de defensa contra los patógenos, intervienen activamente en la formación de una barrera mecánica, fisicoquímica e inmunológica. Elaboran queratina y otras proteínas no estructuradas, las que intervienen en el proceso de queratinización de los epitelios. Durante la citodiferenciación adicionan queratina, cuyo peso molecular aumenta a medida que las células migran hacia la superficie. Los queratinocitos de la epidermis producen varias proteínas antimicrobianas, incluyendo catelicidinas, β -defensina humana 2, y calprotectina. Estas proteínas parecen ser generadas en mayores cantidades cuando los queratinocitos se estimulan por el contacto con los microorganismos o citocinas.⁴⁹

Los queratinocitos también participan en el proceso inmunológico local. Intervienen en la maduración postmítica e instrucción de algunos linfocitos. Inducen a las células T inmaduras a sintetizar la enzima TdT. Producen sustancias parecidas a las hormonas y secretan IL-1. Este tipo de células provocan la amplificación y persistencia de respuestas inflamatorias e inmunes en la dermatitis atópica a través de la producción de mediadores pro-inflamatorios tales como quimiocinas (CCL2 / MCP-1 y CXCL1/ GRO α) y citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-6 y la IL-1 β ⁶⁵, además de que reconocen microorganismos por un conjunto de receptores de reconocimiento de patrones, incluyendo receptores de tipo Toll (TLRs).⁶⁶

Los queratinocitos humanos normales pueden presentar una expresión de TLR2, TLR3, TLR4 y TLR6. La exposición de los queratinocitos a IFN- γ y TNF- α aumenta la expresión intra-citoplasmática de estos receptores lo cual conduce a su translocación parcial en la superficie celular. La activación de queratinocitos por los TLRs, y sus ligandos lleva a la translocación nuclear de NF- κ B y la liberación de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-8.

2.7 Citocinas pro-inflamatorias.

El proceso inflamatorio está mediado fundamentalmente por la producción de mediadores solubles, en su mayoría citocinas, pero también factores de crecimiento y quimiocinas. Las citocinas son proteínas o glicoproteínas de bajo peso molecular (< 30 kD) con vida media corta, producidas principalmente por las células del sistema inmunológico, así como también por determinadas células de otros tejidos, y son mediadores fundamentales de la transmisión de

señales intercelulares. Las citocinas pro-inflamatorias actúan como moléculas efectoras fundamentales: el TNF- α y la IL-1 β son los principales componentes del proceso inflamatorio y parecen actuar sinérgicamente. El TNF- α es un estímulo importante para las células productoras de mediadores inflamatorios (citocinas, metaloproteinasas, óxido nítrico, prostaglandina E2, etc.).^{60, 67, 68}

2.8 Receptores tipo Toll.

Los TLRs son una familia de receptores señalizadores expresados por diferentes células los cuales permiten mediar la respuesta inmunitaria innata, ya que son los principales iniciadores de esta dependiendo del patógeno y el sitio de infección⁶⁹; además desempeñan un papel central en promover la respuesta de la inmunidad adaptativa después de la infección, actuando como sensores del huésped de componentes estructurales conservados de virus, bacterias, hongos y protozoarios. La interacción de estos receptores transmembranales con el patógeno induce una dimerización que reúne a dos dominios de señalización que sirven posteriormente como una plataforma para la atracción de diversas moléculas adaptadoras intracelulares, esto conduce a una señalización celular que produce cambios dinámicos en la expresión de genes que codifican citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión celular, así como marcadores de la maduración de células dendríticas.⁷⁰ En la actualidad se conocen 11 TLRs en humanos (TLR1-TLR11) que tienen un patrón de expresión variable en los diferentes tejidos. De modo característico, los TLRs tienen un amplio rango de ligandos que incluyen patrones estructurales presentes en bacterias, hongos levaduras y parásitos.

Los receptores tipo Toll (TLRs) son glicoproteínas integrales de membrana de varias células que en su dominio extracelular poseen repeticiones ricas en leucina⁷¹. La aparición de TLRs se encuentra en la superficie de las células de la epidermis y la dermis, incluyendo a los queratinocitos.

Después de la interacción con su ligando respectivo, los TLRs dimerizan y sufren un cambio conformacional requerido para el reclutamiento de moléculas de señalización. Estas incluyen moléculas adaptadoras como MyD88, TIRAP/MAL, TRIF y TRAM, cinasas asociadas con el receptor de IL-1 β (IRAK), cinasas activadas por el factor transformante de crecimiento β /TGF- β , (TAK1) proteínas de unión a TAK1 (TAB1), TAB 2 y el factor 6 asociados con el receptor de TNF- α (TRAF6). Cada molécula adaptadora induce vías de señalización intracelular distintas que promueven la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y moléculas coestimuladoras.⁷²

Se expresan en las células del sistema inmunitario: monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastocitos, células B, epitelio intestinal, respiratorio y la piel.⁷¹ Inducen la expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos naturales, moléculas coestimuladoras y citocinas importantes para la regulación y activación de la respuesta inmunitaria adaptativa.

El TLR2 es un receptor que posee un mecanismo único de reconocimiento de ligandos en donde coopera con otros TLR miembros de la familia, especialmente TLR1 y TLR6, e inicia la activación de genes característicos de

una respuesta de tipo Th2. TLR2 reconoce diferentes productos bacterianos como lipoproteínas de bacterias Gram negativas, peptidoglicano de bacterias Gram positivas, ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas, LPS, entre otras.⁷³

El TLR4 interviene en la señalización de la respuesta a un amplio espectro de estímulos: el LPS (reconocimiento en el que interviene esencialmente), la proteína F del virus respiratorio sincitial (VRS) y proteínas bacterianas de choque térmico (HSP60 y HSP70), entre otros.⁷⁴ Parece actuar como un heterodímero, a diferencia de TLR2 que actúa preferencialmente de forma homodimérica. Al unirse el LPS al receptor TLR4, éste interactúa con tres diferentes proteínas extracelulares (proteína de unión a lipopolisacárido (LBP), CD14 y proteína de diferenciación mieloide 2), para inducir la activación de NF- κ B y la posterior producción de citocinas proinflamatorias.⁷⁵

El TLR6 actúa de manera sinérgica con TLR2 como un heterodímero para el reconocimiento de peptidoglicanos, que son componentes de bacterias Gram positivas, reconoce sólo lipoproteínas bacterianas diacetiladas como las producidas por micoplasmas, que son potentes activadores de macrófagos.⁷³

Los TLR1, TLR2 y TLR4 se expresan constitutivamente en los queratinocitos a lo largo de la epidermis, mientras que los TLR3 y TLR5 tienen una expresión restringida principalmente a la capa basal de queratinocitos.⁷⁶ Los TLR2 y TLR4 se ha descrito que desempeñan papeles cruciales en la defensa del hospedero contra la infección por *C. albicans*. El TLR4 se activa junto con CD14 para inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias.^{11,77}

3 Justificación

Las candidiasis superficiales son frecuentes, de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, pero cuando pasan a ser sistémicas de evolución aguda o crónica son infecciones generalmente graves, y en los últimos 20 años su incidencia ha aumentado considerablemente. Existe poca información sobre la expresión de receptores y citocinas asociadas a las infecciones cutáneas por *Candida*, en este trabajo se estudian a los queratinocitos humanos infectados por *Candida albicans* y *Candida glabrata* para determinar su importancia durante la infección.

4 Hipótesis

La activación de queratinocitos humanos estimulados por *Candida albicans* y *Candida glabrata* induce la expresión de receptores tipo Toll (TLR), así como el incremento en la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias, lo que supone su participación en el control de la infección como células inmunológicamente competentes.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar de manera *in vitro* la sobre expresión de los receptores TLR-2, TLR-4, TLR-6, y la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, MCP-1) en una línea celular de queratinocitos humanos HaCaT activados con *Candida albicans* y *Candida glabrata*.

5.2 Objetivos específicos

- a) Establecer un modelo de infección *in vitro* de queratinocitos humanos infectados con *Candida albicans* y *Candida glabrata*.
- b) Evaluar la expresión de los receptores TLR-2, TLR-4, TLR-6, en una línea celular HaCaT de queratinocitos, activados con *Candida albicans* y *Candida glabrata*.
- c) Cuantificar la concentración de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) y de las quimiocinas (IL-8, MCP-1) en queratinocitos humanos infectados con *Candida albicans* y *Candida glabrata*, mediante una cinética de 2, 4, 6 y 12 h post-infección.

6 Material y métodos

a) Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT.

La línea celular de queratinocitos HaCaT provino de la colección ATCC 12191. Para escoger el medio de cultivo idóneo para el crecimiento de queratinocitos se probaron tres medios:

- medio D-MEM suplementado con alta glucosa y sin piruvato de sodio (Sigma-Aldrich)
- medio D-MEM suplementado con piruvato de sodio y alta glucosa (Life Technologies)
- medio D-MEM/F-12 suplementado con piruvato de sodio y alta glucosa (Life Technologies)

En los cuales se adicionaron diferentes concentraciones de suero fetal bovino, 10, 13 y 15%; y se les agregó a cada medio penicilina (1000 U/ml) y estreptomycin (100 μ g/ml), manteniendolos a una temperatura de 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%.

Al final se estableció que el cultivo de queratinocitos se debía realizar en botellas de 25 cm² con medio D-MEM (GIBCO advanced D-MEM 1X, con D-glucosa a 4500 mg/mL, piruvato de sodio a 110 mg/L sin L-glutamina, Invitrogen Corporation), suplementado con 5 mL (10%) de suero fetal bovino más 200 μ L de una mezcla de penicilina (+10 000 Units/mL), estreptomycin (+10 000 μ g/mL) (GIBCO); incubando las botellas a 37°C con una atmósfera de

CO₂ al 5%. Se realizó el cambio de medio cada tercer día hasta obtener un número suficiente de células para cada experimento (Figura 6).

Al alcanzar las células a una concentración aproximada del 70%, se procedió a tripsinizar para separar las células de las cajas y poder hacer un recuento celular, con la finalidad de mantener las células y por otro lado realizar las monocapas que posteriormente se utilizaron en las pruebas de infección celular.

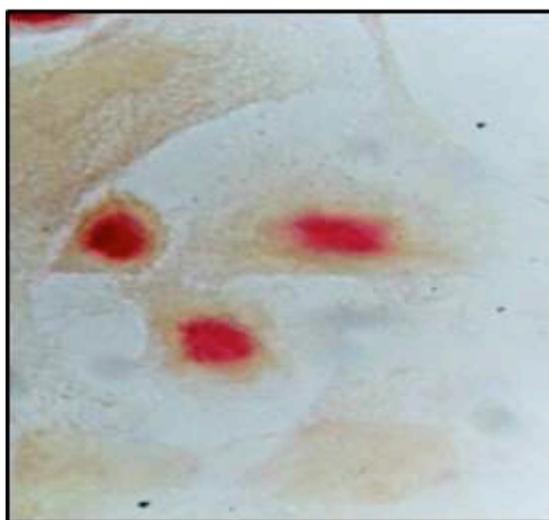


Figura 6. Queratinocitos creciendo en medio D-MEM/F12 con 10% de SFB, aumento 40X. Se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

a.1) Tripsinización de células

Se recuperaron las células en un tubo falcon y se añadió la solución resultante y medio D-MEM/F-12 con piruvato de sodio y alta glucosa (Life Technologies) suplementado con 13% de suero bovino fetal (GIBCO) más penicilina (1000 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml) volumen/volumen, se centrifugó a 1000 rpm/ 5 min a 20°C.

Se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en un volumen suficiente para cubrir la superficie de la botella de medio DMEM suplementado.

b) Cultivo de microorganismos.

Se utilizó *Candida albicans* proveniente de la cepa ATCC10231 y *Candida glabrata* de la cepa ATCC 64677, crecidas durante un día en caldo dextrosa Sabouraud a 37°C. En los experimentos donse se usaron levaduras muertas, estas fueron inactivadas por autoclave, 15 minutos a 121°C/15lb.

c) Suspensión de microorganismos.

Una vez crecidas las cepas en caldo dextrosa Sabouraud, tras 24 horas de incubación, se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos a 20°C, eliminando el sobrenadante se resuspendieron en solución salina 0.9 %, y se contabilizaron las levaduras en la cámara de Neubauer para alcanzar las concentraciones necesarias.

d) Determinación de la fase logarítmica del crecimiento.

Se realizó la cinética de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 y *C. glabrata* ATCC 64677 creciendo las levaduras en caldo dextrosa Sabouraud, manteniéndolas en incubación a 37°C; para realizar la lectura del crecimiento se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm, utilizando un intervalo de tiempo para cada lectura de una hora durante 24 horas. (EPOCH 2, Espectrofotómetro de placa).

e) Ensayo de infección celular

En placas de 12 pozos, se realizaron monocapas de células HaCaT con 400 mil células por pozo (2 mL) para cada tiempo de infección correspondientes a 2, 4, 6, 8 y 10 h. Se lavaron dos veces con PBS 1X (pH 7.4) para eliminar el suero del medio de cultivo y se infectaron con 1mL de las suspensiones de levadura de *Candida albicans* viva o muerta, y levadura de *Candida glabrata* viva o muerta a una MOI 1:1 (multiplicidad de la infección, 1 levadura por célula) durante 2h y se siguieron tiempos post-infección de 4, 6, 8 y 10 h. Para prevenir el crecimiento extracelular de la *Candida albicans* y *Candida glabrata*, las monocapas infectadas se trataron con 2 µg/mL de anfotericina B durante 2 h, transcurrido ese tiempo, el medio se reemplazó por medio de cultivo D-MEM/F12 adicionado con 1 µg/mL de anfotericina B, el cual se dejó hasta el término de la cinética.

f) Microscopia confocal para la evaluación de la expresión de receptores Toll.

Se realizaron monocapas de células HaCaT con 40 mil células para cada tiempo de infección en placas de 24 pozos con cubreobjetos estériles a una confluencia celular del 60%, se infectaron con las suspensiones de levaduras a una MOI de 1:1 siguiendo una cinética de 2, 4, 6, 8 y 10 h post-infección. Paralelamente y para tener un control positivo de la expresión de TLRs, se estimularon monocapas de células HaCaT con 0.2 µg/1x10⁶ células de PMA (forbol- miristato-acetato) durante 24 h. Después del tratamiento con PMA y de la infección, las monocapas se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% por 1 h a temperatura ambiente.

Para la determinación de la expresión de TLR, las preparaciones se incubaron con anticuerpos monoclonales específicos IgG anti-TLR-2 humano producido en ratón (Santa Cruz), IgG anti TLR-4 humana producido en cabra (eBioscience), e IgG anti TLR-6 humano producido en ratón (Santa Cruz) por 2 horas a 37°C, posteriormente se lavaron 5 veces con PBS y se incubaron por

90 minutos a 37°C con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón producido en cabra-FITC (Chemicon international), anti IgG de conejo producido en cabra-TRITC (Santa Cruz) y anti IgG de ratón producido en cabra-FITC (Santa Cruz) respectivamente. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó lavando las monocapas 5 veces con PBS, finalmente, las preparaciones teñidas se montaron en portaobjetos usando Vectashield-DAPI (VectorLabs) como medio de montaje, y se observaron las señales de fluorescencia en un sistema de escaneo confocal (LSM5 Pascal, Zeiss).

g) Cuantificación de citocinas.

Se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos de queratinocitos activados con *Candida albicans* y *Candida glabrata*, siguiendo una cinética de 2, 4, 6, 8 y 10 h post-infección. Se centrifugaron los cultivos para eliminar las levaduras y los sobrenadantes así obtenidos, se congelaron a -70°C, para su posterior utilización en las ELISAS.

Para la cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de cultivos se empleó la técnica de ELISA, utilizando los Kits comerciales:

1. Human TNF- α ELISA Ready-SET-Go! eBioscience Inc. REF. 88-7346-22 (San Diego, CA 92121).
2. Human IL-1 β ELISA Ready-SET-Go (2nd Generation) eBioscience Inc. REF 88-7261-22 (San Diego, CA 92121)
3. Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go (2nd Generation) eBioscience Inc. REF 88-8086-22 (San Diego, CA 92121)
4. Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go eBioscience Inc. REF 88-7066-22 (San Diego, CA 92121)
5. Human CCL2/MCP-1 ELISA Ready-SET-Go eBioscience Inc. REF 88-7399-22 (San Diego, CA 92121).

h) Aislamiento de mRNA y RT-PCR para los fragmentos de los genes de citocinas proinflamatorias y receptores tipo Toll.

Se realizaron monocapas con 400 mil células, y se infectaron como se describió anteriormente con *C. albicans* y *C. glabrata* durante 2 h a una MOI de 1:1, siguiendo una cinética de post-infección de 2, 4, 6, 8 y 10 h. Después de cada tiempo de post-infección, se adicionaron 500 μ L de TRIzol (Invitrogen) a cada uno de los pozos para realizar la extracción de RNA total. El RNA total se trató con DNasa II y se precipitó con isopropanol. Para la retro-transcripción (RT) del RNA se usaron 3 μ g de RNA total, al cual se le adicionaron 0.5 μ g de oligo (dT) (Invitrogen) y se incubaron a 70°C por 10 min. El “master mix” para la RT se preparó con “1X single strand buffer”; 0.5 mM de DTT, 500 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) (Invitrogen) y 200 U de transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen). Las reacciones de RT se incubaron a 42°C por 1 h.

Después de la formación de cDNA se realizó PCR en tiempo real usando un Master Mix con 1.5 mM de MgCl₂ (Ampliqon III) y Eva Green (Biotium) como fluorocromo y Rox (Invitrogen) como colorante de referencia. Como gen endógeno se utilizó G3PDH usando los siguientes iniciadores específicos 5'-GGTCATCCATGACAACTTTGG-3' (forward) y

5'GTCATACCAGGAATTGAGCTTGAC-3' (reverse); los iniciadores específicos para la MCP1 fueron 5'-CTCGCTCAGCCAGATGCAAT-3' (forward) y 5'-TGCTTGTCCAGGTGGTCCAT-3' (reverse); para el fragmento específico de la IL8 fueron 5'-GCCAAGAGAATATCCGAACT-3' (forward) y 5'-TCAACACAGCACTACCAACA-3' (reverse); para el TNF α 5'-GACTTCCTTGAGACACGG-3' (forward) y 5'-AGGGCGATTACAGACACA-3'(reverse); y para el fragmento específico de la IL1 β 5'-GCCCTGTGCCTTAGTAGTAT' (forward) y 5'-TGCATCAGCTCATCAATAAC'(reverse); para TLR-2 los iniciadores 5'-GGCCAGCAAATTACCTGTGTG-3' (Forward) y 5'-AGGCGGACATCCTGAACCT-3' (Reverse); para TLR-4 5'-CAGAGTTTCCTGCAATGGATCA-3' (Forward) y 5'-GCTTATCTGAAGGTGTTGCACAT-3' (Reverse) y para TLR-6 5'-GAAGAAGAACAACCTTTAGGATAGC-3' (Forward) y 5'-AGGCAAACAAAATGGAAGCTT-3' (Reverse). Los genes para todas las citocinas fueron amplificados de la siguiente manera, 15 s de desnaturalización a 95°C, 30 s de alineamiento a 60°C y 15 s de extensión a 72°C por 35 ciclos.

i) Tinción de citoesqueleto

Se realizaron monocapas de células HaCaT con 40 mil células para cada tiempo de infección en placas de 12 pozos con cubreobjetos estériles a una confluencia celular del 60%, se infectaron con las suspensiones de levaduras (Teñidas por 20 minutos con Uvitex(Polysciences Inc) al 0.75%) a una MOI de 1:1 siguiendo una cinética de 2, 6 y 10 h post-infección. Después de terminado cada punto de infección se lavó el pozo tres veces con PBS y se le agregaron 500 μ L de paraformaldehído durante 20 min, manteniéndolo en refrigeración; a continuación se volvió a lavar el pozo 3 veces con PBS y se le adicionaron 40 μ L de faloidina (1:250) y se dejó en reposo en refrigeración durante 30 min; se lavó de nuevo 3 veces con PBS sacando el cubreobjetos y pasandolo a un portaobjetos limpio con 1 μ L de DAPI (4'6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), teniendo cuidado de voltear el cubreobjetos dejando la manocapa en la parte de abajo. Se dejó secar y se selló, cuidando siempre la exposición a la luz.

j) Interpretación de resultados

A partir de las imágenes obtenidas, de la microscopía confocal se determinó la activación y sobreexpresión de los receptores mediante la observación de las imágenes con el programa LSM Image Examiner Pascal (Confocal Zeiss).

El método colorimétrico de ELISA permitió en los sobrenadantes de cultivo celular la cuantificación de la concentración de las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, MCP-1), en base a una curva estándar para cada una. El análisis estadístico utilizado para la correlación de los datos fue mediante la prueba de ANOVA de dos vías para el tratamiento de datos no paramétricos, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism V 5.1.

Para el RT-qPCR, todos los valores numéricos de cada gen fueron normalizados con su respectivo valor de gen endógeno G3PDH y los

experimentos fueron calibrados utilizando el nivel basal de la expresión de cada gen como valor inicial (células sin infectar). Todos los valores fueron sometidos al análisis de expresión relativa de ddCt usando el software Step One V.2.3.1 de Life Technologies USA.

Los valores representados en las gráficas corresponden al promedio de dos experimentos independientes, y fueron representados como la media más la desviación estandar. Los valores fueron sometidos a análisis estadístico usando el software Graph prism V. 6.0 utilizando la prueba no paramétrica ANOVA de dos vías.

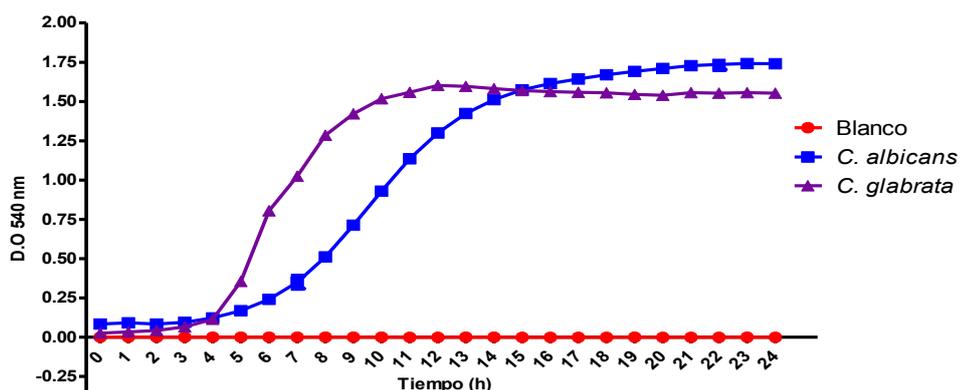
7 Resultados

a) Preparación y estandarización de las técnicas para cultivos celulares.

Los cultivos de queratinocitos se estadarizaron con medio D-MEM/F12 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO) más penicilina (1000 U/ml) y estreptomycin (100 μ g/ml), crecidas en botellas de 25 cm² durante 3 días a una atmósfera de CO₂ al 5%.

b) Determinación de la fase logarítmica del crecimiento.

Se realizó la cinética de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 y *C. glabrata* creciendo las levaduras en caldo Dextrosa Sabouraud y para realizar la lectura del crecimiento se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm, utilizando un intervalo de tiempo para cada lectura fue de una hora durante 24 horas.



Gráfica 1. Curvas de crecimiento de levaduras de *C. albicans* y *C. glabrata* hasta las 24 horas en medio Sabouraud.

Los resultados obtenidos del crecimiento de ambas cepas de *Candida* (*albicans* y *glabrata*) se pueden observar en la gráfica 1. Las levaduras de *C. albicans* ATCC 10231 presentan un crecimiento exponencial entre las 6 y 16 horas a partir de la cual hay un aumento en la pendiente lo que indica la fase

logarítmica y a las 16 horas comienza su fase estacionaria mientras que el tiempo de la fase logarítmica de *C. glabrata* está entre las 4 y 12 horas.

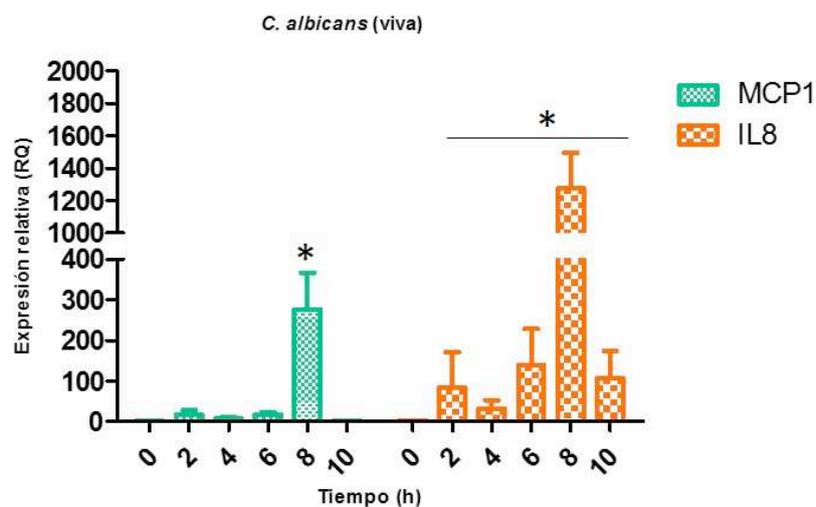
c) Aislamiento de mRNA y RT-PCR para los fragmentos de los genes de citocinas proinflamatorias y receptores tipo Toll.

Posteriormente el ensayo de infección celular se llevó a cabo obteniendo monocapas de células HaCaT con 400 mil células por pozo para cada tiempo de infección correspondientes a 0, 2, 4, 6, 8 y 10 h, las células infectadas se utilizaron para la obtención de mRNA y efectuar el RT-PCR, una vez obtenido el cDNA se realizaron qPCR por duplicado para cada una de los receptores tipo Toll y las citocinas pro-inflamatorias.

Las siguientes gráficas muestran los resultados de la expresión del mRNA de las citocinas y receptores tipo Toll por la técnica de RT-qPCR en queratinocitos humanos HaCaT infectados con levaduras de *C. albicans* tanto vivas como muertas a una MOI 10:1 obtenidos de una cinética de 2, 4, 6, 8 y 10 h. Los valores representados en las gráficas corresponden al promedio de duplicados y son presentados en unidades de expresión relativa.

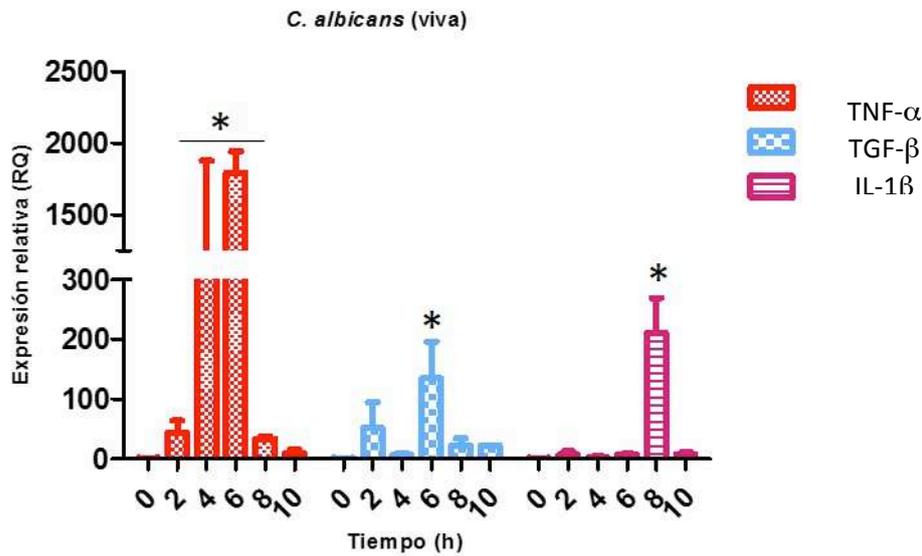
- Cepa viva de *C. albicans* ATCC 10231.

Los resultados de expresión de quimiocinas muestran que las levaduras de esta cepa producen una mayor cantidad de IL-8 a las 8 h en comparación de MCP-1 producida al mismo tiempo cuyos valores son de 1300 y 300 Unidades de Expresión Relativa (RQ) respectivamente como se muestra en la grafica 2.1, ambas representan valores significativos al compararse con el grupo control expresado por las cero horas.



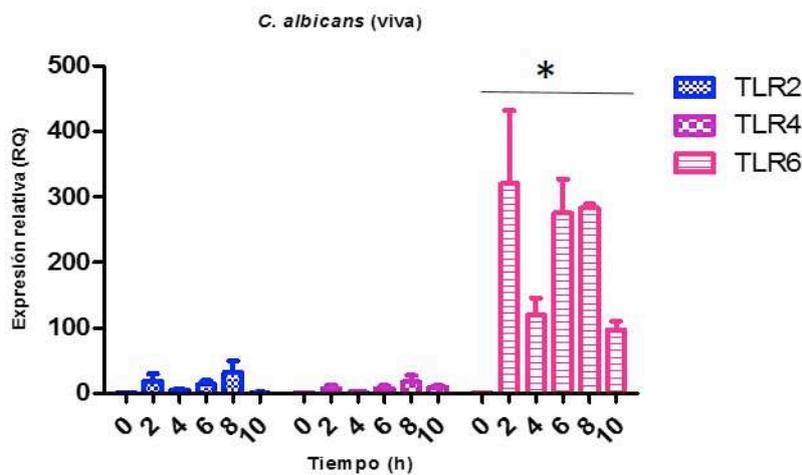
Gráfica 2.1. Expresión relativa de quimiocinas MCP-1 y IL-8 en queratinocitos HaCaT infectados con la cepa viva de *C. albicans* ATCC 10231. Resultados obtenidos por RT-qPCR. *p<0.05.

En cuanto a la expresión de citocinas pro-inflamatorias los valores son significativos y muestran que el conteo de RQ fue mayor para TNF- α (1800) a las 6 h en comparación a TGF- β que su expresión fue al mismo tiempo pero en menor cantidad (130 QR) mientras IL-1 β se expresa a tiempos tardíos post-infección en cantidad similar a TGF- β (Gráfica 2.2).



Gráfica 2.2. Expresión de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , y TGF- β en queratinocitos HaCaT infectados con la cepa viva de *C. albicans* ATCC 10231. Resultados obtenidos por RT-qPCR. * $p < 0.05$.

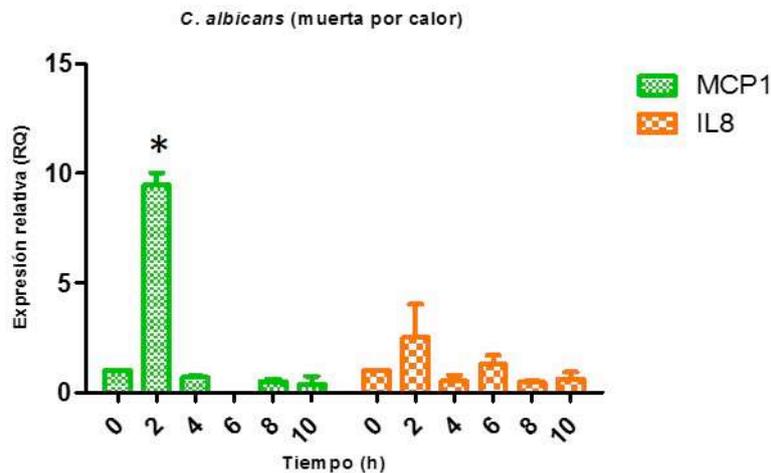
En la gráfica 2.3 se puede observar que la máxima expresión en Unidades Relativas para los receptores tipo Toll, en donde el receptor de superficie TLR6 presentó valores significativos durante todo el ensayo de infección, mientras que los TLRs 2 y 4 muestran valores muy bajos en comparación a éste.



Gráfica 2.3. Expresión de receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) en queratinocitos HaCaT infectados con la cepa viva *C. albicans* ATCC 10231. Resultados obtenidos por RT-qPCR. * $p < 0.05$.

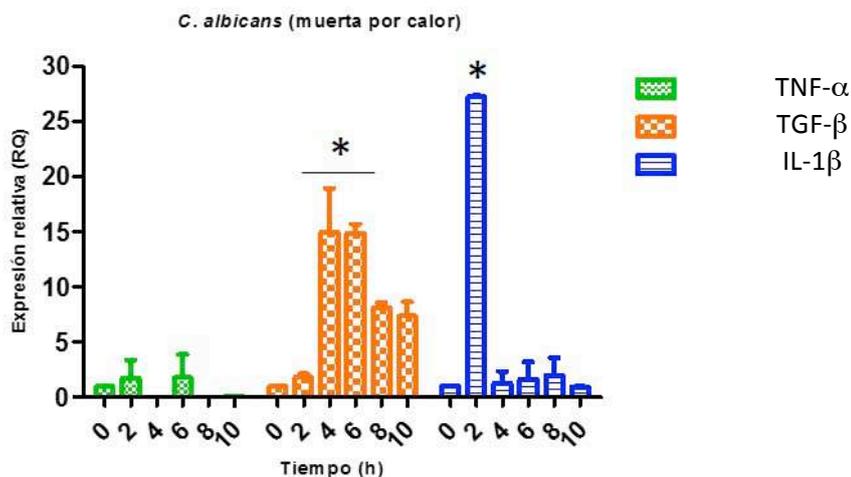
- Cepa muerta de *C. albicans* ATCC 10231.

En este caso la gráfica 3.1 muestra que en las quimiocinas producidas por la cepa de *C. albicans* muerta hay mayor cantidad de MCP-1 en tiempos tempranos de expresión en comparación con IL-8 producida al mismo tiempo pero en menor cantidad.



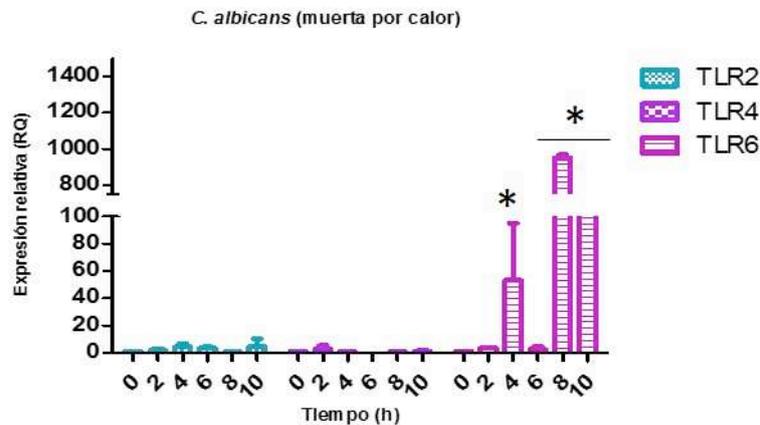
Gráfica 3.1. Expresión relativa de quimiocinas MCP-1 y IL-8 en queratinocitos HaCaT infectados con de *C. albicans* ATCC 10231 muerta por calor. Resultados obtenidos por RT-qPCR. * $p < 0.05$.

En cuanto a la producción de citocinas en este estudio se observa en la gráfica 3.2 que para TNF- α hay un mayor conteo de RQ a las 2 h, seguida de IL-1 β por su producción a las 4 y 6 h, ambas con valores arriba de 15, mientras que para TGF- β hubo una producción no significativa, aunque los valores en general son insignificantes comparados con la expresión cuando la infección se realiza con levadura viva.



Gráfica 3.2. Expresión de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , y TGF- β en queratinocitos HaCaT infectados con la cepa muerta por calor de *C. albicans* ATCC 10231. Resultados obtenidos por RT-qPCR. * $p < 0.05$.

De igual manera la levadura fue detectada por el receptor TLR6 con una máxima expresión a las 8 y 10 h después de la infección de los queratinocitos, dando valores por arriba del doble de los obtenidos al infectar con levadura viva.

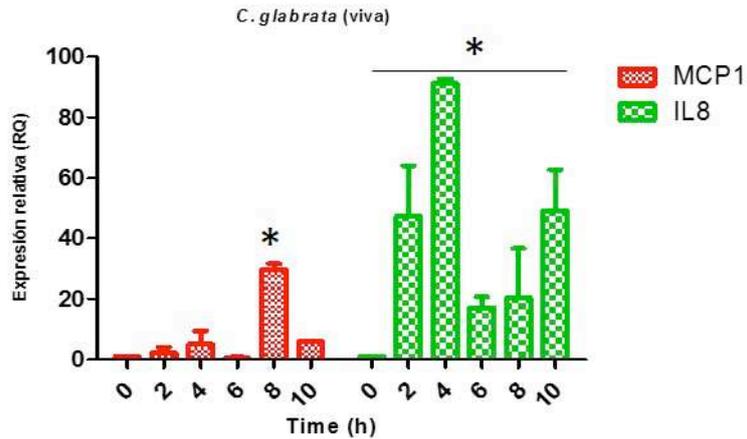


Gráfica 3.3. Expresión de receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) en queratinocitos HaCaT infectados con la cepa muerta por calor de *C. albicans* ATCC 10231. Resultados obtenidos por RT-qPCR. * $p < 0.05$.

- Levadura viva de *C. glabrata* ATCC 64677.

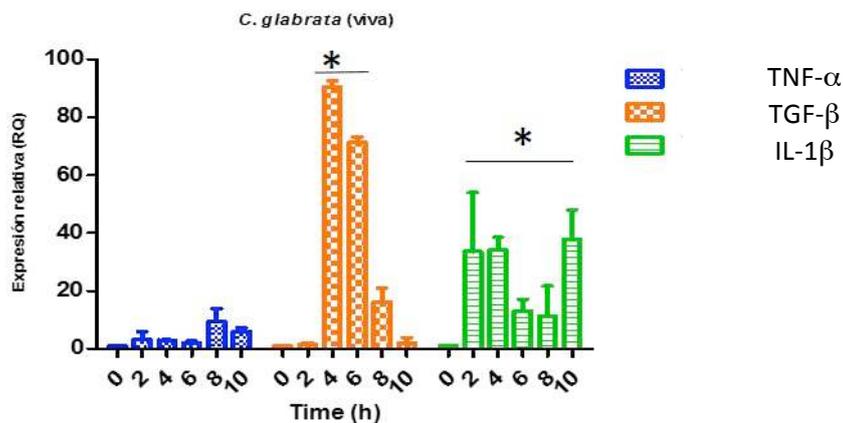
De la misma forma se muestran a continuación los resultados de la expresión del mRNA de las quimiocinas, citocinas y receptores tipo Toll por la técnica de RT-qPCR en queratinocitos humanos HaCaT infectados con levaduras de *C. glabrata* tanto vivas como muertas.

La gráfica 4.1 muestra los primeros resultados en cuanto a la expresión de quimiocinas; la que alcanzó mayor nivel de expresión fue la IL-8 a las 4 y 10 h post-infección con valores arriba de 90 y 40 unidades de Expresión Relativa respectivamente mientras que para MCP-1 el mayor conteo en QR fue a las 8 h en menor cantidad pero mostrando valores significativos.



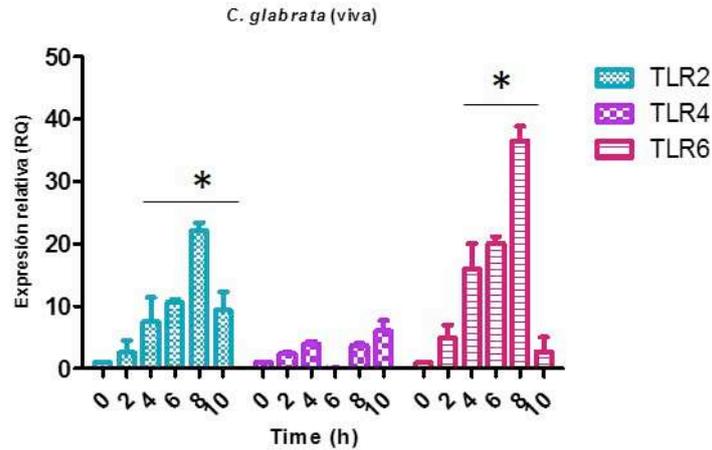
Gráfica 4.1. Expresión de quimiocinas MCP-1 y IL-8 en queratinocitos HaCaT infectados con la levadura viva de *C. glabrata* (ATCC 64677). Resultados obtenidos por RT-qPCR. * $p < 0.05$.

En la gráfica 4.2 se muestran los resultados de expresión de las citocinas, donde se observa que la mayor expresión relativa de citocinas producidas fueron de IL-1 β a las 4 y 6 h, seguido de TNF- α a las 2 y 10 h, y por último TGF- β en la cual no hubo prácticamente producción y no muestra significancia.



Gráfica 4.2. Expresión de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL- 1 β , y TGF- β en queratinocitos HaCaT infectados con la levadura viva de *C. glabrata* (ATCC 64677). Resultados obtenidos por RT-qPCR. * $p < 0.05$.

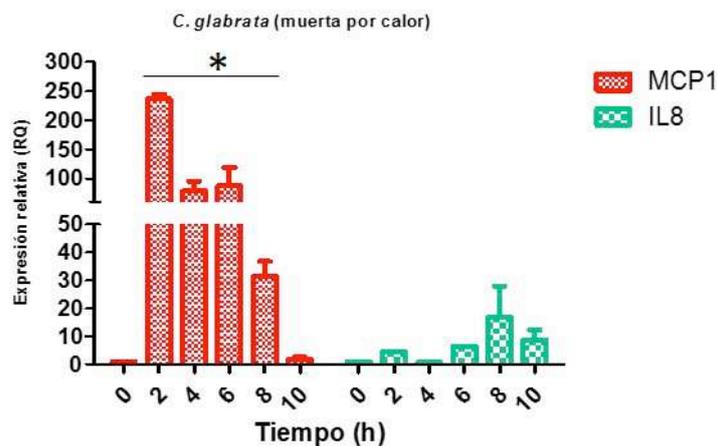
En este caso la levadura también fue detectada por el receptor tipo Toll 6 y Toll 2, mientras que la expresión del receptor tipo Toll 4 sigue siendo poco significativa (gráfica 4.3).



Gráfica 4.3. Expresión de receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) en la levadura muerta de viva de *C. glabrata* (ATCC 64677). Resultados obtenidos por RT-qPCR. * $p < 0.05$.

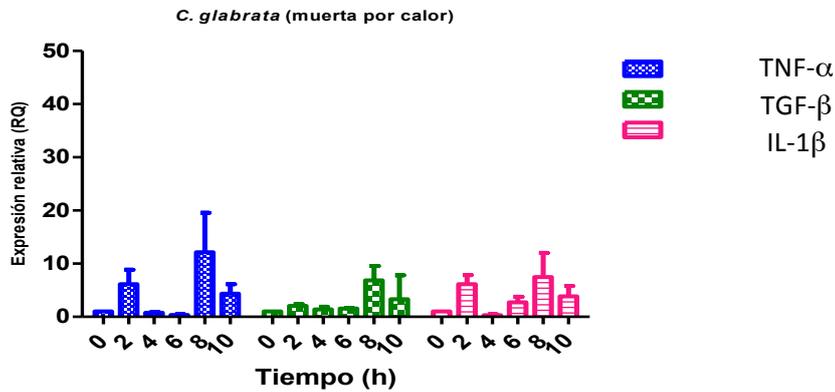
- Levadura muerta de *C. glabrata* ATCC 64677.

Por otro lado el registro en mayor número de unidades de Expresión Relativa para las quimiocinas producidas por la cepa muerta por calor de *C. glabrata* corresponden a MCP-1 ya que la expresión se observó desde las 2 hasta las 6 h conservando niveles significativos como se muestra en la gráfica 5.1, mientras que la expresión de IL-8 tiene valores muy bajos comparados con MCP-1 y el tiempo a las cero horas.

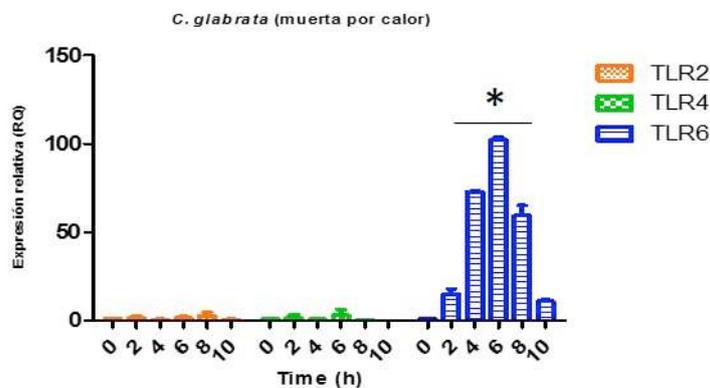


Gráfica 5.1. Expresión de quimiocinas MCP-1 y IL-8 en queratinocitos HaCaT infectados con la levadura muerta por calor de *C. glabrata* (ATCC 64677). Resultados obtenidos por RT-qPCR. * $p < 0.05$.

Los resultados de la expresión de TGF- β , TNF- α e IL-1 β mostradas en la gráfica 5.2 se observa que los niveles son bajos y no son representativos ya que en los tres casos los valores alcanzados están por debajo de las 15 unidades de RQ. En el caso de los tres receptores de superficie, de igual forma el tipo Toll 6 el más sensible a las levaduras de *C. glabrata* muertas ya que alcanzo valores altos a las 6h de post infección mostrados en la gráfica 5.3 pero no muestra significancia estadística respecto al grupo control.



Gráfica 5.2. Expresión de citocinas pro-inflamatorias TNF- α IL- 1 β y TGF- β en queratinocitos HaCaT infectados con la levadura muerta por calor de *C. glabrata* (ATCC 64677). Resultados obtenidos por RT-qPCR. * $p < 0.05$.



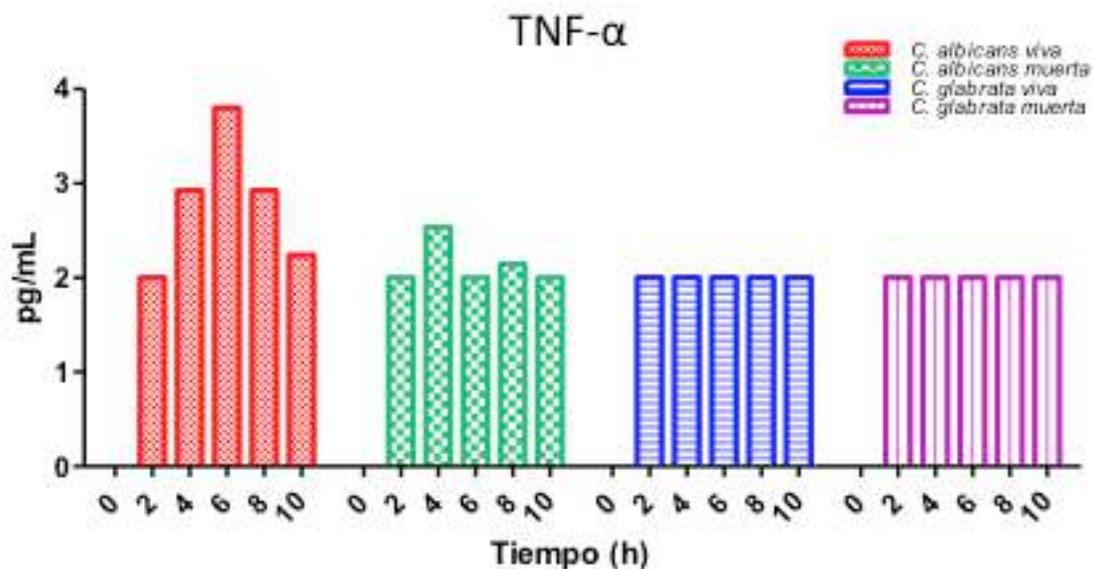
Gráfica 5.3. Expresión de receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) en queratinocitos HaCaT infectados con la levadura muerta por calor de *C. glabrata* (ATCC 64677). Resultados obtenidos por RT-qPCR. * $p < 0.05$.

d) Cuantificación de citocinas.

Se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos de queratonocitos activados con levaduras vivas y muertas de *C. albicans* y *glabrata*, obtenidos tras la cinética de 0, 2, 4, 6, 8, 10 hrs post-infección. Las siguientes gráficas muestran los resultados de la cuantificación de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas por el método de ELISA.

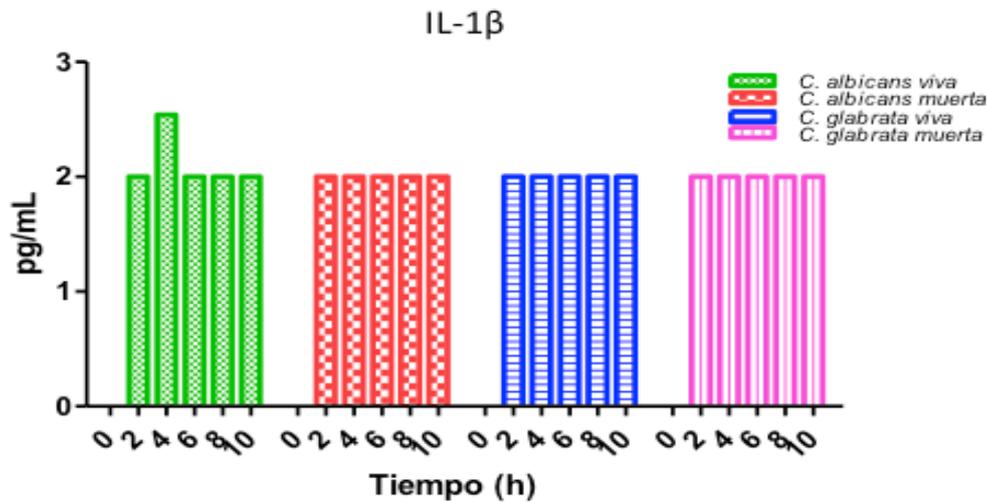
- Citocinas pro-inflamatorias.

Las concentraciones de TNF- α en las muestras de infección con *C. albicans* viva, muestran que a las 6 horas se alcanza el mayor nivel de secreción esta citocina (3.8 pg/mL) y pasando este tiempo comienzan a disminuir sus niveles de expresión gradualmente; y se observa cuando se infecta con cepa de *C. albicans* muerta se observa una menor concentración de esta citocina llegando a su mayor expresión a las 4 horas (2.5 pg/mL) disminuyendo en los siguientes tiempos. Al utilizar *C. glabrata* para la infección, tanto viva como muerta, se puede observar que las concentraciones son muy bajas y es imposible cuantificarlas por los límites de detección de la técnica de ELISA.



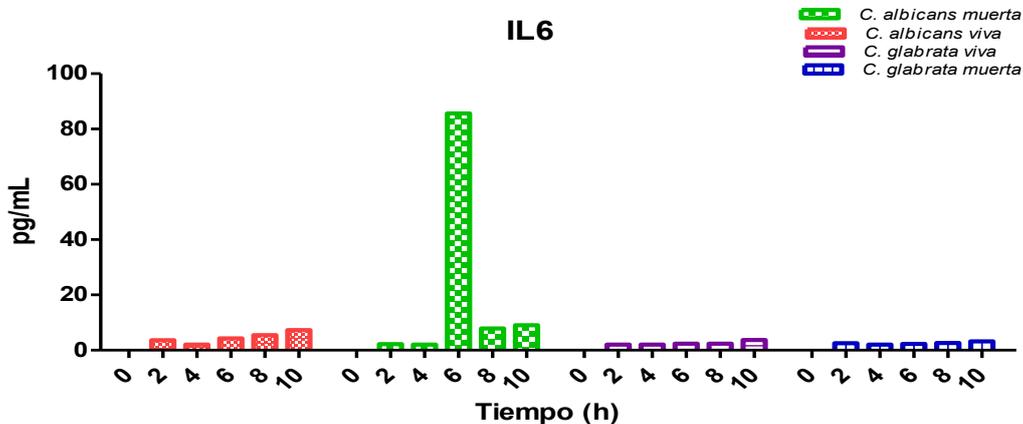
Gráfica 6.1. Cuantificación de la citocina pro-inflamatoria TNF- α en queratinocitos HaCaT infectados con las levaduras vivas y muertas de *C. albicans* y *C. glabrata*.

En la Gráfica 6.2 se muestran los resultados correspondientes a la concentración de IL-1 β la cual alcanza su concentración máxima a las 4 horas en la infección con *C. albicans* viva (2.58 pg/mL) y posteriormente baja la concentración a 2 pg/mL como para el resto de los tiempos del estudio para las otras infecciones.



Gráfica 6.2. Cuantificación de la citocina pro-inflamatoria IL-1 β en queratinocitos HaCaT infectados con las levaduras vivas y muertas de *C. albicans* y *C. glabrata*.

Por otra parte, los resultados correspondientes a la concentración de IL-6 muestran que la mayor concentración alcanzada fue por la infección obtenida por las levaduras de *C. albicans* muerta por calor alcanzando su mayor concentración a las 6 horas (85.63 pg/mL) y posteriormente disminuyendo considerablemente. En las demás infecciones si se registran concentraciones de dicha citocina pro-inflamatoria pero en mucha menor cantidad teniendo sus concentraciones más altas a las 10 horas.

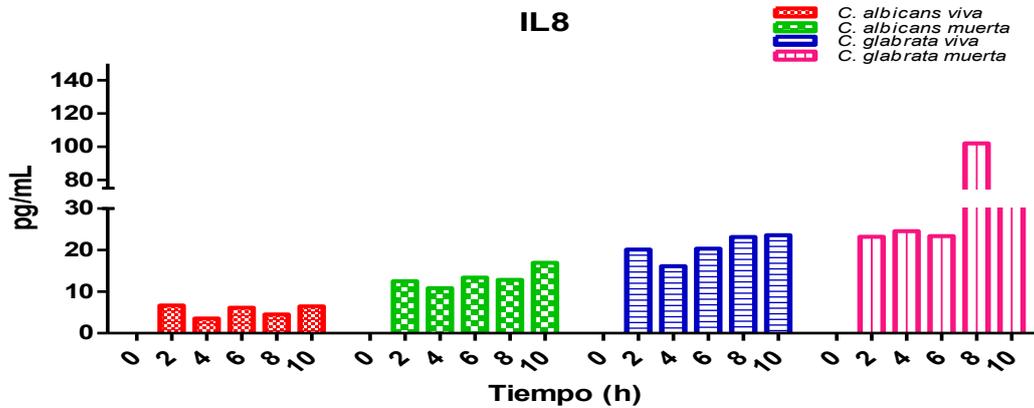


Gráfica 6.3. Cuantificación de la citocina pro-inflamatoria IL-6 en queratinocitos HaCaT infectados con las levaduras vivas y muertas de *C. albicans* y *C. glabrata*.

- Quimiocinas

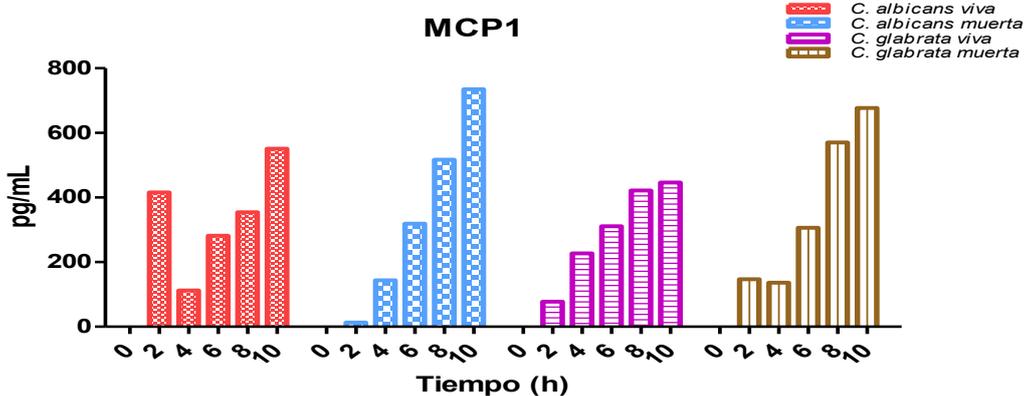
Los resultados de las concentraciones de IL-8 que se muestran en la gráfica 6.4 muestran que la mayor concentración se obtuvo con la infección de *C. glabrata* muerta por calor a las 8 horas (102.11 pg/mL), valor mucho más elevado en comparación con *C. glabrata* viva en donde alcanza concentraciones de hasta 23.59 pg/mL a las 10 horas. *C. albicans* también

tiene expresión de dicha quimiocina pero en mucha menor concentración en donde podemos observar que a las 10 horas es cuando se tiene mayor cantidad.



Gráfica 7.1. Cuantificación de la quimiocina IL-8 en queratinocitos HaCaT infectados con las levaduras vivas y muertas de *C. albicans* y *C. glabrata*.

Por otra parte, los resultados correspondientes a la expresión de MCP-1 muestra que las concentraciones de esta quimiocina son mucho mayores que el resto de las citocinas evaluadas, alcanzando valores de concentración de hasta 735.27 pg/mL a las 10 horas en la infección realizada por *C. albicans* muerta por calor, seguida por *C. glabrata* muerta por calor a las 10 horas con una concentración de 677.24 pg/mL. En conclusión, la producción de citocinas y quimiocinas en las células HaCaT infectadas puede diferenciarse en función de su capacidad metabólica.



Gráfica 7.2. Cuantificación de la quimiocina MCP-1 en queratinocitos HaCaT infectados con las levaduras vivas y muertas de *C. albicans* y *C. glabrata*.

e) Microscopía Confocal

En la figura 7 se muestran las imágenes resultantes del marcaje de los TLRs 2, 4 y 6 en queratinocitos infectados por levaduras vivas de *Candida albicans* durante 2, 6 y 10 h, en donde se puede observar que la mayor expresión se encuentra en el receptor TLR-6 seguido por el TLR-2, a las 10 horas de

infección. En el caso del TLR-4 sí se nota expresión pero es menor que los receptores anteriores, sin embargo igual se observa su mayor expresión a las 10 h.

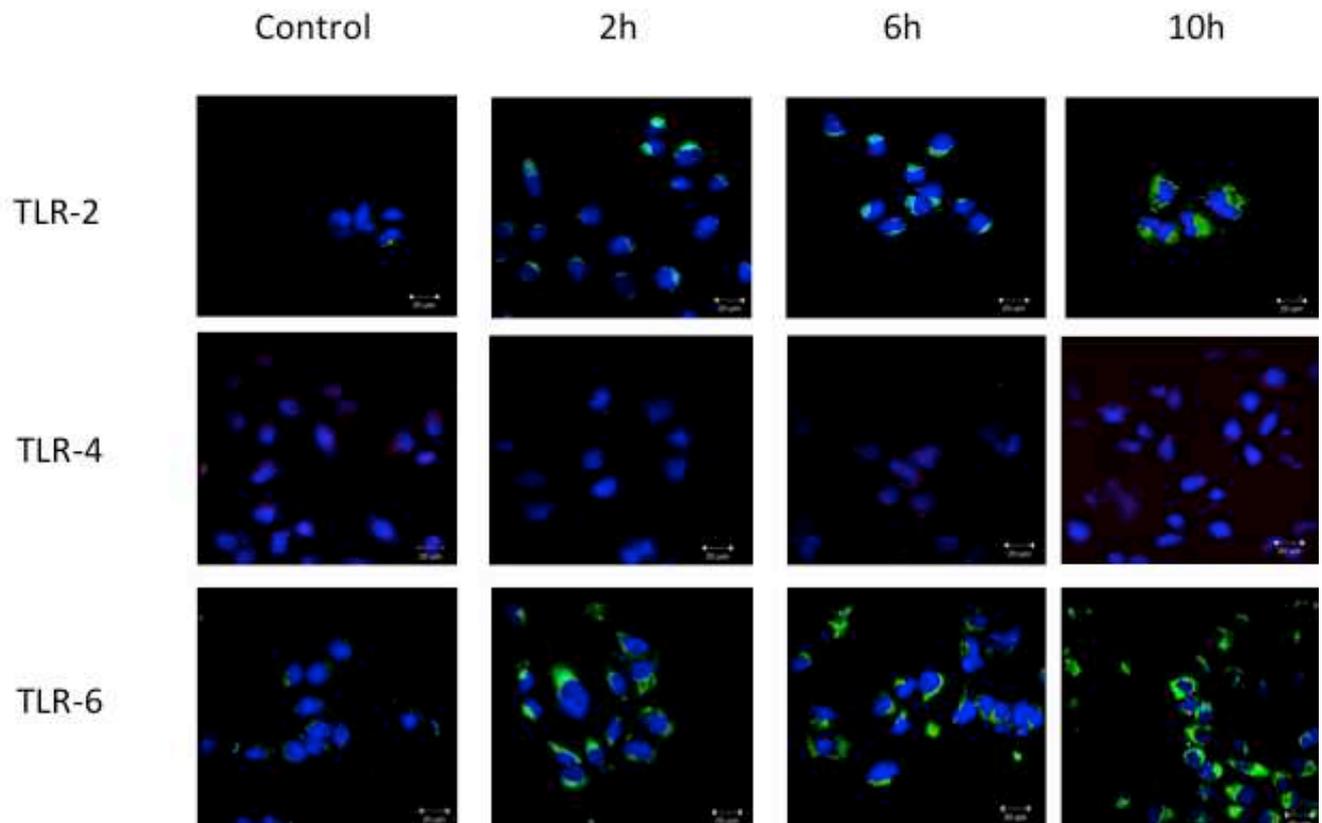


Figura 7. Marcaje por microscopía confocal de los receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos HaCaT infectados con levaduras vivas de *C. albicans*, de las 2 a las 10 h. (TLR-2 Y 6 en verde, TLR-4 en rojo, núcleos en azul)

En el caso de la infección con *C. albicans* muerta por calor, en donde se puede observar que la expresión de los tres receptores es mucho menor que con la cepa viva, pero aun así el receptor TLR-6 se expresa de mayor manera en comparación de TLR2 Y TLR4 durante toda la cinética.

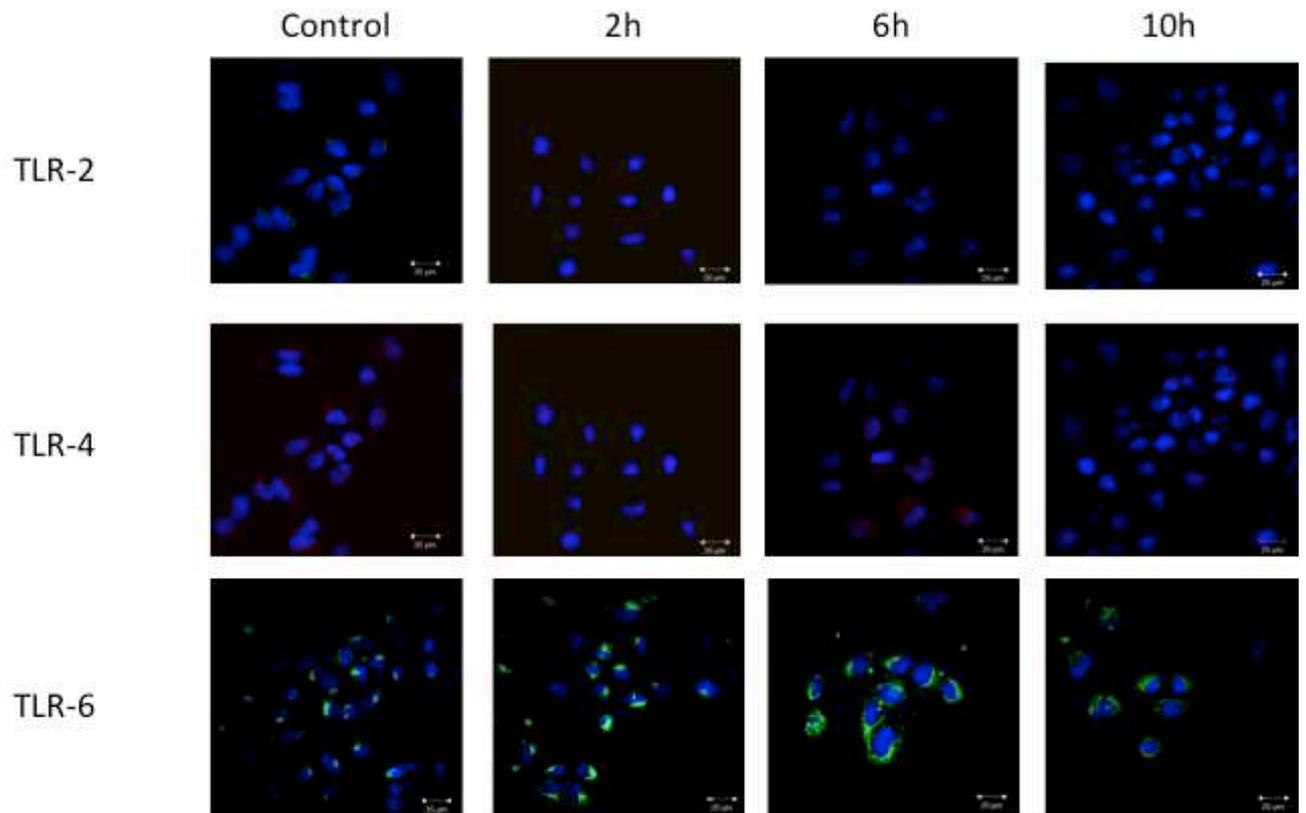


Figura 8. Marcaje por microscopía confocal de los receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos HaCaT infectados con *C. albicans* muerta por calor, de las 2 a las 10 h. (TLR-2 Y 6 en verde, TLR-4 en rojo, núcleos en azul)

En el caso de los marcajes obtenidos para las infecciones con *C. glabrata* viva se puede observar en la figura 9 que la mayor expresión se detectó para el receptor TLR6 seguido del TLR2 pero en este caso a las 6 h. La expresión de TLR2 es baja cuando se compara con TLR4 y TLR6.

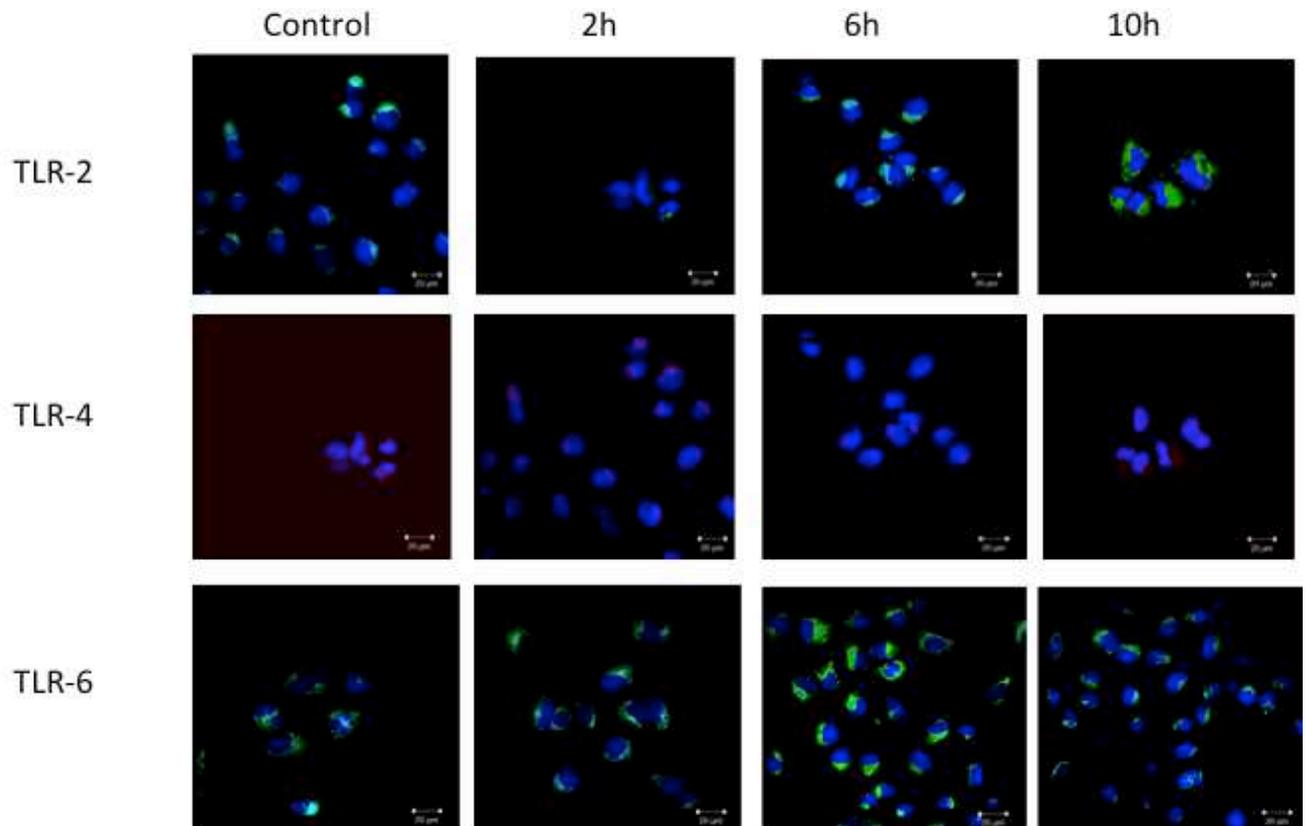


Figura 9. Marcaje por microscopía confocal de los receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos HaCaT infectados con *C. glabrata*, de las 2 a las 10 h. (TLR-2 Y 6 en verde, TLR-4 en rojo, núcleos en azul)

En la figura 10 se observan los marcajes realizados en las infecciones de HaCaT por *C. glabrata* muerta por calor, en donde la mayor expresión se alcanzó para el TLR6. No se observó ninguna marca para TLR2 ó TLR4.

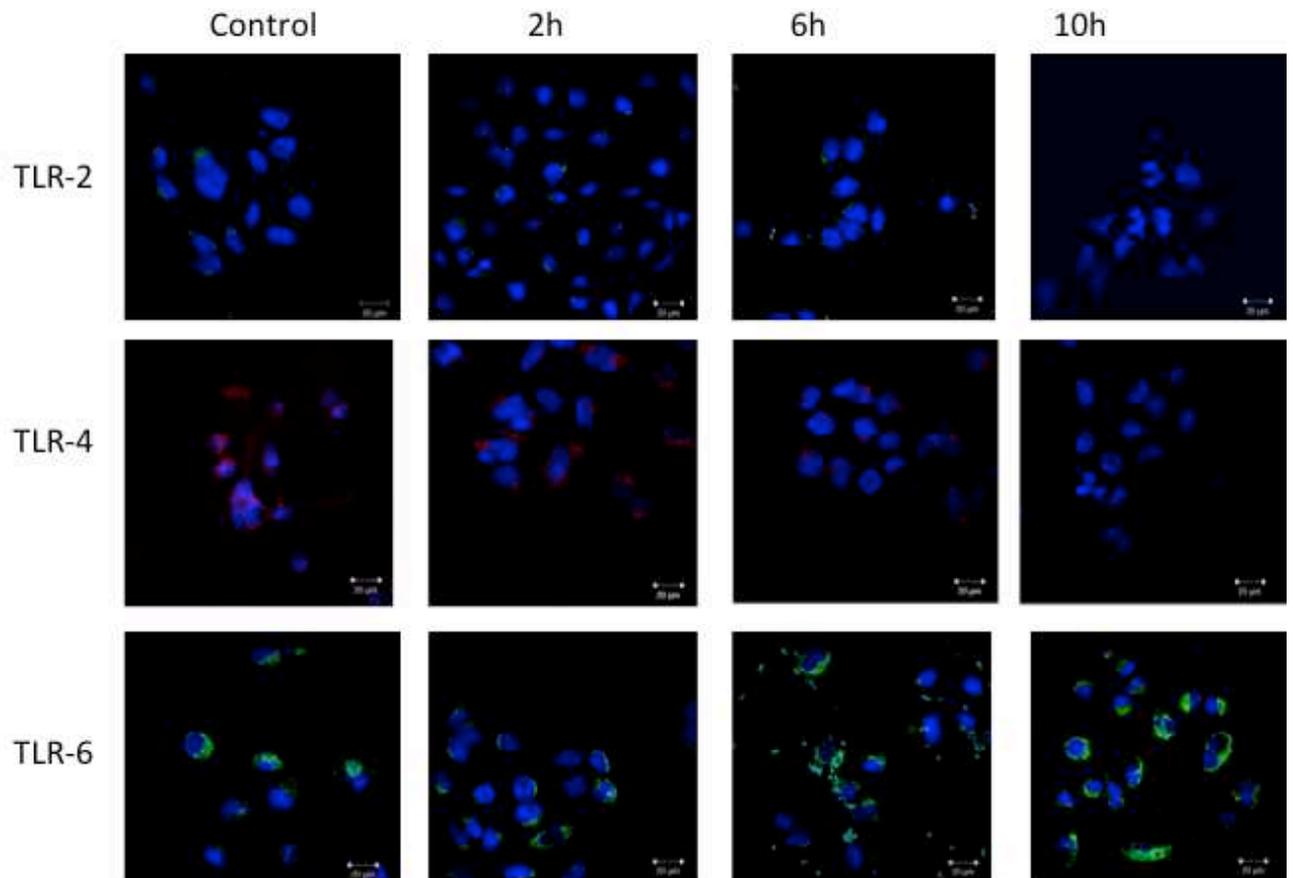


Figura 10. Marcaje por microscopía confocal de los receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en queratinocitos HaCaT infectados con *C. glabrata* muerta por calor, de las 2 a las 10 h. (TLR-2 Y 6 en verde, TLR-4 en rojo, núcleos en azul)

f) Tinción del citoesqueleto

- *Candida albicans*

Se puede observar en la Figura 11 el rearrreglo que se genera en las fibras de actina presentes en el queratinocito al ser infectadas por *C. albicans* tanto viva como muerta por calor; en las imágenes del grupo control se ven claramente en rojo las fibras de actina. En el caso de *C. albicans* viva, a las 2 horas de infección se empieza a modificar el arreglo de estas fibras ya que se ven como si se abrieran, pasando 6 horas se empiezan a destruir estas fibras de actina y a las 10 horas se observa que ya no hay células, solo la formación de tubo germinativo de *C. albicans*, esto demuestra la agresividad de la cepa.

Al estar muerta *C. albicans* cambia su comportamiento ya que efectivamente a las 2 horas empieza a darse el rearrreglo de las fibras de actina en las células y prosigue en toda la cinética, pero en comparación con lo anterior, ésta no destruye a la célula, solo se interioriza, como se ve en la imagen de 10 horas.

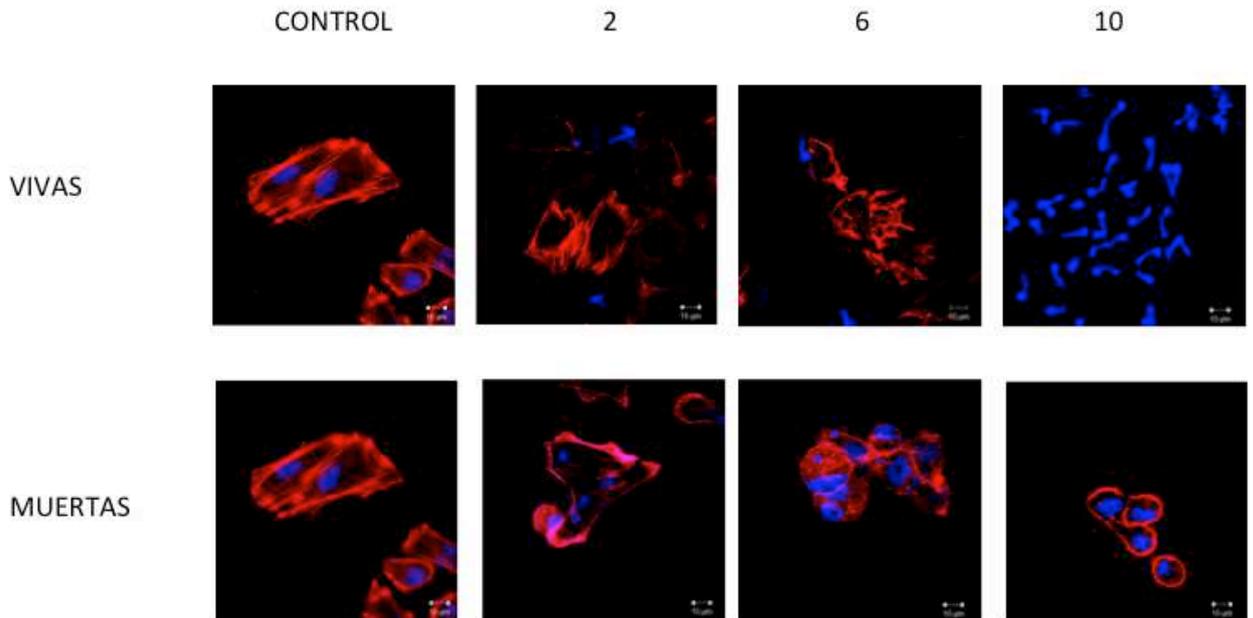


Figura 11. Rearreglo de las fibras de actina de los queratinocitos HaCaT al infectarse con levaduras vivas y muertas de *C. albicans*. (fibras de actina marcadas en rojo, núcleos y levadura marcados en azul)

C. glabrata se comporta de misma manera que *C. albicans* pero de una manera menos agresiva, ya que ésta no llega a matar por completo a la célula pero si se interioriza ocasionando el rearreglo de las fibras de actina desde las 2 horas; cuando infectamos con *C. glabrata* viva se puede ver que a las 10 horas, las levaduras entran a la célula, pero cuando se infectan con levadura muerta, éstas son interiorizadas a las 2 horas y al no tener actividad, las células las van eliminando quedando a las 10 horas muy pocas levaduras dentro de éstas.

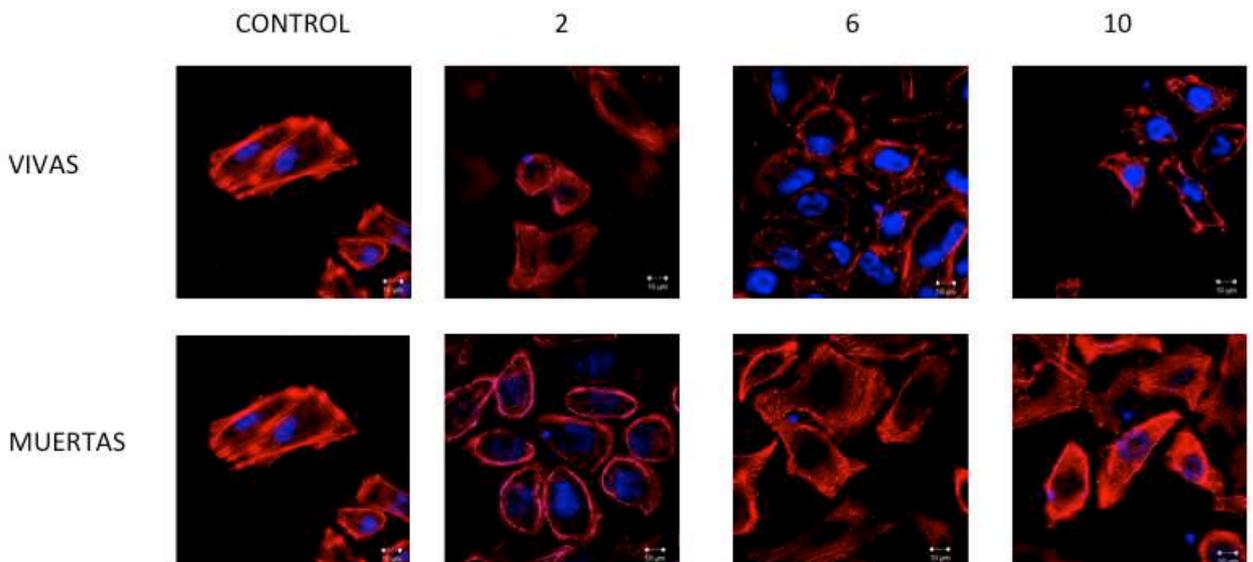


Figura 12. Rearreglo de las fibras de actina de los queratinocitos al infectarse con levaduras vivas y muertas de *C. glabrata*. (fibras de actina marcadas en rojo, núcleos y levaduras marcados en azul)

8 Discusión

Como la piel es el órgano más grande del cuerpo, éste se considera la barrera física más importante que se tiene contra patógenos externos, la cual está compuesta por diferentes tipos de células capaces de desempeñar mecanismos de defensa tanto a nivel innato como adaptativo; estos mecanismos se activan al presentarse algún tipo de lesión en el tejido. Como parte del gran repertorio celular epidérmico, se encuentran los queratinocitos que representan el 80% de estas células y por lo tanto tienen una mayor posibilidad de encontrarse primero con el agente patógeno, y son capaces de desencadenar una respuesta inmunológica de tipo innata contra ellos mediante la expresión de receptores de superficie (Toll) y además son una fuente importante de liberación de citocinas y quimiocinas.^{50,78,79}

Debido a la gran cantidad de estas células en la epidermis fue que se decidió en este trabajo estudiar la activación de los queratinocitos cuando son expuestos a levaduras de dos diferentes especies de *Candida* y así determinar la expresión de los receptores de superficie tipo Toll y la producción de citocinas pro-inflamatorias.

De acuerdo a la literatura las levaduras de *C. albicans* son aquellas que se aíslan con mayor frecuencia en los diferentes tipos de candidiasis por lo que ésta se considera la más patógena;^{80,81} debido a que tiene varios factores de virulencia que son capaces de activar al sistema inmune innato del hospedero, específicamente induciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias en distintos tipos de células debido a que es reconocida por varios receptores, como los receptores tipo Toll (TLRs).⁸²

Al momento de revisar los RT-qPCR se compararon los resultados de las gráficas 2.1 y 4.1 de las levaduras vivas de *C. albicans* y *C. glabrata* respectivamente se observa que hay una mayor expresión de quimiocinas MCP-1 y IL-8 en la infección, sin embargo las levaduras de *C. albicans* alcanzaron valores mucho más altos. De la misma forma en las gráficas 2.2 y 4.2 se demuestra que la expresión de citocinas pro- inflamatorias (TNF- α , IL1- β y TGF- β) es mayor en la cepa viva de *C. albicans* para los tres casos, mientras que TGF- β no se expresa significativamente con levaduras de *C. glabrata*.

Pero sucede algo interesante al momento de comparar los resultados obtenidos por medio del RT-PCR con las lecturas de concentraciones de estas citocinas y quimiocinas por medio del método de ELISA, ya que en el caso de las quimiocinas en efecto sí se alcanzan concentraciones altas de IL-8 y más altas de MCP-1 en la infección, sin embargo se alcanzaron concentraciones similares de MCP-1 en las dos levaduras tanto vivas como muertas; esto puede ocurrir debido a los factores de virulencia con los que cuentan las levaduras de la familia de *Candida*, como son las proteasas que pueden dañar a la célula hospedera e hidrolizar proteínas y por tanto inactivar la función de las moléculas del sistema inmune de naturaleza protéica y con ello evadir o resistir el ataque anti-fúngico. Por otra parte al momento en que el queratinocito genera el RNAm para la producción de quimiocinas y citocinas, las levaduras liberan fosfolipasas que atacan a este ácido nucléico impidiendo así la síntesis de proteínas, como se demuestra en este caso con las quimiocinas.^{25,26,27}

Las citocinas MCP1 y IL8 tienen actividad quimiotáctica, y las gráficas 2.1 y 4.1 muestran que hay mayor expresión de IL8 cuando las levaduras de ambas *Candidas* están vivas, la participación de estas quimiocinas ha sido reconocida de manera muy importante en el fenómeno inflamatorio ya que son las encargadas de reclutar e inducir la activación de neutrófilos en el sitio de infección por *Candida Spp.*^{14, 83} Al momento de comparar estos resultados con los niveles de las quimiocinas secretadas al medio mediante la técnica de ELISA, se observó que la expresión de estas quimiocinas puede ser activada tanto por levaduras vivas como muertas, esto se explica por lo demostrado por el grupo de Kiyoura *et al.*, los cuales dicen que las levaduras del género *Candida* al ser inactivas por calor pierden la actividad biosintética de proteínas y por tanto del factor de virulencia asociado con las proteasas, coincidiendo así con lo explicado anteriormente.⁸²

En las gráficas 2.2 se observó que hay una mayor expresión de citocinas pro-inflamatorias cuando las levaduras que infectaron a la línea HaCaT se presentaron vivas, en comparación con aquellas muertas por calor (gráfica 3.2), esto se debe a que al estar muertas por calor éstas inducen poca producción de citocinas en los queratinocitos pero siguiendo el mismo patrón que cuando se da la infección con levaduras vivas mostradas en las gráficas 4.3 y 5.2 ($TNF-\alpha > IL-1\beta > TGF-\beta$). Al momento de cuantificar las concentraciones de las citocinas por el método de ELISA nos percatamos que las concentraciones obtenidas eran muy pequeñas, esto se pudo deber a las proteasas anteriormente explicadas.

En las gráficas 2.1 y 4.1 para el caso de las quimiocinas los queratinocitos infectados tanto con levaduras vivas de *C. albicans* como *C. glabrata* la mayor expresión relativa de estas moléculas se observó a las 6 h después de la infección momento en el cual se produce la mayor cantidad de RNAm.

En los resultados de la expresión de los receptores tipo Toll se observó que se expresaban mejor en infecciones con levaduras vivas, aunque por otro lado al tener las levaduras muertas la expresión de los receptores era débil, esto sucede debido a que en las levaduras muertas por calor los componentes de la pared celular siguen siendo reconocidos por anticuerpos anti-receptores tipo Toll, esto ya había sido demostrado por otros autores con anterioridad^{82,83}; incluso en este trabajo se demuestra que las levaduras de *C. albicans* muertas por calor incrementaron la expresión superficial de TLR6 en la célula inmunocompetente como se observa en la gráfica 3.3.

Kiyoura y colaboradores demostraron que levaduras del género *Candida* al ser inactivas por calor pierden la actividad biológica de un grupo de adhesinas catalogadas como factores de virulencia, las cuales participan en el reconocimiento de las levaduras por parte de los receptores TLR2 Y TLR4⁸², tomando como referencia lo anterior, en este trabajo se demostró que las levaduras muertas por calor inducen niveles bajos de los receptores TLR2 y TLR4, sin embargo TLR6 sí es reconocido como se muestra en las gráficas 3.3 y 5.3 tanto así que a las 6 y 8 horas después de la infección respectivamente se observa una expresión relativa de 100 y 1000 veces mayor que el valor basal.

Los resultados obtenidos por medio de la RT-PCR en la expresión de los receptores tipo Toll se confirma por medio de las imágenes captadas por el método de microscopía confocal, en donde se corrobora que TLR-6 es el que más se estimula por ambas levaduras de *Candida*, metabólicamente activa como muerta.

Para corroborar que las levaduras se internalizan en los queratinocitos, llevamos a cabo tinciones del citoesqueleto en las 4 cinéticas de infección realizadas en este estudio. En las figuras 12 y 13, se puede apreciar claramente como la actina que se encuentra en el citoplasma del queratinocito sufre un rearrreglo para permitir el ingreso de las levaduras a la célula, confirmando el que estas levaduras se internalizan. También por medio de este experimento se puede comprobar el por qué *C. albicans* es la cepa más aislada en casos de candidiasis cutánea, ya que se observa que al estar viva a las 10 horas de infección la levadura ya destruyó al queratinocito, en comparación con *C. glabrata* que aunque también se ve daño en la estructura de la célula, a las 10 horas no la ha destruido totalmente y sigue estando dentro de ella.^{2, 3, 29,30}

Los factores de virulencia del grupo de *Candida* son piezas importantes en la comprensión de la infección por estas levaduras, ya que estas interrumpen la acción pro-inflamatoria que generan los queratinocitos en defensa contra ellas, ocasionando que la respuesta innata sea muy débil, generando así que las especies de *Candida* sean agresivas y un peligro para las personas con inmunodepresión, generando así los altos índices de candidiasis que se presentan en el mundo.

Por lo tanto, es importante seguir estudiando las diferentes funciones y mecanismos por los que el queratinocito al ser la primera célula inmunocompetente con la que se encuentran las levaduras en piel, puede ser capaz de evitar y/o controlar las infecciones cutáneas que pueden ser causadas por *Candida*.

9. Conclusiones

- 1.- Se logró establecer el modelo de infección *in vitro* de queratinocitos humanos con la línea celular HaCaT por *C. albicans* y *C. glabrata*.
- 2.- Los queratinocitos humanos infectados con ambas especies de *Candida* sobre expresan altos niveles del receptor Toll 6.
- 3.- La infección del queratinocito por levaduras de *Candida* induce la expresión de las quimiocinas IL-8 y MCP-1.
- 4.- El queratinocito produce las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β como resultado de la infección, sin embargo se observa mayor producción cuando se usan levaduras vivas en el modelo de infección.
- 5.- En las tinciones de citoesqueleto se confirma que las levaduras se internalizan en los queratinocitos, apreciándose un rearrreglo en las fibras de actina.

6.- Se logró determinar un perfil diferenciado de expresión y secreción de citocinas por parte del queratinocito de acuerdo a la especie de *Candida*.

Perspectivas al proyecto

Será interesante seguir la investigación buscando los diferentes medios de internalización de las levaduras de ambas cepas en el queratinocito, al igual de ampliar la búsqueda de expresión de citocinas de regulación (IL-4, IL-10 etc.), así como de otros mediadores importantes en la función inmune innata como son los péptidos antimicrobianos.

10. Bibliografía

1. Candidiasis. Generalidades. [http : // www . fcm . uncu . edu . ar / medicina / posgrado/dermatologia/teoricospdf](http://www.fcm.uncu.edu.ar/medicina/posgrado/dermatologia/teoricospdf), 29/05/15 10:43 am.
2. Martínez E., García J. E., Calvo M. G., Carrasco R. L., Padilla F. G., López Z. C., Mayorga J., Arenas R. (2008). Candidiasis cutánea: utilidad del CHROMagar *Candida* en la identificación de especies. *Dermatología Revista Mexicana*, 52: 121-126.
3. Etezadi T., Hajheydari Z., Kalarestaghi A. R., Omran A. N., Shokohi T., Hedayati M. T. (2012). The Prevalence of *Candida* in Skin and Acne Lesions. *Journal of Isfahan Medical School*, 30: 1-9.
4. Fidel P.L., Vázquez J.A., Sobel J.D. (1999). *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Review*, 12: 80-96.
5. Arenas R, Bonifaz A, Chávez G, Estrada R. (1999). Primer consenso de micosis superficiales. *Dermatología Revista Mexicana*, 43(2):80-88.
6. Sobel JD, Chaim W. (1997). Treatment of *Torulopsis glabrata* vaginitis: retrospective review of boric acid therapy. *Clin Infect Dis*, 24:649-52.
7. Arenas R, Cedeño L, Vázquez del Mercado E, Aguilar Heredia MR. (2004). Micosis superficiales en geriatría. Estudio retrospectivo de los casos estudiados en 10 años en un hospital general de la Ciudad de México. *Dermatología Revista Mexicana* 48:300-6.
8. Castrillón L. E., Palma A., Padilla M. C. (2005). Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatología Revista Mexicana* 46:12-27.
9. Martín A. (2010). Tratamiento de la infección fúngica basado en la respuesta inmunológica. *An Pediatr (Barc)*. doi:10.1016/j.anpedi.2010.04.016.
10. Murciano C. (2009). Participación de los receptores tipo Toll (TLRs) y efecto de la inmunosenescencia en la respuesta inmunitaria frente a *Candida albicans*. *Universitat de València. Servei de Publicacions*.
11. Min L., Qing C., Yongnian S., Weida L. (2009). *Candida albicans* phospholipomannan triggers inflammatory responses of human keratinocytes through Toll-like receptor 2. *Experimental Dermatology*, 18: 603-610.

12. Yadev N.P. (2011). Evaluation of tissue engineered models of the oral mucosa to investigate oral candidiasis /Microbial Pathogenesis 50: 278-285.
13. Koelsch G. (2000). Enzymatic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, Biochimica et Biophysica Acta 1480: 117-131.
14. Whinbley N. (2015). *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-albicans *Candida* species. Cytokine. 76: 42-52.
15. Rajendran (2016). Clinical consequences of *Candida* biofilm formation, Clinical Microbiology and Infection, Volume 22 Number 1, January.
16. Bouza E., Muñoz P. (2008). Epidemiology of candidemia in intensive care units, International Journal of Antimicrobial Agents 32 Suppl. 2: S87–S91.
17. Zhao L., Sybren de Hoog G. , Cornelissen A., Lyu Q., Mou L., Liu T., Cao Y., Vatanshenassan M., Kanget Y., (2016). Prospective evaluation of the chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of non-*Candida albicans*. *Candida* species/ fungal biology 120: 173-178.
18. Vázquez, J., Sobel J. (2001). Candidiasis. Essentials of Clinical Mycology: 167- 206.
19. Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, (2005). Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol 43:1829–35.
20. Dominique S., Frank C. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. The LANCET Infectious Diseases Vol 2 February.
21. Krcmery V., Barnes A. J. (2002). Non-*albicans Candida spp.* causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. Journal of Hospital Infection 50: 243-260.
22. Dimopoulos G, Ntziora F, Rachiotis G, Armaganidis A, Falagas ME. (2008). *Candida albicans* versus non-albicans intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. Anesth Analg, 106:523–9.
23. Bodey G., Mardani M., Hanna H., Boktour M., Abbas J., Girgawy E., Hachem R., Kontoyiannis D., Raad I., (2002). *C. glabrata* and *C. albicans* Fungemia in Patients with Cancer. Am J Med. April 1, Volume 112.
24. Weinberger M., Leibovici L, Perez S, Samra Z, Ostfeld I, Levi I, Bash E, Turner D, Goldschmied-Reouven A, Regev-Yochay G, Pitlik SD, Keller N. (2005). Characteristics of candidaemia with *Candida- albicans* compared with non-albicans *Candida* species and predictors of mortality, Journal of Hospital Infection 61: 146–154.
25. Salyers A, Witt D. (1994). Virulence factors that damage the host. In: Salyers A, Witt D, editors. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, DC: ASM Press. p. 47e62.

26. Whiteway M. and Oberholzer U. (2004). *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 7: 350–357.
27. Richard A. Calderone and William A. Fonzi. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *TREND Sin Microbiology*. Vol.9 No.7.
28. Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J., Gow, N.A., (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 67.
29. Rangel, C., Moro-Morales, H., Flores, A. (2011). Aislamiento y caracterización bioquímica de la α -glucosidasa II del hongo patógeno *Candida albicans*. *Acta Universitaria de la Universidad de Guanajuato*; 21 (2): 5-10.
30. Calderone, R.A. (2002). *Candida* and Candidiasis. 3rd ed. American Society for Microbiology Press.
31. 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. *Current opinion in microbiology* 8: 378-384.
32. Pärnänen P. Meurman J., Nikula-Ijäs P. (2015) A novel *Candida glabrata* cell wall associated serine protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 457: 676-680.
33. Malani, A., Hmoud, J., Chiu, L., Carver, P.L., Bielaczyc, A., Kauffman, C.A. (2005). *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. *Clin. Infect. Dis.* 41: 975– 981.
34. Pfaller, M.A., Diekema, D.J., (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 133–163.
35. Holley A., Dulhunty J., Blot S., Lipman J., Lobo S., Dancer C., Rello J. and Dimopoulou G. (2009). Temporal trends, risk factors and outcomes in *albicans* and *non-albicans* candidemia: an international epidemiological study in four multidisciplinary intensive care units. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 554.e1–554.e7.
36. Nguyen H., Peacock J.E., Morris A.J., Tanner D.C., Nguyen M.L., Snyderman D.R., Wagener M.M., Rinaldi M.G., Yu V. L. (1996). The Changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *The American Journal of Medicine*. Volume 100. 6: 617–623.
37. Molina, M., Gil, C., Pla, J., Arroyo, J., Nombela, C. (2000). Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc. Res. Tech.*, 51: 601-612.
38. Ruan SY, Lee LN, Jerng JS, Yu CJ, Hsueh PR. (2008) *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. *Clin Microbiol Infect.* 14: 136–40.
39. Pontón J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol.* 25: 78-82.

40. Arenas R. (2003). *Micología médica ilustrada*. 2a ed. México: McGraw- Hill Interamericana, 189.
41. Granados-Perales, D., Ugalde-Fernández, J. (2010). Successful evolution of premature triplets with systemic neonatal candidiasis treated with caspofungin. *Bol Med Hosp Infant mex*; 67 ene- feb: 52-57.
42. Pereira, G., Maisch, T. (2012). Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biology*, 116: 1-10.
43. Guzel, AB., Ilkit, M., Akar, T., Burgut, R., Demir, S. (2011). Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID *Candida* agar versus CHROMagar *Candida* for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. *Med Mycol.* 49(1): 16-25.
44. Mundy L., MD. (2009). Risk factors and outcomes of *Candida albicans* and *non-albicans Candida* species at a Thai tertiary care center/ *American Journal of Infection Control* November.
45. Chintaginjala A., Kolalapudi S. (2014). Congenital candidiasis. *Indian Dermatology Online Journal*, Vol 5: Suplemento 1.
46. Rocha, R., Lozano, P., Laguna Y. (2005). Modelos de la patogénesis de las enfermedades infecciosas. BUAP 1a edición México: 50-80.
47. Krishna S. & Miller L. S. (2012). Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections *Seminars in Immunopathology*. 34: 261–280.
48. Lulevich V., Yang H., Isseroff R.R., Liu G. (2010). Single cell mechanics of keratinocyte cells. *Ultramicroscopy*. 110: 1435–1442.
49. Watts C. J., Wagner D. K., and Sohnle P. G. (2009). *Fungal Infections, Cutaneous. Pathogenesis*. Elsevier Inc.
50. Castrillón R. L. E, Palma R. A., Padilla D. C. (2008). La función inmunológica de la piel. *Revista Mexicana de Dermatología*. 52(5): 211-24.
51. Archundia, A. (2013). *Cirugía 2*. 1st ed. México: McGraw Hill.
52. Palomino, M. (2001). Fisiología de la piel. *Revista Peruana de Dermatología*. 11(2): p. 1-10.
53. Velásquez P. D., Pineda M. C., Cardona C. M. E., Gómez S. N. E., Gartz M. G.J., Úsuga G. I. C., Tróchez W. D. F., Londoño P. C. (2008). Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis. Oportunidades en el medio antioqueño. *Revista Ingeniería Biomédica Medellín, Colombia*, 2(3): 72-83.
54. Nestle F. O., Di Meglio P., Qin J. and Nickoloff B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews Immunology*. 9: 679-691.

55. Summerfield A., Meurens F., Ricklin M. E. (2015). The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Molecular Immunology*. 66 :14–21.
56. Slominski A. T., Zmijewski M. A., Zbytek B., Brozyna A. A., Granese J., Pisarchik A., Szczesniwski A., and Tobin D. J. (2011). Regulated Proenkephalin Expression in Human Skin and Cultured Skin Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 131(3): 613–622.
57. Novak N, Bieber T. (2000). The skin as a target for allergic diseases. *Allergy*. 55: 103-7.
58. Goebel, C., Aeby, P., Ade, N., Alépen, N., Rowland, J., (2012). Guiding principles for the implantation of non-animal safety assesment approaches for cosmetics: Skin sensitisation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. (40): p. 40-52.
59. Hieronymus, T., Zenk, M., Baek, J., Sere, K. (2014). The clash of Langerhans cell homeostasy skin. *Semin Cell Dev Biol*.
60. Rojas, E. (2006). *Inmunología (de memoria): Editorial medica panamericana*.
61. Mascia, F., Mariani, V., Girolomoro, G., Pastore, S. (2003). Blockade of the EGF Receptor Induces a Deranged Chemokine Expression in Keratinocytes Leading to Enhanced Skin Inflammation. *The American Journal of Pathology* 163: 1, 303–312.
62. Abbas, A., Lichtmas, A., Pillai, S. (2008). *Inmunología celular y molecular*. 7° edición. Elsevier. México. Pag: 60-62.
63. Carmichael, A., Willis, M. (2013). The immunology of infection. *Medicine*. 41(11): 611-618.
64. Nieto-Patlán A., Campillo-Navarro M., Rodríguez-Cortés O., Muñoz-Cruz S., Wong-Baeza I., Estrada-Parra S., Estrada-García I., Serafín-López J., Chacón-Salinas R. (2015). Recognition of *Candida albicans* by Dectin-1 induces mast cell activation. *Immunobiology*. 220: 1093–1100.
65. Kim, Y., Jang, E., Lee, J., Seo, S., Lee, M., Lee, C. (2010). Diarylheptanoid Hirsutenoxime Inhibits Toll-Like Receptor 4-Mediated NF-κB Activation Regulated by Akt Pathway in Keratinocytes. *American Journal of Chinese Medicine*, 38: 1207- 1222.
66. Florian, M., Landen, N., Bouez, C., Zucolo, M., Gueniche, A. (2014). Activation of Toll – like receptors alters the microRNA expression profile of keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 23: 272–293.
67. Sánchez, S., López, F., Carreño, L. (2011). Interleukins network in rheumatoid arthritis pathophysiology: beyond proinflammatory cytokines. *Reumatol Clin*. 6(S3): S20-S24.
68. Trinchieri, G., Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*, 7: 179–190.

69. Wang, X., Tao, C., Wu, Q., Yuan, C. (2013). Protein extract of ultraviolet-irradiated human skin keratinocytes promote the expression of mitogen-activated protein kinases, nuclear factor- κ B and interferon regulatory factor-3 in Langerhans cells via Toll-like receptor 2 and 4. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 29: 41-48.
70. Tapping R.I. (2009). Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*. 21: 175–184.
71. Bacharewicz, J., Reduta, T., Flisiak, I. (2014). Rola receptorów Toll-like w chorobach skóry. (Polish). The role of Toll-like receptors in skin diseases. (English), 101: 309-318.
72. Mesa-Villanueva, M., Patiño, P. (2006). Toll like receptors: between infectious non- self recognition and the endogenous danger signals. *Inmunología*. Abril- Junio; 25(2): 115-130.
73. Bautista, C., Mosqueda, J. (2005). Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria. *Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria*. México. 36: 4.
74. Moreno, C., Sánchez, A. (2003). Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Revista Médica de la Universidad de Navarra*. 47(3): 29-33.
75. Sabroe, I., Parker, L. (2002). Receptores Símil Toll: Su papel e Enfermedades Inflamatorias Alérgicas y no Alérgicas. *Clinical and Experimental Allergy*. 32: 984- 989.
76. Olaru, F., and L. E. Jensen. (2010). Chemokine Expression by Human Keratinocyte Cell Lines after Activation of Toll-Like Receptors (TLRs). *Experimental Dermatology*. 19: 8.
77. Tada H., Nemoto E., Shimauchi H. (2002). *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor α by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol*, 46: 503–512.
78. Palma, R.A., Castrillón, R.L.E., Encinas, P., Padilla, D.M.C., Arenas G.R. (2009). Participación de los queratinocitos en la respuesta inmunitaria contra actinomicetoma. *Dermatología Rev Mex* . 53(5): 225-33.
79. <http://www.uv.es/derma/CLdermatopat/CLdermatopatologia.html>
80. Castrillón, R.L.E., Palma, R.A., Padilla, D. (2004). Reacción inmunológica en infecciones por *Candida* sp. *Dermatologica Rev Mex*. 48: 140-50.
81. Calderone, R., Fonzi, W. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 9 (7): 327-333.
82. Kiyoura, y., Tamai, R. (2015). Innate immunity to *Candida albicans*. *Japanese Dental Science Review* 51: 59-64.

83. Haynes, K. (2001). Virulence in *Candida* species. Trends Microbiol. 9 (12): 591- 596.

11. Anexo

1) 1X regulador de recubrimiento (Coating Buffer)

Diluir 2.5 mL de regulador 10X coating regulador a 22.5 mL de agua grado HPLC.

2) Anticuerpo de captura

Adicionar 48 µL de anticuerpo de captura a 12 mL de 1x regulador de recubrimiento.

3) 1X Diluyente ELISA/ELISPOT

Diluir 10 mL de 5X Diluyente ELISA/ELISPOT en 40 mL de agua grado HPLC

4) Regulador de lavado (PBS-TWEEN 20 pH 7.4)

NaCl	8.00 gr
KCl	0.20 gr
KH ₂ PO ₄	0.14 gr
Na ₂ HPO ₄	0.91 gr
Agua destilada	1000 ml
TWEEN 20.....	50µL

5) Soluciones estándar concentradas

Para reconstituir el liofilizado se adiciona 1 mL de agua grado HPLC al vial, y se agita suavemente durante 15 min. A partir de esta solución se hacen las diluciones correspondientes para cada curva de calibración.

6) Enzima Avidina-HRP (250X)

Adicionar 48 μ L de la enzima en 12 mL de 1X Diluyente ELISA/ELISPOT.

7) Anticuerpo de detección

Adicionar 48 μ L de la enzima en 12 mL de 1X Diluyente ELISA/ELISPOT.