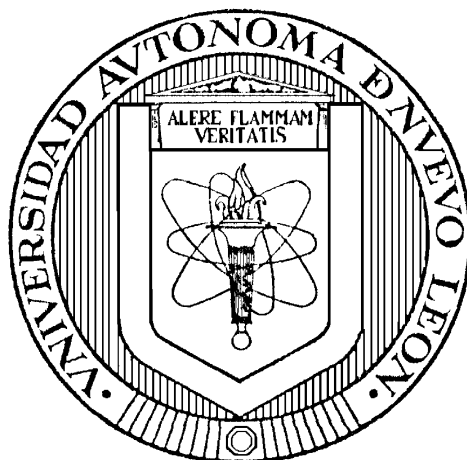


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS FOSFOLIPASAS FÚNGICAS EN LA
INDUCCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs)
POR ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*”**

Por

Q.C.B. LIZBETH CAMPOS GARCÍA

**Como requisito parcial para la obtención del Grado de MAESTRÍA en CIENCIAS
con orientación en Microbiología Médica**

AGOSTO, 2015

**“ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS FOSFOLIPASAS FÚNGICAS EN LA
INDUCCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs)
POR ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*”**

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Alejandro Sánchez González
Director de Tesis



Dr. C. Gloria María González González
Co-director de Tesis



Dr. C. José Frisco Palma Nicolás
Miembro de la Comisión



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

**“ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS FOSFOLIPASAS FÚNGICAS EN LA
INDUCCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs)
POR ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*”**

Presentado por: Q.C.B. Lizbeth Campos García

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Micología y Bacteriología, ambos del centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr.C. Alejandro Sánchez González y la Dra. C. Gloria María González González.



Dra. C. Alejandro Sánchez González
Director de Tesis

*La mayor necesidad del mundo es la de Hombres que no se vendan ni se compren.
Hombres que sean honrados y sinceros en lo más íntimo de sus almas.
Hombres que no teman dar al pecado el nombre que les corresponde.
Hombres cuya conciencia sea tan leal al deber como la brújula al polo.
Hombres que se mantengan de parte de la justicia aunque se desplomen los cielos".*

Elena de White.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado con Amor y Cariño a
Dios y a Toda mi Familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente al científico de científicos, mi Dios, de quien emana la sabiduría y quien me ha acompañado todos los días de mi vida, ninguna victoria o éxito sería posible sin él.

A mi querido esposo Samuel, por su apoyo incondicional que me brindó durante esta etapa, por su amor y comprensión.

A mis amados padres Rubén y Lucitania y mis hermanos menores Rubén y Alejandra, que en la distancia me han apoyado siempre, por su amor y espera al verme.

A mis queridos suegros Javier y Ma. Jesús y toda mi familia que siempre me han echado porras.

A mi comisión de tesis: el Dr. Alejandro Sánchez por su ayuda incondicional, por depositar en mí su confianza en este trabajo y creer en mi capacidad, así como a la Dra. Gloria González por su gran apoyo y guía durante la realización de este trabajo y al Dr. José Prisco Palma por sus sabios consejos que sin duda alguna han contribuido a mi crecimiento profesional.

A mis profesores del departamento de Microbiología, al Dr. Romel Hernández y al Dr. Miguel A. Becerril, por compartir sus conocimientos que me han ayudado a salir adelante en el área de la Ciencia.

Al personal del laboratorio de Micología, la Química Lydia Oviedo, por su disposición amable para enseñarme en el laboratorio y contribuir a este trabajo, así como a las químicas Alma, Laura, Karina por su apoyo que me brindaron.

Al personal técnico del departamento, a Ángeles Quijano y Montserrat por su atención amable y paciencia de enseñarme en los detalles más pequeños pero importantes.

A mis amigos y compañeros de la Maestría: Luis J. Cortez, Rita Moreno, Álvaro Colin, Rogelio Treviño, Alexandra Montoya, Byron Bodden, Abraham Díaz, Saira Martínez, Dany Reyes, Carolina Luna, Sonia Aguilar y Mariana Elizondo. Gracias por hacer de esta etapa la mejor, la mas divertida, por sus ánimos, apoyo y por su amistad valiosa.

¡Infinitas Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN	1-18
1.1 Características de los neutrófilos	1-10
1.1.1 Fagocitosis	2-3
1.1.2 Degranulación	3-4
1.1.3 Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)	4-10
1.2 Características generales de <i>Candida</i>	10-15
1.2.1 Enzimas hidrolíticas de <i>Candida</i>	11-15
1.3 NETs y fosfolipasas	16-18
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. MATERIAL Y MÉTODOS	21-34
4.1 Estrategia general	21
4.2 Identificación fenotípica de especies <i>Candida</i>	21-23
4.2.1 Prueba de filamentación	22
4.2.2 Prueba de producción de clamidosporas	22
4.2.3 Identificación por el sistema API 20C AUX	23
4.3 Determinación de la producción de fosfolipasas	24-27
4.3.1 Actividad y cinética de fosfolipasas en cepas reactivadas en medio sólido	24-25
4.3.2 Actividad y cinética de fosfolipasas en cepas crecidas en medio líquido	25
4.3.3 Determinación del crecimiento	26

4.4	Inducción de NETs por especies de <i>Candida</i> y sus fosfolipasas	28-34
4.4.1	Obtención y purificación de neutrófilos	28-29
4.4.2	Inducción de NETs	29-30
4.4.3	Preparación de diferentes multiplicidad de infección (MOI) y tratamientos	30
4.4.4	Cuantificación de la expansión nuclear	31-33
4.4.5	Ensayo de inmunofluorescencia	33-34
5.	RESULTADOS	35-87
5.1	Identificación fenotípica de especies de <i>Candida</i>	35-39
5.2	<i>C. albicans</i>	39-51
5.2.1	Producción de fosfolipasas	39-44
5.2.2	Inducción de NETs por <i>C. albicans</i>	45-49
5.2.3	Demostración de la presencia de gránulos líticos en los NETs promovidos por <i>C.albicas</i> por medio de inmunofluorescencia	50-51
5.3	<i>C. tropicalis</i>	52-64
5.3.1	Producción de fosfolipasas	52-57
5.3.2	Inducción de NETs por <i>C. tropicalis</i>	58-62
5.3.3	Demostración de la presencia de gránulos líticos en los NETs promovidos por <i>C.tropicalis</i> por medio de inmunofluorescencia	63-64
5.4	<i>C. parapsilosis</i>	65-77
5.4.1	Producción de fosfolipasas	65-70
5.4.2	Inducción de NETs por <i>C. parapsilosis</i>	71-75
5.4.3	Demostración de la presencia de gránulos líticos en los NETs promovidos por <i>C. parapsilosis</i> por medio de inmunofluorescencia	76-77
5.5	<i>C. glabrata</i>	78-87

5.5.1 Producción de fosfolipasas	76-82
5.5.2 Inducción de NETs por <i>C. glabrata</i>	83-85
5.5.3 Demostración de la presencia de gránulos líticos en los NETs promovidos por <i>C. glabrata</i> por medio de inmunofluorescencia	86-87
6. DISCUSIÓN	88-99
7. CONCLUSIONES	100
8. PERSPECTIVAS	101
9. REFERENCIAS	102-108
APÉNDICES	109-114
APÉNDICE A. Preparación de reactivos y soluciones	108-111
APÉNDICE B. Lista de cepas clínicas utilizadas durante el estudio	112-115

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tipos de fosfolipasas	15
2. Mecanismo de Inducción de NETs por fosfolipasas	18
3. Metodología para la actividad de fosfolipasas y determinación crecimiento	27
4. Prueba de filamentación	37
5. Prueba de clamidosporas.	38
6. Actividad de fosfolipasas de cepas de <i>C. albicans</i>	41
7. Producción de halos por cepas de <i>C. albicans</i>	42
8. Cinética de producción de fosfolipasas de <i>C. albicans</i>	43
9. Determinación del crecimiento de cepas de <i>C. albicans</i>	44
10. Inducción de NETs por factores secretados presentes en el sobrenadante de aislados de <i>C. albicans</i>	47
11. Inducción de NETs por aislados de <i>C. albicans</i>	48
12. Inducción de NETs por aislados de crecimiento tardío de <i>C. albicans</i>	49
13. Ensayo de inmunofluorescencia de neutrófilos inducidos con <i>C. albicans</i>	51

14.	Actividad de fosfolipasas de cepas de <i>C. tropicalis</i>	54
15.	Producción de halos por cepas de <i>C. tropicalis</i>	55
16.	Cinética de producción de fosfolipasas de <i>C. tropicalis</i>	56
17.	Determinación del crecimiento de cepas de <i>C. tropicalis</i>	57
18.	Inducción de NETs por factores secretados en el sobrenadante de <i>C. tropicalis</i>	60
19.	Inducción de NETs por aislados de <i>C. tropicalis</i>	61
20.	Inducción de NETs por aislados de crecimiento tardío de <i>C. tropicalis</i>	62
21.	Ensayo de inmunofluorescencia de neutrófilos inducidos con <i>C. tropicalis</i>	64
22.	Actividad de fosfolipasas de cepas de <i>C. parapsilosis</i>	67
23.	Producción de halos por cepas de <i>C. parapsilosis</i>	68
24.	Cinética de producción de fosfolipasas de <i>C. parapsilosis</i>	69
25.	Determinación del crecimiento de cepas de <i>C. parapsilosis</i>	70
26.	Inducción de NETs por aislados de <i>C. parapsilosis</i> con actividad mayor de fosfolipasas o producción de halo translúcido grande y factores secretados en el medio.	73

27.	Inducción de NETs por aislados de <i>C. parapsilosis</i> con actividad menor de fosfolipasas o producción de halo translúcido pequeño y factores secretados en el medio.	74
28.	Inducción de NETs por un aislado de <i>C. parapsilosis</i> negativo a la prueba de fosfolipasas.	75
29.	Ensayo de inmunofluorescencia de neutrófilos inducidos por aislados de <i>C. parapsilosis</i> .	77
30.	Actividad de fosfolipasas de cepas de <i>C. glabrata</i>	79
31.	Producción de halos por cepas de <i>C. glabrata</i>	80
32.	Cinética de producción de fosfolipasas de <i>C. glabrata</i>	81
33.	Determinación del crecimiento de cepas de <i>C. glabrata</i>	82
34.	Ensayo de Inducción de NETs por factores secretados en el sobrenadante de <i>C. glabrata</i> .	84
35.	Ensayo de Inducción de NETs por aislados de <i>C. glabrata</i>	85
36.	Ensayo de inmunofluorescencia de neutrófilos inducidos por aislados de <i>C. glabrata</i>	87

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Comparación de los mecanismos de control de infecciones en neutrófilos.	5
2.	Diferencias morfológicas y características de los diferentes tipos de muerte celular.	7-8
3.	Identificación por el sistema API 20C AUX.	39
4.	Cepas de levaduras de hemocultivos correspondiente a <i>C. albicans</i>	112
5.	Cepas de levaduras de hemocultivos correspondiente a <i>C. parapsilosis</i>	113
6.	Cepas de levaduras de hemocultivos correspondiente a <i>C. glabrata</i>	114
7.	Cepas de levaduras de hemocultivos correspondiente a <i>C. tropicalis</i>	115

ABREVIATURAS

a = Años	ITS = Espaciadores de Transcripción Interna específicos del ADN ribosomal.
ADN = Ácido desoxirribonucleico	LPS = Lipopolisacáridos
AS = Agar Sabouraud	LSGL-1 = Glicoproteína ligando 1 L- selectina
ATCC = Colección Americana de Cultivo Tipo	m = Meses
BPI = Proteína bactericida que incrementa la permeabilidad	M = Masculino
BSA = Albúmina de suero bovino	MAPK38 = proteína cinasa activada por mitógeno p38
cPLA2 = Fosfolipasa A2 citoplasmática	mL = mililitros
°C = Grados Celsius	mM = milimoles
DAG =2,3 Diacilglicerol	μL = microlitros
DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol	μm² = micrometros cuadrados
EDTA = Ácido etilendiamino tetracético	MOI = Multiplicidad de Infección
et. al. = <i>et Alli</i> (Latín, “y otros”)	MPO = Mieloperoxidasa
F = Femenino	(n) = Número de muestra
F (-) = Fosfolipasa negativo	NETs = Trampas extracelulares de Neutrófilos
fMLP = Formil lipopéptidos	NADPH Oxidasa = Complejo oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
g = gramos	Naive = Células sin tratamiento
GO = Glucosa oxidasa	NE = Elastasa de Neutrófilos
h = horas	nm = nanómetros
Id. = Identificación	nM = nanomoles
ICAMs = Moléculas de adhesión intracelular	OD = Densidad óptica
IL-(No.) = Interleucinas	P = Prueba
IP3 = Fosfatidil inositol	

PAD4 = Peptidil aginina deaminasa

PAF-AH = Factor activador de plaquetas
acetilhidrolasa

PAMPs = Patrones moleculares
asociados a patógenos

PBS = Salina amortiguadora de fosfatos

PDA = Agar papa dextrosa

pH = Potencial de hidrógeno

PI3K= Fosfoinosítido 3-quinasa

PKC = Proteín quinasa C

PLB=Fosfolipasa B

PLC = Fosfolipasa C

PMA= Forbol-12-miristato Acetato

PMNs = Polimorfonucleares

PSGL-1= Glicoproteína ligando-1 P-
selectina

PRRs = Receptores de reconocimiento
de patrones

% = Porcentaje

R/N= Recién nacido

ROS = Especies reactivas de oxígeno

SAPs = Familias de aspartil- proteasas
secretadas

Sn= Ataque nucleofílico.

TNF-a = Factor de necrosis tumoral alfa

TSC = Caldo soya tripticasa

UFC/mL = Unidades formadoras de
colonias por mililitro

RESUMEN

Q.C.B. Lizbeth Campos García

Fecha de Graduación: Agosto, 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del estudio: “ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS FOSFOLIPASAS FÚNGICAS EN LA INDUCCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETs) POR ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*”

Número de páginas: 115

Candidato al Grado de MAESTRÍA en CIENCIAS con orientación en Microbiología Médica.

Área de estudio: Micología Médica

La formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) es un mecanismo de reciente descripción llevada a cabo por neutrófilos para la eliminación de hongos a través de una muerte celular denominada NETosis. **Objetivos:** Estudiar los mecanismos involucrados en la inducción de los NETs por 4 especies de *Candida* de relevancia clínica, a través de un análisis del perfil de producción de sus fosfolipasas, y su interacción con los neutrófilos en la inducción de NETs. **Material y Métodos:** Se estudió la cinética de secreción de las fosfolipasas y la actividad enzimática de 120 aislados clínicos de *Candida* a través del método en agar con yema de huevo y el índice Pz. La inducción de NETs se determinó por microscopia de fluorescencia, cuantificación de la expansión nuclear y ensayos de inmunofluorescencia. **Resultados:** Las cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y algunas cepas de *C. parapsilosis* mostraron una actividad muy elevada de fosfolipasas, cinéticas diferenciales de producción, además de una robusta inducción de NETs demostrado por la presencia de calprotectina y mieloperoxidasa, no siendo así para *C. glabrata* la cual mostró actividad alta de fosfolipasas sin inducción de NETs. **Conclusión:** Factores de virulencia presentes en *C. albicans*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis* como las fosfolipasas están implicados en la inducción de NETs. *C. glabrata* no induce la formación de NETs por lo que se sugiere que otros factores de virulencia y de inhibición de este mecanismo podrían influir en dicha respuesta.



Dr.C. Alejandro Sánchez González

Director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Características de los neutrófilos

Los neutrófilos son leucocitos circundantes en sangre pertenecientes a la familia de granulocitos, estas células también denominadas como polimorfonucleares (PMNs) debido a su particular forma nuclear segmentada, desempeñan una función determinante en la respuesta inmune innata, ya que son los primeros en ser reclutados al sitio de la infección para eliminar a los patógenos [1, 2]. Durante su reclutamiento a los sitios de inflamación, reconocen señales derivadas de los microorganismos como los lipopolisacáridos (LPS) y formil lipopéptidos (fMLP) y del hospedero entre los que se encuentran las quimiocinas y citocinas, ejemplos de éstas son las interleucinas 6, 8 y 17 (IL-6, IL-8 e IL-17) así como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), los cuales tienen un papel preponderante. Estas señales estimulan a las células endoteliales para producir moléculas de adhesión como las P-selectinas, E-selectinas y miembros de la superfamilia de las integrinas (ICAMs), donde al interactuar con los neutrófilos por medio de la glicoproteína ligando-1 P-selectina (PSGL-1) y L-selectina (LSGL-1), se acoplan y resultan en un rodamiento característico de los neutrófilos a lo largo del endotelio.

A medida que los neutrófilos interactúan con las células endoteliales, se producen cambios en su biología por la activación de vías de señalamiento mediadas por las familias de cinasas Src, Syk, el fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K) y la proteína cinasa activada por mitógeno p38 (MAPK38). Dicha activación promueve una firme adhesión del neutrófilo al endotelio mediada por la familia de las integrinas $\beta 2$ (LFA-1 y Mac-1). Tal interacción con las integrinas, así como la secreción de quimioatrayentes inflamatorios y citocinas, capacita a los neutrófilos su migración a los sitios de infección y transendotelial. Una vez translocados, los neutrófilos se encuentran en un medio rico en estimulantes inflamatorios tanto del hospedero como de origen patógeno, los cuales dictarán su comportamiento promoviendo la liberación de citocinas para el reclutamiento de otras células inmunes, así como la fagocitosis, la liberación de sus gránulos y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), el cual es un nuevo mecanismo que se ha descrito por el cual puede eliminarse a los microorganismos [2].

1.1.1 Fagocitosis

La fagocitosis es la principal estrategia de defensa utilizada por los neutrófilos contra los patógenos, en la cual, por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), son capaces de reconocer dominios proteicos presentes en patógenos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Una vez que los patógenos son reconocidos por el neutrófilo, los microorganismos son internalizados por la membrana celular en una vacuola llamada fagosoma, la cual al madurar se convierte letal para éstos. En los neutrófilos la maduración del fagosoma

consiste en la fusión de gránulos líticos presentes en el citoplasma al lumen fagosomal, donde al mismo tiempo, el montaje de la NADPH oxidasa en la membrana fagosomal permite la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y de forma conjunta, estos dos mecanismos crean un entorno tóxico para la mayoría de los patógenos (aunque existen microorganismos que han desarrollado estrategias para sobrevivir dentro de ellas) [3].

1.1.2 Degranulación

Una segunda estrategia microbicida llevada a cabo por los neutrófilos es la degranulación. En ésta, los neutrófilos participan activamente en el proceso inflamatorio mediante la acción de múltiples gránulos líticos presentes en su citoplasma, los cuales son clasificados en tres tipos: a) Gránulos azurófilos, formados durante la maduración de los neutrófilos y que contienen mieloperoxidasa (MPO, enzima crítica en el estallido oxidativo), defensinas, lisozimas, Proteína que incrementa la permeabilidad bactericida o BPI (Bactericidal permeability increasing protein), y serin-proteasas como la elastasa de neutrófilos o NE (Neutrophil Elastase) entre otras; b) Gránulos específicos, caracterizados por contener lactoferrina y glicoproteínas, y ser formados después de los gránulos azurófilos, y c) Gránulos gelatinasas, las cuales permiten la trasvasación de los neutrófilos a través del endotelio de los vasos sanguíneos. Una vez que los neutrófilos activados llegan al sitio de inflamación, mediante señales aún desconocidas, movilizan sus gránulos y los fusiona con la membrana plasmática liberando su contenido. De forma interesante, las diferentes clases de gránulos presentan cierta selectividad de movilización en

respuesta a señales inflamatorias, siendo los gránulos azurófilos los más difíciles de movilizar, seguida de gránulos específicos, los gránulos gelatinasa y por último las vesículas de secreción [2].

1.1.3 Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Recientemente se describió un nuevo mecanismo que los neutrófilos utilizan como estrategia antimicrobiana contra los patógenos, denominado trampas extracelulares de neutrófilos o NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Los NETs se originan de la liberación del contenido nuclear de los neutrófilos al espacio extracelular, y están compuestos por ADN, histonas, y cromatina descondensada, lo que simulan fibras delgadas con dominios globulares, en forma de red. Estas redes tienen una doble función: la de capturar a los microorganismos, limitando su expansión y el daño colateral del contenido granular del NET [4-6].

Algunas de las ventajas que ofrece esta nueva estrategia en comparación con la fagocitosis y la degranulación son: la eficiencia de acción por un mayor tiempo, causar el menor daño posible al hospedero, además de ser más eficiente en la eliminación de microorganismos [7], Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de los mecanismos de control de infecciones en neutrófilos.

Mecanismo de control de la infección	Características y lapso de tiempo aproximado.	Técnicas para su estudio.
Fagocitosis	Requiere una constante quimiotaxis y la ingestión de microbios dentro del fagolisosoma requiere alto consumo de energía. Producen menos daño al tejido celular. El tiempo aproximado en el que ocurre es a los 10 min.	-Neutrófilos sin estimular con PMA más la aplicación de ADNsa I. -Aplicación de citocalacina D (la cual inhibe la fagocitosis por medio de la actina). -Ensayo de muerte intracelular (% de supervivencia de microorganismos).
Degranulación	Sus gránulos son tóxicos para el tejido celular produciendo daño y también necesita gasto de energía aunque menos que la fagocitosis. Tiempo aproximado en el que ocurre a los 30 min.	-Utilización de citocalacina D para inhibir la fagocitosis, midiendo el % de muerte de los microorganismos al tiempo de 30min en neutrófilos sin estimular con PMA. -Para ver la actividad antimicrobiana de neutrófilos utilizar la técnica de extractos granulares de neutrófilos humanos en varias concentraciones de ésta y de cultivo (de células) de los microorganismos.
Formación de NETs	Pueden persistir más tiempo en la muerte de los microorganismos que por vía fagocitosis. Tiene menos gasto de energía. Minimiza el daño celular del hospedero al limitar la dispersión de los gránulos con un efecto antimicrobiano al atrapar a los patógenos. El tiempo aproximado en el que ocurre es a los 120 min.	-Ensayo de muerte extracelular (% de supervivencia y % de muerte por NETs). -Utilización de ADNsa I, libre de proteasas y RNAasa en neutrófilos estimulados con PMA. -Fluorescencia con fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales contra el complejo de Histonas H2A H2B y ADN o elastasa. -Colorante azul de calceína y anexina V. -Ensayos de Western Blot. -Tratamiento con PMA o Glucosa oxidasa (GO)

Los NETs son producidos por una muerte celular denominada NETosis, durante la cual los neutrófilos se someten a una serie de cambios morfológicos drásticos. En ésta, una vez que los neutrófilos son activados, adquieren una forma más extendida debido a una firme adhesión a su sustrato. Durante este proceso, la activación de la proteína quinasa C (PKC) es esencial para que a través de reacciones de fosforilación por las MAP cinasas se active al complejo NADPH oxidasa y genere la producción de ROS. Posteriormente el núcleo pierde sus lóbulos por una desintegración de la membrana nuclear. Concomitantemente, los gránulos se desintegran y las proteínas contenidas en éstos, como elastasa y mieloperoxidasa, migran hacia la periferia del núcleo colocalizándose y contribuyendo a la descondesación de la cromatina de manera sinérgica con la actividad de la peptidil arginina deaminasa 4 (PAD4). Posteriormente, la envoltura nuclear se desintegra totalmente, y el contenido del núcleo es mezclado con el citoplasma. Finalmente la membrana citoplasmática del neutrófilo se compromete y su contenido es expuesto al espacio extracelular dando lugar a la formación de NETs [5].

Existen diferencias entre la NETosis y otros tipos de muerte celular como la apoptosis o la necrosis, tanto de manera morfológica como en la producción de algunas moléculas que participan en su inducción [5, 8-11], Tabla 2.

Tabla 2. Diferencias morfológicas y características de los diferentes tipos de muerte celular.

TIPO DE MUERTE CELULAR	CARACTERÍSTICAS	TÉCNICAS DE DETECCIÓN
APOPTOSIS	<ul style="list-style-type: none"> -El ADN es fragmentado por la escisión de los nucleosomas. -La cromatina se condensa y el núcleo se disgrega en fragmentos. -La célula se encoge y se rompe en fragmentos envueltos (cuerpos apoptóticos). -No hay ruptura de la envuelta nuclear. -Vacuolización del citoplasma. -La fosfatidil serina se expone en la hoja externa antes de la integridad de la membrana plasmática comprometida. (son Anexina V positivo) -Los organelos en el citoplasma permanecen intactos, se condensan. -Dependiente de caspasas y requieren producción de ROS. -Requiere estímulo fisiológico o patológico. -Requiere gran gasto de energía. -Afecta a células individuales 	<ul style="list-style-type: none"> -Microscopía electrónica, y de fluorescencia (para ver morfología). -Inmunohistoquímica (proteína Anexina V, colorante azul de calceína, utilización del anticuerpo anti-Fas). -Western Blot: Detección de proteínas presentes en el proceso. -Ioduro de propidio (IP), solo entra a las células con la membrana plasmática dañada (necrosis y apoptosis).
NECROSIS	<ul style="list-style-type: none"> -Retracción del núcleo con condensación de la cromatina. -Lisis del núcleo (cariolisis), fragmentación del núcleo (cariorexsis). -Las células se hinchan, se margina la cromatina. -Dilatación del retículo endoplásmico (RE), tumefacción de las mitocondrias. -Ruptura de las membranas internas como la de los lisosomas. -Requiere estímulo patológico y algunas ocasiones fisiológicas y afecta a grupos de células. -Degradación específica del ADN. -Requiere energía. -Activan proteasas inespecíficas. 	<ul style="list-style-type: none"> -Microscopía electrónica, electroforesis de proteínas (fragmentación del ADN). -Anexina V-FICT positivo/ IP positivo. -Microscopía de fluorescencia combinada con citometría de flujo.

<p>NETosis</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Las células se aplanan y los núcleos pierden su forma lobulada. -La cromatina se descondensa. -Se dilata el espacio entre la membrana interna y externa del núcleo. -Se activa la proteína quinasa 3 para la producción de ROS. -Las membranas nucleares forman vesículas. -Se desintegra la membrana nuclear en vesículas. -Es dependiente de la producción de ROS, e independiente de caspasas. -No hay fragmentación del ADN. -No requiere gasto de energía. -Afecta a células individuales. -La fosfatidil serina se expone cuando se rompe la membrana plasmática. -Relocalización de gránulos (elastasa). -Mezcla de componentes citoplasmáticos y nucleares. -Desaparecen los organelos citoplasmáticos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Microscopía electrónica, inmunofluorescencia. -Fluorescencia con fragmentos FAB de anticuerpos monoclonales contra el complejo de Histonas H2A H2B y ADN o elastasa. -Colorante azul de calceína y anexina V. -Western Blot. -Tratamiento con PMA o GO -Microscopía de fluorescencia combinada con citometría de flujo.
<p>NECROPTOSIS</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Es una necrosis regulada, independiente de caspasas. -Requiere que la función de la caspasa 8 se inhiba o se interrumpa. -Puede ser ejecutada por el FNT (Factor de necrosis tumoral), FasL (Ligando Fas). -Permeabilización temprana de la membrana plasmática. -Citosol translúcido y mitocondrias hinchadas. -Aumenta su tamaño celular y de organelos. -Expulsan el material citoplasmático por perforaciones de la membrana. -Vía de señalización importante a través de RIP I quinasa. - Escapa de la vía de las caspasas y activa a las DNAsas. -Se puede observar cuando las células son estimuladas por señales post-mortem como ligandos de la familia de receptores de muerte (FAS, FNT, TRAIL o ligando inductor de apoptosis relacionado al FNT) en ausencia de la activación de caspasas o <i>in vivo</i> después de lesiones isquémicas. 	<ul style="list-style-type: none"> -Microscopía electrónica de transmisión. -Producción de ROS.
<p>AUTOFAGIA</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Es una muerte celular programada. -Hay una fase de nucleación o ensamblaje. -La membrana se elonga y forma vesículas. -Las vesículas se fusionan formando autofagosomas y después los lisosomas dirigen a éste formando autofagolisosomas. - Los lisosomas del fagosoma destruyen orgánulos de la célula. -Se muestra una célula con muchas vacuolas y lisosomas (no hay morfología de apoptosis) 	<ul style="list-style-type: none"> -Microscopio electrónico y de fluorescencia (morfología, presencia de autofagosomas doble membrana.) -anti LC3 en la membrana de los autofagosomas.

Así, durante la NETosis se observa un aplanamiento del neutrófilo, pérdida de la forma lobular de su núcleo, activación de la proteína quinasa 3, migración de gránulos (mieloperoxidasa y elastasa) hacia la periferia del núcleo para contribuir a la descondensación de la cromatina, desintegración de las membranas nucleares y ruptura de la membrana citoplasmática con el vertimiento del contenido de la célula al espacio extracelular [5]. Estos eventos contrastan con los otros tipos de muerte celular como la apoptosis, donde se observa condensación de la cromatina, y cuerpos apoptóticos; de la necrosis donde existe retracción del núcleo y degradación del DNA con un mayor gasto de energía; de la necroptosis por la vía de señalamiento dependiente de la RIP I quinasa y activación de ADNsas con permeabilización de la membrana citoplasmática, y finalmente difiere de la autofagia por la ausencia de vacuolas o fagolisosomas en la célula.

Por otro lado, se ha observado que los neutrófilos que son inducidos a la formación de NETs, participan en el sistema inmune contra las infecciones tanto bacterianas como parasitarias. Se ha demostrado que algunos parásitos protozoos como *Toxoplasma gondii* y *Eimeria arloingi* son atrapados por las redes que constituyen los NETs promoviendo un efecto antiparasitario. Mientras que en algunas bacterias, como *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, los NETs son inducidos pero sin mostrar dicho efecto microbicida, favoreciendo la diseminación de éstas. Finalmente en los últimos años se ha descrito que uno de los principales factores de riesgo para contraer una micosis oportunista, se encuentran

aquellos en donde los pacientes poseen una disfunción tanto cuantitativa y cualitativa de los neutrófilos, debido a que estas células juegan un papel en impedir el progreso de la enfermedad y a su vez, se ha reportado un efecto fungistático y antifúngico de los NETs frente a hongos de relevancia clínica, entre ellos se encuentran *Aspergillus fumigatus*, y *C. albicans* [12-16,19,75].

1.2 Características generales de *Candida*

Candida albicans es el agente causal de la candidiasis y es uno de los patógenos oportunistas que en los últimos años ha adquirido un mayor interés médico, debido a los porcentajes altos en incidencia y mortalidad. Este hongo comprende más de 200 especies, pero sólo ocho son las más frecuentemente aisladas en enfermedades del ser humano, siendo *C. albicans* la que sobresale ya que puede aislarse hasta en un 85% de los casos. Sin embargo especies como *C. parapsilopsis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* causan candidiasis invasiva y en conjunto con *C. albicans* son la cuarta causa de infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo en los Estados Unidos [17].

C. albicans, y otras especies, forman parte habitual de la biota normal de las personas, teniendo predilección por las mucosas. Una particularidad importante del género *Candida*, es que no producen pigmentos melánicos, formando colonias cremosas, limitadas, planas, opacas, y en ocasiones rugosas o surcadas, de color blanco o blanco-amarillento en el medio de crecimiento. Su morfología microscópica puede variar según la especie: globosas, ovoides, elípticas y cilíndricas; su reproducción asexual o anamórfica es por blastoconidios (holoblástica) y la mayoría

de las especies patógenas pueden formar pseudohifas, con excepción de *Candida glabrata*. Una de las principales características que posee *C.albicans* es crecer de manera dimórfica, es decir a una temperatura de 35-37°C se mantiene como blastoconidias (2-10 milímetros de diámetro) y a 25°-30°C en un medio pobre de nutrientes y tenso forman estructuras a partir de tubos germinales, denominadas hifas o micelio verdadero (5-15 milímetros de largo). Este dimorfismo es considerado uno de los principales factores de virulencia de *C. albicans* [18,19], y reportes demuestran que los NETs, actúan capturando y eliminando a dicho hongo en sus dos formas [20].

Posteriormente se demostró que uno de los principales componentes de los NETs, la calprotectina, proteína de los gránulos del neutrófilo, reduce el crecimiento de *C. albicans* contribuyendo a la acción antifúngica de los NETs contra este patógeno [21]. Por lo que, es de relevancia investigar que tipo de proteínas granulares de los NETs son eficientes contra las especies de *Candida* y que mecanismos del hongo inducen a la formación de NETs.

1.2.1 Enzimas hidrolíticas de *Candida*

Por otra parte, los patógenos también llevan a cabo diferentes estrategias para invadir las células del huésped y al mismo tiempo evadir el sistema inmune. En el caso de *Candida spp.*, secreta diversos factores de virulencia, como enzimas hidrolíticas para la adhesión, invasión y destrucción de los tejidos, promoviendo destrucción de las membranas celulares [22,23]. Entre los principales factores de virulencia secretados, se encuentran las proteasas, cuya función es la hidrólisis de

enlaces peptídicos, y las fosfolipasas que hidrolizan los fosfolípidos de las membranas celulares [24]. Las proteasas contribuyen a la adhesión e invasión de los tejidos, además tienen un amplio espectro de sustratos, ya que degrada estructuras de proteínas como la albúmina, hemoglobinas hasta inmunoglobulinas o proteínas del sistema inmune, y a su vez proveen del nitrógeno necesario para la supervivencia del hongo [25-27]. Existen trabajos en los que la función de estas proteínas en la virulencia de las especies de *Candida* ha sido documentado, sin embargo, otros investigadores han encontrado que su presencia no necesariamente representa un rasgo de virulencia para todas las especies. En este sentido, Parra-Ortega y cols. realizaron un árbol filogenético de las familias aspartil proteasas secretadas o SAPs (Secreted Aspartic Proteases) de especies de *Candida* clínicamente relevantes, en donde demuestran que esta familia de genes está presente en los genomas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, no siendo así en *C. glabrata* y *C. krusei*, especies que actualmente han tomado mayor relevancia en infecciones en pacientes inmunocomprometidos [28].

Por otra parte, la relación que poseen las fosfolipasas en la virulencia del hongo han cobrado relevancia, ya que estudios demuestran que existe una expresión activa de estas proteínas en las levaduras y en las hifas de *C. albicans* durante la invasión al tejido, encontrándose de manera abundante en la parte apical de la hifa, en la superficie de la levadura, así como se ha observado que es secretada al medio extracelular en tejidos profundamente invadidos por dicho hongo, como el tracto gastrointestinal [29,30].

Adicionalmente, estudios recientes han demostrado que otras especies emergentes de importancia clínica incluyendo *C. glabrata*, y *C. krusei* poseen actividad de fosfolipasas. D'Eca Junior y colaboradores al realizar pruebas de fosfolipasas y proteasas de diferentes aislados clínicos de *Candida*, encontraron que la mayoría de estos aislados clínicos, 56 (68.3%) fueron positivos a la prueba de fosfolipasas, por otra parte, solamente 16 cepas (44%) resultaron positivas para la producción de proteasas [31-33]. En cuanto al tipo de las fosfolipasas secretadas por las especies de *Candida* se tiene muy poca información y los resultados de los estudios por los investigadores varían debido posiblemente al método utilizado para este fin, además de que en estudios no se ha establecido una relación con su posible papel en la patogenia. Se ha reportado la secreción de dos tipos de fosfolipasas: A y C en *C. albicans* (Abstr. Atti XIV Cong. Naz. Microbiol. Messina, abstr. P35 and P36, 1967), sin embargo otros investigadores al realizar un fraccionamiento crudo de proteínas en filtrados de cultivo de *C. albicans*, encontraron actividad de tres tipos de fosfolipasas; lisofosfolipasa, lisofosfolipasa transacilasa y fosfolipasa B. Otro grupo encontró actividad de fosfolipasa D de esta misma especie [34-37]. Información concerniente a los tipos de fosfolipasas secretadas por especies no pertenecientes al grupo *albicans* es muy escasa, siendo solamente el único estudio realizado por Clency y col., (Programs Abstr. 36th Annu. Meet. Infect. Dis. Soc. Am., abstr. 317, 1998) en donde se encontró actividad de fosfolipasa B y lisofosfolipasa en *C. glabrata*, sin embargo información pertinente a la cinética de producción de estas enzimas, o de otras especies no *albicans* de relevancia clínica no se describió.

La identificación precisa de la cinética de producción y la identificación del o los tipos de fosfolipasas secretadas por las especies de *Candida* de importancia clínica resulta fundamental ya que se sabe que cada una posee diferentes funciones o se encuentran localizadas en diferentes compartimentos de la célula, por lo que podrían tener una relevancia en su patogenicidad o progresión de la enfermedad en los pacientes inmunocomprometidos [38-43].

Existen diferentes tipos de fosfolipasas conocidos como fosfolipasas A,B,C, y D, así como sus subtipos. Dentro de las fosfolipasas A, están la A2 secretoria, encargada del metabolismo de lípidos de membrana; la A2 citosólica con actividad transacilasa y fosfolipasa; la A2 independiente de calcio con actividad de acilglicerol- transacilasa y tria-acil glicerol lipasa y la fosfolipasa A2 dependiente del factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH) implicada en el metabolismo oxidativo de ácidos grasos. Dentro de la fosfolipasas B, se encuentra la B1, la cual tiene una hidrólisis preferencial en la posición sn-2 del diacilfosfolípido y diacilglicerol. En las fosfolipasas C, se encuentra la fosfolipasa C-G2 la cual es crucial en el señalamiento transmembrana y en las fosfolipasas D; se encuentran los subtipos D4, asociada a enfermedades como la artritis reumatoide, y D5 la cual interactúa con hormonas como la 17- β -estradiol.(Figura 1).



Figura 1. Tipos de fosfolipasas

1.3 NETs y fosfolipasas

Las fosfolipasas poseen capacidad de actuar como enzimas degradadoras de glicerofosfolípidos de las membranas celulares, dicha actividad es llevada a cabo al reconocer de manera específica diferentes fosfolípidos que actúan como blanco. Una vez reconocido el enlace éster, es escindido, lo que promueve la síntesis de segundos mensajeros celulares. Dicha capacidad deja en claro el papel de las fosfolipasas en la transducción de señales [30,44].

Como ejemplo de esto, se ha descrito la participación de la fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA2) en la hidrólisis y activación del ácido araquidónico en la posición *sn-2* de los glicerofosfolípidos, en donde este ácido participa como segundo mensajero y contribuye a la síntesis de mediadores inflamatorios a través de la generación de ecosanoínes (tromboxanos, prostaglandinas y leucotrienos). Dichas moléculas son relevantes en la respuesta inflamatoria, pues se sabe que en las células inmunes, entre los que se encuentran los neutrófilos, al activarse esta vía, se incrementa su actividad microbicida frente a microorganismos patógenos, puesto que, la vía del ácido araquidónico derivada de la fosfolipasa A2 citoplasmática, actúa como un análogo a diacilglicerol (DAG), que activa directamente a la PKC y esta a su vez estimula a la NAPH oxidasa y una redistribución de la membrana durante la fagocitosis [45-47].

Adicionalmente, la generación y activación del ácido araquidónico puede llevarse a cabo mediante la acción de otras fosfolipasas, por ejemplo, se sabe que el corte de fosfolípidos de membrana por medio de la acción de la fosfolipasa C (PLC) genera dos productos, el fosfatidil inositol (IP3) y la 2,3 diacilglicerol o DAG, ésta última enzima también posee la capacidad de activar la PKC. De igual forma, cuando el substrato es fosfatidil colina, la fosfolipasa D (PLD) y/o la PLC en conjunto al fosfátido fosfatasa (PA, producto primario de la PLD) produce diacilglicerol [44].

Con respecto a lo mencionado en los párrafos anteriores, la acción de estas fosfolipasas convergen en la activación de la PKC, la cual, es una de las moléculas importantes en la inducción de NETs. La importancia de la activación de la PKC en la formación de NETs ha sido demostrada ampliamente, mediante la utilización del forbol miristato acetato (PMA), el cual es un análogo sintético del DAG que posee la capacidad de activar directamente a la PKC e induciendo la generación de ROS y la formación de NETs [48-51].

Actualmente, no existen estudios que describan el papel de las fosfolipasas en la inducción de NETs, sin embargo, a través de lo documentado y descrito anteriormente, las fosfolipasas A2 citosólica y B, al hidrolizar los fosfolípidos de la membrana celular, dan origen a la formación del ácido araquidónico, el cual activa de manera directa a la PKC, molécula principal en el proceso de la NETosis. Lo anterior sugiere que las fosfolipasas pudiesen participar a través de la vía del ácido araquidónico en la inducción de NETs. La figura 2 muestra este mecanismo

señalando la vía de inducción de NETs mediante el forbol miristato acetato (PMA), un clásico inductor químico de NETs.

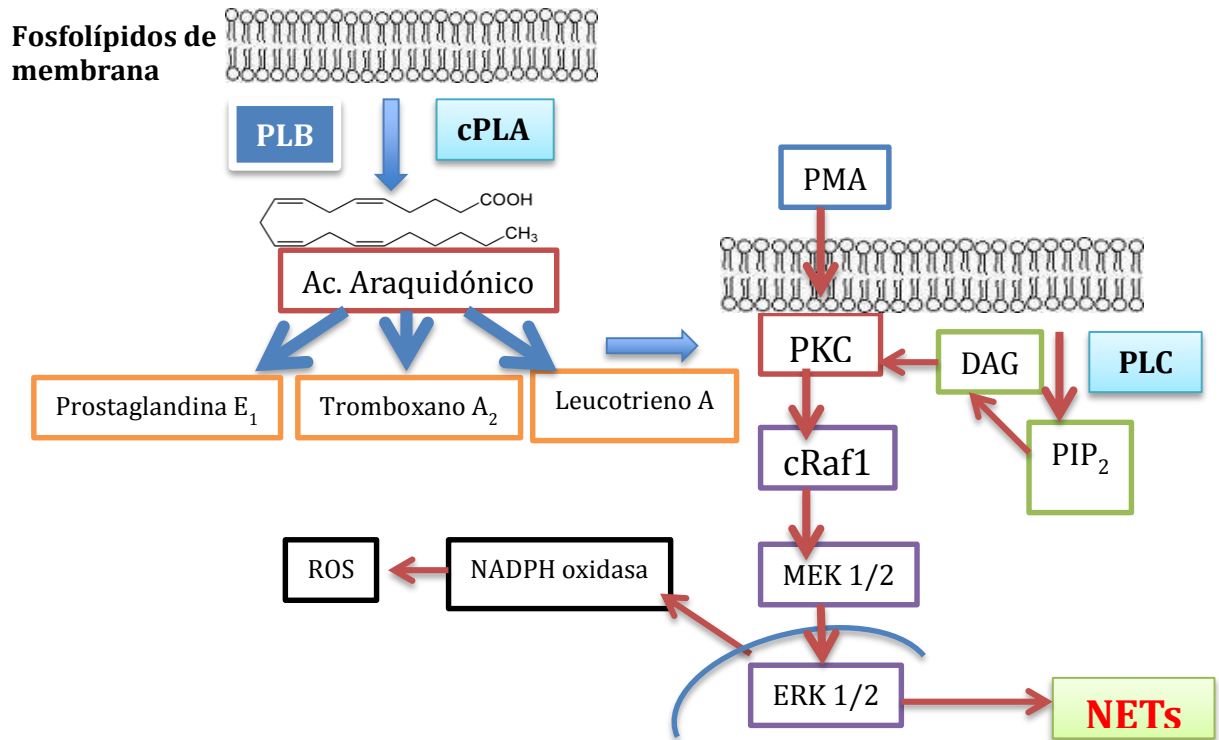


Figura 2. Mecanismo de inducción de NETs por fosfolipasas

En la actualidad, no se sabe cual mecanismo utilizan los hongos oportunistas como *Candida albicans* en la inducción de NETs, pero una posibilidad sería que dependiendo del tipo de fosfolipasas que expresen pudiesen activar a la PKC, a través de la producción de ácido araquidónico, y de este modo promover la formación de NETs.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe muy poca información acerca de los factores de *Candida* que promueven la formación de NETs por lo que la producción de fosfolipasas puede tener un papel importante en su inducción, influir en la eliminación del hongo así como en la patología de la enfermedad.

Una mejor comprensión de estos mecanismos será de utilidad para desarrollar estrategias mas efectivas para el control de las infecciones fúngicas.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la capacidad de diferentes especies de *Candida* y de sus fosfolipasas para inducir trampas extracelulares de neutrófilos.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar fenotípicamente las 4 especies de *Candida* de relevancia clínica (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*) obtenidas a partir de hemocultivos.
2. Evaluar y determinar *in vitro* la producción de fosfolipasas en levaduras de 4 especies de importancia clínica del género *Candida*.
3. Estudiar la capacidad de las cepas y de las fosfolipasas para inducir los NETs.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Estrategia general

Para llevar a cabo el objetivo de este trabajo, se estableció la siguiente estrategia general: A partir de una colección de 120 aislamientos clínicos de sangre, se realizó la identificación fenotípica de especies de *Candida* por los métodos convencionales reportados en la literatura: prueba de filamentación en suero, producción de clamidosporas y mediante el sistema API 20C AUX. Una vez identificadas las especies, de una selección de éstas y mediante previa reactivación en medio líquido o sólido se procedió a la determinación de la actividad de fosfolipasas por la prueba en agar yema de huevo. Se realizó la cinética de producción de dichas enzimas y finalmente se determinó el crecimiento fúngico con el propósito de correlacionar si la secreción de fosfolipasas era dependiente de este. Finalmente se realizó la inducción de NETs por las especies del género *Candida* seleccionadas y sus fosfolipasas.

4.2 Identificación fenotípica de especies de *Candida*

Para la realización de este trabajo, se analizaron una colección de 120 aislados clínicos de hemocultivos con diagnóstico presuntivo de *Candida* spp. Las cepas fueron recolectadas de 2005 a 2013 en el Laboratorio de Micología del Centro

Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI), del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Con el fin de identificar y seleccionar las especies que en la actualidad tienen mayor relevancia clínica (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*), se realizaron las siguientes pruebas de manera simultánea:

4.2.1 Prueba de filamentación

A partir de un cultivo fresco (24h) de *Candida spp.*, se tomó una muestra que fue inoculada en 0.5mL de suero humano y se incubó a 37°C durante 3h. Posteriormente se realizó una prueba en fresco para observar al microscopio (40X) la formación de tubos germinales, los cuales se caracterizan por una pequeña prolongación filamentosa proveniente de la célula levaduriforme, sin constricción en el punto de origen. Esta prueba es presuntiva de *C. albicans*.

4.2.2 Prueba de producción de clamidosporas

Se tomó a partir de un cultivo fresco (24h) de *Candida spp* una muestra de levaduras para ser inoculada en agar harina de maíz (Corn-meal Agar, BD, BBL™) que contiene tween 80 para reducir la tensión superficial y aumentar la formación de hifas y blastoconidias. El cultivo se incubó a 37°C durante 72h., y se realizó un examen en fresco para observar al microscopio la formación de esporas asexuales de paredes gruesas y refringentes, llamadas clamidosporas, que pueden estar intercaladas o en posición terminal de las hifas tabicadas o septadas. Esta prueba es presuntiva de *C. albicans*.

4.2.3 Identificación por el sistema API 20C AUX

Con el propósito de identificar las cepas no *C. albicans* y confirmar las cepas *C. albicans*, se llevó a cabo la determinación por medio del sistema API 20C AUX. En ésta, se tomó una muestra a partir de cultivos frescos (24-48h) de *Candida spp*, para realizar un inóculo en solución salina estéril y ajustarlo al tubo No. 2 del nefelómetro de McFarland (equivalente a 6×10^8 células/mL). Después se tomaron 100µL de la solución, para colocarlo en una solución enriquecedora (API 20C AUX) y posteriormente se cubrieron las 20 cúpulas de la tira API 20C AUX (Biomérieux, Durham, NC), las cuales contienen 19 substratos deshidratados y permiten efectuar ensayos de asimilación de carbohidratos: D-glucosa (GLU), glicerol (GLY), 2-ceto-gluconato cálcico (2KG), L-arabinosa (ARA), D-xilosa (XYL), adonitol (ADO), xilitol (XLT), D-galactosa (GAL), inositol (INO), D-sorbitol (SOR), Metil-αD-glucopiranosida (MDG), N-acetil-glucosamina (NAG), D-cellobiosa (CEL), D-lactosa (origen bovino) (LAC), D-maltosa (MAL), D-sacarosa (SAC), D-trehalosa (TRE), D-melezitosa (MLZ), y D-rafinosa (RAF). Adicionalmente, una de éstas cúpulas contiene un control negativo, el cual también fue incluido colocando sólo el medio enriquecedor sin inóculo. Se llevó a incubación a 30°C (Incubadora American Gold Series, modelo IS-81). La lectura final se hizo a las 72h, y según el perfil de asimilación de carbohidratos, se realizó la identificación de las cepas (sistema de identificación disponible en línea: [apiWeb .biomerieux.com](http://apiWeb.biomerieux.com)).

4.3 Determinación de la producción de fosfolipasas

Para la determinación de la actividad y la cinética de producción de fosfolipasas de las especies de *Candida* previamente identificadas, se utilizó medio con yema de huevo base Sabouraud y para determinar el crecimiento fúngico se utilizó medio PDA (Agar papa dextrosa) (BD, Sparks, MD). La metodología utilizada se describe en la figura 3 y a continuación se menciona de manera detallada.

4.3.1 Actividad y cinética de producción de fosfolipasas en cepas reactivadas en medio sólido

Cepas de *Candida* previamente identificadas, fueron sembradas en agar Sabouraud (AS), (BD, Sparks, MD), para ser reactivadas metabólicamente. A partir de cultivos frescos crecidos a 24h., se inoculó una muestra en solución salina estéril al 0.8% y se ajustó a un inóculo de 1×10^7 UFC/ml que equivale al 20% de transmitancia a 590nm., utilizando un espectrofotómetro (Sequoia-Turner, modelo 340). Una vez ajustado el inóculo, se procedió a realizar la prueba de fosfolipasas, colocando 5 μ L del inóculo en un agar dextrosa Sabouraud modificado con yema de huevo (BD, Difco, Franklin Lakes, NJ) y se incubó a 37°C, llevando a cabo una lectura cada 24h, durante 4 días. Para aquellas cepas de *Candida* que resultaron productoras de fosfolipasas se observó la formación de un halo alrededor del crecimiento de la colonia en el medio de cultivo. La actividad de fosfolipasas fue cuantificada mediante los valores del índice Pz, basado en la medición del diámetro de la colonia /total del diámetro de la colonia más el halo de precipitación. Así, un valor de Pz <0.69 equivale a una actividad muy fuerte, un Pz= 0.70-0.79 (actividad

fuerte), Pz= 0.80-0.89 (actividad leve), Pz= 0.90-0.99 (actividad débil) y Pz= 1 (Negativo).

Una vez realizada la prueba de fosfolipasas para todas las especies de *Candida*, se seleccionó una muestra de cepas productoras o no productoras de fosfolipasas. Como control negativo se utilizó una cepa de *Trichosporum asahii*, la cual no es productora de fosfolipasas, y una cepa ATCC de *C. albicans* como control positivo.

4.3.2 Actividad y cinética de fosfolipasas en cepas crecidas en medio líquido

Para la prueba de fosfolipasas de las especies de *Candida* crecidas en medio líquido, se inoculó una muestra de levaduras a partir de las cepas previamente reactivadas en cultivo fresco de 24h, en 4mL de caldo soya tripticasa o TSC (BD, Sparks, MD). Posteriormente las cepas fueron incubadas a 37°C durante 24h, 72h y 120h, a los cuales de manera independiente se les realizó la siguiente metodología: las muestras se centrifugaron a 3000rpm, durante 15 minutos (DYNAC. Modelo 420101), donde se obtuvo el sobrenadante, el cual se almacenó a 4°C para los siguientes estudios y el pellet, este se ajustó al inóculo establecido (1×10^7 UFC/mL) y se llevó a cabo el mismo procedimiento de la prueba en medio con yema de huevo. En cada punto de estos tiempos de crecimiento mencionados se realizó la prueba de fosfolipasas por 4 días tomando en cuenta la actividad de la enzima cada 24h.

4.3.3 Determinación del crecimiento

Para la determinación del crecimiento de las cepas de *Candida* crecidas tanto en medio líquido como en medio sólido, se llevó a cabo la metodología mencionada en las secciones anteriores (4.3.1 y 4.3.2 respectivamente), con la diferencia que al ajustar el pellet obtenido del medio líquido o la muestra de levadura del medio sólido al inóculo ya establecido, se procedió a colocar 5µL de esta solución en PDA y se incubó a 37°C. La lectura se llevo a cabo cada 24h durante 4 días, tomando la porción de crecimiento de la colonia en el agar e inoculando en 3mL de solución salina estéril, para su posterior lectura a 600nm en el espectrofotómetro. Una vez que se obtuvo la densidad óptica, se realizó una equivalencia, donde $1 \text{ OD} = 3 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$.

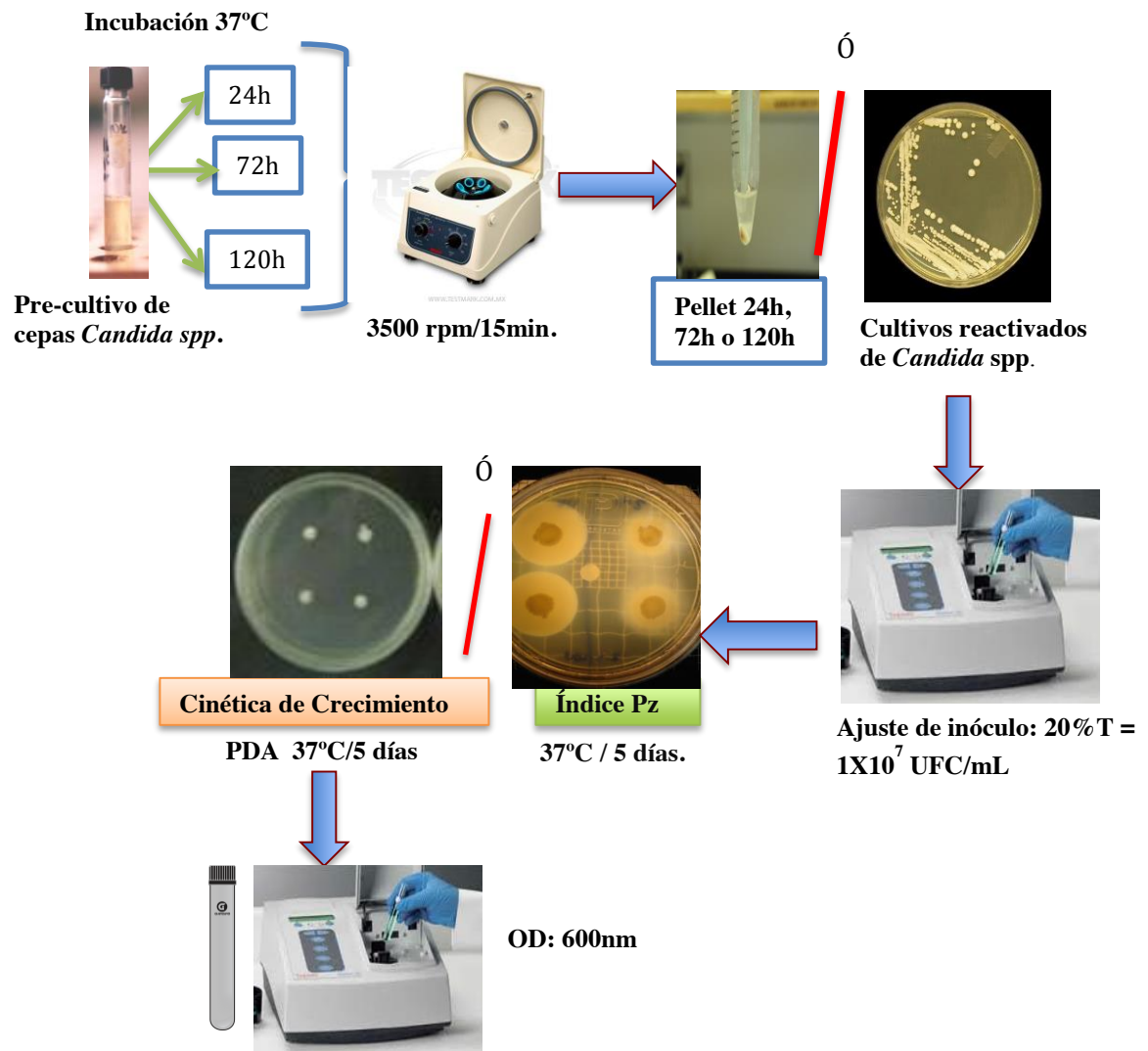


Figura 3. Metodología para la actividad de fosfolipasas y determinación crecimiento

4.4 Inducción de NETs por especies de *Candida* y sus fosfolipasas

Para llevar a cabo la siguiente prueba, las especies de *Candida* seleccionadas fueron previamente reactivadas en agar Sabouraud y además otra parte fue crecida en medio líquido tomando un punto en el tiempo (24-96h), de acuerdo con los resultados de las cinéticas. La metodología para obtención de los neutrófilos e inducción de NETs se describe a continuación.

4.4.1 Obtención y purificación de neutrófilos

Se realizaron extracciones de sangre periférica de donadores sanos en tubos con EDTA (BD vacutainer, Franklin Lakes, NJ.) y las muestras fueron colocadas (7mL) en tubos cónicos de polipropileno de 15mL sobre la cantidad equivalente de Histopaque 119 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se centrifugaron a 800 x g durante 20 minutos, con freno mínimo (valor de 3) (Symphony, modelo 4417R). Las fases correspondientes al suero, monocitos y linfocitos (capa celular superior) se desecharon y se recolectó la capa inferior, correspondiente a los polimorfonucleares (PMN) con una pipeta pasteur, cuidando que la fase roja (eritrocitos) no se recolecte junto con esta. Los PMN recolectados fueron lavados con 2mL de PBS 1X (a partir de PBS 10X: 1,370 mM NaCl, 27mM KCl, 100mM Na₂HPO₄, 18mM KH₂PO₄, pH 7.4) mediante centrifugación a 300 x g durante 10 minutos. Los PMN fueron separados de los eritrocitos remanentes mediante un gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El gradiente de Percoll se preparó a partir de una solución al 100% (9 partes de Percoll más 1 parte de PBS 10X). Se prepararon 5 porcentajes adicionales en 5 tubos de 15mL de la siguiente manera: de la solución Percoll al

100% se tomaron los siguientes volúmenes para las distintas fases, 6.5mL (65%), 7.0mL (70%), 7.5mL (75%), 8.0mL (80%) y 8.5mL (85%) de esta solución y se llevó a volumen total de 10mL con PBS 1X en cada tubo. A continuación, en otro tubo, se colocó cuidadosamente 2mL de cada gradiente de Percoll ya preparado, empezando desde el más concentrado (85%) al menor concentrado (65%). Se resuspendió y mezcló el pellet de células PMN en 4mL de PBS, y se transfirió 2mL de éste a la parte superior del tubo con los diferentes gradientes de percoll. Se centrifugó durante 20 minutos a 800 x g (sin freno). Posteriormente se colectó la interfase entre las capas del 70 y 75% de percoll en un tubo de 15mL y se lavó de nuevo con PBS, mediante centrifugación a 300 x g por 10 minutos. Finalmente las células fueron resuspendidas en medio RPMI suplementado con 10mM HEPES y 0.5% HSA (Life Technologies, Mainway Drive Burlington, ONT). Los neutrófilos se cuantificaron mediante su conteo directo en cámara de Neubauer (Propper, NY, 11101) y se determinó la viabilidad de las células mediante tinción con azul de tripano.

4.4.2 Inducción de NETs

Los neutrófilos (2×10^5 /mL) fueron sembrados en medio RPMI (suplementado con 10mM HEPES y 0.5% HSA) en una placa con 24 pozos (300 μ L/pozo) y se incubaron por 20 minutos a 37°C (Shel Lab, modelo 5215) para permitir su adherencia. Posteriormente se añadieron los siguientes tratamientos: cultivos de especies de *Candida* (MOI 1:100, 50 μ L/pozo) sobrenadante del cultivo líquido al 4% (50 μ L/pozo) o 40 nM PMA (50 μ L/pozo) (Sigma, Saint Louis, MO) para inducir

la formación de NETs. Se incluyó como control negativo, neutrófilos sin estimular, y como control positivo, neutrófilos estimulados con PMA. Se incubaron a 37°C durante 3h y posteriormente se le añadió a cada pozo 10µL de Sytox Green (Molecular probes, Life Technologies, Eugene, OR), y se incubaron en oscuridad por 10 minutos a temperatura ambiente. Adicionalmente en algunos casos las cepas fueron previamente fijadas con paraformaldehído al 4%. Se realizó la cuantificación de la expansión nuclear y se analizó la morfología de las células a través de un microscopio de fluorescencia (Zeiss, axioplan, West Germany).

4.4.3 Preparación de diferentes multiplicidad de infección (MOI) y tratamientos

Para determinar la inducción de NETs por las especies de *Candida*, las cepas que fueron reactivadas en medio sólido, o las que se trataron en medio líquido fueron ajustadas al 40% de transmitancia (2×10^7 UFC/mL) con solución salina al 0.85% estéril, siendo éste un MOI equivalente a 1:100. Para un MOI de 1:10 (2×10^6), se colocaron en un tubo eppendorf, 100µL de la solución anterior añadiendo 900µL de RPMI, y para una MOI de 1:1 (2×10^5), se colocó de igual forma en un tubo eppendorf, 100µL de la solución anterior añadiendo 900µL de RPMI. Los sobrenadantes del cultivo crecido en medio líquido fueron añadidos a los neutrófilos a diferentes concentraciones (40% y 4%), así como el medio de cultivo (Agar soya tripticasa) sin inóculo, utilizado para el crecimiento de la cepa.

4.4.4 Cuantificación de la expansión nuclear

Una vez realizada la inducción de NETs, utilizando un microscopio de fluorescencia, se capturaron imágenes de fluorescencia y su correspondiente campo claro o contraste de fases de al menos 5 campos al azar con el filtro FITC (ex=480;/em=535/50) usando el objetivo de 20X. Posteriormente las imágenes obtenidas fueron procesadas en el programa Image J (Versión 1.47) de la siguiente manera. Por medio de la imagen de fase de contraste de la muestra, se hizo un conteo de la cantidad de células totales por campo, utilizando el contador de células “plug in” del programa mediante los siguientes comandos: Plug-in → Analyze → Cell counter → Initialize → Select the desired type → count. El número total de células fue registrado en una hoja de Excel (Microsoft Excel 2011 para Mac, Versión 14.1.0). Después se trabajó con la imagen de fluorescencia por el sytox, transformándola en una imagen blanco y negro de 8-bit en este programa (Comandos: Image→ type→8-bit). Se ajustó la luz y contraste de la imagen para hacer claramente discernibles las células enteras del ruido del fondo, haciendo click para aplicarlo (Comandos: Image→Adjust → Brightness/Contrast→ Apply). Se ajustó posteriormente, el umbral de la imagen (en la tabulación de la imagen se seleccionó “Adjust” y después “threshold” y en las opciones se seleccionó “Default”, fondo rojo y negro). Se movió la pestaña deslizante superior hasta que el color rojo cubrió por completo las células, evitando la aparición de ruido en la imagen (Comandos: Image → Adjust → Threshold (select Default, Red and Dark background) → Apply). Luego, usando las herramientas de dibujo, se eliminaron las células del borde de la imagen, y manualmente se separaron las células, seleccionando la herramienta brocha o “paintbrush”. Se analizaron las imágenes para obtener el área pixel correspondiente

de cada célula, para esto se seleccionó en la tabulación “Analyze”, “Analyze particle” y se estableció los valores de tamaño 100-Infinito, mostrando los contornos y comprobando los resultados de la pantalla, haciendo click en aceptar (Comandos: Analyze → Analyze Particle <set Size: 100-Infinity, Show: Outlines and check Display results> → OK).

Posteriormente si se dividieron adecuadamente las células, el programa debe ser capaz de contar las células individuales (indicado por un número rojo dentro de cada célula). Una vez realizado esto, se copiaron los datos del número de evento y área que se muestran en la ventana de resultados y se pegaron en el documento de Excel en una nueva columna llamada Imagen J resultados. Luego, en la misma hoja de Excel, se creó una columna llamada BINS, el cual es un rango de los números en incremento que cubren desde el valor mínimo al máximo obtenido por el área de todos los tratamientos. En la siguiente celda se calculó la frecuencia de cada dato en el tratamiento, insertando la función “Frecuencia” y se introdujo el rango de datos para el área del tratamiento de la matriz de datos y el rango de los datos para los contenedores de la matriz de BINS, haciendo click en aceptar. La función sólo devolverá el primer valor; de ésta extender la selección para toda la gama de valores de Bins. Después se hizo click sobre la fórmula y se introdujo el comando <Ctrl> + <Shift> + <Enter>.

Los datos fueron convertidos al porcentaje de células positivas al sytox dividiendo los valores de frecuencia por la cantidad total de células determinadas de la imagen de contraste de fase, y se trazó el porcentaje de células Sytox-positivas dentro del rango del área ADN en μm^2 (dividir los valores de la matriz de Bins por el

diámetro estimado en una etapa no estimulada de los neutrófilos humanos ,10 μ m). En general se puede considerar una célula NETotica a la que presenta núcleos descondensados y supera la superficie media normal de neutrófilos no estimulados (80 μ m²), suponiendo una forma circular y el uso de $\pi \times r^2$.

4.4.5. Ensayo de inmunofluorescencia

Se analizaron los NETs inducidos por inmunofluorescencia. Para esto se prepararon previamente los anticuerpos por dilución en un buffer de incubación (BSA al 3% en PBS 1x) y después de sembrar los neutrófilos (2x10⁵ células/pozo) en medio RPMI sobre cubreobjetos de 13mm en placas de 24 pozos, se añadieron los tratamientos con las especies de *Candida* así como los controles respectivos y se incubó durante 3h a 37°C para inducir la formación de NETs. Posteriormente se fijaron las células con 4% de paraformaldehído (concentración final), y se incubó por 10 minutos o el tiempo requerido a temperatura ambiente.

Se preparó una cámara húmeda recubriendo el fondo de una bandeja con toallas de papel húmedo, descartando el exceso de agua y extendiendo bien el papel para eliminar las arrugas. Se cortó el parafilm del tamaño adecuado y se puso sobre las toallas de papel húmedo añadiendo agua de nuevo y eliminando el exceso. Con el uso de pinzas y una aguja, se sacaron los cubreobjetos de los pozos y se colocaron en la cámara húmeda, etiquetándolos adecuadamente. Luego, se lavaron cuidadosamente con 100 μ L de buffer BSA al 3% en PBS 1x. Se permeabilizaron las células con 100 μ L de buffer de permeabilización, Tritón 100x al 2% (50 μ L de Triton 100x en 2.5mL

de PBS 1x) cubriendo cada cubreobjetos y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo 2 veces con 100 μ L de buffer BSA al 3% en PBS 1x. Después se añadieron los anticuerpos primarios previamente diluidos 1:100, utilizando anti-calprotectina (Anti-ratón, monoclonal) y anti- Mieloperoxidasa (Anti-Humano, policlonal) (Dako, Agilent Technologies, Carpinteria, USA), los cuales fueron incubados durante 1h a 37°C y de nuevo se lavó 2 veces con buffer BSA al 3% en PBS 1x. Finalmente se añadieron 50 μ L de los anticuerpos secundarios, Alexa Fluor 488 conejo-anti-ratón IgG (Life Technologies, Thermo Fisher, USA) con fluorescencia verde y Alexa Fluor 568 cabra anti-conejo (Life Technologies, Thermo Fisher, USA) con fluorescencia roja, diluidos ambos a 1:300 con la solución Buffer, éstos fueron incubados por 45 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavó 2 veces con 100 μ L de buffer BSA al 3% en PBS 1x, y se agregó 50 μ L de DAPI (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) previamente diluido (990 μ L Buffer más 10 μ L DAPI) a cada tratamiento para teñir los núcleos, llevándose a incubación a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos. Se montaron laminillas para su análisis por microscopia de fluorescencia colocando los cubreobjetos cuidadosamente en una gota de glicerol al 70% sobre portaobjetos y se adquirieron imágenes de los diferentes campos.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Identificación fenotípica de especies de *Candida*

En la figura 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos de la prueba de filamentación y clamidosporas respectivamente realizada para las 120 cepas de *Candida spp.* provenientes de aislados clínicos de sangre, así como una imagen representativa de cada una, siendo un 25% de cepas positivas para la prueba de filamentación y clamidosporas y un 75% negativas para ambas pruebas. Las cepas que fueron positivas para ambas pruebas ya mencionadas y presuntivas de *C.albicans*, se observó la formación del tubo germinal, el cual es una prolongación filamentosa originada de la célula levaduriforme (filamentación) y también se observó la formación de esporas asexuales (Clamidosporas), intercaladas o en la porción terminal de las pseudohifas que son refringentes al microscopio y que se muestran en la imágenes 4 y 5 de los incisos correspondiente a los incisos B.

A continuación, para la identificación a nivel de especie de las cepas de *Candida* que fueron positivas y negativas para las pruebas anteriormente mencionadas, se confirmaron por el sistema API 20C AUX, resultando en 120 cepas que correspondían a las 4 especies de relevancia clínica, donde el 25% de las cepas positivas a la prueba de filamentación y clamidosporas (n=30) fueron todas

identificadas como *C.albicans* por dicho sistema bioquímico y el resto (75%) de cepas negativas a las dos primeras pruebas fueron identificadas como no *C.albicans*. El perfil de asimilación de carbohidratos mas representativo de cada especie así como su respectivo porcentaje de especificidad por esta prueba se muestra en la tabla 3, resultando para las cepas *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* un 99.60%, 99.90%, 99.30% y 95.70% de especificidad de identificación más frecuente, variando en su perfil bioquímico 8/30 cepas en carbohidratos como xilitol y trealosa en *C. albicans*, 8/30 cepas en carbohidratos como glicina, arabinosa, D-xilosa y adonitol en *C. parapsilosis*, 1/30 cepas en carbohidratos como trealosa en *C. glabrata* y 5/30 cepas en carbohidratos como xilitol, inositol, D-cellobiosa y D-lactosa en *C. tropicalis* (Tablas 4-7, Apéndice B).

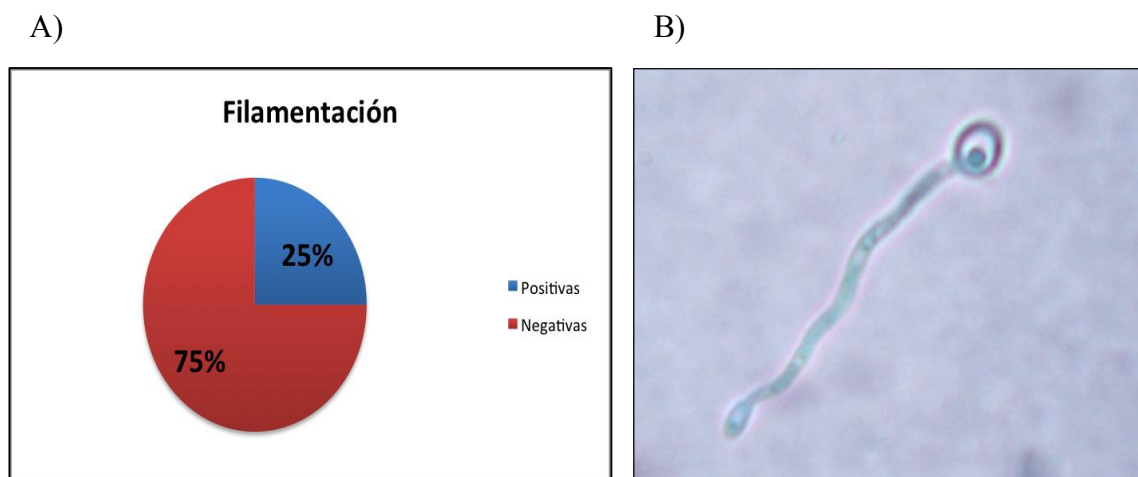


Figura 4. Prueba de filamentación. En la figura (A) se muestra el porcentaje de las 200 cepas de *Candida spp.* que fueron positivas (25%) y negativas (75%) a esta prueba. En la figura de la derecha (B) se observa la formación de un tubo germinal, el cual es una prolongación filamentosas originada de la célula levaduriforme, característico de *C. albicans*.

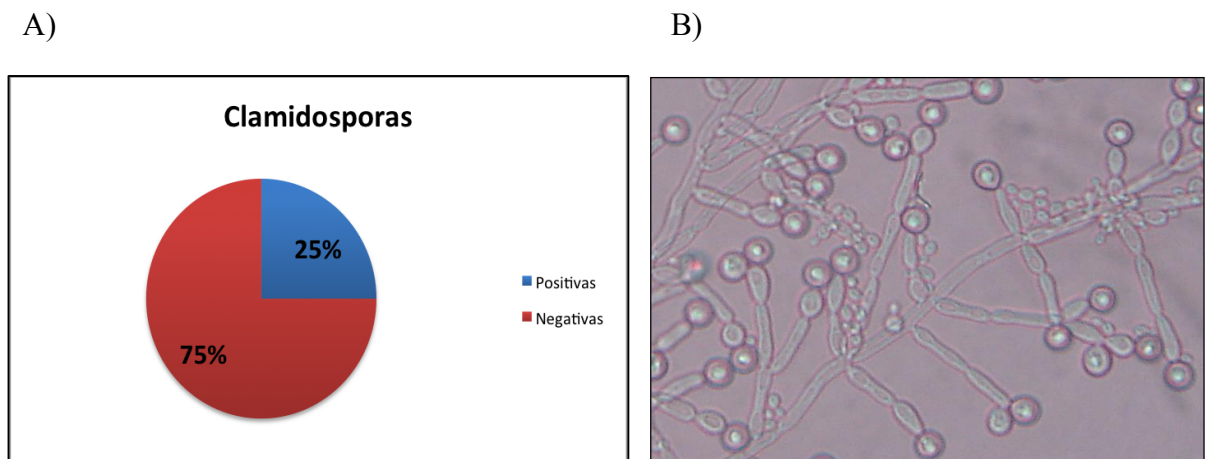


Figura 5. Prueba de clamidosporas. En la figura de la izquierda (A) se muestra el porcentaje de las 200 cepas de *Candida spp.* que fueron positivas (25%) y negativas (75%) a esta prueba. En la figura de la derecha (B) se observa la formación de esporas asexuales, intercaladas o en la porción terminal de las pseudohifas refringentes al microscopio, presuntivas de *C. albicans*.

Tabla 3. Identificación por el sistema API 20C AUX.

<i>Candida spp.</i>	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	Frecuencia de identificación de las cepas <i>Candida spp.</i>	% de especificidad
<i>C. albicans</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	30/120	99.60%
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	30/120	99.90%
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	30/120	99.30%
<i>C. tropicalis</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	30/120	95.70%

Para el cumplimiento de los siguientes 2 objetivos del trabajo experimental, los resultados fueron seccionados en 4 partes, de acuerdo a las cuatro cepas previamente identificadas para un mejor análisis de cada una.

5.2 *C. albicans*

Se realizó la determinación de producción de fosfolipasas de las 120 cepas previamente identificadas, ya que el porcentaje de especificidad de la prueba fue alta para todas y la frecuencia de la variación en el perfil bioquímico fue bajo. Dichas cepas fueron activadas y crecidas en medio sólido (AS) y se llevó a cabo el método en agar yema de huevo. A partir de dicho análisis se realizó una selección de estas para los siguientes estudios.

5.2.1 Producción de fosfolipasas

La figura 6 muestra los resultados obtenidos de la actividad de fosfolipasas de las cepas de *C. albicans* (n=30) con base al valor o “índice Pz”, observándose un 97% de actividad muy alta para estos aislados. De manera interesante, observamos la

formación de distintos halos de precipitación en el agar con yema de huevo por acción de las fosfolipasas los cuales se muestran en la figura 7. Dichos halos fueron categorizados como halo transparente, halo muy marcado, y doble halo para las cepas de *C. albicans*, en diferentes porcentajes.

En la figura 8 se muestra la cinética de la actividad de fosfolipasas (índice Pz; eje “y”) de las cepas *C. albicans* previamente seleccionadas con base a los resultados anteriores. Las mediciones se llevaron a cabo cada 24h durante 4 días (eje “x”), tanto para aquellas crecidas y activadas en medio sólido, como aquellas cepas crecidas en un medio líquido por 24h, 72h y 120h como se describe en la metodología. Se observó una actividad similar de fosfolipasas para los diferentes tratamientos a las 96h de la prueba (4º día), sin embargo las cepas de cultivo tardío (120h), su actividad es lenta y pierden la producción del halo marcado. Adicionalmente, en esta misma figura se muestran imágenes representativas (a los 4 días de la prueba, para todos los grupos) de 4 de estas cepas que produjeron los 2 halos más característicos (halo muy marcado, y halo transparente con actividad alta para ambos), en los 3 diferentes tiempos de crecimiento en medio líquido. Se incluye el control negativo a un aislado de *T.asahii* el cual se conoce previamente como no productor de estas enzimas, el cual fue probado en las mismas condiciones que los aislados de *Candida*. En la figura 9 se muestra la cinética de crecimiento de las cepas *C. albicans*, obtenidos de la medición a través de la densidad óptica. La medición es reflejada como levaduras /mL (eje“y”) el cual también se realizó cada 24h durante 4 días (eje “x”). Es interesante mencionar que en las cepas así como en el control negativo se observa que el crecimiento es mayor en las cepas crecidas en medio sólido que para las crecidas en medio líquido.

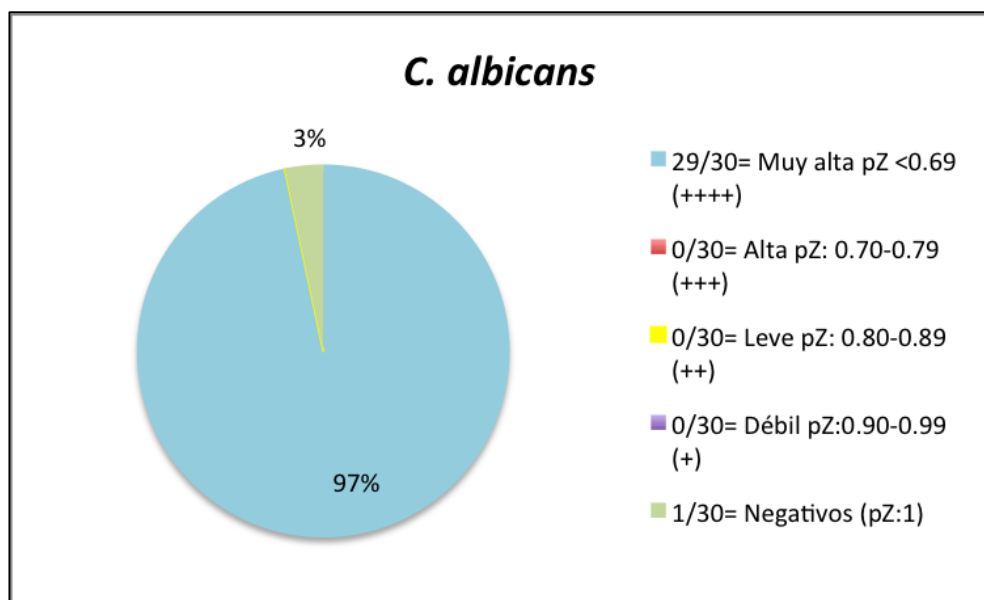


Figura 6. Actividad de fosfolipasas de cepas de *C. albicans*. Todas las cepas (n=30) fueron activadas en medio sólido (AS) y posteriormente fueron inoculadas en agar con yema de huevo, donde se midió la actividad de fosfolipasas en base al índice Pz: Muy alta, alta, leve, débil o negativa. El porcentaje más alto (97%) mostró una actividad muy alta para esta especie.

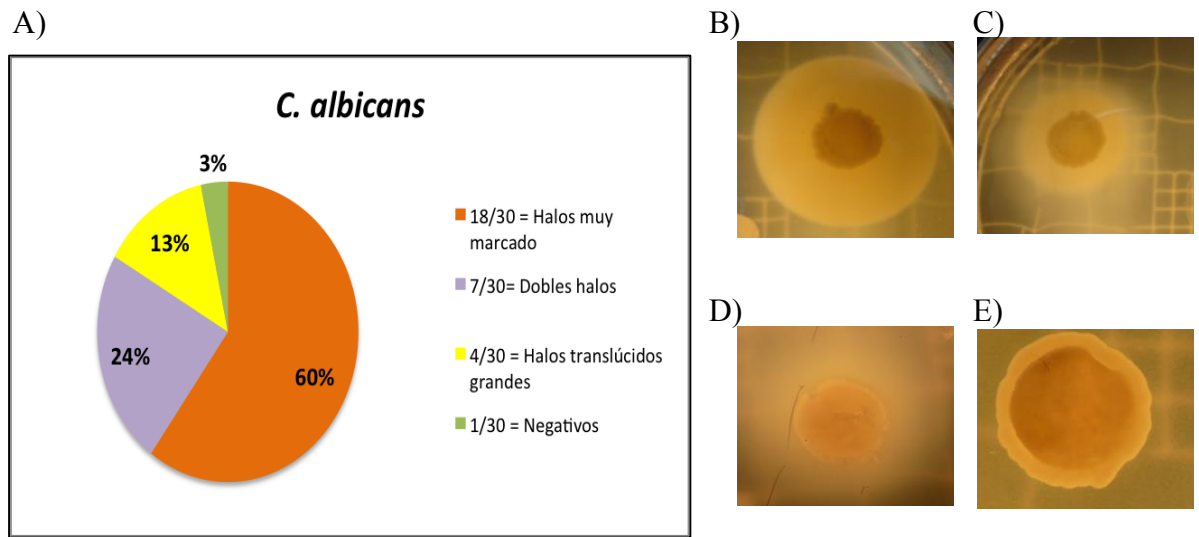


Figura 7. Producción de halos por cepas de *C. albicans*. Se realizó una categorización de acuerdo a las formas de precipitación de halos dentro de esta especie durante los 4 días de la prueba de fosfolipasas, donde el 60% de las cepas produjeron halos muy marcados (A,B), 24% dobles halos, es decir, un halo muy marcado y otro transparente (A, C), 13% Halos translúcidos o transparentes (A,D) y 3% fue negativo a la prueba (A,E).

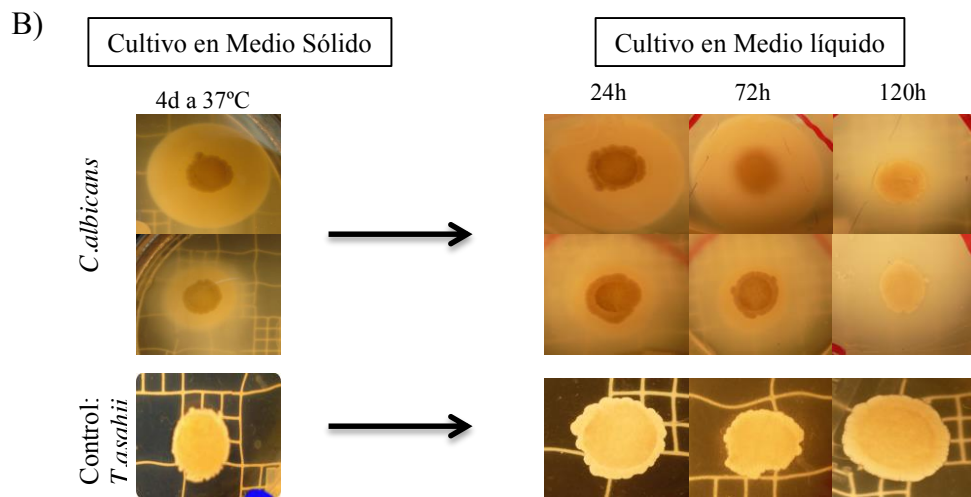
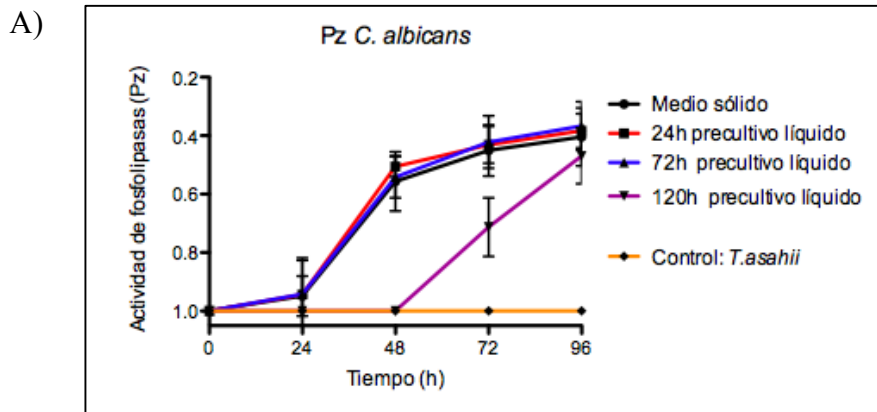


Figura 8. Cinética de producción de fosfolipasas de *C. albicans*. En la figura A, se muestra la cinética de actividad de fosfolipasas de una cepa de *C. albicans* (halo muy marcado con actividad alta) en base al valor Pz, llevada a cabo con diferentes tratamientos (cultivo y pre-cultivo en medio sólido y líquido a 24h, 72 h y 120 h de incubación a 37°C) alcanzando la misma actividad de fosfolipasas a los 4 días para todos los tratamientos. En la figura B, se muestran imágenes representativas de las cinéticas de fosfolipasas de 2 cepas crecidas en medio sólido y líquido a 4 días de la prueba. Las cepas más tardías (120h) pierden la producción del halo marcado. Se incluye como control negativo a *T. asahii*.

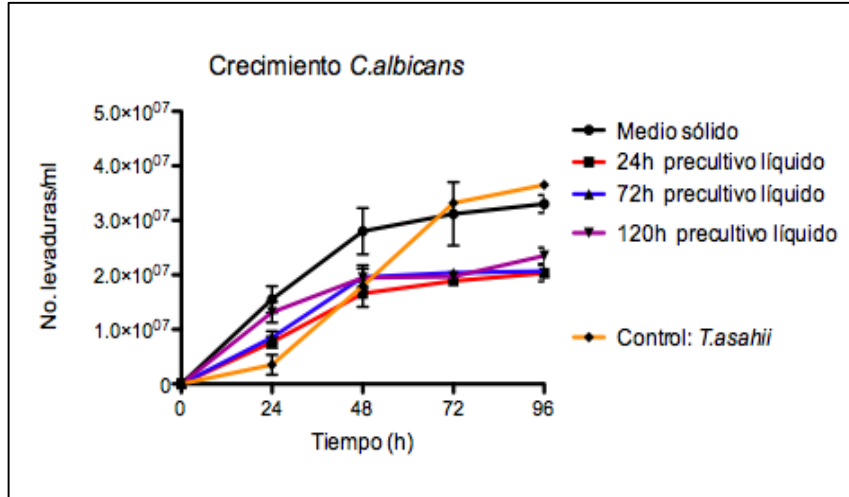


Figura 9. Determinación del crecimiento de cepas de *C. albicans*. Esta gráfica muestra las cinética de crecimiento de las cepas (n= 8) tanto las que fueron crecidas en medio sólido, como en medio líquido (24h,72h, y 120h de incubación a 37°C) previamente. Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro (Densidad óptica 600nm), el eje “y” representa la cantidad de levaduras por mL (1OD= 3X10⁷ UFC/mL). La prueba se realizó cada 24 h durante 4 días (eje x), para ambos grupos. Las cepas crecidas y activadas en medio sólido (AS) tuvieron un crecimiento mayor, comparándolos con las cepas previamente crecidas en medio líquido por diferentes tiempos. Se incluye como control negativo a *T.asahii*.

5.2.2 Inducción de NETs por *C. albicans*

Se ha reportado que *C.albicans* induce a la formación de NETs, sin embargo se desconoce el mecanismo de dicha inducción [20], por lo que en este estudio se analizó la inducción de NETs por aislados clínicos de *C.albicans* y su correlación con la actividad de fosfolipasas de dicha especie.

En la figura 10 se muestra la prueba de inducción de NETs promovida por *C. albicans*. En el panel de la izquierda se muestra la fotografía correspondiente al campo claro con el fin de demostrar la presencia de neutrófilos donde se muestra en campo claro la presencia de las células (2×10^5 Neutrófilos/campo) y en el panel adjunto se muestra la respectiva imagen de fluorescencia, utilizando el fluoróforo impermeable a células vivas sytox Green, el cual permite la identificación de las células NETóticas (color verde). Como control negativo se usaron neutrófilos no estimulados y como control positivo, neutrófilos estimulados con PMA. Adicionalmente, se incubaron neutrófilos con medio de cultivo líquido de crecimiento de las células fúngicas (TSC 4%) y el sobrenadante de *C. albicans* (4%) crecida a un tiempo de 48h. La cuantificación de la expansión nuclear se incluye en una gráfica representativa, en donde un desplazamiento hacia la derecha de la curva es indicativo de células en proceso de NETosis, puesto que corresponde a un aumento del área nuclear del neutrófilo ($>100 \mu\text{m}^2$), considerando que para un neutrófilo dicha área tiene un rango de $80-100 \mu\text{m}^2$. En esta gráfica se observó el desplazamiento hacia la derecha de la curva correspondiente al sobrenadante de *C.albicans* a diferencia del control negativo. Adicionalmente, en esta gráfica se incluye un control fosfolipasa

negativo de la cepa *T.asahii* bajo las mismas condiciones. La figura 11 muestra la inducción de NETs por una cepa de *C.albicans* crecida y activada tanto en medio sólido y líquido a 48h a una MOI de 1:100, por otra parte, también se muestra la discreta inducción de NETs por la cepa control *T.asahii* crecida en las mismas condiciones a 48h a una MOI de 1:100. Para ambas cepas se incluyen las gráficas de cuantificación de la expansión nuclear.

La figura 12 muestra la inducción de NETs por una cepa de *C.albicans* (MOI 1:100) crecida en un medio líquido por 120h de incubación, se incluyen sus controles positivo, negativo, el medio de cultivo de crecimiento de la cepa (TSC 4%) y el sobrenadante (4%). En esta misma figura se representa la imagen con la gráfica de la cuantificación de la expansión nuclear.

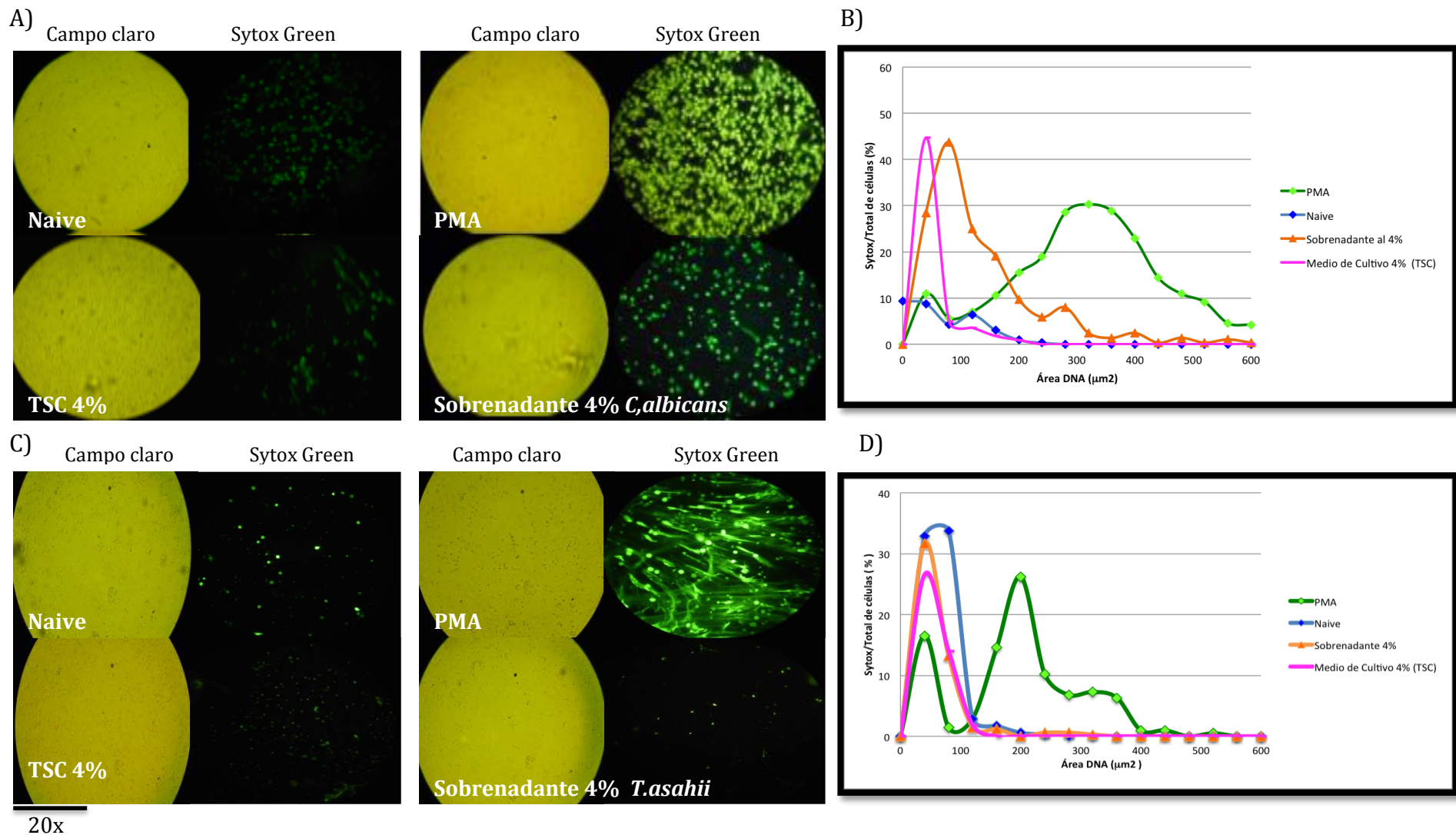


Figura 10. Inducción de NETs por factores secretados presentes en el sobrenadante de aislados de *C.albicans*. Se observa la inducción de NETs en el sobrenadante del medio de crecimiento de *C.albicans* (A), reflejado en la gráfica de la cuantificación nuclear con células sytox Green con desviación a la derecha a comparación del control negativo (B). Pobre o nula inducción de NETs por el sobrenadante de *T.asahii* (C) con un bajo porcentaje de células con desviación a la derecha (D) en la gráfica de cuantificación de expansión nuclear. Controles positivos y negativos así como el medio de cultivo de crecimiento (TSC 4%) para ambas cepas son mostrados, con una alta y baja o nula inducción de NETs respectivamente.

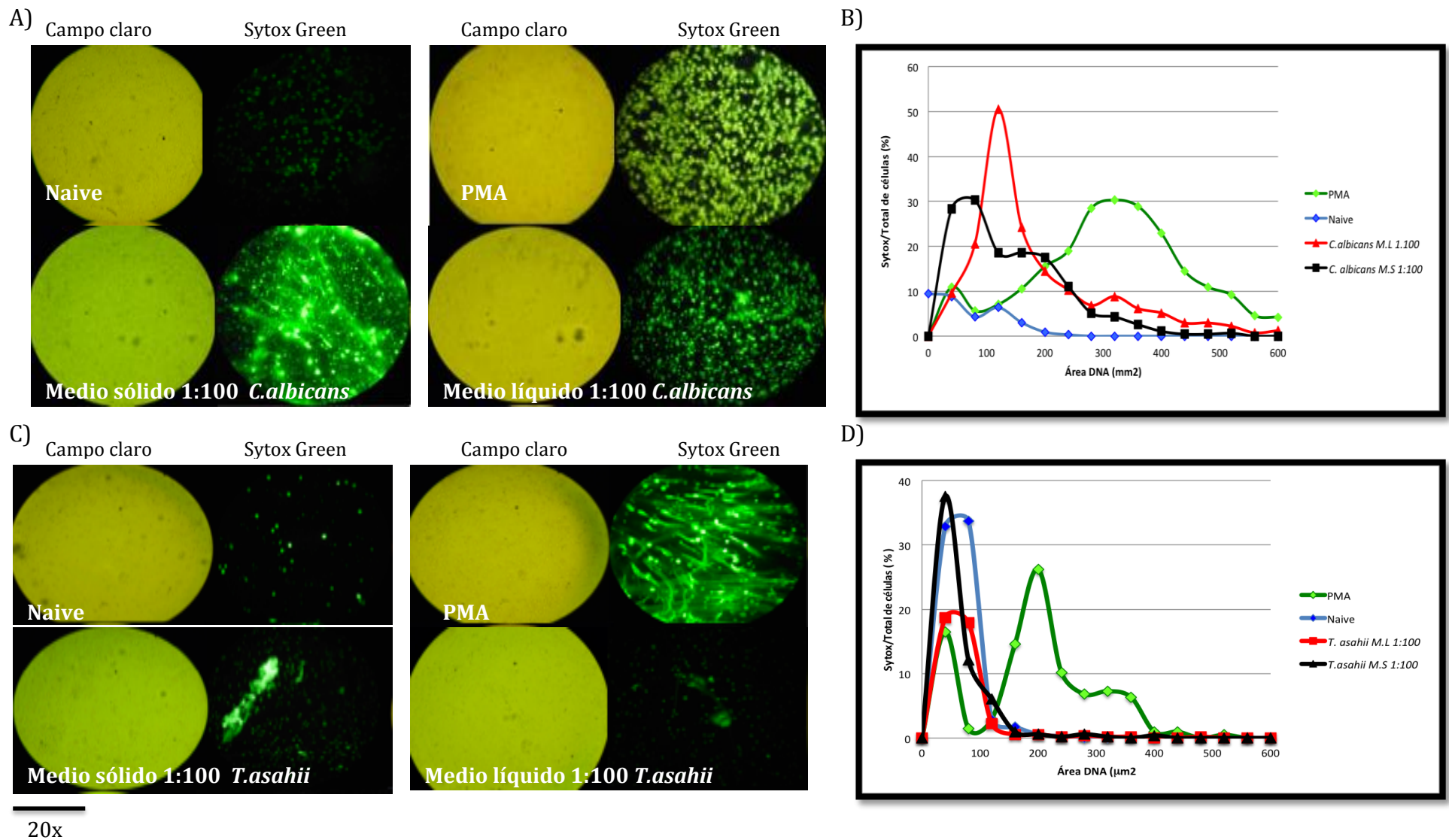


Figura 11. Inducción de NETs por aislados de *C.albicans*. Se observa robusta inducción de NETs por cepas de *C.albicans* con actividad alta de fosfolipasas crecidas en medio sólido y líquido a una MOI de 1:100 (A), lo que se refleja en la gráfica de la cuantificación nuclear con células sytox positivas con desviación a la derecha para ambas condiciones a comparación del control negativo (B). Pobre o nula inducción de NETs por *T.asahii* crecida en medio líquido y sólido a una MOI 1:100 (C) con un bajo porcentaje de células con desviación a la derecha (D) en la gráfica de cuantificación de expansión nuclear.

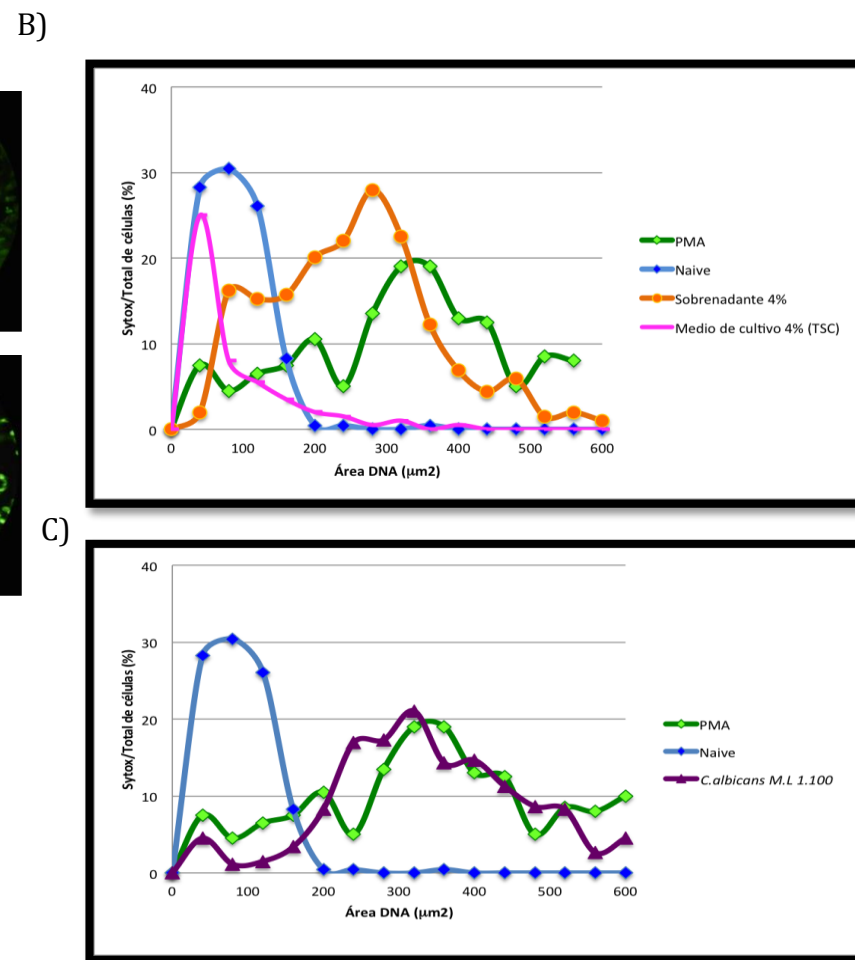
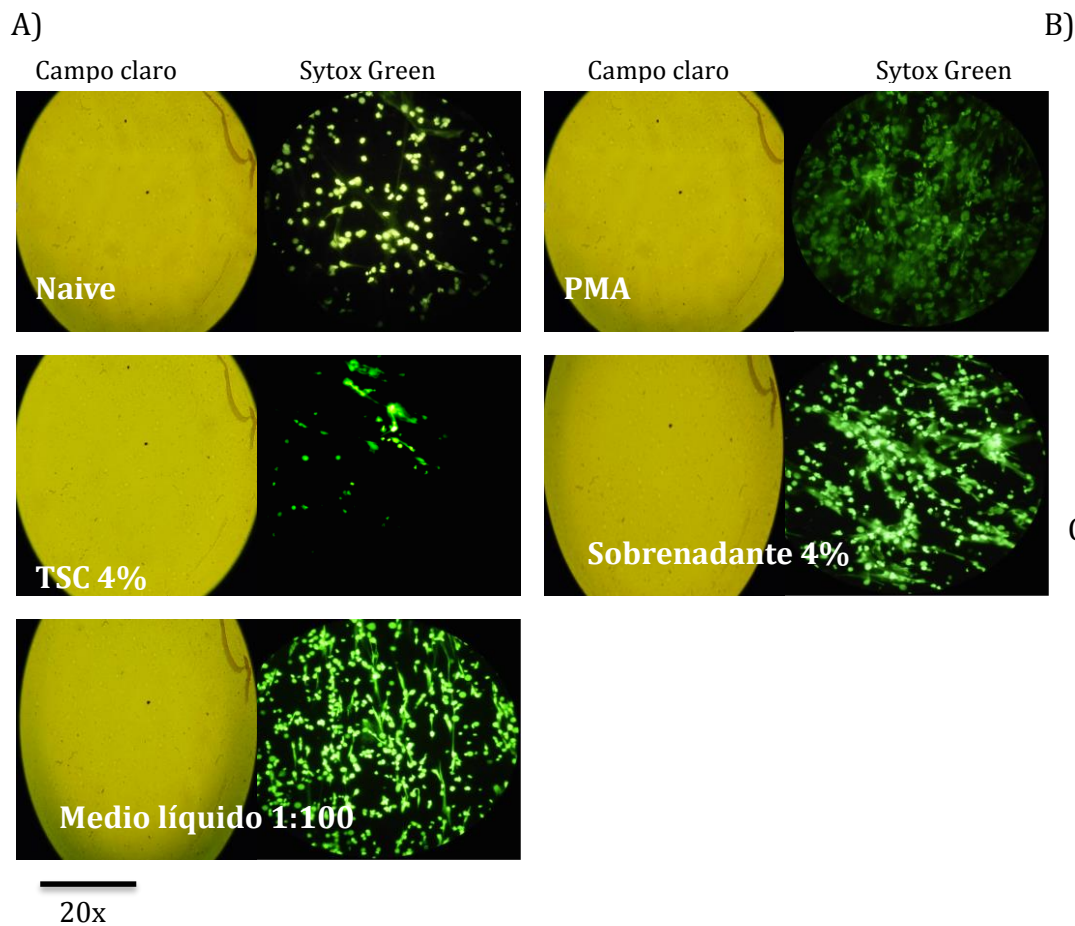


Figura 12. Inducción de NETs por aislados de crecimiento tardío de *C.albicans*. Se observa robusta inducción de NETs por cepas de *C.albicans* y del sobrenadante de dicho aislado a una MOI de 1:100, con actividad alta de fosfolipasas crecidas en medio líquido por 120h de incubación a 37°C (A), lo que se refleja en la gráfica de la cuantificación nuclear con células sytox green positivas con desviación a la derecha para el sobrenadante como para la cepa a comparación del control negativo (B) (C). Controles positivos y negativos así como el medio de cultivo de crecimiento (TSC4%) para ambas cepas son mostrados, con una alta y baja o nula inducción de NETs respectivamente.

5.2.3 Demostración de la presencia de gránulos líticos en los NETs promovidos por *C.albicans* por medio de inmunofluorescencia

La presencia de los gránulos líticos del neutrófilo en las trampas extracelulares fue demostrada por inmunofluorescencia. En la figura 13, neutrófilos tratados con *C.albicans*, fueron tratados con anticuerpos dirigidos contra la mieloperoxidasa (Rojo) y la calprotectina (Verde), los cuales en condiciones no estimuladas se observan dispersos en la célula, sin embargo, después del estímulo dicha localización cambia y ahora se observan cerca del núcleo, correlacionada con la intensa colocalización de ambos gránulos. También se utilizó el colorante DAPI para teñir el núcleo, de manera interesante, se observa la pérdida de la lobulación nuclear normal en los gránulos no estimulados que da lugar a una expansión nuclear correspondiente a la formación de los NETs en la células estimuladas por *C.albicans*, lo que fue similar a comparación del control positivo (neutrófilos inducidos con PMA). En esta figura también se muestra a un neutrófilo puesto en contacto con la cepa control fosfolipasa negativo, *T. asahii*, en donde el neutrófilo conserva sus gránulos en el citoplasma y la forma lobulada de su núcleo, similar a comparación del control negativo, los cuales son neutrófilos incubados con medio RPMI, sin estímulo.

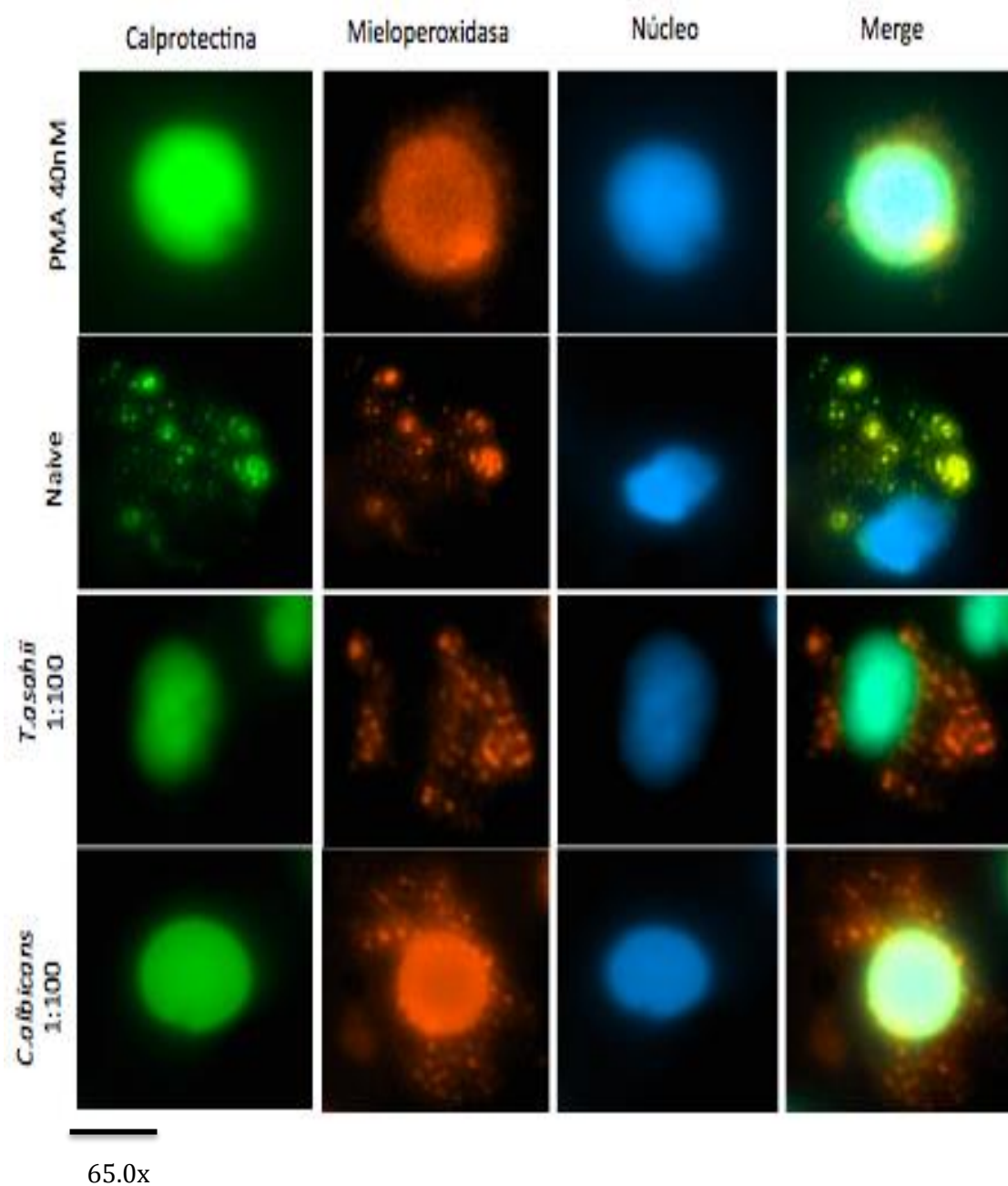


Figura 13. Ensayo de inmunofluorescencia de neutrófilos inducidos con *C.albicans*, (MOI 1:100) utilizando anticuerpos dirigidos contra la calprotectina (Verde) y mieloperoxidasa (Rojo). El Dapi fue utilizado para teñir el núcleo (Azul) y se observa la intensa colocalización (Merge) de ambos gránulos cerca del núcleo expandido, a diferencia del control negativo (Naive o sin tratamiento). Neutrófilos inducidos con *T. asahii* se observan en esta figura, mostrando el núcleo lobulado y menor colocalización de gránulos a diferencia del control positivo (Neutrófilos inducidos con PMA).

5.3 *C. tropicalis*

Para la realización de los siguientes ensayos, de las 120 cepas de *Candida spp.* se utilizaron las 30 especies previamente identificadas de *C. tropicalis*.

5.3.1 Producción de fosfolipasas

La figura 14 muestra los resultados obtenidos de la actividad de fosfolipasas de las cepas de *C. tropicalis* con base al valor o “índice Pz”, observándose un 100% de actividad muy alta dentro de esta especie. En la figura 15, se muestra la producción de halos de precipitación observados de estos aislados en el agar con yema de huevo por acción de las fosfolipasas, los cuales fueron categorizados como halo translúcido grande y halo marcado, siendo el mayor porcentaje (97%) para el primero.

En la figura 16 se muestra la cinética de la actividad de fosfolipasas (índice Pz; eje “y”) de las cepas *C. tropicalis* previamente seleccionadas con base a los resultados anteriores. Las mediciones se llevaron a cabo cada 24h durante 4 días (eje “x”), tanto para aquellas crecidas y activadas en medio sólido, como aquellas cepas crecidas en un medio líquido por 24h, 72h y 120h como se describe en la metodología. Se observó una actividad similar de fosfolipasas a las 96h (4º día) de la prueba para las cepas crecidas en medio sólido como en medio líquido a un tiempo temprano (24h y 72 h), sin embargo, la actividad de fosfolipasa fue mayor en aquellas cepas crecidas en un medio líquido de tiempo tardío (120h). Adicionalmente, en esta misma figura se muestran imágenes representativas (a los 4 días de la prueba, para todos los grupos) de 4 de estas cepas que produjeron halos

translúcidos grandes, los cuales se mantuvieron esta forma durante la prueba sin mostrar ningún cambio. Se incluye el control negativo a un aislado de *T.asahii* el cual se conoce previamente como no productor de estas enzimas, el cual fue probado en las mismas condiciones que los aislados de *Candida*. En la figura 17 se muestra la cinética de crecimiento de las cepas *C. tropicalis*, obtenidos de la medición a través de la densidad óptica. La medición es reflejada como levaduras /mL (eje “y”) el cual también se realizó cada 24h por 4 días (eje “x”). Se observó que a pesar de que el crecimiento de estas cepas en los dos tipos de medio es heterogéneo, tomando un punto del tiempo como referencia (72h), el crecimiento es mayor en las cepas crecidas en medio sólido que para las crecidas en medio líquido.

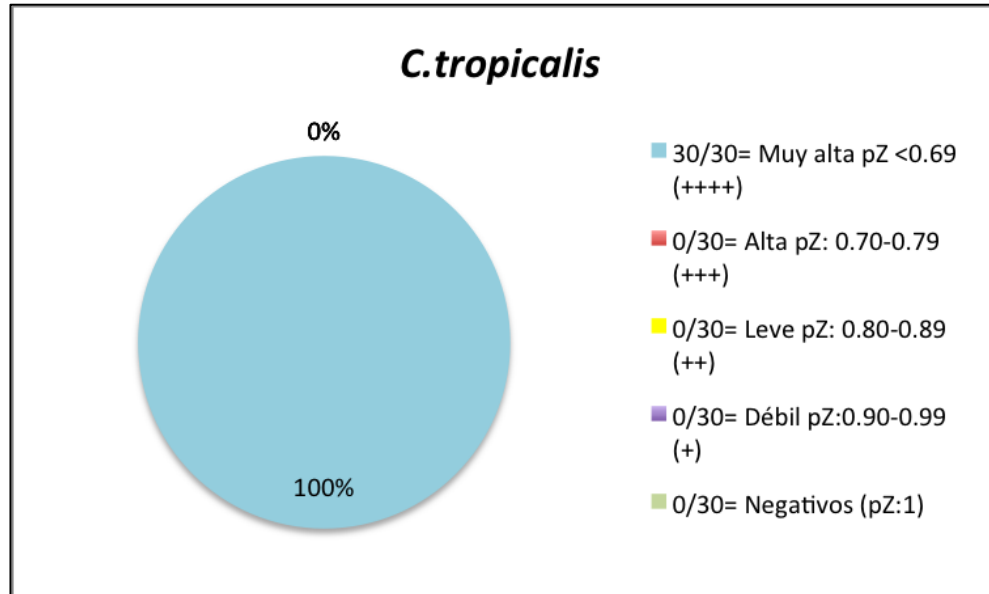


Figura 14. Actividad de fosfolipasas de cepas de *C. tropicalis*. Todas las cepas (n=30) fueron activadas en medio sólido (AS) y posteriormente fueron inoculadas en agar con yema de huevo, donde se midió la actividad de fosfolipasas con base al índice Pz. La actividad de fosfolipasas fue muy alta para todas de las cepas (100%).

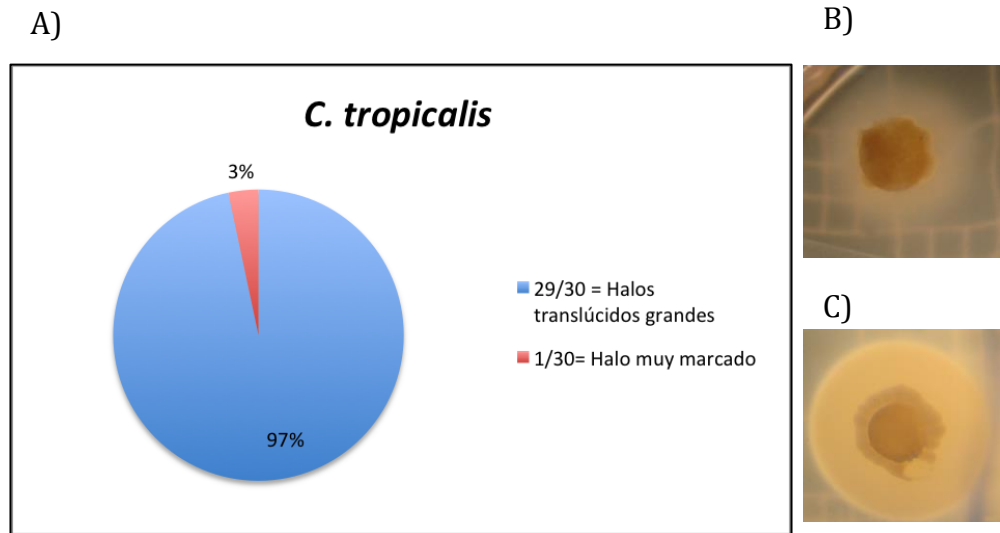
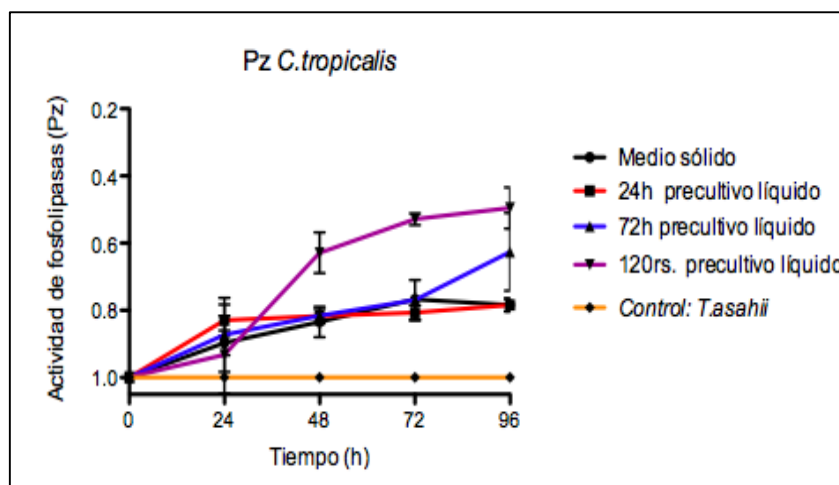


Figura 15. Producción de halos por cepas de *C. tropicalis*. Se realizó una categorización de acuerdo a las formas de precipitación de halos dentro de esta especie durante los 4 días de la prueba de fosfolipasas, donde el 97% de las cepas produjeron halos translúcidos grandes (A, B) y solo una cepa de las 30 produjo un halo muy marcado (A,C).

A)



B)

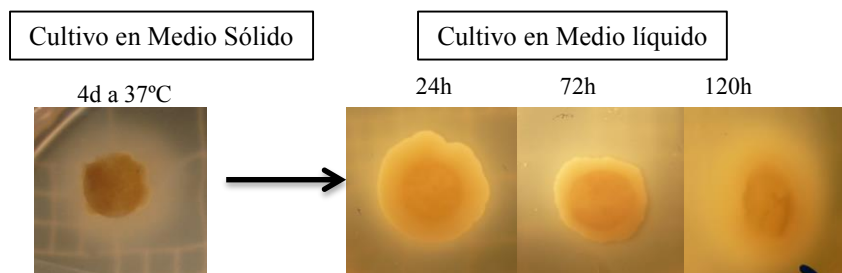


Figura 16. Cinética de producción de fosfolipasas de *C. tropicalis*. En el inciso A de la presente figura se observa la cinética de la actividad de fosfolipasas de aislados de *C. tropicalis* que produjeron halos translúcidos grandes llevada a cabo con diferentes tratamientos (cultivo y pre-cultivo en medio sólido y líquido a 24h, 72h y 120h de incubación a 37°C). Con base al índice Pz, se observó a que en el tratamiento de precultivo tardío en medio líquido (120h los 4 días) alcanza una mayor actividad que los precultivos a tiempos tempranos en medio líquido (24h y 72h) y los activados en medio sólido. En el inciso B se muestra una imagen representativa de cepas que produjeron halo translúcido grande que fueron crecidas en medio líquido por 24h, 72h y 120h de incubación a 37°C, a los 4 días de la prueba, mostrando el mismo halo de precipitación durante el estudio.

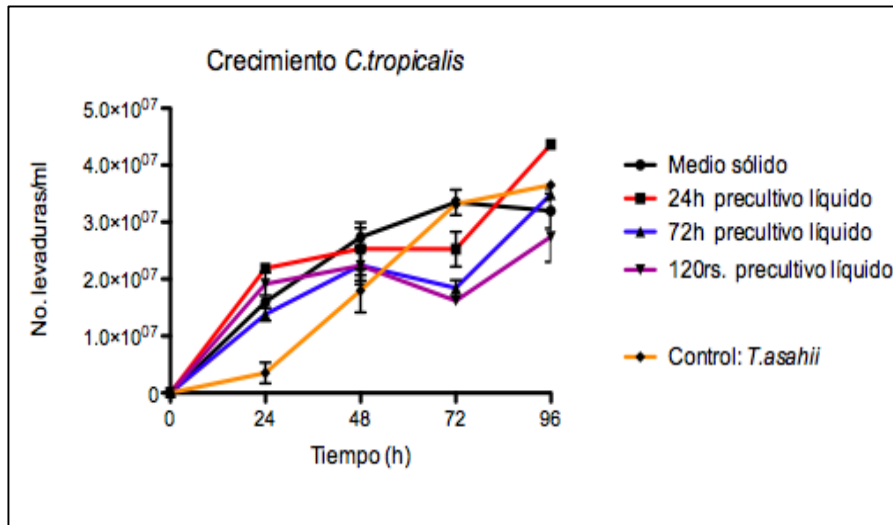


Figura 17. Determinación del crecimiento de cepas de *C. tropicalis*. En esta figura se muestra las cinética de crecimiento de las cepas de *C. tropicalis* (n=8), tanto las que fueron crecidas en medio sólido como en medio líquido (24h, 72h y 120h de incubación a 37°C) previamente. Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro (Densidad óptica 600nm), el eje “y” representa la cantidad de levaduras por mL (1OD= 3X10⁷ UFC/mL). La prueba se realizó cada 24 h durante 4 días (eje x), para ambos grupos. Las cepas crecidas y activadas en medio sólido (AS) como en medio líquido tuvieron un crecimiento heterogéneo, sin embargo, tomando un punto del tiempo como referencia (72h), el crecimiento es mayor en las cepas crecidas en medio sólido que para las crecidas en medio líquido. Se incluye como control negativo a *T.asahii*.

5.3.2 Inducción de NETs por *C. tropicalis*

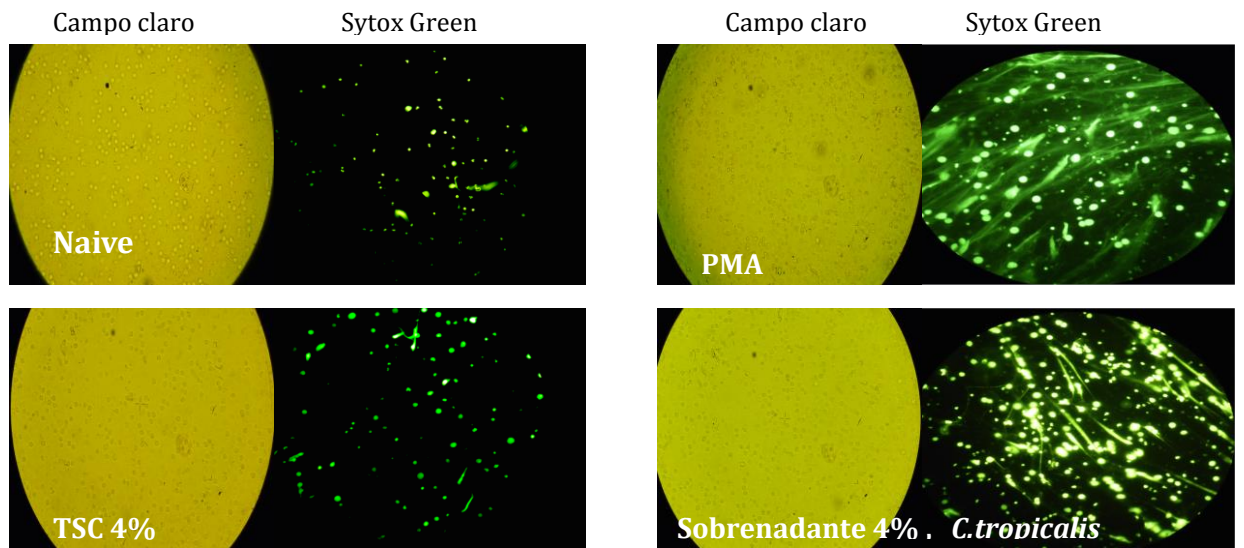
C. tropicalis es uno de los principales hongos pertenecientes al grupo no *C. albicans* que en los últimos años ha tenido relevancia clínica y se desconoce sobre su interacción con el sistema inmune así como su patogenicidad, por lo que en este estudio se analizó la capacidad de dicha especie para promover la inducción de NETs y su correlación con la actividad de sus fosfolipasas.

En la figura 18 se muestra la prueba de inducción de NETs promovida por *C. tropicalis*. En el panel de la izquierda se muestra la fotografía correspondiente al campo claro con el fin de demostrar la presencia de células y neutrófilos (2×10^5 Neutrófilos/campo) y en el panel adjunto se muestra la respectiva imagen de fluorescencia, utilizando el fluoróforo impermeable a células vivas sytox Green, el cual permite la identificación de las células NETóticas (color verde). Como control negativo se usaron neutrófilos no estimulados y como control positivo, neutrófilos estimulados con PMA. Adicionalmente, se incubaron neutrófilos con medio de cultivo líquido de crecimiento de las células fúngicas (TSC 4%) y el sobrenadante de *C. tropicalis* (4%) crecida a un tiempo de 48h. La cuantificación de la expansión nuclear se incluye en una gráfica representativa, en donde un desplazamiento hacia la derecha de la curva es indicativo de células en proceso de NETosis, puesto que corresponde a un aumento del área nuclear del neutrófilo ($>100 \mu\text{m}^2$), considerando que para un neutrófilo dicha área tiene un rango de 80-100 μm^2 . En esta gráfica se observó el desplazamiento hacia la derecha de la curva correspondiente al sobrenadante de *C. tropicalis* a diferencia del control negativo.

La figura 19 muestra la inducción de NETs por una cepa de *C.tropicalis* crecida y activada tanto en medio sólido y líquido a 48h a una MOI de 1:100, incluyendo las gráficas de cuantificación de la expansión nuclear.

La figura 20 muestra la inducción de NETs por una cepa de *C.tropicalis* (MOI 1:100) crecida en un medio líquido por 120h de incubación, se incluyen sus controles positivo, negativo, el medio de cultivo de crecimiento de la cepa (TSC 4%) y el sobrenadante (4%). En esta misma figura se representa la imagen con la gráfica de la cuantificación de la expansión nuclear.

A)



20x

B)

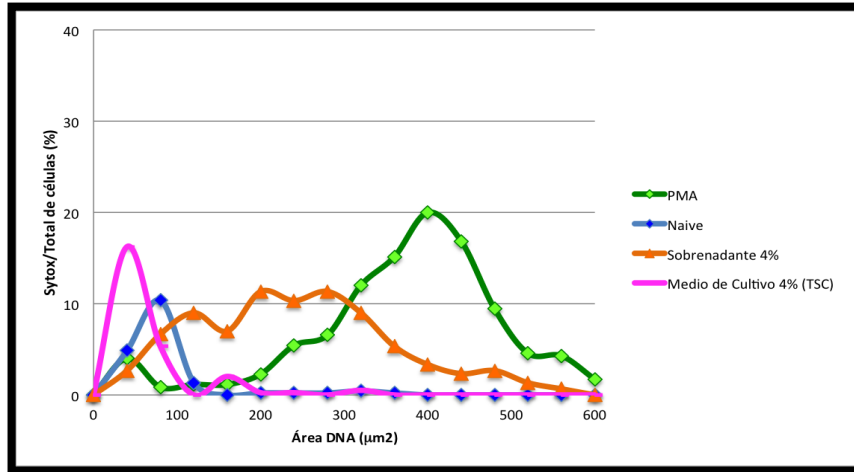
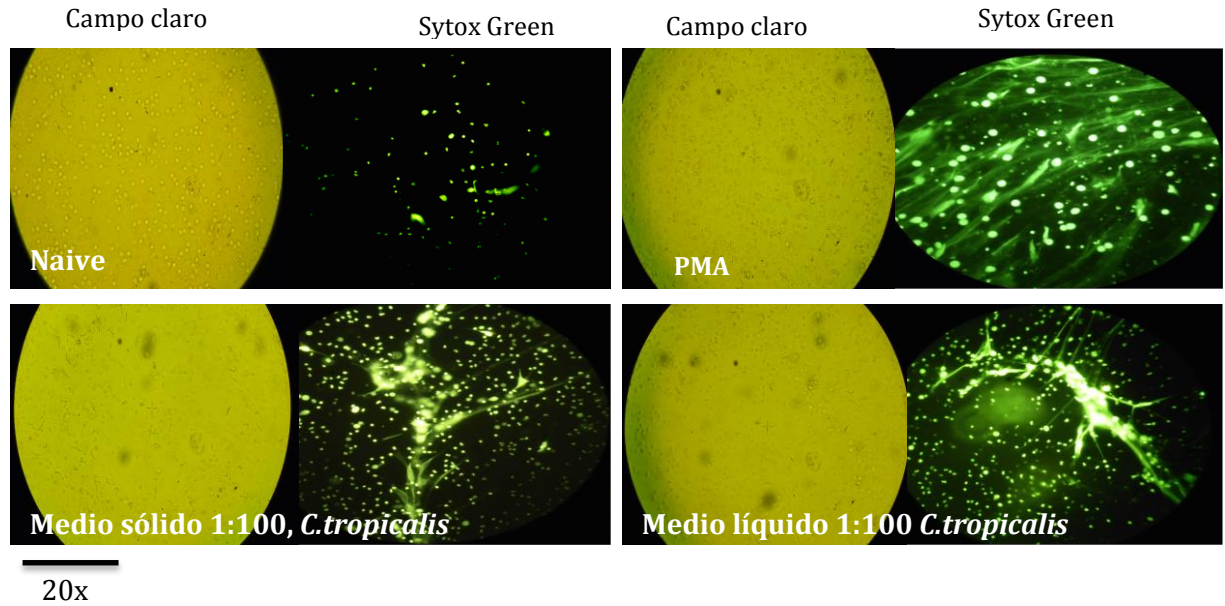


Fig. 18 Inducción de NETs por factores secretados en el sobrenadante de *C.tropicalis*. Se observa la inducción de NETs en el sobrenadante del medio de crecimiento de *C.tropicalis* (A), reflejado en la gráfica de la cuantificación nuclear con desviación a la derecha a comparación del control negativo (B). Controles positivos y negativos así como el medio de cultivo de crecimiento (TSC 4%) para esta cepa son mostrados, con una alta y nula inducción de NETs respectivamente.

A)



B)

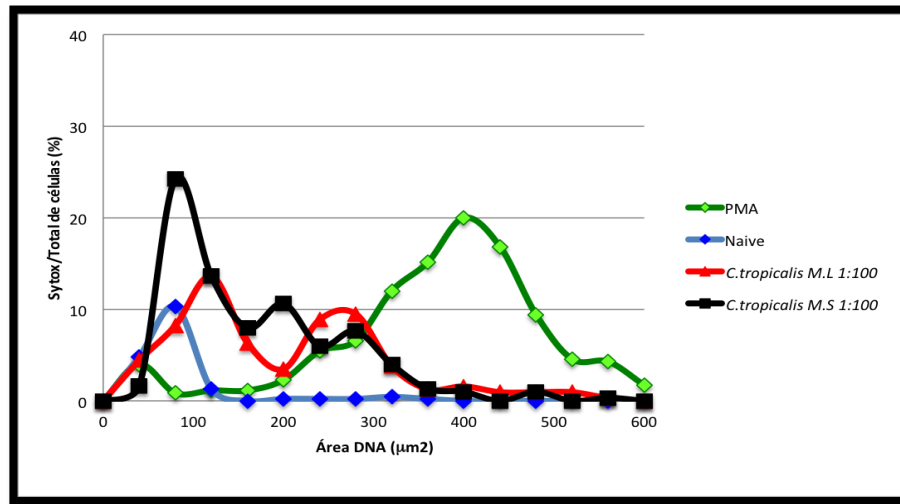


Figura 19. Inducción de NETs por aislados de *C. tropicalis*. Se observa robusta inducción de NETs por cepas de *C. tropicalis* crecidas en medio sólido y líquido a una MOI de 1:100 (A), lo que se refleja en la gráfica de la cuantificación nuclear con células sytox positivas con desviación a la derecha para ambas condiciones a comparación del control negativo (B).

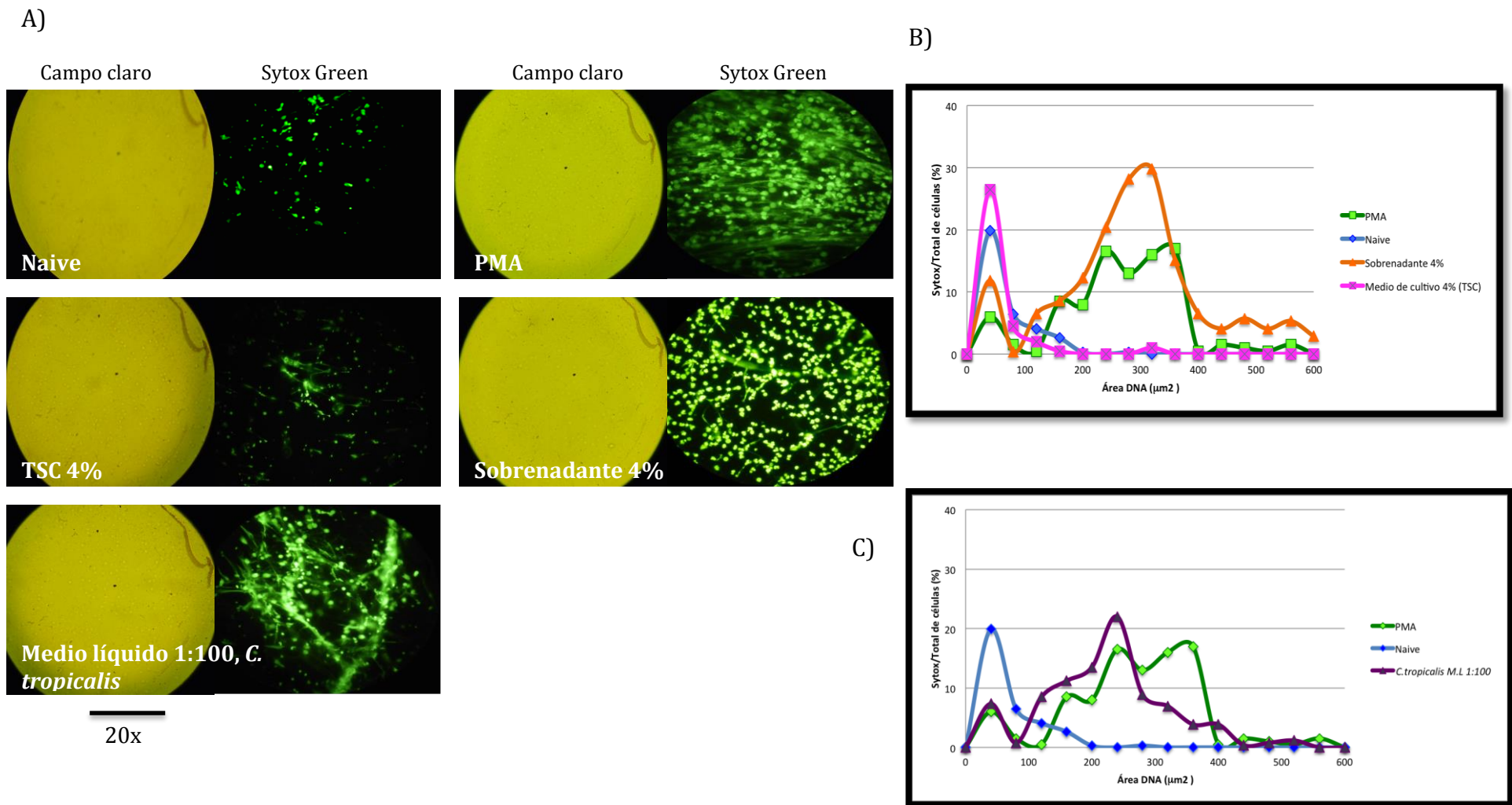
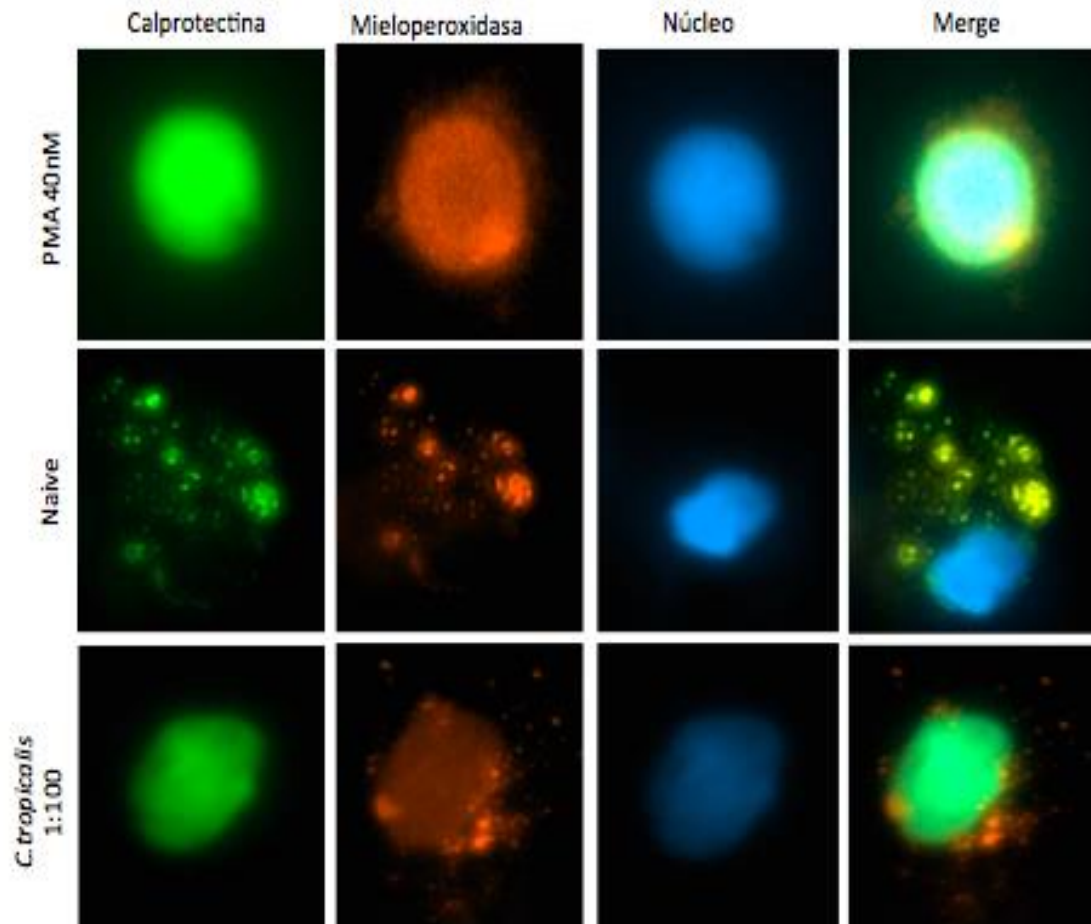


Figura 20. Inducción de NETs por aislados de crecimiento tardío de *C. tropicalis*. Se observa robusta inducción de NETs por cepas de *C. tropicalis* y del sobrenadante de dicho aislado a una MOI de 1:100, con actividad alta de fosfolipasas crecidas en medio líquido por 120h de incubación a 37°C (A), lo que se refleja en la gráfica de la cuantificación nuclear con células sytox green positivas con desviación a la derecha para el sobrenadante como para la cepa a comparación del control negativo (B)(C). Controles positivos y negativos así como el medio de cultivo de crecimiento (TSC 4%) para ambas cepas son mostrados, con una alta y baja o nula inducción de NETs respectivamente.

5.3.3 Demostración de la presencia de gránulos líticos en los NETs promovidos por *C. tropicalis* por medio de inmunofluorescencia.

La presencia de los gránulos líticos del neutrófilo en las trampas extracelulares fue demostrada por inmunofluorescencia. En la figura 21, neutrófilos tratados con *C. tropicalis*, fueron tratados con anticuerpos dirigidos contra la mieloperoxidasa (Rojo) y la calprotectina (Verde), los cuales en condiciones no estimuladas se observan dispersos en la célula, sin embargo, después del estímulo dicha localización cambia y ahora se observan cerca del núcleo, correlacionada con la intensa colocación de ambos gránulos. También se utilizó el colorante DAPI para teñir el núcleo, de manera interesante, se observa la pérdida de la lobulación nuclear normal en los gránulos no estimulados que da lugar a una expansión nuclear correspondiente a la formación de los NETs en los neutrófilos estimulados por *C. tropicalis*, lo que fue similar a comparación del control positivo (neutrófilos inducidos con PMA). Estos resultados contrastan con el control negativo, los cuales son neutrófilos incubados con medio RPMI, sin estímulo, puesto que en estas células el neutrófilo conserva sus gránulos en el citoplasma y la forma lobulada de su núcleo.



65.0x

Figura 21. Ensayo de inmunofluorescencia de neutrófilos inducidos con *C.tropicalis* (MOI 1:100) utilizando anticuerpos dirigidos contra la calprotectina (Verde) y mieloperoxidasa (Rojo). El Dapi fue utilizado para teñir el núcleo (Azul) y se observa la colocalización (Merge) de gránulos como la calprotectina cerca del núcleo expandido, a diferencia del control negativo (Naive o sin tratamiento). Se muestra el control positivo, los cuales son neutrófilos inducidos con PMA.

5.4 *C. parapsilosis*

De las 120 cepas de *Candida spp.*, fueron identificadas a través del API 20c AUX 30 aislados de *C. parapsilosis*, las cuales fueron utilizadas para la realización de los siguientes ensayos.

5.4.1 Producción de fosfolipasas

En la figura 22, se muestra los resultados obtenidos de la actividad de fosfolipasas de las cepas de *C. parapsilosis*, con base al valor o “ índice Pz “, observándose una actividad heterogénea dentro de estas desde un 27%,7%,33% y 20% de actividad muy alta, alta, leve y débil respectivamente, mostrando adicionalmente, un 13% de cepas sin actividad de esta enzima. De forma interesante, observamos la formación de diferentes halos de precipitación en el agar con yema de huevo correlacionadas a la actividad de las fosfolipasas de las cepas los cuales se muestran en la figura 23. Dichos halos fueron categorizados como halo translúcido grande y halo translúcido pequeño en diferentes porcentajes.

La figura 24 muestra las gráficas de las cinética de la actividad de fosfolipasas (índice Pz; eje “y”) de las cepas *C. parapsilosis* previamente seleccionadas con base a los resultados anteriores. Las mediciones se llevaron a cabo cada 24h durante 4 días (eje “x”), tanto para aquellas crecidas y activadas en medio sólido, como aquellas cepas crecidas en un medio líquido por 24h, 72h y 120h como se describe en la metodología. Se observó una actividad mayor de fosfolipasas en las cepas de *C. parapsilosis* de producción de halo

translúcido grande crecidas en un medio de cultivo líquido que aquellas crecidas en un medio sólido en los diferentes tiempos establecidos. Sin embargo, las cepas que producen un halo translúcido pequeño mostraron una actividad similar de fosfolipasas para los diferentes tratamientos a las 96h de la prueba (4° día). Adicionalmente, en esta misma figura se muestran imágenes representativas (a los 4 días de la prueba, para todos los grupos) de 4 de estas cepas que produjeron los 2 halos característicos (halo translúcido grande y halo translúcido pequeño), en los 3 diferentes tiempos de crecimiento en medio líquido, mostrando para ambas cepas la misma forma de producción de halo en el agar durante la prueba. Se incluye el control negativo a un aislado de *T. asahii* el cual se conoce previamente como no productor de estas enzimas, el cual fue probado en las mismas condiciones que los aislados de *Candida*. En la figura 25 se muestra la cinética de crecimiento de las cepas *C. parapsilosis*, obtenidos de la medición a través de la densidad óptica. La medición es reflejada como levaduras /mL (eje“y”) el cual también se realizó cada 24h durante 4 días (eje “x”). Es interesante mencionar que en las cepas de *C. parapsilosis* productoras de halos translúcidos grande y pequeño así como en el control negativo se observa que el crecimiento es mayor en las cepas crecidas en medio sólido que para las crecidas en medio líquido.

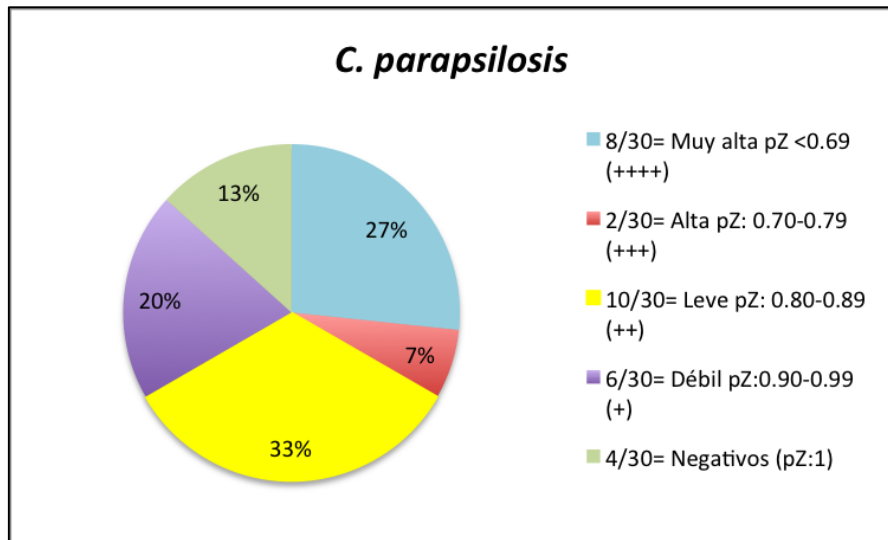


Figura 22. Actividad de fosfolipasas de cepas de *C. parapsilosis*. Todas las cepas (n=30) fueron activadas en medio sólido (AS) y posteriormente fueron inoculadas en agar con yema de huevo, donde se midió la actividad de fosfolipasas con base al índice Pz: Muy alta, alta, leve, débil o negativa. La actividad entre las cepas fue heterogénea, presentando así el porcentaje más alto (33%) una actividad leve, seguida de una actividad muy alta (27%), actividad débil (20%) y un porcentaje bajo con una actividad muy alta (7%). El 13% de las cepas fue negativa a la prueba.

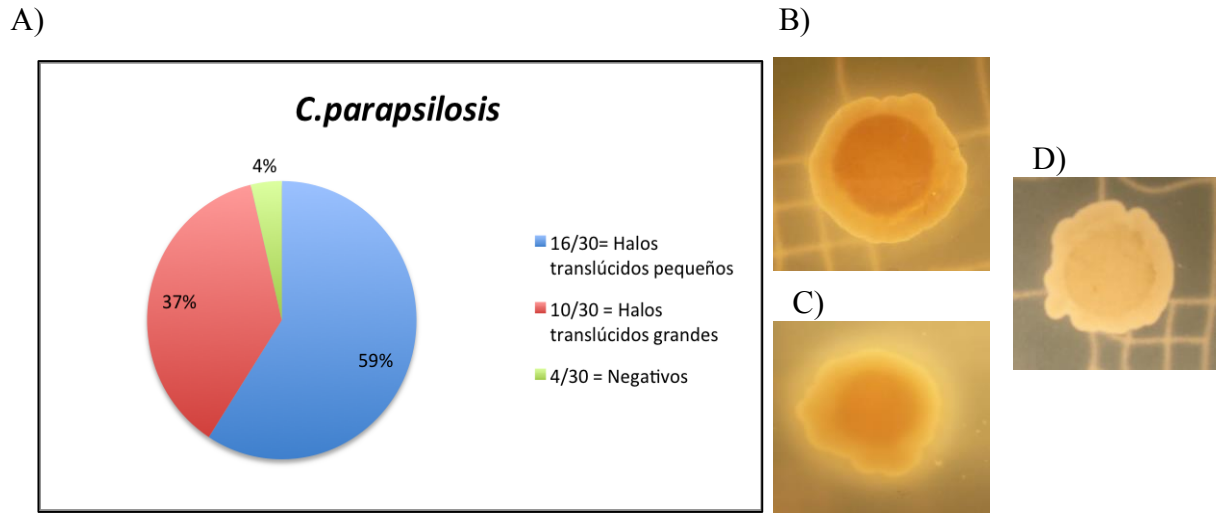


Figura 23. Producción de halos por cepas de *C. parapsilosis*. Se realizó una categorización de acuerdo a las formas de precipitación de halos dentro de esta especie durante los 4 días de la prueba de fosfolipasas, donde el 59% de las cepas produjeron halos translúcidos pequeños o de actividad baja (A,B), 37% halos translúcidos grandes o de actividad alta (A,C) y un 4% fue negativo a la prueba (A,D).

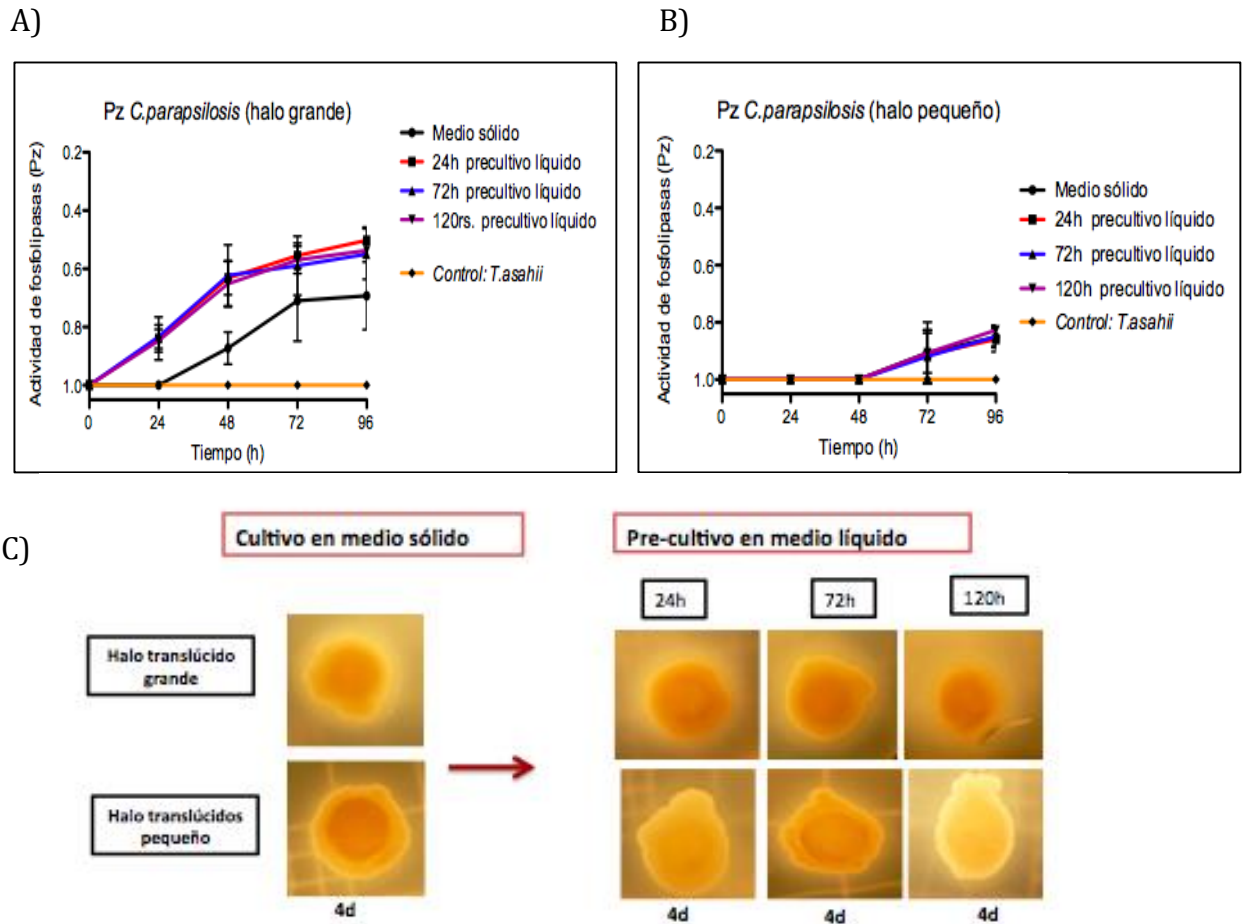


Figura 24. Cinética de producción de fosfolipasas de *C. parapsilosis*. En los incisos A y B, se muestra la cinética de estas cepas con halos translúcidos pequeño (mayor actividad) y grande (menor actividad) respectivamente. Para las cepas con halos translúcidos grandes, la actividad de fosfolipasas es mayor en cepas crecidas en medio líquido que en medio sólido, mientras que para las cepas con halos pequeños alcanzan la misma actividad de fosfolipasas a los 4 días para todos los tratamientos. En el inciso C se muestran una imagen representativa de cepas que produjeron halo translúcido grande y halo transparente pequeño que fueron crecidas (n=8) tanto en medio sólido y líquido por 24h, 72h y 120h de incubación a 37°C. La producción de halos se mantiene para ambos tratamientos.

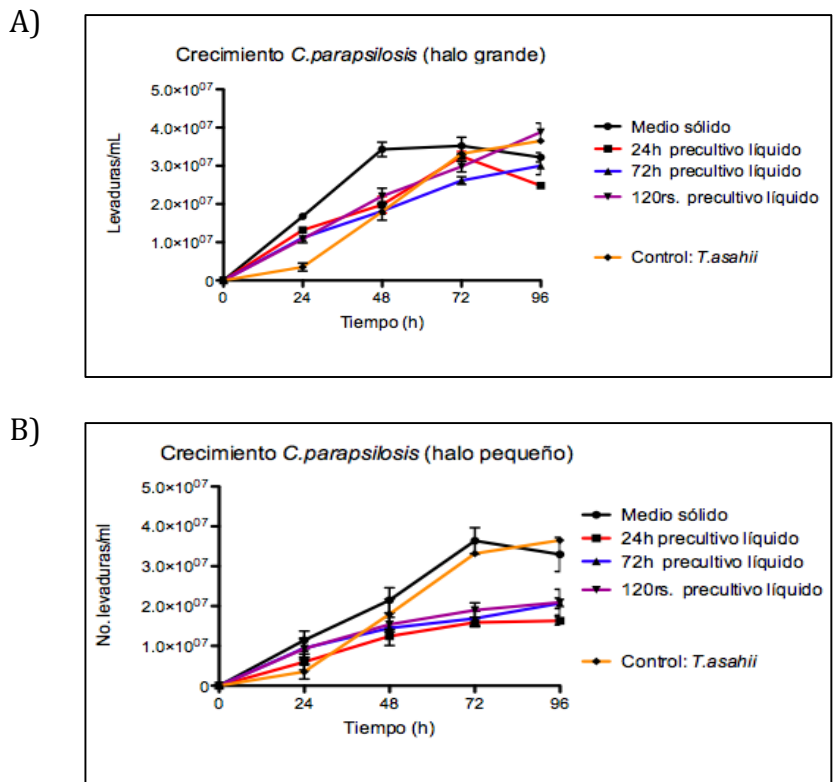


Figura 25. Determinación del crecimiento de cepas de *C. parapsilosis*. Esta gráfica muestra las cinética de crecimiento de las cepas que produjeron un halo translúcido grande y pequeño (A y B respectivamente) las cuales fueron crecidas en medio sólido, como en medio líquido (24h, 72h, y 120h de incubación a 37°C) previamente. Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro (Densidad óptica 600nm), el eje “y” representa la cantidad de levaduras por mL ($1OD= 3 \times 10^7$ UFC/mL). La prueba se realizó cada 24 h durante 4 días (eje x), para ambos grupos. Las cepas crecidas y activadas en medio sólido (AS) de halo grande y pequeño, tuvieron un crecimiento mayor, comparándolos con las cepas previamente crecidas en medio líquido por diferentes tiempos. Se incluye como control negativo a *T. asahii*

5.4.2 Inducción de NETs por *C. parapsilosis*

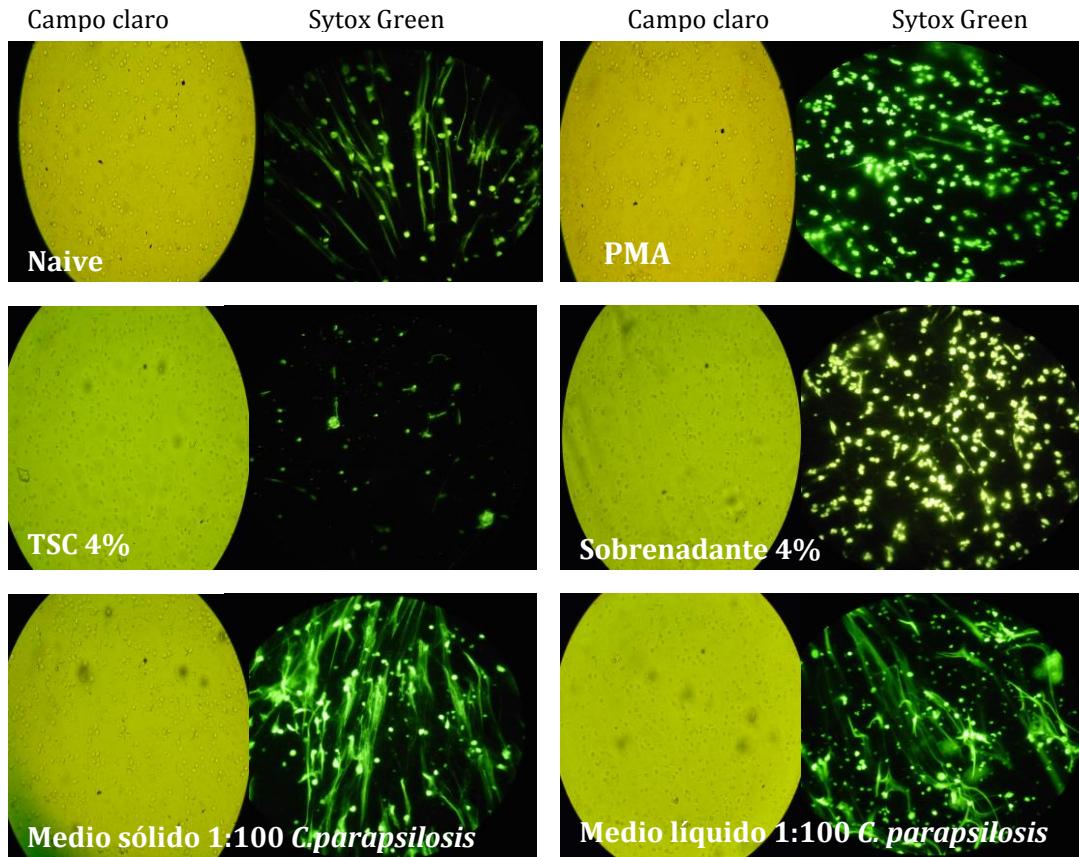
Actualmente *C. parapsilosis* es otro de los hongos oportunistas que por su característica de ser resistente a los antifúngicos en los últimos años ha tenido relevancia clínica y se desconoce sobre su interacción con el sistema inmune, principalmente con los neutrófilos, por lo que en este estudio se analizó la capacidad de dicha especie para promover la inducción de NETs y su correlación con la actividad de sus fosfolipasas.

La figura 26 muestra la prueba de inducción de NETs por una cepa de *C. parapsilosis* de actividad mayor de fosfolipasas o halo translúcido grande. En el panel de la izquierda se muestra la fotografía correspondiente al campo claro con el fin de demostrar la presencia de células y neutrófilos donde se muestra en campo claro la presencia de las células (2×10^5 Neutrófilos/campo) y en el panel adjunto se muestra la respectiva imagen de fluorescencia, utilizando el fluoróforo impermeable a células vivas sytox Green, el cual permite la identificación de las células NETóticas (color verde). Como control negativo se usaron neutrófilos no estimulados y como control positivo, neutrófilos estimulados con PMA. Adicionalmente, se incubaron neutrófilos con medio de cultivo líquido de crecimiento de las células fúngicas (TSC 4%) y el sobrenadante de *C. albicans* (4%) crecida a un tiempo de 48h. La cuantificación de la expansión nuclear se incluye en una gráfica representativa, en donde un desplazamiento hacia la derecha de la curva es indicativo de células en proceso de NETosis, puesto que corresponde a un aumento del área nuclear del neutrófilo ($>100 \mu\text{m}^2$), considerando que para un neutrófilo dicha área tiene un rango de $80-100 \mu\text{m}^2$. En esta gráfica se observó una robusta inducción de NETs, con células sytox positivas con desviación a la derecha por parte de la cepa crecida en ambas

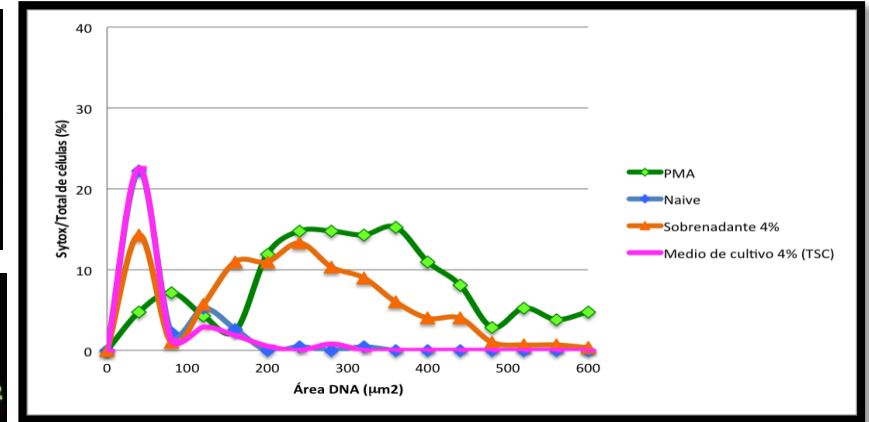
condiciones y de su sobrenadante, lo contrario a comparación del control negativo y del medio de crecimiento (TSA 4%). En la figura 27 se muestra la robusta inducción de NETs por una cepa de *C. parapsilosis* (MOI 1:100) de actividad menor o productora de halo translúcido pequeño y de su sobrenadante, crecida tanto en un medio sólido como en un medio líquido por 72h de incubación, la cual se representa con la gráfica de la cuantificación de la expansión nuclear con células sytox green positivas con desviación a la derecha para ambos tratamientos a diferencia del control negativo y al medio de cultivo de crecimiento (TSA 4%).

En la figura 28 se analizó la inducción de NETs por una cepa de *C. parapsilosis* negativa a la prueba de fosfolipasas crecida en medio sólido, la cual muestra nula inducción de NETs, así como se refleja en la gráfica de cuantificación de la expansión nuclear lo contrario a comparación de una cepa de *C. parapsilosis* de actividad mayor de fosfolipasas.

A)



B)



C)

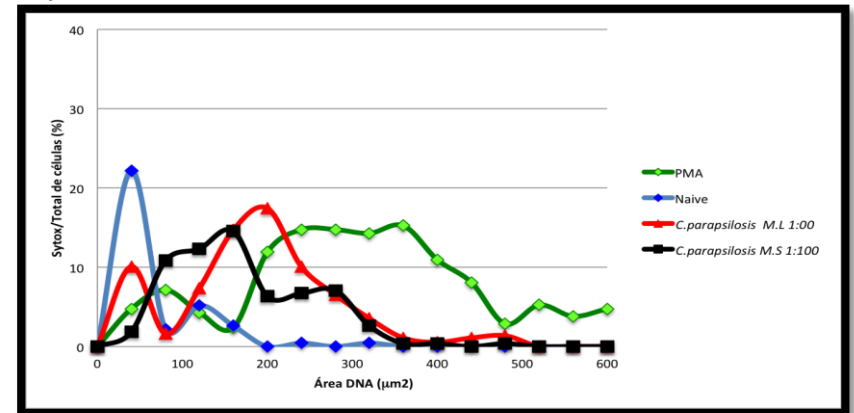
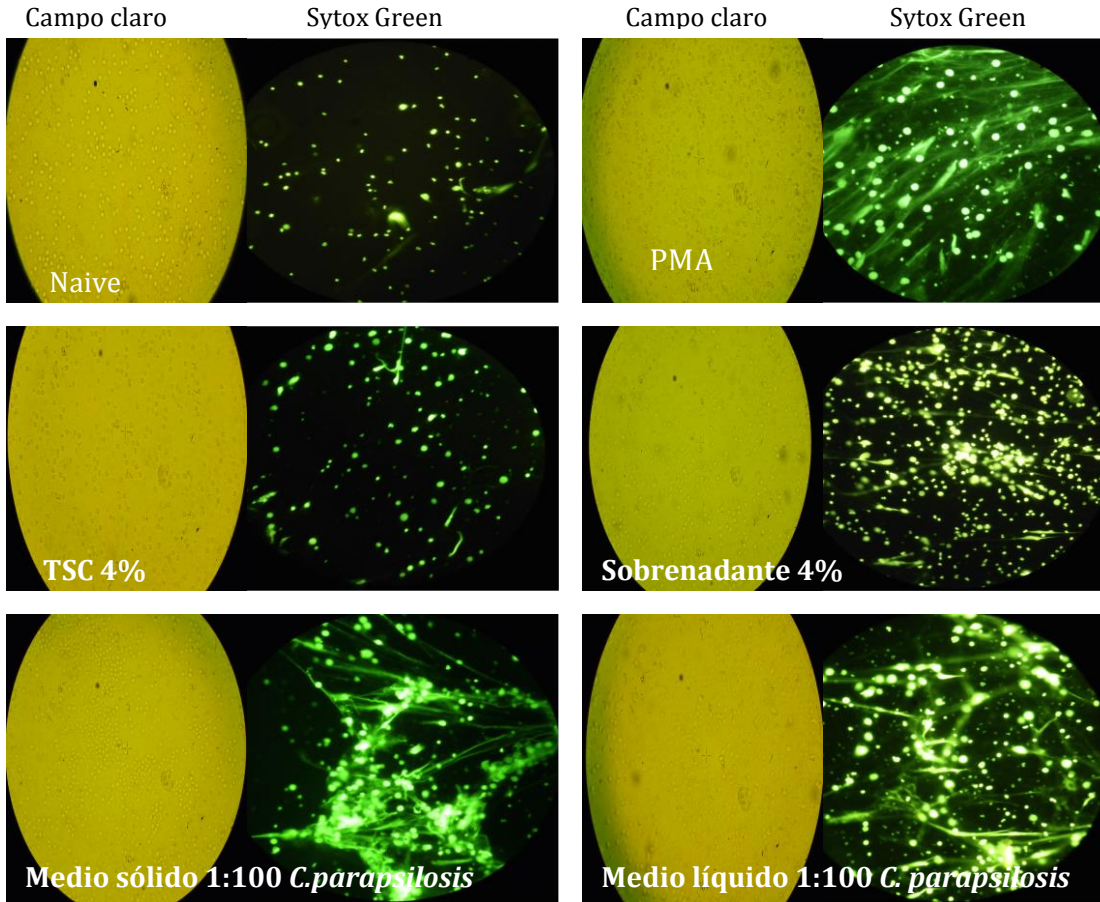
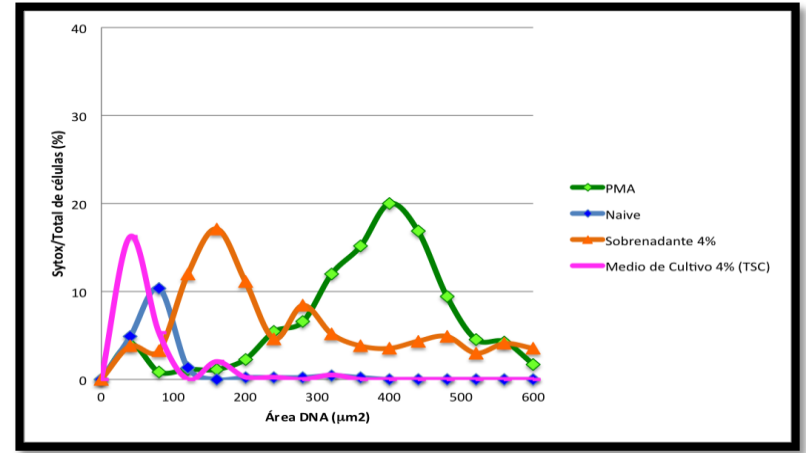


Figura 26. Inducción de NETs por aislados de *C. parapsilosis* con actividad mayor de fosfolipasas o producción de halo translúcido grande y factores secretados en el medio. Se observa robusta inducción de NETs por cepas de *C. tropicalis* con actividad mayor de fosfolipasas crecidas en medio sólido y líquido a una MOI de 1:100, así como de su sobrenadante (A), lo que se refleja en la gráfica de la cuantificación nuclear con células sytox green positivas con desviación a la derecha para ambas condiciones lo contrario a comparación del control negativo y el medio de crecimiento de la cepa (TSC 4%), incisos B y C.

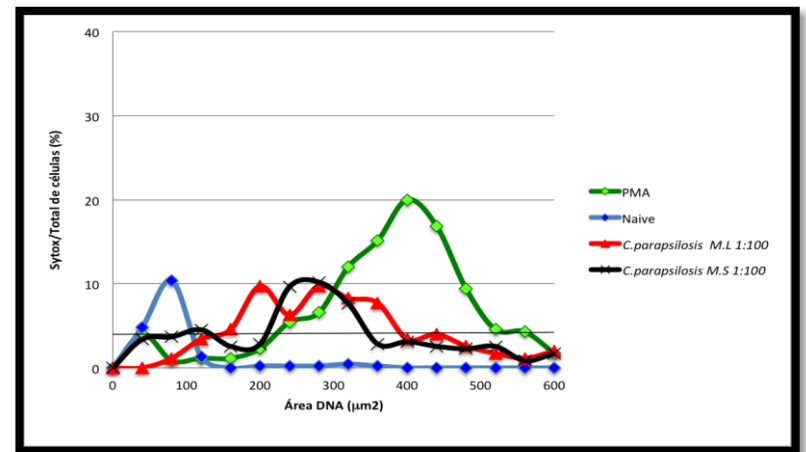
A)



B)

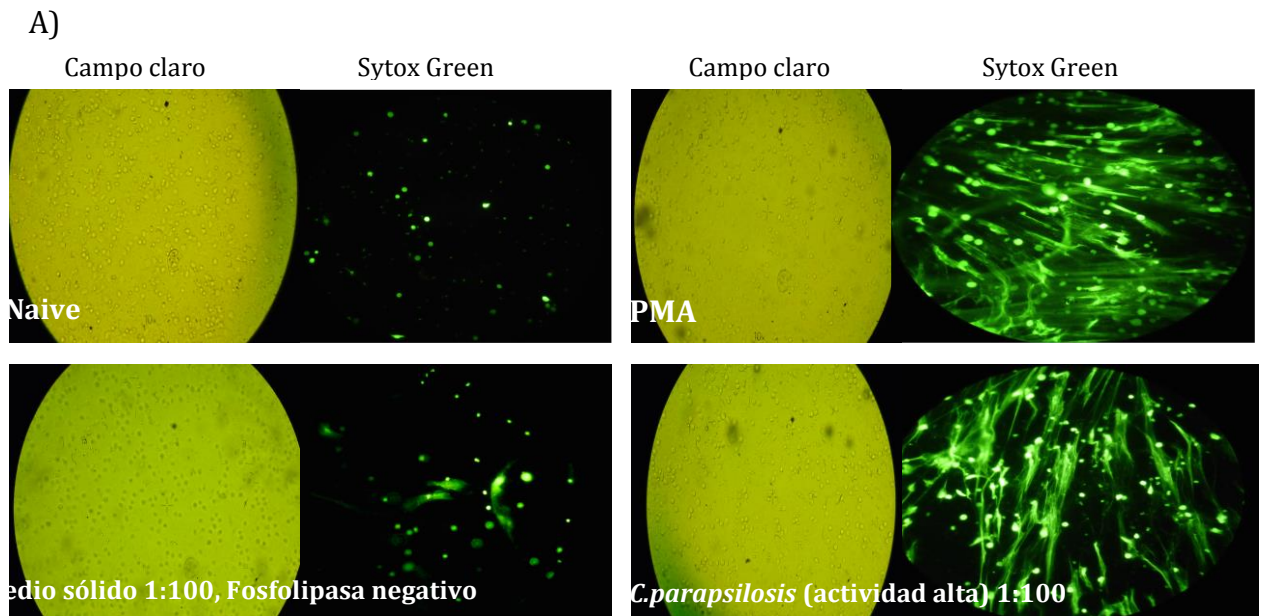


C)



20x

Figura 27. Inducción de NETs por aislados de *C. parapsilosis* con actividad menor de fosfolipasas o producción de halo translúcido pequeño y factores secretados en el medio. Se observa robusta inducción de NETs por cepas de *C. tropicalis* con actividad menor de fosfolipasas crecidas en medio sólido y líquido a una MOI de 1:100, así como de su sobrenadante (A), lo que se refleja en la gráfica de la cuantificación nuclear con células sytox green positivas con desviación a la derecha para ambas condiciones, lo contrario a comparación del control negativo y el medio de crecimiento de la cepa (TSC 4%), incisos B y C.



20x

B)

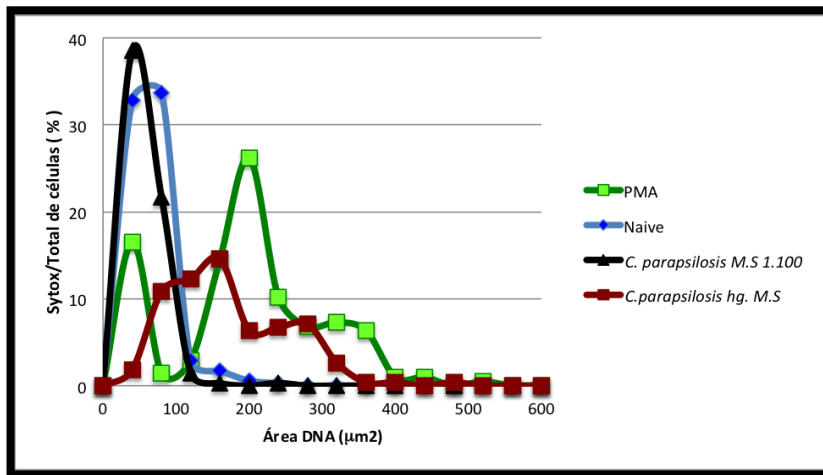


Figura 28. Inducción de NETs por un aislado de *C.parapsilosis* negativo a la prueba de fosfolipasas. Se observa nula inducción de NETs por una cepa de *C.parapsilosis* negativa a fosfolipasas crecida en medio sólido a una MOI de 1:100, lo contrario ocurrido a comparación de una cepa de *C. parapsilosis* con actividad alta de fosfolipasas crecida en las mismas condiciones (A), lo que se refleja en la gráfica de la cuantificación nuclear con pocas células sytox green positivas con desviación a la derecha similar a comparación del control negativo (B).

5.4.3 Demostración de la presencia de gránulos líticos en los NETs promovidos por *C. parapsilosis* por medio de inmunofluorescencia

La presencia de los gránulos líticos del neutrófilo en las trampas extracelulares fue demostrada por inmunofluorescencia. En la figura 29, neutrófilos tratados con *C. parapsilosis* de actividad alta y negativa de fosfolipasa, fueron tratados con anticuerpos dirigidos contra la mieloperoxidasa (Rojo) y la calprotectina (Verde), los cuales en condiciones no estimuladas se observan dispersos en la célula, sin embargo, después del estímulo dicha localización cambia y ahora se observan cerca del núcleo, correlacionada con la intensa colocalización de ambos gránulos. También se utilizó el colorante DAPI para teñir el núcleo y de manera interesante, se observa la pérdida de la lobulación nuclear normal en los gránulos no estimulados que da lugar a una expansión nuclear correspondiente a la formación de los NETs en la células estimuladas por *C. parapsilosis* con actividad alta de fosfolipasa, lo que fue similar a comparación del control positivo (neutrófilos inducidos con PMA). En esta figura también se muestra a un neutrófilo puesto en contacto con la cepa de *C. parapsilosis* fosfolipasa negativo (F-), en donde el neutrófilo conserva sus gránulos en el citoplasma y la forma lobulada de su núcleo, similar a comparación del control negativo, los cuales son neutrófilos incubados con medio RPMI, sin estímulo.

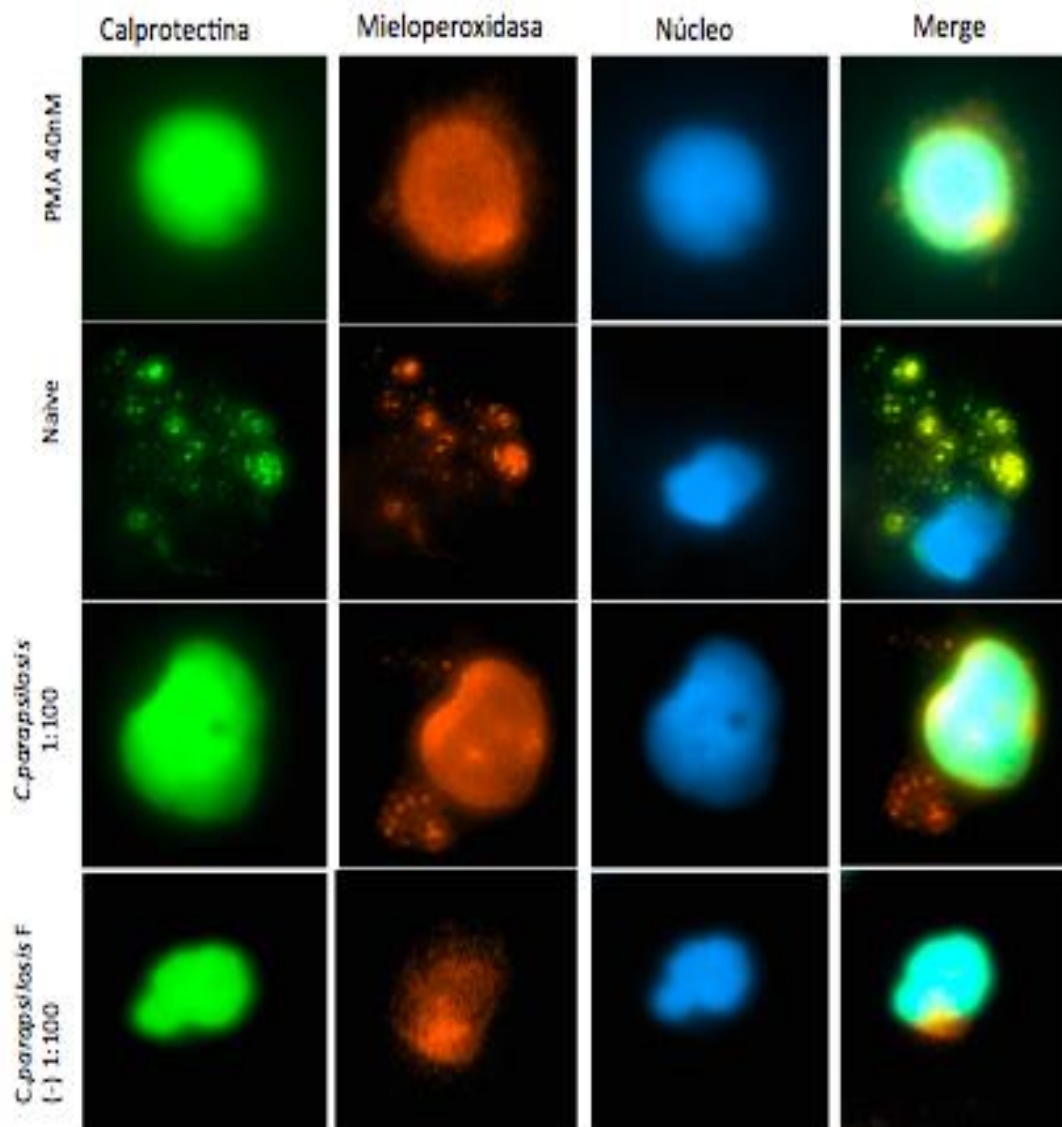


Figura 29. Ensayo de inmunofluorescencia de neutrófilos inducidos por aislados de *C. parapsilosis*. Se utilizaron aislados de *C.parapsilosis* fosfolipasa positivo y otra cepa fosfolipasa negativo (MOI 1:100) utilizando anticuerpos dirigidos contra la calprotectina (Verde) y mieloperoxidasa (Rojo). El DAPI fue utilizado para teñir el núcleo (Azul) y se observa la colocalización (Merge) de gránulos como la calprotectina cerca del núcleo expandido en la cepa con actividad de fosfolipasas, a diferencia de la cepa fosfolipasa negativo, donde el neutrófilo conserva su forma lobulada del núcleo sin una intensa colocalización de los gránulos. Se muestran el control positivo, los cuales son neutrófilos inducidos con PMA y el control negativo (Naive o sin tratamiento).

5.5 *C. glabrata*

De las 120 cepas de *Candida spp.* se utilizaron las 30 especies previamente identificadas de *C. glabrata* para la realización de los siguientes ensayos.

5.5.1 Producción de fosfolipasas

Los resultados obtenidos de la actividad de fosfolipasas de las cepas de *C. glabrata* se muestran en la figura 30 donde con base al valor o “ índice Pz “, se obtuvo un mayor porcentaje (97%) de una actividad alta dentro de estas. La figura 31, muestra la producción de halos de precipitación en el agar con yema de huevo por acción de las fosfolipasas observados de estos aislados. Dichos halos fueron categorizados como halo translúcido grande y halo translúcido pequeño, mostrado en mayor porcentaje para el primero.

En la figura 32 se muestra la cinética de actividad de fosfolipasas (índice Pz; eje “y”) de las cepas *C. glabrata* previamente seleccionadas con base a los resultados anteriores. Las mediciones se llevaron a cabo cada 24h durante 4 días (eje “x”), tanto para aquellas crecidas y activadas en medio sólido, como aquellas cepas crecidas en un medio líquido por 24h, 72h y 120h como se describe en la metodología. Se observó una actividad similar de fosfolipasas para los diferentes tratamientos a las 96h de la prueba (4° día). Adicionalmente, en esta misma figura se muestran imágenes representativas (a los 4 días de la prueba, para todos los grupos) de 4 de estas cepas que produjeron halos translúcidos grandes en los 3 diferentes tiempos de crecimiento en medio líquido, observándose la conservación de la forma del halo de precipitación en el agar durante el estudio. Se incluye el control negativo a un aislado de *T. asahii* el cual se conoce previamente como no

productor de estas enzimas, el cual fue probado en las mismas condiciones que los aislados de *Candida*. En la figura 33 se muestra la cinética de crecimiento de las cepas *C. glabrata*, obtenidos de la medición a través de la densidad óptica. La medición es reflejada como levaduras /mL (eje“y”) el cual también se realizó cada 24h durante 4 días (eje “x”). Es interesante mencionar que en las cepas así como en el control negativo se observa que el crecimiento es mayor en las cepas crecidas en medio sólido que para las crecidas en medio líquido.

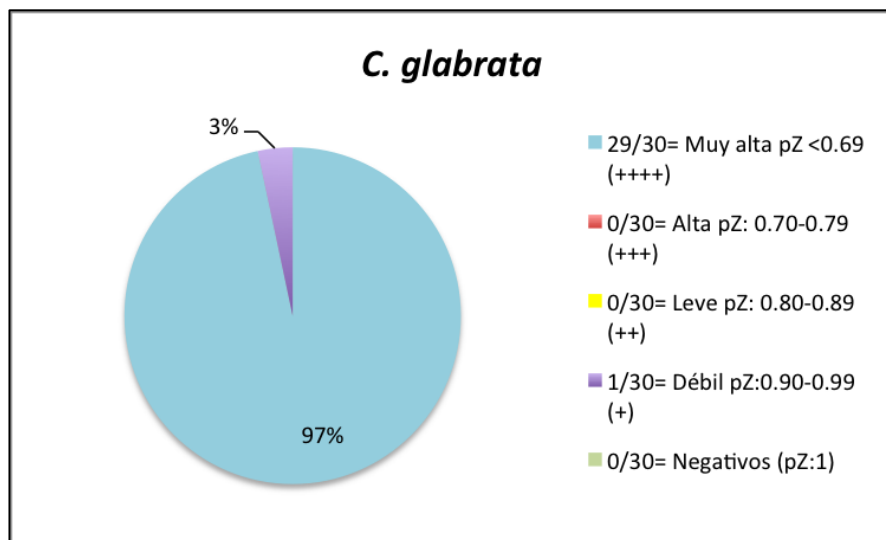


Figura 30. Actividad de fosfolipasas de cepas de *C. glabrata*. Todas las cepas (n=30) fueron activadas en medio sólido (AS) y posteriormente fueron inoculadas en agar con yema de huevo, donde se midió la actividad de fosfolipasas con base al índice Pz: Muy alta, alta, leve, débil o negativa.. La actividad de fosfolipasas fue muy alta para la mayoría de las cepas (97%), solo con un 3% (1 cepa de 30) mostrando actividad débil.

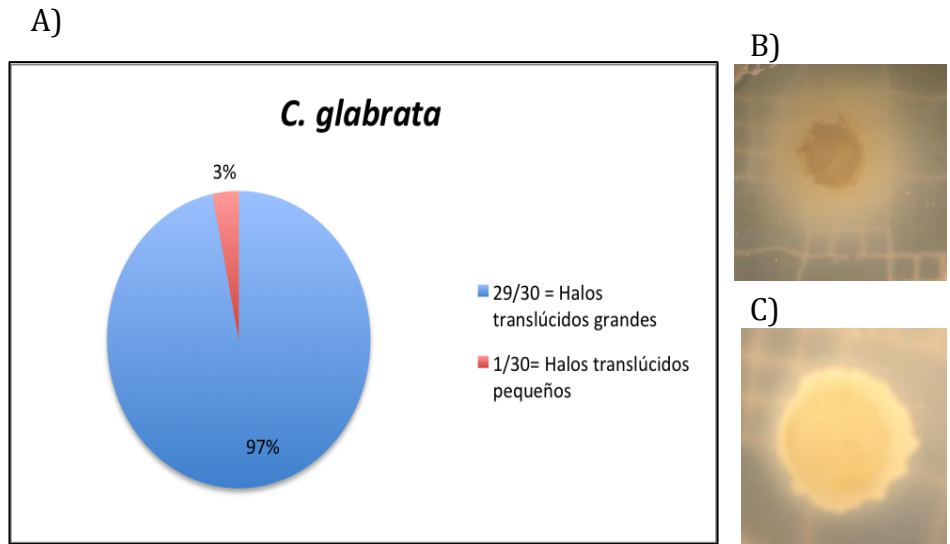
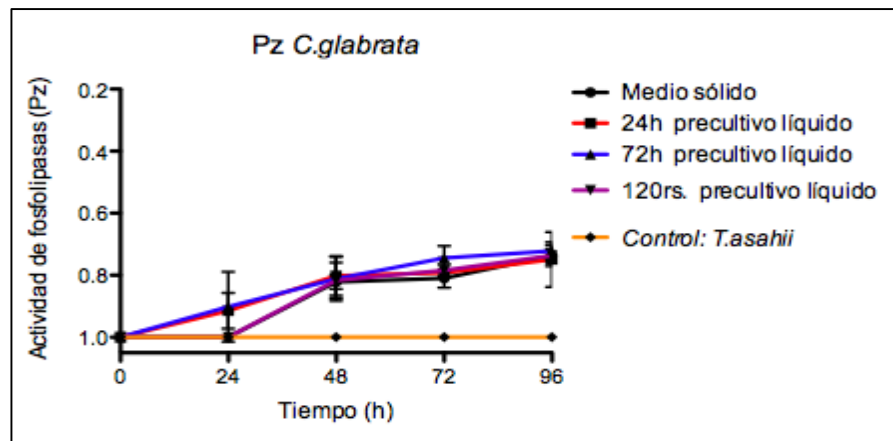


Figura 31. Producción de halos por cepas de *C. glabrata*. Se realizó una categorización de acuerdo a las formas de precipitación de halos dentro de esta especie durante los 5 días de la prueba de fosfolipasas, donde el 97% de las cepas produjeron halos translúcidos grandes (A, B) y solo una cepa de las 30 produjo un halo translúcido pequeño (A,C).

A)



B)

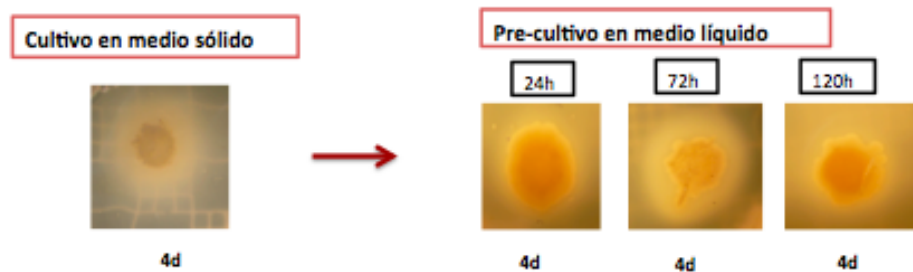


Figura 32. Cinética de producción de fosfolipasas de *C. glabrata*. La figura en el inciso A muestra la actividad de fosfolipasas en base al índice Pz, en donde se observa que todos los grupos de tratamiento (crecimiento en medio líquido o sólido) alcanzan la misma actividad a las 96h de la prueba. En el inciso B se muestra una imagen representativa de cepas que produjeron halo transparente grande crecidas en medio sólido y líquido por 24h, 72h y 120h de incubación a 37°C a los 4 días de la prueba. La producción de halos se mantiene para ambos tratamientos (medio sólido o líquido) durante el estudio. Se incluye como control negativo a *T. asahii*.

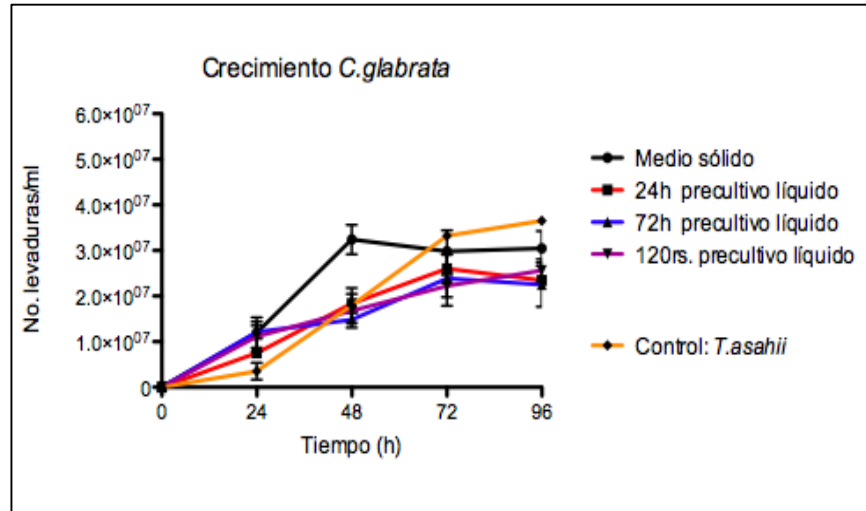


Figura 33. Determinación del crecimiento de cepas de *C. glabrata*. En esta figura se observa las cinética de crecimiento de las cepas de *C. glabrata* (n=8), tanto las que fueron crecidas en medio sólido como en medio líquido (24h, 72h y 120h de incubación a 37°C) previamente. Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro (Densidad óptica 600nm), el eje “y” representa la cantidad de levaduras por mL (1OD= 3X10⁷ UFC/mL). La prueba se realizó cada 24h durante 4 días (eje x), para ambos grupos. Las cepas crecidas y activadas en medio sólido (AS) tuvieron un crecimiento mayor, comparándolos con las cepas previamente crecidas en medio líquido por diferentes tiempos. Se incluye como control negativo a *T. asahii*.

5.5.2 Inducción de NETs por *C. glabrata*

C. glabrata al igual que *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* son hongos no *C. albicans* con una actual relevancia clínica y que poco se sabe sobre su interacción con el sistema inmune y patogenicidad, por lo que en este estudio se analizó la capacidad de dicha especie para promover la inducción de NETs y su correlación con la actividad de sus fosfolipasas. En la figura 34 se muestra la prueba de inducción de NETs por *C. glabrata*. En el panel de la izquierda se muestra la fotografía correspondiente al campo claro con el fin de demostrar la presencia de células y neutrófilos donde se muestra en campo claro la presencia de las células (2×10^5 Neutrófilos/campo) y en el panel adjunto se muestra la respectiva imagen de fluorescencia, utilizando el fluoróforo impermeable a células vivas sytox Green, el cual permite la identificación de las células NETóticas (color verde). Como control negativo se usaron neutrófilos no estimulados y como control positivo, neutrófilos estimulados con PMA. Adicionalmente, se incubaron neutrófilos con medio de cultivo líquido de crecimiento de las células fúngicas (TSC 4%) y el sobrenadante de *C. glabrata* (4%) crecida a un tiempo de 48h. La cuantificación de la expansión nuclear se incluye en una gráfica representativa, en donde un desplazamiento hacia la derecha de la curva es indicativo de células en proceso de NETosis, puesto que corresponde a un aumento del área nuclear del neutrófilo ($>100 \mu\text{m}^2$), considerando que para un neutrófilo dicha área tiene un rango de 80-100 μm^2 . De manera interesante se observó que el sobrenadante de *C. glabrata* no promovió la inducción de NETs, mostrando así la curva en la gráfica de expansión nuclear, sin desplazamiento hacia la derecha.

La figura 35 muestra la inducción de NETs por cepas de *C. glabrata* a una MOI de 1:100 crecidas a 37°C durante 48h de incubación en medio sólido y medio líquido. Se observó que *C. glabrata* no promovió la inducción de NETs lo contrario al control positivo. En esta figura se incluyen las gráficas de cuantificación de la expansión nuclear.

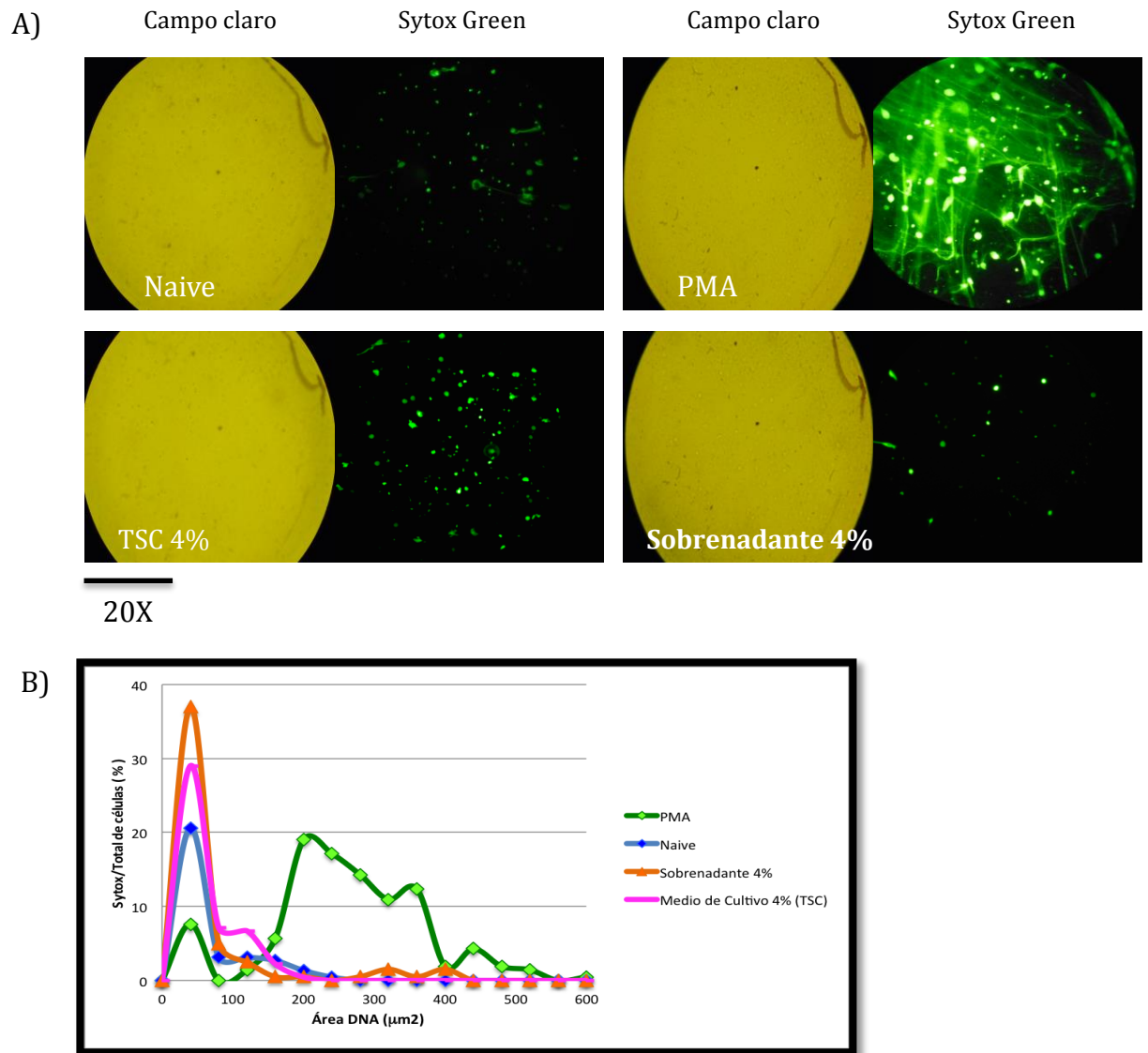
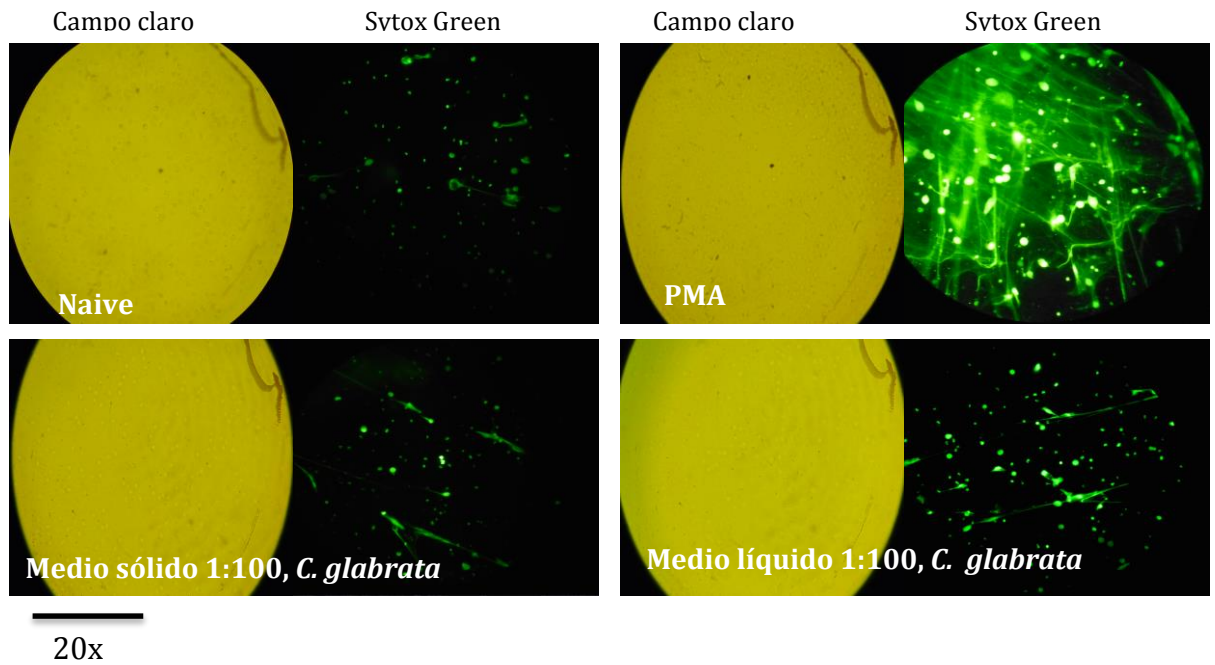


Fig. 34 Ensayo de Inducción de NETs por factores secretados en el sobrenadante de *C. glabrata*. Se observa una nula inducción de NETs en el sobrenadante del medio de crecimiento de *C. glabrata* (A), reflejado en la gráfica de la cuantificación nuclear con células sytox green positivas sin desviación a la derecha a comparación del control positivo, mostrando una respuesta similar al control negativo así como como el medio de cultivo de crecimiento (TSC 4%) (B).

A)



B)

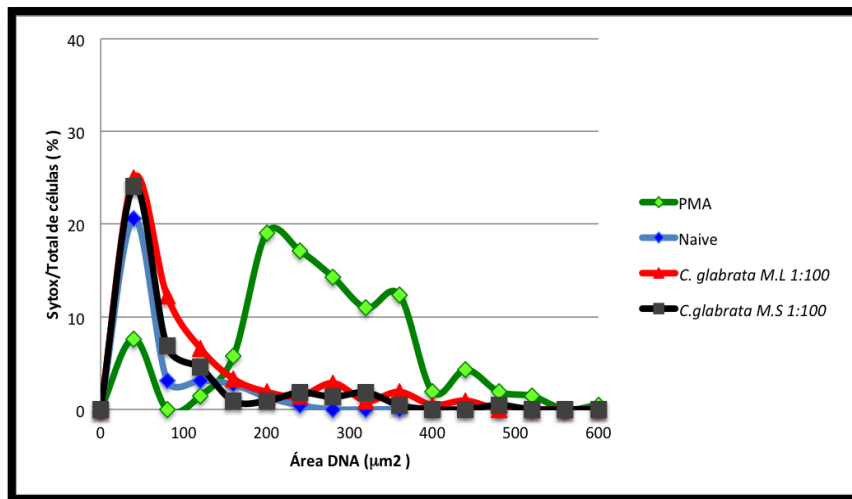


Fig. 35 Ensayo de Inducción de NETs por aislados de *C. glabrata*. Se observa una pobre o nula inducción de NETs por cepas de *C. glabrata* (MOI 1:100) crecidas en medio sólido y líquido por 48h de incubación (A), reflejado en la gráfica de la cuantificación nuclear con células sytox green positivas sin desviación a la derecha a comparación del control positivo, mostrando una respuesta similar al control negativo (B).

5.5.3 Demostración de la presencia de gránulos líticos en los NETs promovidos por *C. glabrata* por medio de inmunofluorescencia

Se demostró la nula inducción de NETs por *C. glabrata* a través de la presencia de los gránulos líticos del neutrófilo por medio de inmunofluorescencia. En la figura 13, neutrófilos tratados con *C. glabrata*, fueron tratados con anticuerpos dirigidos contra la mieloperoxidasa (Rojo) y la calprotectina (Verde), los cuales en condiciones no estimuladas se observan dispersos en la célula, sin embargo, después del estímulo estos gránulos se mantienen dicha localización a diferencia del control positivo (neutrófilos inducidos con PMA) donde estos gránulos ahora se observan cerca del núcleo, correlacionada con la intensa colocalización de estos. También se utilizó el colorante DAPI para teñir el núcleo, y de manera interesante, se observa que las células conservan la forma lobulada de su núcleo, similar a comparación del control negativo, los cuales son neutrófilos incubados con medio RPMI, sin estímulo y a diferencia del control positivo, el cual muestra en las células la pérdida de la lobulación nuclear normal que da lugar a una expansión nuclear correspondiente a la formación de los NETs.

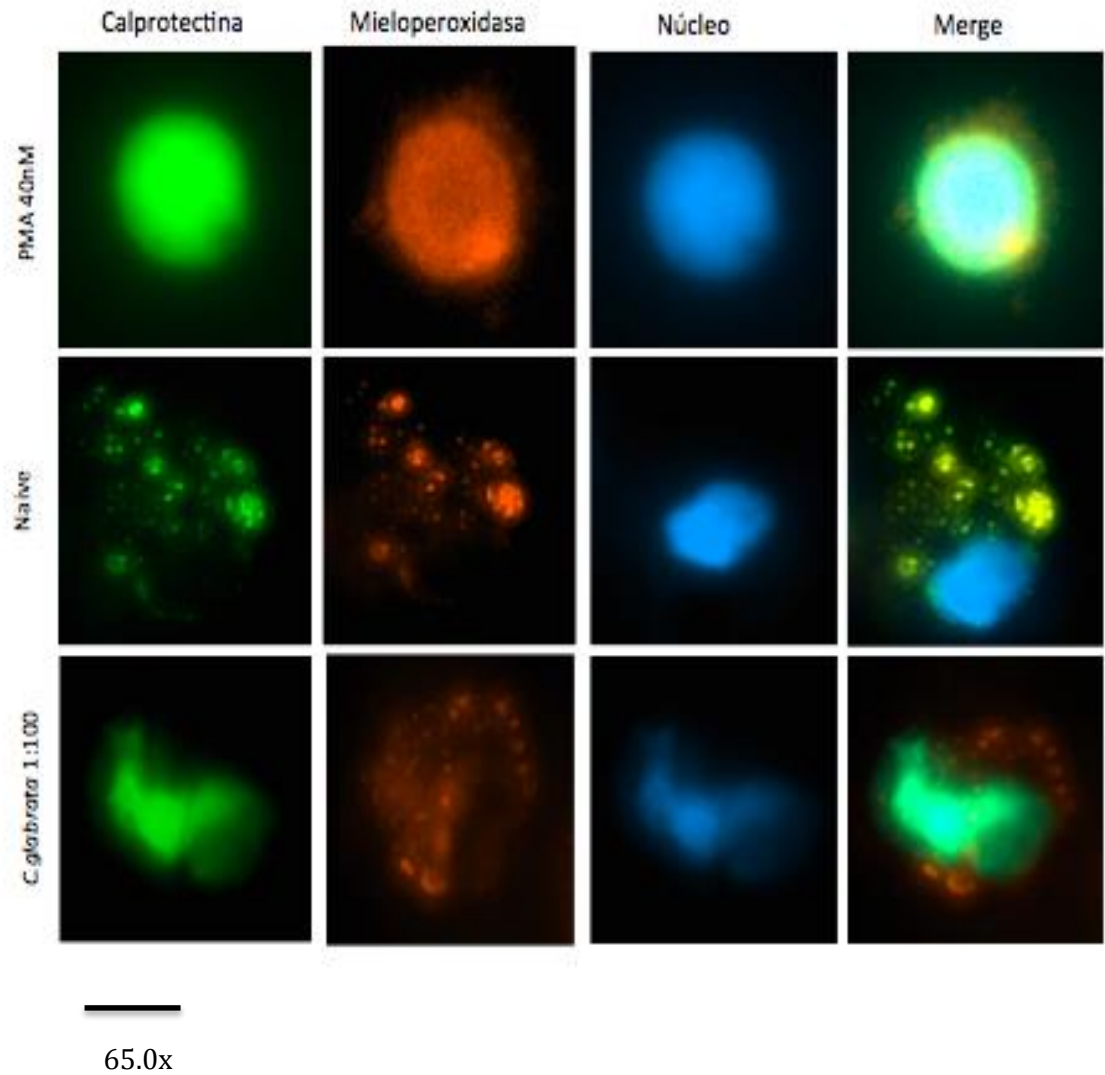


Figura 36. Ensayo de inmunofluorescencia de neutrófilos inducidos por aislados de *C.glabrata*. Se utilizó una cepa con actividad alta de fosfolipasa (MOI 1:100) y anticuerpos dirigidos contra la calprotectina (Verde) y mieloperoxidasa (Rojo). El DAPI fue utilizado para teñir el núcleo (Azul) y se observa al igual que el control negativo, donde el neutrófilo conserva su forma lobulada del núcleo sin una intensa colocalización de los gránulos (Merge). Se muestran el control positivo, los cuales son neutrófilos inducidos con PMA.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

La inducción de NETs por patógenos fúngicos como *Candida albicans* ha sido descrita recientemente [20], sin embargo los mecanismos de esta inducción no han sido esclarecidos. En el presente trabajo se estudió el rol de las fosfolipasas fúngicas de especies de *Candida* como posibles inductores de NETs y se encontró que, sin descartar otros factores, las fosfolipasas tienen participación importante en este proceso en algunas especies de *Candida* mientras que otras tienen diferentes respuesta a esta inducción.

Para el cumplimiento del presente estudio, se realizó en primera instancia la identificación fenotípica de las especies de *Candida*, mediante los ensayos de filamentación y clamidosporas, pruebas presuntivas de *Candida albicans*, debido a las características que posee en particular y que la distingue de otras especies de formar tubos germinales en suero y clamidosporas en agar con sustratos bajos en carbohidratos más tensoactivos, son pruebas esenciales como primer paso, sin embargo, es importante llegar a confirmar las pruebas positivas a las ya mencionadas, puesto que dichas pruebas no distinguen entre *C.albicans* y *C.dublinsiensis*, ya que esta última tiene de igual forma, la capacidad de formar tubos germinales y adicionalmente era necesario la identificación de otras especies no *C.albicans*, lo cual estas pruebas no lo permiten. Por lo que fue necesario corroborar esta identificación por otro método. Se utilizó el sistema bioquímico API 20C AUX, el cual está basado en la asimilación diferencial de carbohidratos y ha demostrado ser uno de los métodos más eficientes en la identificación de especies de *Candida* junto con las pruebas morfológicas

[52-54]. Mediante esta técnica, se logró identificar las especies de relevancia clínica como lo es *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, con un porcentaje de especificidad de la prueba arriba del 95% para cada una, adicionalmente a que la frecuencia de variación en el perfil metabólico de dichas cepas fue muy bajo. En cuanto a nuestros resultados, el sistema API20C AUX demostró ser eficiente en la identificación de las especies de *Candida spp.* lo que va acorde con reportes de identificación de levaduras por dicho sistema a comparación de otros [52].

Debido a que la producción de fosfolipasas es uno de los mecanismos asociados a la virulencia de *Candida*, y que además, el estudio de estas son de utilidad para comprender los mecanismos de la enfermedad, algunos estudios han centrado su atención en analizar los procesos por lo que estas proteínas contribuyen a dicha virulencia, puesto que pueden influir tanto en el éxito de la infección así como en la respuesta inmunológica [55-57]. En nuestro primer ensayo de actividad de fosfolipasas, llevado a cabo en agar yema de huevo, encontramos que con base en el índice Pz, las especies estudiadas presentaron en general una actividad muy alta ($Pz < 0.69$), mostrando así que no solamente *Candida albicans* posee este nivel de actividad, sino que otras no *C. albicans*, como *C. tropicalis*, *C. glabrata* y aunque en menor porcentaje *C. parapsilosis* también tienen la capacidad de producir una actividad muy alta de estas enzimas. Lo contrario se ha reportado en otros trabajos en donde las cepas aisladas de diversos orígenes (cavidad oral, vaginal y aislados clínicos de sangre) muestran un menor porcentaje de producción de estas enzimas en las no *C. albicans* e incluso para interés del presente estudio, se ha reportado que las cepas aisladas de esta última fuente tienen un menor porcentaje de actividad, lo cual pudiera ser debido a la falta de homogeneidad en el número de cepas de las muestras obtenidas de las diferentes regiones o en la falta de la identificación precisa de las especies [31, 58-60].

Por otra parte encontramos que cada especie mostró diferentes halos (patrones de precipitación) correspondientes a su actividad de corte de las fosfolipasas presentes en el medio, por lo cual realizamos una categorización en base a las características del mismo. En lo que respecta a los aislados de *C.albicans*, mostraron mayor heterogeneidad en la forma de halo, presentando dos tipos en mayor porcentaje dentro de estos, halos marcados (60%) y doble halos (24%). Mientras que en *C. parapsilosis* presentaron halos translúcidos de diferentes tamaños, grandes o pequeños, lo cual estaba correlacionado a su actividad por medio del índice Pz. Con lo que respecta a las últimas no *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* para ambas el 97% presentó un halo translúcido de mayor tamaño. Estos resultados nos indican que posiblemente la producción de diferentes halos entre las cepas pudiera estar correlacionado con el tipo de fosfolipasas que secreten con el corte del sustrato en el medio. Trabajos realizados para la cuantificación de la actividad de fosfolipasas en cepas de *Candida*, utilizando el mismo método de agar con yema de huevo solo se limitan en describir el nivel de actividad de dichas enzimas, sin embargo, no se han reportado diferencias en los patrones de actividad de precipitación del halo y tampoco se han correlacionado con la cantidad de producción de fosfolipasas. En este trabajo, determinamos que el índice Pz solo permite evaluar de manera semi-cuantitativa la actividad de producción de las fosfolipasas por el hongo, sin embargo, no categoriza entre distintos patrones de precipitación del sustrato que forma el halo en el medio, lo cual sería de interés investigar, ya que estos diferentes tipos de fosfolipasas, si este fuera el caso, pudieran tener alguna influencia en la patogenia del hongo e inducir diferentes respuestas inmunológicas [33]. Como control negativo para la producción de fosfolipasas incluimos una cepa de *T. asahii*, ya que anteriormente se había reportado a éste hongo con actividad

de fosfolipasa nula, dicha observación fue confirmada por nuestros experimentos ya que no obtuvimos ningun halo de precipitación en el agar con yema de huevo [61].

La cinética de producción de las fosfolipasas en las especies de *Candida* es otro aspecto que se evaluó en el presente estudio, el cual de manera sorprendente no ha sido analizado anteriormente. Para estudiar si el medio de crecimiento podría influir en la secreción de las fosfolipasas crecimos las cepas en medio sólido para su activación y crecimiento previo a la prueba, así como un pre-cultivo en medio líquido a diferentes tiempos de incubación, comparando cultivos de tiempo de crecimiento temprano, intermedio y tardíos. Adicionalmente, esto nos permitió determinar los puntos críticos de su secreción para posteriormente analizar su posible asociación con la inducción de NETs durante estas fases. Se analizó la cinética de crecimiento para cada cepa, y se estableció si la producción de fosfolipasas era dependiente de este factor.

En este trabajo encontramos que las cepas de *C. albicans* ensayadas mantuvieron de manera uniforme las formas de halos de precipitación en el medio (halo muy marcado y doble halo), sin importar el medio de crecimiento utilizado para su activación (sólido ó líquido) en tiempos tempranos (24h) e intermedios (72h), sin embargo, las cepas crecidas en medio líquido a tiempos tardíos (120h), pierden el halo marcado durante los 4 días de la prueba mostrando solo un halo menos acentuado en la precipitación (halo transparente). Debido a que no hay reportes acerca de las formas de halos que pudieran presentar las diferentes especies de *Candida*, dicho cambio pudiera ser producto de algún tipo de fosfolipasa o fosfolipasas producidas de manera tardía en un cultivo viejo, por lo que sería interesante el analizar a detalle el tipo de estas enzimas producidas en estas cepas como ya se había discutido anteriormente. Por otro lado, los resultados de la cinética de actividad de

fosfolipasas para *C. albicans* de cultivo tardío en medio líquido, muestran una actividad de fosfolipasas retardada, iniciando a partir de las 48h a 72h, sin embargo, interesantemente a las 96h las cepas alcanzan una actividad similar a las del resto de los cultivos en medio líquido ó sólido, por lo que si se realiza una correlación en cuanto a la cinética de crecimiento de estas mismas, la producción de fosfolipasas es independiente del crecimiento. Otro punto importante que arrojaron estos datos es que tomando en cuenta que el crecimiento de estas cepas en medio sólido es mayor, los resultados sugieren que al menos por levadura, las cepas crecidas en este medio, producen menos fosfolipasas que las cepas crecidas en un medio líquido.

Para las cepas de *C. tropicalis*, durante la cinética de actividad de fosfolipasas, conservaron el mismo halo de precipitación tanto en medio sólido como medio líquido en los tiempos de estudio, sin embargo, a diferencia de las otras especies de *Candida*, estos aislados crecidos en un medio líquido a tiempo tardío (120h) tienen una actividad mayor de fosfolipasas que las cepas crecidas en medio sólido o líquido a tiempos de 24h y 72h, lo cual se refleja haciendo una correlación con las cinéticas de crecimiento de estas cepas, a pesar de que dicho crecimiento es mas variable que las demás especies.

Al igual que *C. tropicalis* y *C. glabrata*, el halo de precipitación de la actividad de fosfolipasas de las cepas de *C. parapsilosis* se mantiene para ambos tratamientos de cultivo. La cinética de actividad de fosfolipasas de *C. parapsilosis* de menor actividad o halo pequeño muestra una respuesta similar a la observada para *C. albicans* y *C. glabrata*, en donde independientemente del pre-cultivo en medio líquido o sólido a diferentes tiempos, las cepas alcanzan una actividad similar de esta enzima a los 4 días de la prueba, por lo que de nuevo, se afirma que el crecimiento no es un factor determinante en dicha actividad y

correlacionado de nuevo con la cinética de crecimiento de éstas especies, dichas cepas crecidas en medio líquido a los diferentes tiempos de incubación, son mas productoras de fosfolipasas que aquellas crecidas en un medio sólido. Finalmente, estos resultados se reafirman para los aislados de *C. parapsilosis* de mayor actividad o de halo grande, en donde, las cepas crecidas en un medio líquido, muestran una actividad más alta que las cepas crecidas en un medio sólido, por lo que asociando con la cinética de crecimiento, estas últimas producen el doble de fosfolipasas que las primeras. Con todos estos resultados hasta el momento, nos sugiere que el tratamiento en un cultivo líquido de las cepas de *Candida spp.* promueve cambios metabólicos que regulan la actividad de fosfolipasas. Es importante de mencionar que no hay algún reporte acerca de la evaluación de la cinética de producción de fosfolipasas en *Candida spp.*

Uno de los mecanismos de defensa empleados por los neutrófilos frente a patógenos de importancia clínica como *Candida albicans*, es la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), los cuales son efectivos al promover la muerte del hongo, sin embargo los factores tanto fúngicos como celulares implicados en la inducción de dichas trampas son desconocidos hasta el momento. Se ha documentado que algunas fosfolipasas de patógenos entre las que se encuentran la fosfolipasa A₂ citoplasmática y la fosfolipasa B por la vía de señalamiento del ácido araquidónico son capaces de activar directamente a la proteína quinasa C, siendo esta última uno de los principales mediadores implicados en la formación de NETs [44, 45, 62]. Para determinar si las fosfolipasas fúngicas tienen un papel en la producción de los NETs investigamos la capacidad de algunas cepas de *Candida* para inducir las trampas extracelulares de neutrófilos.

En nuestros resultados observamos que cepas de *C. albicans* con actividad muy alta de fosfolipasas, independientemente del crecimiento de éstas en diferentes medios (líquido y sólido) así como el sobrenadante del medio de cultivo de crecimiento del hongo, indujeron una robusta formación de NETs, la inducción de trampas fue independiente al tiempo de pre activación de las cepas (48h o 120h), lo cual se refleja en las gráficas de cuantificación de la expansión nuclear (fig. 8-10), que van desde un 30% a un 45% de las células con un área nuclear mayor a $80\mu\text{m}^2$ expuestas al sobrenadante, de un 30% a un 50% para las cepas de 48h de crecimiento en sólido y líquido respectivamente y de un 20% para la cepa de 120h de crecimiento en medio líquido. En contraste para la cepa control de *T. asahii* la cual no posee actividad de fosfolipasa, la inducción de NETs fue nula en todas las condiciones probadas, lo que refuerza la hipótesis que posiblemente las fosfolipasas fúngicas son inductoras de NETs de manera proporcional a la actividad de dichas enzimas. A pesar de que la inducción de NETs por las cepas de *C. albicans* se reportó con anterioridad, en este trabajo encontramos que otros factores secretados por esta especie en el medio extracelular pueden inducir la formación de NETs, por lo que sería de interés un análisis más profundo de estos.

En lo que respecta a los aislados de *C. tropicalis*, también fueron capaces de inducir la formación de NETs así como el sobrenadante de éstos. Sin embargo, las cepas de tiempo temprano (48h) independientemente del medio de cultivo usado para su activación, su inducción fue más heterogénea y de una manera menos robusta que las cepas crecidas en medio líquido a tiempo tardío (120h) o que cualquiera de los tratamientos con las cepas de *C. albicans*. No existen reportes anteriores acerca de la capacidad de esta especie para inducir los NETs, sin embargo, los resultados nos sugieren de nuevo que *C. tropicalis* al ser uno de los principales patógenos fúngicos causantes de candidiasis invasiva, ubicándose

solamente detrás de *C. albicans* [63], posee factores que inducen la formación de NETs, ya sea mediante contacto directo así como mediante factores secretados al medio extracelular. Finalmente, un dato interesante que afirma nuestra hipótesis de trabajo, es que las cepas con una doble actividad de fosfolipasa mostrada (cultivo en medio líquido a 120h) induce una robusta inducción de NETs, por lo que dichas enzimas muy posiblemente se encuentren entre los principales inductores de NETs.

Otras de las cepas analizadas en este estudio, fue *C. parapsilosis*, su análisis resulta interesante ya que los hongos pertenecientes a esta especie se han reportado entre los mayormente productores de proteinasas que de fosfolipasas [32]. En nuestro trabajo encontramos que las cepas analizadas de dicha especie demostraron una variabilidad en la producción de fosfolipasas dentro de las cepas, sin embargo y de manera consistente, aquellas con una actividad alta, demostraron una inducción de NETs robusta independientemente del medio utilizado para su cultivo (sólido ó líquido) al igual que el sobrenadante del medio de crecimiento. Estos resultados nos sugieren que tanto factores de este hongo como aquellos que son secretados tienen una participación en esta respuesta, donde las fosfolipasas pudieran incluirse, sin descartar otras enzimas como las proteínasas las cuales no fueron analizadas en el presente trabajo. De manera similar sucede para *C. parapsilosis* que mostró una menor actividad de fosfolipasas, la cual es capaz de inducir los NETs aunque de una forma menos robusta en comparación con *C. albicans*. Finalmente, dado a la heterogeneidad de actividad de fosfolipasas que presentaron dichas cepas, incluimos una con actividad negativa para dicha enzima, la cual demostró ser negativa a la inducción de NETs. No existe ningún reporte hasta el momento sobre la inducción de NETs por esta especie, además que se sabe que *C. parapsilosis* pertenece a un complejo de tres

especies, siendo *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* [64]. En este trabajo, no se llegó a la identificación o determinación de las especies de dicho complejo, por lo que posiblemente dicha variabilidad entre la actividad de fosfolipasas y la respuesta frente a neutrófilos como lo es la inducción de NETs podría atribuírsele, ya que se ha reportado diferencias de esta actividad entre las especies, sin embargo, la correlación directa entre la producción de fosfolipasas y la inducción de NETs es una observación muy relevante que continuaremos explorando [65].

En lo que respecta a los aislados de *C. glabrata*, de forma sorprendente tanto la cepa crecida en medio sólido y líquido así como el sobrenadante del medio de cultivo de ésta, no mostró inducción de NETs, a comparación del control positivo. Las cepas de *C. glabrata* en nuestro estudio demostraron tener una actividad alta de fosfolipasas, sin embargo, los resultados anteriormente mencionados nos indican que si bien, a pesar de tener este tipo de enzimas posiblemente no están promoviendo la inducción de NETs o si esto fuera así, habrían otros factores de virulencia que posee dicha especie para inhibir la vía de formación de NETs. Dentro de algunos factores de virulencia reportados hasta el momento de esta especie, se encuentran las catalasas, y superóxido dismutasa, los cuales han demostrado tener un rol importante en la resistencia al estrés oxidativo, además de otras moléculas que participan de manera importante en la evasión de la maduración del fagosoma y la modulación de señalamiento por lípidos como lo es la proteína-3-Kinasa (PI3K), los cuales serían de interés analizar, así como la presencia de actividad de DNAsas en la cepa [66-68]. A pesar de no haber reportes hasta el momento de inducción de NETs por *C. glabrata*, recientemente se describió que los neutrófilos pueden censar el tamaño de los microorganismos, y selectivamente liberar trampas extracelulares, como por ejemplo en respuesta a hifas de *C. albicans*, esto a través de la vía dectina-1, por lo que posiblemente el

estado morfológico de *C. glabrata*, que únicamente se mantiene en forma de levadura, también podría influir en la respuesta de inducción de NETs en los neutrófilos, ya que otros mecanismos como la fagocitosis pudieran estar predominando [69].

Las distintas respuestas de las especies de *Candida* a la inducción de NETs por los neutrófilos, en especial a lo que es *C. glabrata* puede ser debido a que, aunque exista una actividad enzimática similar entre las especies, en este caso de fosfolipasas, la forma en que interactúan con el sistema inmune varía, ya que se ha documentado en estudios moleculares en la secuencia ITS del DNAr, que las especies como *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* y *C.parapsilosis complex* las cuales poseen polimorfismos o un gran número de haplotipos entre especies que están relacionados de manera predominante a la fuente endógena de adquisición, lo que podría estar modulando la expresión de los diferentes factores de virulencia y dicha interacción [70].

Finalmente para confirmar la formación de NETs, y analizar algunos de los componentes de éstos, inducidos con la diferentes especies de *Candida*, realizamos un ensayo de inmunofluorescencia (figuras: 13,21,29 y 36) en donde utilizamos anticuerpos contra la mieloperoxidasa y calprotectina del neutrófilo, los cuales son gránulos que se han encontrado inmersos en los NETs. La mieloperoxidasa, es un gránulo del neutrófilo, que además de tener funciones importantes en la respuesta antimicrobiana para la generación de ROS, se ha visto que su participación es importante durante la inducción de NETs, ya que este migra hacia el núcleo para contribuir a la descondensación de la cromatina, además se ha demostrado que pacientes sin actividad de MPO no pueden producir los NETs [71-73]. La calprotectina, es otro de los gránulos que se ha observado presente en las redes que conforman los NETs, mostrando una actividad antimicrobiana para los patógenos como

C. albicans que son atrapados en ella, y privándolo de iones divalentes como el Zinc, magnesio y calcio, los cuales son esenciales para el metabolismo de dichos patógenos [22, 28].

En nuestro estudio encontramos que posterior a la incubación de neutrófilos con las cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* con actividad alta de fosfolipasas se promovía una movilización de la mieloperoxidasa y la calprotectina del neutrófilo hacia su núcleo o a la periferia del mismo, a diferencia del control negativo donde los gránulos se mantienen en el citoplasma. Otra característica importante que se mostró en dichos resultados fue que los neutrófilos presentaban una expansión nuclear, perdiendo la forma lobulada del núcleo demostrada mediante la tinción nuclear con DAPI, la cual es una característica que presentan los neutrófilos sometidos a NETosis [4].

En lo que respecta a los neutrófilos inducidos por el control de fosfolipasa negativo *T. asahii*, y la cepa de *C. parapsilosis* con actividad negativa a fosfolipasas así como para la cepa *C. glabrata* se encontró que los gránulos de la mieloperoxidasa se mantienen en el citoplasma, y no hay colocalización de ambos gránulos, asimismo la forma lobulada del núcleo siempre se mantuvo, lo que indica que la delobulación característica de la formación de NETs nunca se llevó a cabo. Estos últimos resultados nos confirman que para estas 2 especies de *Candida* y para *T. asahii* no inducen la formación de NETs.

La formación de NETs es una de las respuestas llevada a cabo por neutrófilos para la eliminación de patógenos como *C. albicans*, sin embargo, se desconocen los mecanismos que generan su inducción. En este estudio se consideraron a las fosfolipasas como posibles factores involucrados en dicha inducción, y para tal propósito, se evaluó el perfil de

producción de fosfolipasas de aislados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* y su interacción con los neutrófilos en la inducción de NETs. De manera interesante obtuvimos que las cuatro especies de relevancia clínica demostraron una actividad de fosfolipasas muy alta siendo algo variable para *C. parapsilosis*. Esta actividad reveló ser independiente del crecimiento, sin embargo el medio de cultivo podría promover cambios metabólicos que la modulen. Adicionalmente, existen diferentes respuestas a la inducción de NETs por las especies de *Candida*, donde las fosfolipasas tienen un papel importante en su inducción, la cual podría estar relacionada a su actividad enzimática, sobre todo para las especies de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, sin embargo, sorprendentemente *C. glabrata* no induce la formación de NETs lo que se sugiere que otros factores de virulencia y de inhibición de este mecanismo podrían influir en dicha respuesta, por lo que sería de interés, analizar los factores involucrados en tal inhibición e identificar de manera precisa las fosfolipasas producidas por las diferentes especies de *Candida* mediante ensayos de Western blot para confirmar su correlación con la inducción de NETs, demostrando la participación de la vía del ácido araquidónico en dicha respuesta.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

- ❖ Las cuatro especies de relevancia clínica obtenidas de hemocultivos, *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* y *C.glabrata* demostraron una actividad de fosfolipasas muy alta siendo algo variable para la penúltima especie. Esta actividad reveló ser independiente del crecimiento, sin embargo el medio de cultivo podría promover cambios metabólicos que la modulen.

- ❖ Existen diferentes respuestas a la inducción de NETs por las especies de *Candida*, donde las fosfolipasas tienen un papel importante en su inducción, la cual podría estar relacionada a su actividad enzimática, sobre todo para las especies de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C.parapsilosis*.

- ❖ *C. glabrata* no induce la formación de NETs lo que se sugiere que otros factores de virulencia y de inhibición de este mecanismo podrían influir en dicha respuesta.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

- Identificar de manera precisa las fosfolipasas producidas y secretadas por las diferentes especies de *Candida* mediante ensayos de Western blot.
- Confirmar la participación de las fosfolipasas fúngicas en la inducción de NETs por ensayos con Inhibidores específicos de fosfolipasas.
- Estudiar los factores involucrados en la baja respuesta a la inducción de NETs por *C. glabrata* y del complejo *C. parapsilosis* (Producción de catalasas, peroxidasas, proteasas, ADNsas, hemolisinas y producción de ROS).
- Estudiar la participación de la vía del ácido araquidónico en la inducción de NETs, a través de purificación de las fosfolipasas fúngicas y mediante el uso de inhibidores específicos para las vías de señalamiento implicadas en la generación de ecosanoides.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS

1. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11: 519-31
2. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 30: 459-89.
3. Underhill DM, Ozinsky A. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20: 825-52.
4. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176: 231-41
5. Brinkmann V, Zychlinsky A. 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?. *J Cell Biol* 198 :773-83
6. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-5.
7. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. 2009 NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 30:513-21.
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition. Molecular Biology* (p. 1616).
9. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 283: 1-16
10. Christofferson DE, Yuan J. 2010. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology* 22:263-8
11. Remijnsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Ryck{Abi Abdallah, 2012 #14}e R, Vandenabeele P. 2011. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell research* 21: 290–304.

12. Silva LM, Caro TM, Gerstberger R, Vila-Vicosa MJ, Cortes HC, Hermosilla C, Taubert A. 2014. The apicomplexan parasite *Eimeria arloingi* induces caprine neutrophil extracellular traps. *Parasitol Res* 113: 2797-807
13. Abi Abdallah DS, Lin C, Ball CJ, King MR, Duhamel GE, Denkers EY. 2012. *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect Immun* 80: 768-77
14. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. 2006. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16: 401-7
15. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13: 463-9
16. Yoo D goon, Floyd M, Winn M, Moskowitz SM, Rada B. 2014. NET formation induced by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes. *Immunology Letters* 160: 186–194.
17. Pfaller MA, Diekema DJ. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133-63
18. Bonifaz Trujillo AJ. 2012. *Micología médica básica*. Cuarta edición. *Introducción y generalidades, Levaduras* Capítulo 6, pags: 86–87.
19. Sudbery P, Gow N, Berman J. 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12: 317-24
20. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8: 668-76
21. Pfaller MA, Diekema DJ. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133-63

22. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 5: e1000639
23. Calderone RA. 2002. *Candida and Candidiasis. Extracellular hydrolases*. Capítulo 9, pags 107-119.
24. Calderone RA, Fonzi WA. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9: 327-35
25. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400-28
26. Remold H, Fasold H, Staib F. 1968. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 167: 399-406
27. White TC, Agabian, N. 1995. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: Isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *Journal of Bacteriology*, 177: 5215–5221.
28. Staib F. 1965. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia*, 4:187–193.
29. Parra-Ortega B, Cruz-Torres H, Villa-Tanaca L, Hernandez-Rodriguez C. 2009. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 505-12
30. Seshan KR, Vitullo JC, Leidich SD, Jessup C, Cole GT, Ghannoum MA. A genetically defined phospholipase B-deficient *Candida albicans* mutant is less virulent in the oral-intragastric infant mouse model. Submitted for publication.
31. Ghannoum MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122-43
32. Mohan das V, Ballal M. 2008. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol.* 25:208-10.
33. D'Eca Junior A, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, de Maria Silva Figueiredo P, de Andrade Monteiro C. 2011. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 44:

34. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7-14
35. Takahashi M, Banno Y, Nozawa Y. 1991. Secreted *Candida albicans* phospholipases: purification and characterization of two forms of lysophospholipase-transacylase. *J Med Vet Mycol* 29: 193-204
36. Banno Y, Yamada T, Nozawa Y. 1985. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia* 23: 47-54
37. McLain N, JW Dolan. 1997. Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. *Microbiology* 143:3521–3526
38. Mirbod, F., Y. Banno, M. A. Ghannoum, A. S. Ibrahim, S. Nakashima, Y. Kitajima, G. T. Cole, and Y. Nozawa. 1995. Purification and characterization of lysophospholipase-transacylase (h-LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1257:181–188
39. García GA, García CA. 2009. Fosfolipasas a2: grandes familias y mecanismos de acción. *Repert med cir.* 18(4):199-209
40. Takemori H, Zolotaryov FN, Ting L, Urbain T, Komatsubara T, Hatano O, Okamoto M, Tojo H. 1998. Identification of functional domains of rat intestinal phospholipase B/lipase. Its cDNA cloning, expression, and tissue distribution. *J Biol Chem* 273: 2222-31
41. Fu G, Chen Y, Schuman J, Wang D, Wen R. 2012. Phospholipase Cgamma2 plays a role in TCR signal transduction and T cell selection. *J Immunol* 189: 2326-32
42. McDermott M, Wakelam MJ, Morris AJ. 2004. Phospholipase D. *Biochem Cell Biol* 82: 225-53
43. Terao C1, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N, Matsuda F, Mimori T. 2013. PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population *Arthritis Rheum* 65:472-80.

44. Jennen DG, Magkoufopoulou C, Ketelslegers HB, van Herwijnen MH, Kleinjans JC, van Delft JH. 2010. Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicol Sci.* 115(1):66-79.
45. Dennis EA, Rhee SG, Billah MM, Hannun YA. 1991. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J* 5: 2068-77
46. Cooper GM, Hausman RE. 2010. La célula. Quinta edición. Señalización celular. Cap. 15, pag. 611-612.
47. Roncero. 2013. Bioquímica de Neurotransmisores y Hormonas Mecanismos de Transducción de Señales por receptores de Membrana. *Rev Esp Cardiol Supl.* 13:8-15
48. Lennartz MR. 1999. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 415-30
49. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M. 2013. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem* 114: 532-40
50. Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. 2013. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol* 190: 4136-48
51. Neeli I, Radic M. 2013. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front Immunol.* 20;4:38.
52. de Louvois J, Mulhall A, Hurley R. 1979. Biochemical identification of clinically important yeast *J Clin Pathol.* 32(7):715-8.
53. Land GA, Harrison BA, Hulme KL, Cooper BH, Byrd JC. 1979. Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a conventional method. *J Clin Microbiol.* 10(3):357-64.
54. Bergan T. 1982. Evaluation of four commercial biochemical test systems for identification of yeasts. *Eur J Clin Microbiol* 1: 217-22
55. Ramos Lde S, Barbedo LS, Braga-Silva LA, Santos AL, Pinto MR, Sgarbi DB. 2015. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 32: 122-5

56. Sanitá PV, Zago CE, Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. 2014. In vitro evaluation of the enzymatic activity profile of non-albicans *Candida* species isolated from patients with oral candidiasis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 118(1):84-91
57. Suram S, Silveira LJ, Mahaffey S, Brown GD, Bonventre JV, Williams DL, Gow NA, Bratton DL, Murphy RC, Leslie CC. 2013. Cytosolic phospholipase A(2)alpha and eicosanoids regulate expression of genes in macrophages involved in host defense and inflammation. *PLoS One* 8: e69002
58. Tellapragada C, Eshwara VK, Johar R, Shaw T, Malik N, Bhat PV, Kamath A, Mukhopadhyay C. 2014. Antifungal susceptibility patterns, in vitro production of virulence factors, and evaluation of diagnostic modalities for the speciation of pathogenic *Candida* from blood stream infections and vulvovaginal candidiasis. *J Pathog* 2014: 142864
59. Costa CR, Passos XS, e Souza LK, Lucena Pde A, Fernandes Ode F, Silva Mdo R. 2010. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 52: 139-43
60. Fule SR, Das D, Fule RP. 2015. Detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and non albicans isolated from women of reproductive age with vulvovaginal candidiasis in rural area. *Indian J Med Microbiol* 33: 92-5
61. Sun W1, Su J, Xu S, Yan D. 2012. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. *J Med Microbiol.* (Pt 12):1750-7
62. Gray RD, Lucas CD, Mackellar A, Li F, Hiersemenzel K, Haslett C, Davidson DJ, Rossi AG. 2013. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps. *J Inflamm (Lond).* 21;10(1):12.
63. Arendrup MC. 2013. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J* 60: B4698
64. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 43: 284-92
65. Trevino-Rangel Rde J, Gonzalez JG, Gonzalez GM. 2013. Aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of clinical isolates of the *Candida parapsilosis* species complex. *Med Mycol* 51: 331-5
66. Cuéllar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Cañas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castaño I, De Las Peñas A. 2008. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single

catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell*. 7(5):814-25

67. Rai MN, Sharma V, Balusu S, Kaur R. 2015. An essential role for phosphatidylinositol 3-kinase in the inhibition of phagosomal maturation, intracellular survival and virulence in *Candida glabrata*. *Cell Microbiol* 17: 269-87
68. Cuellar-Cruz M, Lopez-Romero E, Ruiz-Baca E, Zazueta-Sandoval R. 2014. Differential response of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to oxidative and nitrosative stresses. *Curr Microbiol* 69: 733-9
69. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, Papayannopoulos V. 2014. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* 15: 1017-25
70. Merseguel KB, Nishikaku AS, Rodrigues AM, Padovan AC, RC EF, Salles de Azevedo Melo A, da Silva Briones MR, Colombo AL. 2015. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. *BMC Infect Dis* 15: 57
71. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 191: 677-91
72. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, Wahn V, Papayannopoulos V, Zychlinsky A. 2011. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 20;117(3):953-9
73. Palmer LJ, Cooper PR, Ling MR, Wright HJ, Huissoon A, Chapple IL. 2012. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin Exp Immunol* 167: 261-8
74. Achouiti A, Vogl T, Urban CF, Rohm M, Hommes TJ, van Zoelen MA, Florquin S, Roth J, van 't Veer C, de Vos AF, van der Poll T. 2012. Myeloid-related protein-14 contributes to protective immunity in gram-negative pneumonia derived sepsis. *PLoS Pathog* 8: e1002987
75. cCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, Heesemann J, Ebel F. 2010. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect* 12: 928-36

APÉNDICES

APÉNDICE A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

Agar Papa Dextrosa: Suspender 39.0g de “*Agar Papa Dextrosa, BD, Bioxon,*” en polvo en 1000mL de agua destilada, mezclar, calentar y agitar frecuentemente, dejar hasta antes del punto de ebullición por 1 minuto hasta diluir completamente. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Agar Dextrosa Saboraud: Suspender 65.0g de “*Agar Dextrosa Saboraud, BD, Bioxon*” en polvo en 1000mL de agua destilada, mezclar, calentar y agitar frecuentemente, dejar hasta antes del punto de ebullición por 1 minuto hasta diluir completamente. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Agar Harina de Maíz: Pesar 17g de “*Corn Meal Agar, BD, BBL™*” y suspender en 1000mL de agua destilada, agregándole al final 1% de Tween 80°. Mezclar, calentar y agitar frecuentemente, dejar hasta antes del punto de ebullición por 1 minuto hasta diluir completamente. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Medio para hemolisinas: Pesar 65.0g de Agar Dextrosa Saboraud, y 30.0g de glucosa al 3%, disolver en 1000mL de agua destilada, mezclar, calentar y agitar frecuentemente, dejar hasta antes del punto de ebullición por 1 minuto hasta diluir completamente. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Finalmente añadir 7% de Sangre total de manera estéril.

Agar DNAsas: Disolver 45g de polvo de medio “*DNAsas Test Agar with Methyl green, Difco BD*” en 1000mL de agua destilada. Mezclar, calentar y agitar frecuentemente, dejar hasta antes del punto de ebullición por 1 minuto hasta diluir completamente. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Caldo Soya Trypticaseína: Pesar 30g de “*Caldo soya Trypticaseína, BD, Bioxon*” y suspender en 1000mL de agua destilada. Calentar ligeramente para su completa disolución y vaciar en tubos de 4x100 con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C por 15 minutos

Medio para Fosfolipasas: Pesar 65.0g de Agar Dextrosa Saboraud, 30.0g de glucosa al 3%, 58.44g de NaCl 1M, 0.55g de CaCl₂ 5mM. Se procede a diluir la mezcla en 920mL de agua destilada mezclar, calentar y agitar frecuentemente, dejar hasta antes del punto de ebullición por 1 minuto hasta diluir completamente. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Se deja reposar hasta a temperar y añadir cuidadosamente de manera estéril y agitando 80mL de yema de huevo al 8%.

Solución Salina al 0.85%: Pesar 0.85g de NaCl y disolver en 100mL de agua destilada.

PBS 10X : Pesar 80g de NaCl (1,370 mM), 2g KCl (27 mM), 14.2g de Na₂HPO₄ (100 mM), y 2.45g KH₂PO₄ (18 mM). Disolver en 800mL de agua desionizada y ajustar el pH a 7.4 con HCl. Ajustar el volumen a 1000mL con agua desionizada y esterilizar.

PBS 1X: Medir y colocar 100mL de PBS 10x en 900mL de agua destilada.

Glicerol al 70%: 7mL de glicerol concentrado más 3mL de PBS 1x.

Azul de Tripano diluido: 990µL de PBS 1x más 10µL de azul tripano concentrado.

Sytox Green diluido: 990µL de PBS 1x más 10µL de Sytox Green concentrado.

PMA 40nM: Diluir el PMA que contiene 2mM en 10 µL, agregando 990 µL de RPMI.

Solución Bloqueadora (BSA al 3%): Pesar 2.25g de BSA, y agregar 75mL PBS 1X, mezclar bien hasta completa disolución.

Solución Permeabilizadora: Colocar 50 μ L de Tritón 100x en 2.5mL de PBS 1X.

Diluciones de anticuerpos:

- **Anti- Calprotectina 1:100** = 18 μ L de anticuerpo concentrado en 1,782 μ L de BSA 3%. Para 1800 μ L (36 posos x 50 μ L).
- **Anti-Mieloperoxidasa 1:100** = 5 μ L de anticuerpo concentrado en 495.0 μ L de BSA 3%. Para 500 μ L (10 posos x 50 μ L).
- **Anti- Elastasa 1:100** = 5 μ L de anticuerpo concentrado en 495.0 μ L de BSA 3%. Para 500 μ L (10 posos x 50 μ L).
- **Anti-H3 1:100** = 5 μ L de anticuerpo concentrado en 495.0 μ L de BSA 3%. Para 500 μ L (10 posos x 50 μ L).
- **Alexa Fluor 488 anti-Ratón mezclado con Alexa Fluor 568 1:300** = 4 μ L de anticuerpo concentrado cada uno en 1,192 μ L de BSA 3%. Para 1,200 μ L (24 posos x 50 μ L).

DAPI diluído: 10 μ L de DAPI concentrado en 1,190 μ L de solución BSA 3%. Para 1,200 μ L.

APENDICE B. LISTA DE CEPAS CLÍNICAS UTILIZADAS DURANTE EL ESTUDIO

Tabla 4. Cepas de levaduras de hemocultivos correspondiente a *C. albicans*

Hemocultivo	Edad	Genero	P. Filamentación y Clamidospora	Id. por API 20C AUX
449	73a	M	Positiva	<i>C.albicans</i> 99.6%
450	27a	M	Positiva	<i>C.albicans</i> 99.6%
455	70a	M	Positiva	<i>C.albicans</i> 97.4%
458	54a	F	Positiva	<i>C.albicans</i> 99.6%
461	47a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 99.6%
469	62a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 99.6%
472	24a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 97.4%
473	19a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 97.4%
484	23a	F	Positiva	<i>C. albicans</i> 97.4%
491	36a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 99.6%
499	65a	F	Positiva	<i>C. albicans</i> 99.6%
502	16a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 97.4%
503	60a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 97.4%
506	37a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 99.6%
509	43a	F	Positiva	<i>C. albicans</i> 99.6%
513	77a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 97.3%
514	62a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 99.6%
470	14a	F	Positiva	<i>C. albicans</i> 99.6%
523	65a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 2 99.6%
525	7a	F	Positiva	<i>C. albicans</i> 2 99.6%
547	R/N	F	Positiva	<i>C. albicans</i> 2 99.6%
572	7m	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 2 99.9%
579	8m	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 2 99.6%
589	75a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 99.3%
591	R/N	F	Positiva	<i>C. albicans</i> 2 99.6%
592	54a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 2 99.6%
594	77a	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 2 99.7%
597	34a	F	Positiva	<i>C. albicans</i> 2 99.6%
670	R/N	M	Positiva	<i>C. albicans</i> 99.6%
704	R/N	F	Positiva	<i>C. albicans</i> 99.6%

Tabla 5. Cepas de levaduras de hemocultivos correspondiente a *C. parapsilosis*

Hemocultivo	Edad	Genero	P. Filamentación y Clamidospora	Id. por API 20C AUX
435	27a	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
442	72a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 97%
428	2a	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
448	75a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 97%
456	58a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
457	21a	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
460	38a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
466	21a	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
468	75a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
475	51a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
477	17d	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
480	33a	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
485	45a	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
487	63a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
488	55a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
489	20a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
492	24a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
500	72a	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.5%
519	78a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 98.1%
520	51a	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
556	90a	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 98.1%
566	10 d	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
571	6m	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
580	7a	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
593	77a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
607	47a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
608	47a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 99.9%
609	88a	F	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 98.1%
626	55a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 98.1%
647	36a	M	Negativo	<i>C. parapsilosis</i> 98.1%

Tabla 6. Cepas de levaduras de hemocultivos correspondiente a *C. glabrata*

Hemocultivo	Edad	Genero	P. Filamentación y Clamidospora	Id. por API 20C AUX
178	17A	M	Negativo	<i>C.glabrata</i> 99.3%
186	46a	F	Negativo	<i>C.glabrata</i> 99.3%
202	2a	M	Negativo	<i>C.glabrata</i> 99.3%
209	45a	M	Negativo	<i>C.glabrata</i> 99.3%
210	68a	F	Negativo	<i>C.glabrata</i> 99.3%
235	50a	F	Negativo	<i>C.glabrata</i> 99.3 %
239	62a	F	Negativo	<i>C.glabrata</i> 99.3 %
249	7a	F	Negativo	<i>C.glabrata</i> 99.3%
251	90a	F	Negativo	<i>C.glabrata</i> 99.3%
278	38a	M	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
315	51a	M	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
317	82	F	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
322	59a	F	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
324	40a	F	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
369	23a	F	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
161	67a	M	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
410	59a	M	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
411	22a	F	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
444	72a	F	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
446	73a	M	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
447	42a	M	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
474	47a	M	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
476	40a	F	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
482	69a	M	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
493	46a	F	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
501	74a	M	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
507	56a	F	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
531	69a	F	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%
587	53a	M	Negativo	<i>C. glabrata</i> 91.5%
643	57a	M	Negativo	<i>C. glabrata</i> 99.3%

Tabla 7. Cepas de levaduras de hemocultivos correspondiente a *C. tropicalis*

Hemocultivo	Edad	Genero	P. Filamentación y Clamidospora	Id. por API 20C AUX
441	3a	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
454	33a	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
459	44a	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
462	44a	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
471	28a	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
478	38a	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
486	53a	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 92.5%
490	28a	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
495	64a	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
497	72a	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
508	81a	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
518	61a	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
521	61a	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 98.7%
529	R/N	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.71%
530	R/N	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 97.8%
532	R/N	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.71%
533	R/N	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.71%
534	R/N	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.71%
535	R/N	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.71%
536	R/N	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.71%
537	R/N	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.71%
538	R/N	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.71%
539	R/N	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.71%
568	4a	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.9%
569	7m	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 92.8%
570	3a	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
588	15a	F	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
590	18a	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
600	66a	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 95.7%
627	R/N	M	Negativo	<i>C. tropicalis</i> 96.3%