



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Medicina

Maestría en Micología Médica

“Respuesta inmune diferencial de queratinocitos humanos, frente a su estimulación con
blastocnidios e hifas de *Candida albicans*”

Maestrando

José Miguel Amaro Suazo

Director

Dra. Cecilia Tapia Paredes

Año

2015

Dedicatoria

A mis padres por darme todo sin pedir nada...

A mis hermanos Juan Paulo, Andrés y Victor por ser un ejemplo...

A María Gracia y Gaspar por ser luz y color en mi vida...

A Valentina por todo tu amor y comprensión...

Agradecimientos

Quisiera comenzar agradeciendo a mis compañeros de trabajo y amigos que fueron parte fundamental de esta tesis: a Cecilia Tapia, Germán Hermosilla, Claudio Alburquenque, Eduardo Álvarez, Marisol Fuentes, Valeria Martínez, Néstor Correa.

A mis Profesores de la Maestría Gustavo Guisiano, Ricardo Negroni, Alicia Arechavala, Gabriela Santiso, Mario Bianchi, Elena Maiolo, Laura Walker, Roxana Depardo y a todos los integrantes del Laboratorio de Micología del Hospital Francisco Muñiz de Argentina.

A mis compañeras de maestría Lilia, Paola, Elia, Herminia, Fabiola y Luz, con quienes compartimos muy gratos momentos en Buenos Aires.

Mención especial al Profesor Dr. Eduardo Piontelli por todo el apoyo y confianza depositada en mí.

Finalmente agradecer al programa de Microbiología y Micología, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y al Instituto Profesional Duoc UC, por permitirme el tiempo y paciencia para viajar y desarrolla este trabajo.

Sin duda ha sido una experiencia de saber, de conocer y de disfrutar con cada uno de ustedes una pasión ... la pasión por la Micología.

Índice

Índice	1
Resumen.....	2
Introducción	4
<i>Candida</i> : factores de riesgo y de virulencia	4
Morfogénesis y cambio estructural de <i>C.albicans</i>	6
Reconocimiento entre Patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs) y Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)	8
Respuesta Inmune frente a <i>C.albicans</i>	9
Discriminación de <i>C.albicans</i> comensal y patógena en células epiteliales.....	12
Justificación	15
Hipótesis	16
Objetivos	17
Materiales y métodos.....	18
Cultivo y producción de hifas y blastoconidios de <i>C.albicans</i>	18
Cultivo celular de queratinocitos	19
Estimulación de cultivo de queratinocitos a distintos tiempos y multiplicidad de infección	19
Estimulación de cultivo de queratinocitos con cepas de <i>C.albicans</i> de diferente origen clínico	21
Análisis estadísticos.....	21
Resultados.....	22
Producción de hifas y blastoconidios de <i>C.albicans</i> para estimulación de cultivo de queratinocitos.....	22
Estandarización de las condiciones de cultivo de queratinocitos.....	22
Estimulación de cultivo de queratinocitos a distintos tiempos y MOIs.....	23
Estimulación de cultivo de queratinocitos con cepas de <i>C.albicans</i> de diferente origen clínico	26
Discusión	33
Conclusiones.....	38
Bibliografía.....	39

Resumen

Actualmente se estudia el rol de las células no profesionales, queratinocitos, en detectar la presencia de blastoconidios e hifas de *Candida albicans* y la capacidad de responder a través de la inmunidad innata. Dicha respuesta puede ser dependiente o independiente de la morfología de la levadura (respuesta bifásica). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta inmune diferencial de cultivos de queratinocitos humanos normales, frente a su estimulación con blastoconidios e hifas de *C.albicans*.

Primeramente se cultivaron dos cepas de *C.albicans*; una cepa aislada de una infección superficial (cepa CVV5) y otra cepa aislada de una infección sistémica (cepa SC5314), ambas fueron cultivadas en medios YPD y Lee para producir blastoconidios e hifas, respectivamente, y luego inactivadas por calor. Los queratinocitos fueron cultivados en monocapa hasta ser confluentes. Un vez listos los cultivos celulares estos fueron estimulados a multiplicidades de infección (MOI) diferentes (relación queratinocito: levadura: 1:0,1; 1:1 y 1:10) con blastoconidios e hifas de la cepa CVV5 en diferentes tiempos (30 min, 2hrs. y 24hrs.) y se les midieron 2 citoquinas representativas a través de la técnica de ELISA (IL-1 β e IL-10). De esta manera se seleccionó cuál fue la MOIs más representativa para continuar con el estudio. Luego de seleccionada la MOI se procedió a estimular en las mismas condiciones nuevamente otro cultivo, pero esta vez con las dos cepas de *C.albicans* descritas y se midió la secreción de 8 citoquinas: IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ y GM-CSF a través de un equipo de fluorimetría Luminex.

Los resultados muestran que los queratinocitos humanos reconocen diferencialmente a los blastoconidios y a las hifas de la cepa CVV5. La MOI en la que se estableció la mínima carga fúngica fue 1:0,1. En esta MOI, se observó un incremento significativo en la producción a los 30 minutos y 24 horas para las citoquinas IL-1 β , TNF- α y GM-CSF, lo

que se correlaciona con la respuesta bifásica descrita por algunos grupos de investigadores (1, 2). Por otra parte, la respuesta de queratinocitos estimulados con hifas de la cepa CVV5 sólo fue tardía (24 horas), con un aumento estadísticamente significativo de IL-1 β , IL-10, TNF- α y GM-CSF. Con respecto a la estimulación de queratinocitos con la cepa SC5314, en este caso se observó una escasa producción de citoquinas en general. Solo en IL-1 β , TNF- α y GM-CSF fue observable un aumento significativo de producción a las 24 horas de estimulación. Por lo tanto, en este modelo de infección los queratinocitos reconocen mejor a la cepa de origen superficial que aquella de origen sistémico.

Introducción

***Candida*: factores de riesgo y de virulencia**

Recientemente se ha estimado el número total de especies de hongos en la Tierra entre 3,5 a 5,1 millones, de las cuales 400 a 600 especies afectan al hombre (3). En este grupo relativamente pequeño se incluye a los hongos que causan infecciones que van desde lesiones leves de piel (por ejemplo, dermatofitos y *Malassezia* spp.), infecciones cutáneas graves (por ejemplo, *Sporothrix schenckii*) e infecciones sistémicas (por ejemplo, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *Candida albicans*) (4).

En este último grupo de hongos mencionados destaca *C.albicans*, que es el hongo oportunista que afecta al humano más estudiado. Se considera una levadura comensal presente en mucosas de la cavidad oral y vaginal, así como en el tracto gastrointestinal de los humanos, entre otros sitios de colonización. En dichos sitios es capaz de adaptarse a las condiciones del ambiente, competir por la adquisición de nutrientes y enfrentar los mecanismos de defensa del hospedero (5).

C.albicans normalmente coexiste con otros comensales sin producir daño en el hospedero, sin embargo, frente a cambios microambientales o alteraciones de la respuesta inmune del hospedero, puede transformarse en patógeno, produciendo infecciones superficiales de la piel y las mucosas o infecciones sistémicas (6). Se ha descrito que *C.albicans*, y en menor grado otras especies de *Candida*, están presentes en la cavidad oral de hasta un 75 % de la población. En individuos sanos, esta colonización se mantiene controlada, sin embargo, en los inmunocomprometidos con frecuencia puede invadir los epitelios y mucosas produciendo infecciones de la cavidad oral o candidiasis

oral (4). El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) se ha asociado como un factor de riesgo importante para el desarrollo de esta infección, así como también el uso de prótesis dentales y edades extremas.

Otra enfermedad importante asociada a *Candida* spp. es la candidiasis vulvovaginal (CVV). Se estima que aproximadamente el 75 % de todas las mujeres han sufrido al menos un episodio de esta enfermedad en su vida. Entre el 40-50% sufren al menos dos episodios, y un pequeño porcentaje de mujeres (5-8%) sufre al menos cuatro episodios por año, lo que se conoce como CVV recurrente. Los factores predisponentes para CVV están bien definidos como: *diabetes mellitus*, uso de antibióticos, anticonceptivos orales, embarazo y terapia hormonal. Además de los cuadros superficiales ya mencionados, *Candida* spp. es causante de candidiasis sistémica, considerada la cuarta causa más común de infecciones sistémicas adquiridas en hospitales de los Estados Unidos con una tasa de mortalidad de hasta el 50 %, incluso en pacientes con terapia antifúngica de primera línea. Sin embargo, es difícil atribuir esta alta mortalidad sólo a la levadura dado que generalmente existen enfermedades subyacentes (6). Los factores de riesgo del hospedero son multifactoriales, no obstante existen algunos más importantes y recurrentes como: neutropenia, tratamientos antibióticos prolongados y/o con drogas de amplio espectro, tratamientos quimioterapéuticos, instalación y permanencia de catéteres, hemodiálisis, nutrición parenteral, cirugía gastrointestinal, insuficiencia renal y largas estadías hospitalarias en unidades de cuidados intensivos (7).

Las causas del desarrollo de las infecciones mencionadas no sólo residen en los factores de riesgos del hospedero, sino también en la variedad de factores de virulencia que posee *C.albicans* y que le permiten causar una infección. Entre los factores de virulencia destacan la adherencia a través de proteínas especializadas llamadas *adhesinas* con capacidad de adherirse a otras levaduras y/o a otros microorganismos presentes en

superficies inanimadas o en células de un hospedero. Dentro de las adhesinas más estudiadas se encuentra “*agglutinin-like sequence*” (ALS) y “*hyphal wall protein 1*” (Hwp1) (4, 8).

Una vez adherida a la célula hospedera *C.albicans* es capaz de secretar enzimas hidrolasas (Proteasas (“*secreted aspartic proteases*” (Saps)), Fosfolipasas y Lipasas) que también son consideradas factores de virulencia y tienen como función facilitar la penetración en la célula epitelial y proveer de nutrientes extracelulares por parte de la levadura.

Finalmente, otro factor de virulencia importante es la morfogénesis, que consiste en el cambio regulado de forma de blastoconidio a pseudohifa e incluso a hifa verdadera. Dichos cambios obedecen a diversos estímulos ambientales como la presencia de determinados nutrientes (N-acetil-D glucosamina, suero, ciertos aminoácidos y biotina); pH (a pH>7 predomina forma de hifa), temperatura optima (37°C estimula transición a hifa), concentración de CO₂ (5,5%) (8, 9) e incluso la concentración del mismo microorganismo (*quorum sensing*) (10). Todos estos cambios no sólo se traducen en variaciones morfológicas sino que también conllevan cambios estructurales más profundos en la pared de *C.albicans*.

Morfogénesis y cambio estructural de *C.albicans*

La pared celular de *C.albicans* es una estructura resistente y flexible compuesta principalmente por quitina, glucanos y mananos, que se encuentran organizados en dos capas. Una capa externa, altamente rica en O- y N- polímeros de manosa (mananos) que están asociados covalentemente con proteínas para formar glicoproteínas y una capa interna, que contiene quitina y β -1,3-glucano, constituyentes del esqueleto de la pared (Figura n°1) (11).

En el estado celular de blastoconidio de *C.albicans* la quitina constituye normalmente el 2% del peso seco de la pared celular y se encuentra concentrada en las cicatrices del brote, en cambio en el estado celular de hifa contiene aproximadamente 3 a 5 veces más quitina. Por otra parte los β -1,3-glucanos y β -1,6-glucanos representan un 40% y 20% respectivamente, siendo similar el contenido en estado de blastoconidio e hifa. Sin embargo, β -1,3-glucano puede ser menos expuesto en la superficie celular de hifa que en blastoconidio, ya que también está asociado a sitios de cicatrices de brotes. Todos estos componentes de la pared celular mencionados pueden considerarse activadores o moduladores de la respuesta inmune, también conocidos como Patrones Moleculares Asociados a Patógeno (PAMP).

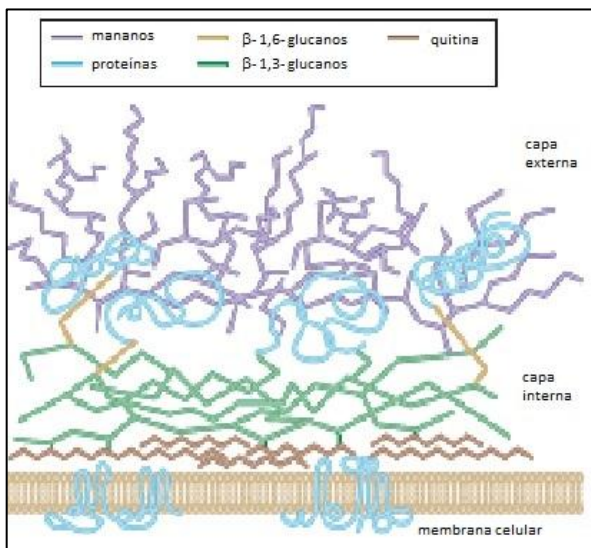


Figura n°1. Estructuras de pared de *C.albicans*. Se distinguen 2 capas de la pared celular. Una capa externa altamente enriquecida con mananos que están asociados covalentemente a proteínas para formar glicoproteínas, mientras que la capa interna contiene quitina y β -1,3-glucano que confieren resistencia a la célula. Las proteínas de la capa externa de la pared están ancladas a la capa interna predominantemente por glicosilfosfatidilinositol (GPI), y otras están vinculadas a la estructura a través de β -1,6-glucano que le otorga una mayor flexibilidad. Modificado de “*Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization” (12).

Por otra parte, la morfogénesis que sufre la célula de *C.albicans* está alta y específicamente reguladas a través de genes y vías de señalización. Los genes involucrados corresponden a la proteína Hwp1, proteína 1 reguladora de hifas (Hyr1), Als3, entre otros (13). Las vías de señalización que colaboran en la regulación de la morfogénesis son *Protein kinase A* (PKA) principalmente a través del complejo AMPc-Proteína Kinasa A, (14) y además existen otros mecanismos alternativos como la cascada

de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), la vía Rim101, entre otros (1, 12, 15, 16).

Por lo tanto, aunque los componentes básicos de la pared celular de *C.albicans* son similares en las formas de blastoconidios e hifas, estos difieren sustancialmente en las proteínas de superficie y las cantidades de PAMPs individuales presentados a las células del sistema inmune, lo que implica que deben ser reconocidos de formas diferentes.

Reconocimiento entre Patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs) y Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)

Durante una infección con *C.albicans* la respuesta inicial del sistema inmune innato está determinada por un reconocimiento de los componentes estructurales dispuestos tanto externa como internamente. En este sentido, componentes internos de la estructura de la pared pueden ser reconocidos por Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) de la inmunidad innata cuando son expuestos en la cicatriz del brote o luego de la acción de fármacos antifúngicos o enzimas del hospedero (17).

Diversas clases de PRRs han sido implicadas en el reconocimiento de PAMPs de *C.albicans*, entre ellos destacan por su importancia los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores lectina tipo C (CLRs) tales como: Receptor de manosa (MR), Dectina 1, Dectina 2, Moléculas de adherencia específicas de células dendríticas (DC-SIGN), Lectina tipo C inducible en macrófago (Mincle) y Lectina unidora de manosa circulante (MBL o MBPC); y por último los receptores tipo dominio de oligomerización de nucleotidos (NOD) de pirina 3 (NLRP3) (12, 18-22) (Tabla n°1).

El reconocimiento de estructuras microbianas es sólo una parte de los mecanismos de defensa del hospedero frente a estos microorganismos, los que colaboran en el desencadenamiento de una respuesta que puede ser innata o adquirida.

Tabla n°1 PRRs asociados a PAMPs de *C.albicans* (23)

PRRs	PAMPs de <i>Candida</i>
Receptores tipo Toll	
TLR 2	fosfolipomanano
TLR 4	manano
TLR 9	DNA fúngico
Receptores de lectina tipo C	
Receptor de manosa	manano residuos N-linked manosil
Dectina 1	β -1,3- glucano
Dectina 2	estructuras ricas en manosa
DC-SIGN	estructuras ricas en manosa
MINCLE	residuos de manosa (24)
Galectina-3	β - 1,2- manósidos
Receptores tipo NOD	
NLRP3	Asociado a la activación de inflammasoma

Respuesta Inmune frente a *C.albicans*

Hasta hace poco tiempo atrás se consideraba a la respuesta inmune innata como una respuesta básica y escasamente sofisticada, mediada a través de las barreras físicas (piel, mucosas, pH, entre otros) y las reacciones inflamatorias (neutrófilos y otros granulocitos). Actualmente se sabe que este sistema no sólo reconoce diversos tipos de microorganismos, sino que es capaz de iniciar y modular una respuesta inmune adquirida mediada por células (linfocitos) T y B que interactúan con células presentadoras de antígeno, tales como las células dendríticas (25). Recientemente algunos autores han propuesto que esta respuesta inmune innata tendría memoria, utilizando el concepto de “inmunidad entrenada”, definido como una respuesta aumentada a una infección secundaria que puede ser ejercida tanto hacia el mismo microorganismo u otro diferente (protección cruzada) (26).

Son diversas las células que participan en la inmunidad innata frente a *C.albicans*, entre ellas destacan células epiteliales, neutrófilos, monocitos-macrófagos y células dendríticas, células NK, entre otros (Figura n°2) (21). Además se ha descrito que células no profesionales de la respuesta inmune como queratinocitos y melanocitos expresan PRRs que reconocen a PAMPs de *C.albicans*. Un ejemplo de ello son las células epiteliales orales y vaginales que pueden inhibir el crecimiento de *C.albicans* de manera contacto-dependiente. A su vez se ha descrito que las células epiteliales secretan β -defensinas capaces de inactivar a *C.albicans* y que además producen citoquinas pro-inflamatorias que no tienen un efecto antifúngico directo, pero sirven como señales para que las células inflamatorias de las mucosas potencien su actividad antifúngica (27).

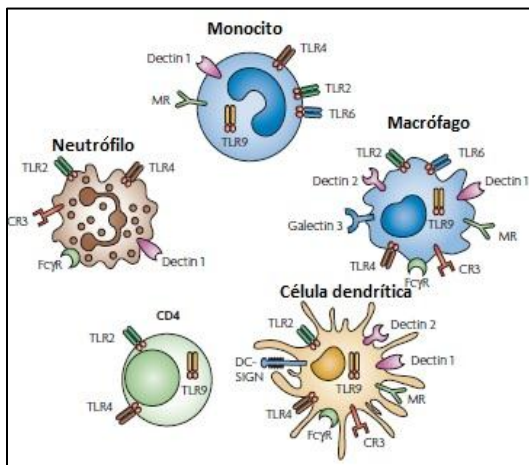


Figura n°2. Células involucradas en la respuesta inmune innata y sus diferentes expresiones de PRRs. Las principales poblaciones involucradas en el reconocimiento de *C. albicans* durante la respuesta inmune innata son los monocitos, neutrófilos y macrófagos. Las células dendríticas son cruciales para la presentación de antígenos a células T, por lo tanto para la inmunidad específica. Modificado de “An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system” (21).

Los PRRs expresados en las distintas células involucradas en la inmunidad innata (Figura n°2) estimulan diferentes vías de traducción de señales, que aparentemente son redundantes y que derivan en la activación de la respuesta inmune a través de la fagocitosis, muerte fúngica e inducción de citoquinas (21).

La inducción de citoquinas cumplen un rol crucial en la activación de la respuesta inmune innata frente a *C.albicans*. Esta producción de citoquinas es activada vía NF κ B y MAPK como se muestra en la Figura n°3 (1, 5, 12, 28).

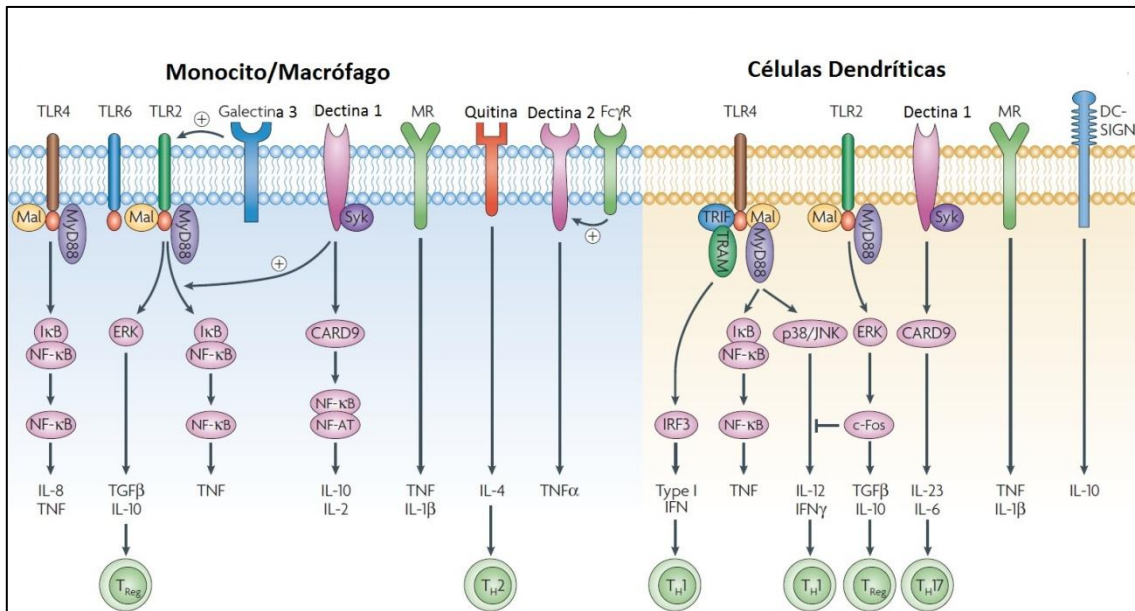


Figura nº3. Cascada de señales activadas por la estimulación de los diversos PRRs en monocitos/macrófago y células dendríticas. Modificado de “An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system” (21).

Las citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α actúan en esta defensa del hospedero activando a los neutrófilos y macrófagos quienes fagocitan la levadura y liberan radicales tóxicos de oxígeno y nitrógeno eliminando al patógeno y evitando la invasión. Existen algunos estudios que demuestran un aumento en la susceptibilidad a las candidiasis en ratones deficientes para estas citoquinas pro-inflamatorias (29, 30). En contraste, las citoquinas anti-inflamatorias, tales como, IL 4 y IL 10 tienen efectos inmunosupresores.

Por lo tanto el balance y el perfil de citoquinas dominantes durante la respuesta inmune innata, ya sean citoquinas pro o anti-inflamatorias, es fundamental para determinar si el sistema inmunitario del hospedero es capaz de eliminar a la forma patógena de *C.albicans* (5). De esta forma las citoquinas pro-inflamatorias estimuladoras de una respuesta de células T helper 1 (Th1) y T helper 17 (Th17) se asocian al desarrollo de una resistencia e inmunidad protectora, mientras que el predominio de citoquinas anti-inflamatorias, inducen una respuesta adaptativa T regulatoria (Treg) o Th2, asociadas con

susceptibilidad a la infección (31, 32). Dichos perfiles de citoquinas quedan demostrados en un estudio realizado en epitelio oral reconstituido infectado con *C.albicans*, en donde la levadura indujo la expresión de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-8 y GM-CSF; quienes desencadenaron una respuesta de tipo Th1, y además una baja expresión de citoquinas tipo Treg como TGF- β (33). Existen también otros estudios que describen el papel fundamental que desempeña IL-17 (Th17) en la defensa o inmunidad de mucosas (34).

La respuesta inmune adaptativa frente a *C.albicans* desempeña un papel muy importante en la protección antifúngica a través de las mismas células mencionadas para la inmunidad innata, células Th1 productoras de IFN- γ y células Th17 productoras de IL-17 e IL-22 (35). Es necesario mencionar que la subpoblación de células Th17 han provisto una nueva e importante visión sobre la patogénesis de las infecciones de las mucosas por *Candida*, ya que han sido descritas como parte fundamental en la defensa del hospedero en modelos de candidiasis orofaríngea y diseminada (36-38).

De esta manera queda expuesto que la activación de la respuesta inmune adaptativa frente a *Candida*, depende en gran medida de la secreción de citoquinas de la respuesta inmune innata, quienes orientan hacia una respuesta específica, ya sea Th1, Th2 o Th17. Ahora surge otra problemática, que aún no está dilucidada del todo, y es como el sistema inmune es capaz de discriminar entre la presencia de una levadura comensal o patógena de este hongo.

Discriminación de *C.albicans* comensal y patógena en células epiteliales

Estudios de caracterización molecular longitudinales indican que las infecciones diseminadas por *C.albicans* son de origen principalmente endógeno y que la transición a la virulencia estaría ligada a alteraciones de la inmunidad del hospedero. Sin embargo, la capacidad de *C.albicans* para vivir en nichos radicalmente diferentes, hace pensar que

además posee mecanismos genéticamente especializados para desarrollarse en estado comensal y/o patógeno (39). Por lo tanto, para el hospedero es fundamental mantener la homeostasis y defensa del epitelio, de tal manera que posea la capacidad de discriminar entre estos estados.

Por su parte las células epiteliales no sólo funcionan como una barrera protectora ante la presencia de *C.albicans*, ya sea se encuentre colonizando o infectando, sino que se ha demostrado que pueden responder estimulando la producción o secreción de citoquinas dependiendo de la exposición de β -glucanos en las superficies de blastoconidios (expuestos en las cicatrices del brote) e hifas (sin exposición de β -glucano) (12).

En el caso de la colonización por un número pequeño de *C.albicans*, esta no provoca un daño epitelial, por lo tanto no hay secreción de citoquinas, a diferencia de una invasión que implica que *C.albicans* atraviesa el epitelio, ya sea mediante endocitosis o penetrando directamente en los tejidos, causando daño en la superficie y una estimulación de la secreción de citoquinas. En ambas situaciones las hifas son más potentes en causar daño epitelial (40).

Una vez generado el daño, la respuesta inmune se inicia con la activación de la vía NF-kB que sería indispensable, pero no suficiente, para estimular la secreción de citoquinas. Luego la respuesta se desencadena a través de la vía bifásica MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), que se inicia con una primera fase independiente del estado morfológico de *C.albicans* (demostrado en experimentos *in vivo* e *in vitro*), pues reconoce sólo la pared celular fúngica. Esto conlleva a la activación de p38 MAPKs y la posterior activación de los factores de transcripción c-JUN y c-FOS. La segunda fase implica la activación de las p38 MAPKs y de *extracellular signal regulated kinase 1 y 2* (ERK1-ERK2 o también llamado MAPK3-MAPK1), que activan el factor de transcripción MAPK *phosphatase 1* (MKP1) y c-FOS, quienes inducen una respuesta de citoquinas por parte de las células

epiteliales (Figura n°4). Es importante destacar que esta segunda fase puede ser inducida sólo por hifas de *C.albicans* y no por blastoconidios. Tal respuesta bifásica se asocia a la capacidad de los tejidos epiteliales de permanecer en reposo en bajas cargas fúngicas, mientras que en altas cargas la respuesta es específica y potente en relación a los daños producidos por las hifas. (41).

La vía MAPK también ha sido descrita como parte de los mecanismos de activación de la respuesta inmune en la infección bacteriana en células epiteliales (42), sin embargo, en el caso de *C.albicans* frente a células epiteliales poco se sabe de su respuesta.

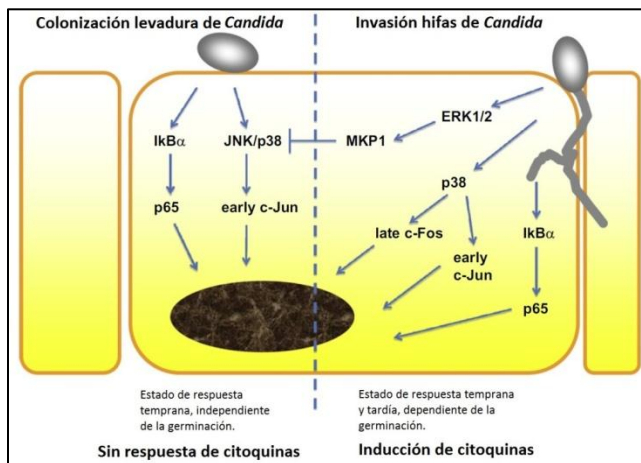


Figura n°4. Respuesta bifásica de la célula epitelial en contacto con *C.albicans*. Se observan las vías diferencialmente activadas en la célula epitelial por *C.albicans* colonizantes e invasoras. Las levaduras inducen la subunidad p65 de NF-κB y c-Jun temprano, pero esta no provoca una respuesta de citoquinas. En contraste, las hifas estimulan p65 y c-Jun temprano además de estimular la fosfatasa MKP-1, MAPK y c-Fos tardío, resultando en la potente liberación de citoquinas. Modificado de "Epithelial sensing of fungal invasión" (43).

Aunque se ha avanzado mucho en la comprensión del reconocimiento de PAMPs de *C.albicans*, poco se sabe sobre el reconocimiento de los estados morfológicos de blastoconidio e hifa. Por lo tanto, teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto y considerando el caso de *C.albicans* en que ambas formas celulares son reconocidas por la célula epitelial, dependiendo además de la carga fúngica y tiempo de exposición; en este trabajo se propuso estudiar la respuesta de citoquinas de queratinocitos estimulados con ambas formas de *C.albicans* de distinto origen clínico y tratar de establecer la mínima carga fúngica y/o tiempo necesarios para observar diferencias.

Justificación

C.albicans es una levadura oportunista que puede presentarse como blastoconidio en su estado comensal, o como hifa en su estado patógeno. Ambas formas son reconocidas por la célula epitelial, dependiendo de la carga fúngica y tiempo de exposición. Este trabajo busca estudiar la respuesta de citoquinas producidas por queratinocitos estimulados con ambas formas de *C.albicans* y además con cepas de diferente origen clínico, pretendiendo establecer la mínima carga fúngica y/o tiempo necesarios para observar diferencias. Con estos resultados se espera conocer más sobre el rol comensal de *C.albicans*, dado que su rol patógeno ha sido ampliamente estudiado.

Hipótesis

Las células epiteliales reconocen la forma de blastoconidio e hifa de *C.albicans* y responden diferencialmente a través de la producción de citoquinas. La forma comensal de blastoconidio induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias por los queratinocitos, mientras que la forma patógena de hifa estimula una mayor producción de citoquinas anti-inflamatorias respecto de las pro-inflamatorias como un mecanismo de evasión inmune.

Objetivos

Objetivo General

- Determinar la respuesta inmune diferencial de cultivos de queratinocitos humanos normales, frente a su estimulación con blastoconidios e hifas de *Candida albicans*.

Objetivos Específicos

- Medir la secreción de citoquinas en cultivos de queratinocitos humanos normales estimulados con blastoconidios e hifas de *C.albicans* a diferentes cargas fúngicas y tiempos.
- Comparar la secreción de citoquinas en cultivos de queratinocitos humanos normales estimulados con blastoconidios e hifas de *C.albicans* de distinto origen clínico y en diferentes tiempos.

Materiales y métodos

Cultivo y producción de hifas y blastoconidios de *C.albicans*

Se utilizaron dos cepas de *C.albicans*, la primera fue una cepa de origen clínico aislada de una CVV recurrente perteneciente al cepario de la Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas, Programa de Microbiología y Micología de la Universidad de Chile, código interno CVV5 (44). La segunda correspondió a una cepa de *C.albicans* comprada a un cepario internacional correspondiente al código ATCC SC5314, que demostró virulencia en un modelo de infección sistémica en ratón (45).

Los cultivos de las levaduras se realizaron de cepas crioconservadas, las cuales se descongelaron y sembraron de manera sucesiva (2 traspasos) en placas de agar Sabouraud para recuperar la viabilidad del microorganismo, se incubaron a 37°C por 24 hrs. De los cultivos en placas obtenidos se prepararon inóculos a concentración 1 Mac Farland de cada cepa y se traspasó 1 ml. de este inóculo a 49 ml. de los medios de cultivo líquidos Lee e YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) (44, 46), los que fueron incubados 3 horas a 37°C en agitación constante a 150 rpm. Una vez que finalizó la incubación se procedió a centrifugar el cultivo 20 min. a 3420 g, luego se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento dos veces con DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), centrifugando cada vez a 1520 g por 10 min. Posteriormente se resuspendió el sedimento en 1 ml. de DPBS y se depositó en tubos *ependorff* para incubarlos en bloque calentador por 60 min. a 95°C con el fin de producir la muerte celular. Finalmente se realizó un recuento de las levaduras en 2 categorías morfológicas (hifas y blastoconidios) en una cámara de Neubauer y se ajustó a distintas concentraciones o cargas fúngicas de prueba. Se consideró como "hifas" a la generación de tubos germinativos e hifas cortas que fuesen fácilmente contables en la cámara de Neubauer. En contraste, para los "blastoconidios" se

consideró a los brotes de la levadura que se observaron desprendidos y de forma independiente de la levadura madre.

Cultivo celular de queratinocitos

Las células utilizadas fueron queratinocitos normales de origen comercial (*Human Epidermal Keratinocytes, adult* (HEKa) (GIBCO)), cultivados en medio de cultivo comercial Epilife® (GIBCO) suplementado con factor de crecimiento (*Human keratinocyte Growth Supplement* (HKGS), GIBCO)), penicilina, estreptomycin y anfotericina B. Las células se incubaron a condiciones estándar de 37°C y 5% de CO₂, en frascos de cultivo T-75 de 7500 mm², además fueron observadas diariamente hasta que se obtuvo un crecimiento confluyente y en monocapa de queratinocitos. Posterior a este crecimiento óptimo, cada frasco fue tratado con 2 ml. de tripsina 1% e incubado por 10 min. en condiciones estándares, con el fin de desprender las células de la superficie del frasco. Una vez desprendidas las células, éstas fueron lavadas con 10 ml. de medio Epilife y centrifugadas a 350 g por 10 min. Luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 12 ml. de Epilife y se distribuyó en una placa de cultivo celular de 6 pocillos, 2 ml. por pocillo con una concentración aproximada de 4-5x10⁵ células/ml. Finalmente estas placas fueron incubadas en condiciones estándares recomendadas por el fabricante con observación diaria hasta que se obtuvo un crecimiento confluyente y en monocapa de queratinocitos (pasaje celular n°2). Se consideró como confluyente el observar el cultivo celular al microscopio invertido con un desarrollo de celular que cubriera un porcentaje mayor al 75% de la superficie del pocillo.

Estimulación de cultivo de queratinocitos a distintos tiempos y multiplicidad de infección

Una vez que se obtuvo el crecimiento confluyente de los queratinocitos, estos fueron estimulados con un inóculo de la cepa *C.albicans* CVV5 a distintas concentraciones y tiempos. Para ello en primer lugar uno de los pocillos de cada placa fue tratado con tripsina 1% para realizar un recuento en cámara de Neubauer y así se estableció la cantidad de queratinocitos de la placa. Una vez realizado este recuento celular, se procedió en base a este dato a ajustar la carga fúngica, conocido como multiplicidad de infección (MOI) (relación queratinocito: levadura). Las MOIs elegidas para ensayos preliminares fueron 1:0,1; 1:1 y 1:10. Por lo tanto, se procedió con cada pocillo a eliminar el medio de cultivo y reemplazarlo por 2 ml. de la suspensión de blastoconidios o hifas en medio de cultivo celular en las MOIs establecidas. Los cultivos se incubaron a condiciones estándar por 30 min., 2 hrs. y 24 hrs. Dichos ensayos fueron realizados en triplicado y se contempló un control sin inóculo por cada condición testada. Luego de completados los tiempos se recolectó el sobrenadante y fueron congelados a -80°C, para una posterior medición de un set representativo de citoquinas.

En este primer ensayo y a modo de *screening* se midió la producción (concentración) de 2 citoquinas representativas (IL-1 β e IL-10) en los sobrenadantes de los pocillos. Para cuantificar las citoquinas se utilizaron kits comerciales de ELISA *sandwich* (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) según las recomendaciones del fabricante: IL-1 β Human ELISA KIT Invitrogen® e IL-10 Human Ultrasensitive ELISA Kit Invitrogen®. Las lecturas de los kits se realizaron en el lector de microplacas marca Labtec®.

La MOI más representativa se definió teniendo en cuenta la que fue de menor concentración, y logro mayor cantidad de diferencias estadísticamente significativas en la producción de citoquinas en los distintos tiempos ensayados.

Estimulación de cultivo de queratinocitos con cepas de *C.albicans* de diferente origen clínico

En una segunda etapa, y una vez establecido cual fue la MOI más representativa, se cultivó y estimuló un nuevo cultivo de queratinocitos en las mismas condiciones señaladas anteriormente. La diferencia es que en este ensayo las estimulaciones se realizaron en paralelo con las cepas *C.albicans* CVV5 y *C.albicans* SC5314, en los mismos tiempos (30 min, 2 hrs. y 24 hrs.), pero sólo con la MOI más representativa que se eligió según los resultados del ensayo anterior. El resto del procedimiento fue el mismo que en el ensayo anterior hasta obtener sobrenadantes. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado experimental.

Una vez que se obtuvo los sobrenadantes se realizó la medición de un set de 8 citoquinas: IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ y GM-CSF; las que se cuantificaron con el kits comercial Milliplex® y según las recomendaciones del fabricante (Millipore). La lectura se realizó en el equipo fluorimétrico Luminex 200®.

Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado mediante *t student* y test de ANOVA para datos grupales en el software *Graph Pad Prism 5*® con una significancia de valor $p < 0,05$.

Resultados

Producción de hifas y blastoconidios de *C.albicans* para estimulación de cultivo de queratinocitos.

Para la producción de hifas y blastoconidios se tomó como referencia la metodología utilizada por otros investigadores del laboratorio de biología molecular de hongos, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (44). En base a lo anterior se ensayó con la cepa CVV5 y la cepa SC5314. Cabe destacar que está descrito que el medio Lee utilizado es un medio bajo en nutrientes que facilita la generación de hifas de *C.albicans*, por el contrario el medio YPD utilizado es un medio enriquecido que promueve la generación de blastoconidios (44). Se consideró como “hifas” a la generación de tubos germinativos e hifas cortas que fuesen fácilmente contables en la cámara de Neubauer. En contraste, los “blastoconidios” se consideraron a los brotes de la levadura que se observaban desprendidos y de forma independiente de la levadura madre. De esta manera, los porcentajes obtenidos tras el protocolo adoptado se muestra en la tabla n°2, en la cual podemos observar el alto porcentaje de hifas alcanzado por ambas cepas en medio Lee y por otra parte un alto porcentaje de blastoconidios en medio YPD.

Tabla n°2 Producción de hifas y blastoconidios de *C.albicans* según cepa y medio de cultivo*.

Cepas	Hifas	Blastoconidios
	Medio Lee	Medio YPD
SC5314	81%	93%
CVV5	87%	94%

*(Incubación por 3 hrs. a 37°C y agitación a 150 rpm.)

Estandarización de las condiciones de cultivo de queratinocitos

Se estandarizó el cultivo y los recuentos celulares para la estimulación con blastoconidios e hifas de *C.albicans* (Figura n°5). En el caso del cultivo de queratinocitos, el tiempo de crecimiento en el cual se observó una óptima confluencia celular varió entre 7 y 10 días en las condiciones estandarizadas ya señaladas. En dicho tiempo el número de células

por pocillos alcanzó las 60.000 ± 10.000 células, cantidad coincidente con la declarada por el proveedor de células que menciona una viabilidad del 70%. Por lo tanto en base a esta cantidad de células se realizaron los cálculos para las MOIs 1:0,1; 1:1 y 1:10.

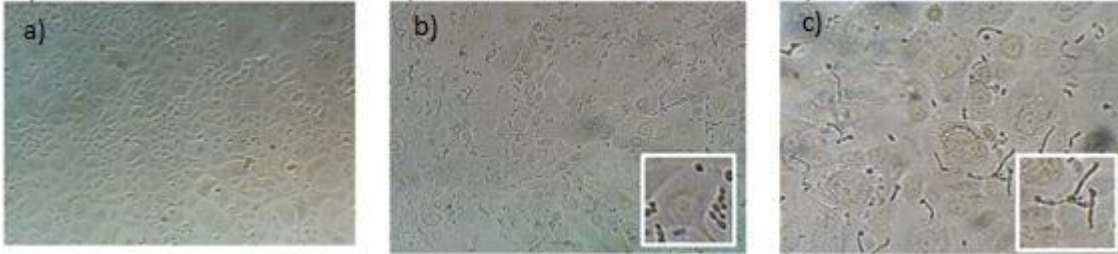


Figura n°5. Estimulación de queratinocitos con *C.albicans* CVV5 a) queratinocitos no estimulados (controles), b) queratinocitos estimulados con blastoconidios, c) queratinocitos estimulados con hifas. En los recuadros amplificados se observa la morfología de *C.albicans*. Aumento de 10X y 40X, respectivamente.

Estimulación de cultivo de queratinocitos a distintos tiempos y MOIs

Se evaluó la respuesta general a una citoquina pro-inflamatoria y anti-inflamatoria, a través de un *screening* con blastoconidios e hifas de la cepa *C.albicans* CVV5 estimulando los queratinocitos a las MOIs 1:0,1; 1:1 y 1:10; en los 3 tiempos mencionados (30 min, 2 hrs. y 24 hrs.). Luego se midió a través de la técnica de ELISA la producción o secreción de las 2 citoquinas que fueron consideradas representativas y de las cuales fue posible obtener información preliminar para continuar con la experimentación. En base a lo anterior se eligió a IL-1 β como pro-inflamatoria e IL-10 como anti-inflamatoria. Cabe recordar que los resultados se consideraron estadísticamente significativos con un $p < 0,05$ o inferior.

Como se observa en la Figura n°6 (a, b y c), al estimular los queratinocitos tanto con blastoconidios como con hifas se evidenció diferencias estadísticamente significativas en la producción de IL-1 β en comparación con queratinocitos no estimuladas (controles). Por tanto, en primera instancia existiría una estimulación de un proceso pro-inflamatorio con cada una de las MOIs ensayadas según parámetros estadísticos.

Al analizar las MOIs de manera independiente, se observó que en la MOI 1:0,1 los blastoconidios estimularon una producción significativa de IL-1 β a los 30 min. y 24 hrs., mientras que las hifas estimularon un aumento significativo a las 24 hrs. Cuando la MOI es 1:1 la producción de IL-1 β es más baja que con la MOI 1:0,1. Sin embargo las hifas indujeron un aumento significativo a los 30 min. y 24 hrs., mientras que los blastoconidios indujeron un aumento significativo sólo a las 24 hrs. Para la MOI 1:10 el aumento significativo de la producción de IL-1 β estuvo dado por la estimulación de hifas a las 2 y 24 hrs.

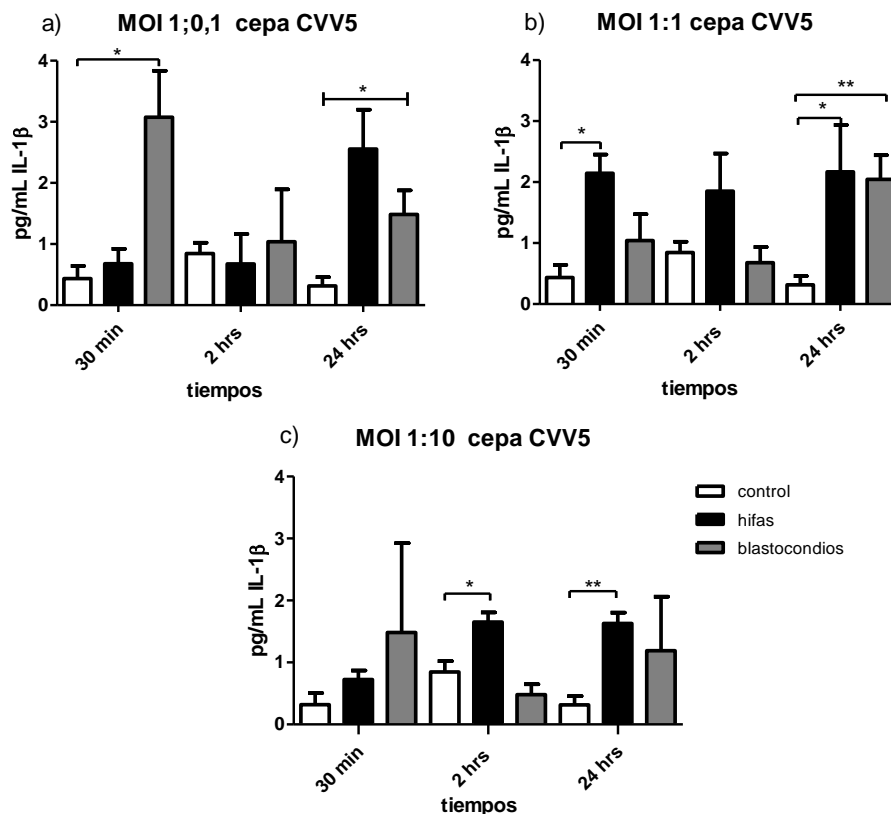


Figura n°6: Producción de IL-1 β por queratinocitos estimulados con blastoconidios o hifas de *C.albicans* (CVV5). Los queratinocitos fueron incubados por 30 min., 2 hrs. o 24 hrs. en medio sólo (controles) o con distintos inóculos de blastoconidios o hifas muertas por calor, estableciendo las relaciones queratinocito/hongo (MOIs) de: a) 1:0,1 b) 1:1 y c) 1:10. Las significancias estadísticas (* p < 0,05. ** p < 0,01) fueron calculadas de hifas o blastoconidios v/s el control respectivo de cada tiempo.

Con respecto a IL-10 (Figura n°7 a, b y c), esta mostró una situación similar a la anterior citoquina, ya que de la estimulación de los queratinocitos tanto con blastoconidios como con hifas fue posible obtener diferencias estadísticamente significativas en la producción de esta citoquina en comparación con los queratinocitos no estimuladas (controles). Por lo

tanto, primariamente existiría una estimulación de un proceso anti-inflamatorio con cada una de las MOIs que se ensayaron según parámetros estadísticos.

En cuanto a la MOI 1:0,1 esta indujo un aumento significativo de la producción de IL-10 a los 30 min. con blastoconidios y a las 24 hrs. con hifas. La MOI 1:1 no fue capaz de generar un aumento estadísticamente significativo en ninguno de los tiempos ensayados, aun cuando si fue posible observar una aumento en la producción de esta citoquina en los tiempos 30 min. y 2 hrs. al estimular con hifas. Para la MOI 1:10 el aumento tras la estimulación con hifas fue progresivo y sólo fue estadísticamente significativo a las 24 hrs. de estimulación.

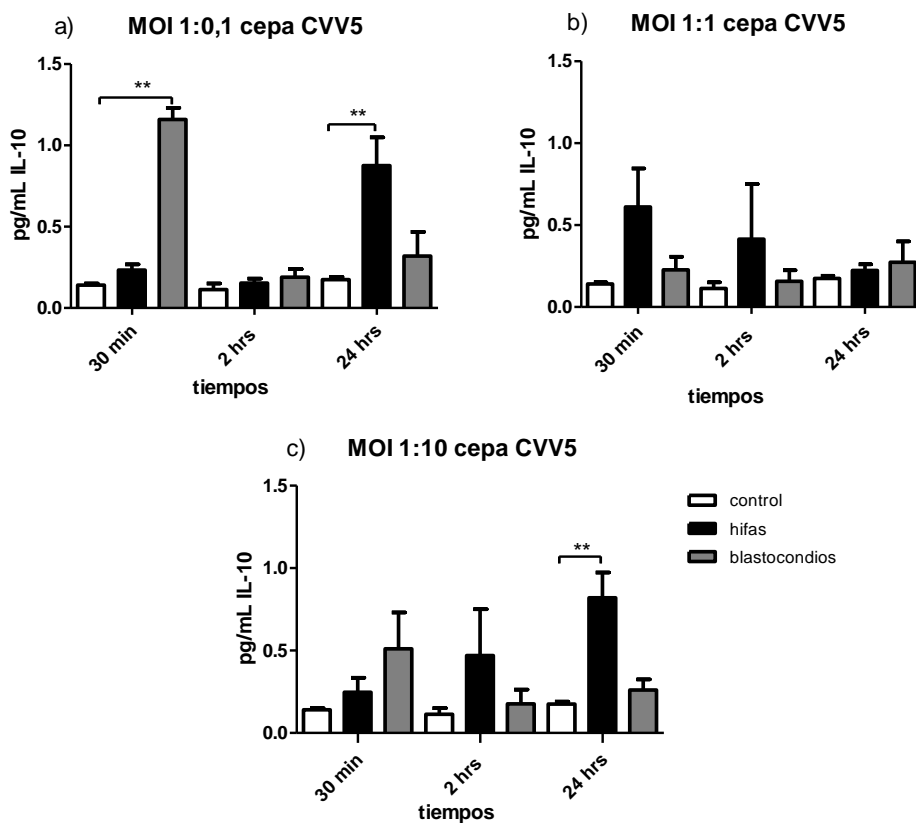


Figura n°7. Producción de IL-10 por queratinocitos estimulados con blastoconidios o hifas de *C.albicans* (CVV5). Los queratinocitos fueron incubados por 30 min., 2 hrs. o 24 hrs. en medio sólo (controles) o con distintos inóculos de blastoconidios o hifas muertas por calor, estableciendo las relaciones queratinocito/hongo (MOIs) de: a) 1:0,1 b) 1:1 y c) 1:10. Las significancias estadísticas (** p < 0,01) fueron calculadas de hifas o blastoconidios v/s el control respectivo de cada tiempo.

En vista a los criterios previamente establecidos y teniendo en cuenta que en las 3 MOIs ensayadas hubo algún grado de producción significativa de las citoquinas, se decidió continuar con la MOI 1:0,1; pues correspondió a la de menor concentración ensayada y en la cual se obtuvieron aumentos estadísticamente significativos en la producción de ambas citoquinas por parte de los queratinocitos.

Estimulación de cultivo de queratinocitos con cepas de *C.albicans* de diferente origen clínico

En base a los experimentos anteriores se eligió la MOI 1:0,1 para realizar la medición del resto de las citoquinas. Para ello se estimularon queratinocitos en las condiciones estandarizadas ya mencionadas y tiempos establecidos, con 2 cepas de distinto origen clínicos, CVV5 aislada de una candidiasis vulvovaginal y SC5314 de origen sistémico. En ambos ensayos se midieron las concentraciones de un set de 8 citoquinas (IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ y GM-CSF) las cuales fueron cuantificadas a través de la técnica de fluorimetría Luminex.

Tal como se observó en el experimento anterior, al estimular queratinocitos con la cepa CVV5 existió una mayor y significativa producción de IL-1 β a los 30 min. con blastoconidios, lo que se tradujo en 7,1 veces de aumento por sobre el valor del control. A las 2 hrs. la producción no fue significativa en los 3 tiempos independientes de la morfología de la levadura. A las 24 hrs. se observó una importante y significativa producción de IL-1 β , alcanzando para hifas y blastoconidios un aumento de 8,1 y 4,7 veces por sobre el control, respectivamente (Figura n°8a). En el caso de la estimulación con la cepa SC5314 (Figura n°8b) se observó un aumento significativo en la producción de esta citoquina sólo a las 24 hrs. con blastoconidios (aumento de 1,6 veces por sobre el valor del control), el resto de los tiempos estudiados no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

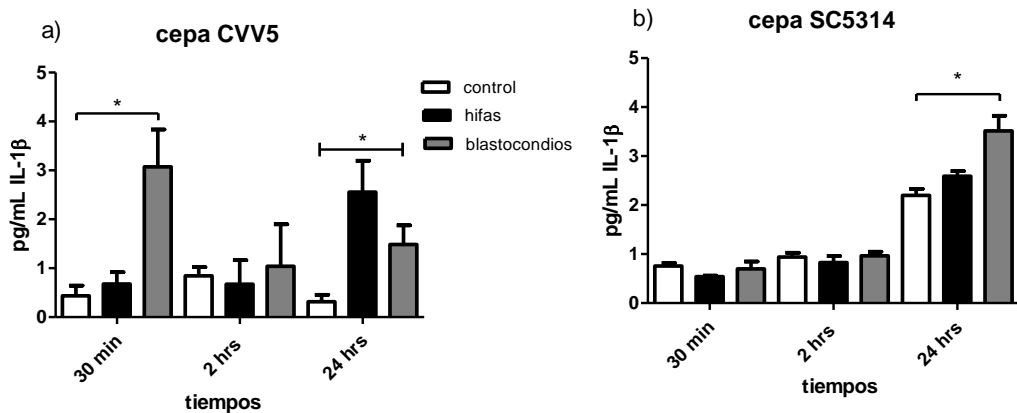


Figura n°8. Producción de IL-1 β por queratinocitos estimulados con blastoconidios o hifas de *C.albicans* a) cepa CVV5 y b) SC5314. Los queratinocitos fueron incubados por 30 min., 2 hrs. o 24 hrs. en medio sólo (controles) o con la MOI 1:0,1. Las significancias estadísticas (*p < 0,05) fueron calculadas de hifas o blastoconidios v/s el control respectivo de cada tiempo.

La Figura n°9a, muestra que hubo un aumento significativo de la producción de IL-4 a las 24 hrs. de estimulación con blastoconidios de la cepa CVV5 (aumento de 9,9 veces por sobre el valor del control), mientras que no hubo cambios al estimular con la cepa SC5314 (Figura n°9b).

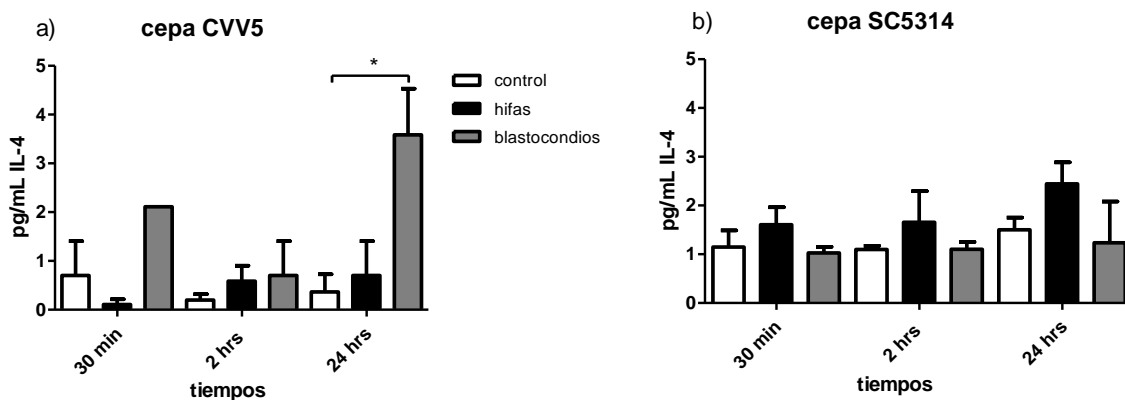


Figura n°9. Producción de IL-4 por queratinocitos estimulados con blastoconidios o hifas de *C.albicans* a) cepa CVV5 y b) SC5314. Los queratinocitos fueron incubados por 30 min., 2 hrs. o 24 hrs. en medio sólo (controles) o con la MOI 1:0,1. Las significancias estadísticas (*p < 0,05) fueron calculadas de hifas o blastoconidios v/s el control respectivo de cada tiempo.

Las Figuras n°10a y 10b, muestran como aumentó progresivamente la producción de IL-8 en el tiempo, sin embargo sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en blastoconidios a los 30 min. con la cepa CVV5 (aumento de 2,4 veces por sobre el valor del control).

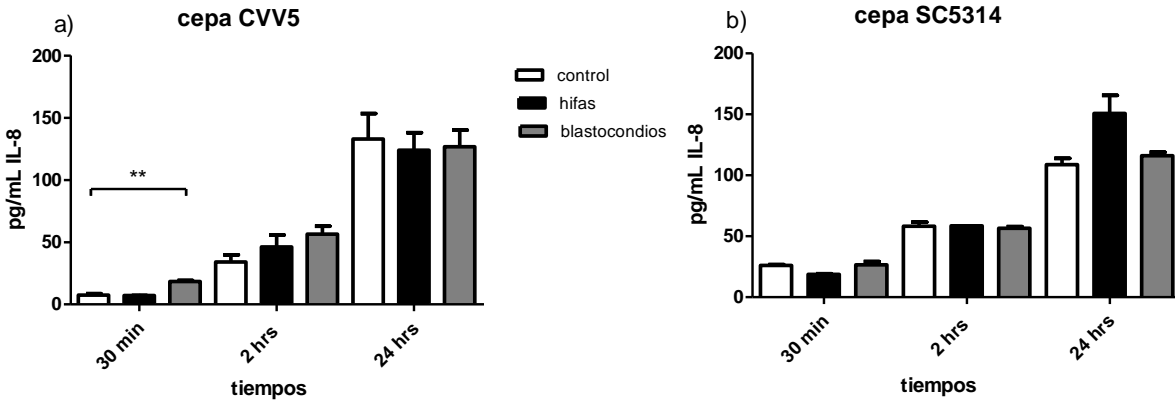


Figura n°10. Producción de IL-8 por queratinocitos estimulados con blastoconidios o hifas de *C.albicans* a) cepa CVV5 y b) SC5314. Los queratinocitos fueron incubados por 30 min., 2 hrs. o 24 hrs. en medio sólo (controles) o con la MOI 1:0,1. Las significancias estadísticas (**p < 0,01) fueron calculadas de hifas o blastoconidios v/s el control respectivo de cada tiempo.

Como se mencionó previamente, en el caso de la producción de IL-10 el aumento fue estadísticamente significativo cuando se estimuló con blastoconidios de la cepa CVV5 por 30 min. (aumento de 8,3 veces sobre el valor del control) y con hifas por 24 hrs. (aumento de 5 veces sobre el valor del control) (Figura n°11a). Cuando se estimularon queratinocitos con hifas y blastoconidios de la cepa SC5314 no se observaron aumentos significativos de esta citoquina en ninguno de los tiempos estudiados (Figura n°11b).

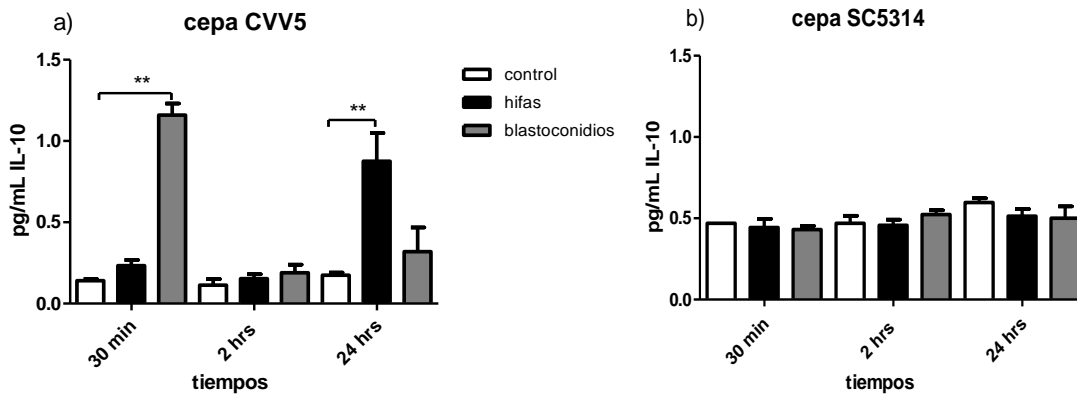


Figura n°11. Producción de IL-10 por queratinocitos estimulados con blastoconidios o hifas de *C.albicans* a) cepa CVV5 y b) SC5314. Los queratinocitos fueron incubados por 30 min., 2 hrs. o 24 hrs. en medio sólo (controles) o con la MOI 1:0,1. Las significancias estadísticas (**p < 0,01) fueron calculadas de hifas o blastoconidios v/s el control respectivo de cada tiempo.

La Figura n°12a, muestra que la producción de IL-17A presentó un aumento estadísticamente significativo a las 24 hrs. de estimulación con blastoconidios de la cepa

CVV5, lo que equivale a un aumento de 4,5 veces sobre el valor del control. En cambio con la cepa SC5314 no existió ningún aumento en la producción de esta citoquina independiente de la morfología o tiempos estudiados (Figura n°12b).

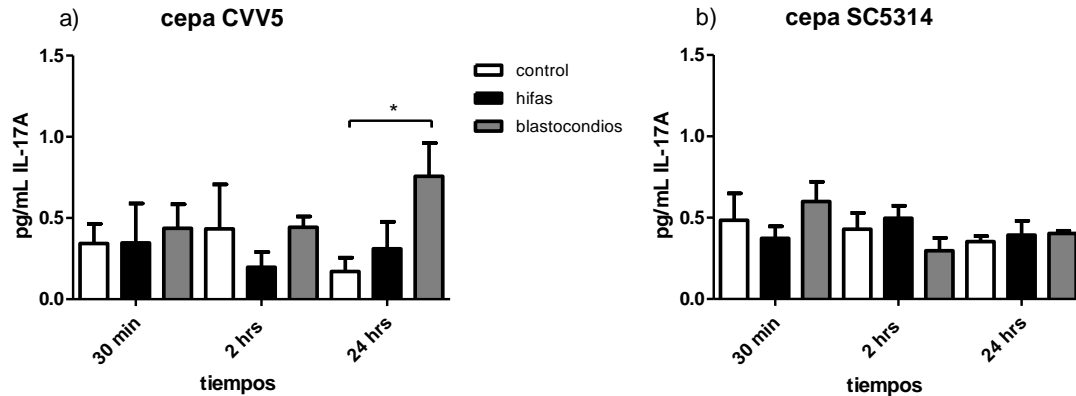


Figura n°12. Producción de IL-17A por queratinocitos estimulados con blastocondios o hifas de *C.albicans* a) cepa CVV5 y b) SC5314. Los queratinocitos fueron incubados por 30 min., 2 hrs. o 24 hrs. en medio sólo (controles) o con la MOI 1:0,1. Las significancias estadísticas (*p < 0,05) fueron calculadas de hifas o blastocondios v/s el control respectivo de cada tiempo.

La Figura n°13 muestra que no hubo cambios en la producción de IFN- γ al estimular con ambas cepas a diferentes tiempos.

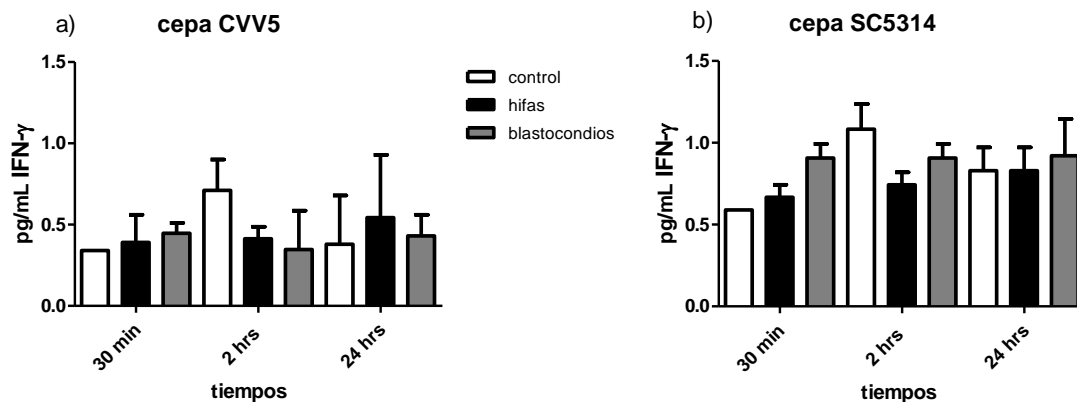


Figura n°13. Producción de IFN- γ por queratinocitos estimulados con blastocondios o hifas de *C.albicans* a) cepa CVV5 y b) SC5314. Los queratinocitos fueron incubados por 30 min., 2 hrs. o 24 hrs. en medio sólo (controles) o con la MOI 1:0,1. No hubo significancias estadísticas (*p < 0,05) para hifas o blastocondios v/s el control respectivo de cada tiempo.

La Figura n°14, muestra que hubo un aumento de la producción de TNF- α al estimular queratinocitos con blastocondios de la cepa CVV5 a los 30 min. y 24 hrs. (aumento de 2,8 y 9,1 veces sobre el valor del control, respectivamente) y con hifas a las 24 hrs se

observó un aumento importante y estadísticamente significativo equivalente a 10,3 veces el valor del control. En el caso de la cepa SC5314 sólo se observó un aumento estadísticamente significativo en la producción de esta citoquina al estimular con hifas durante 24 hrs.

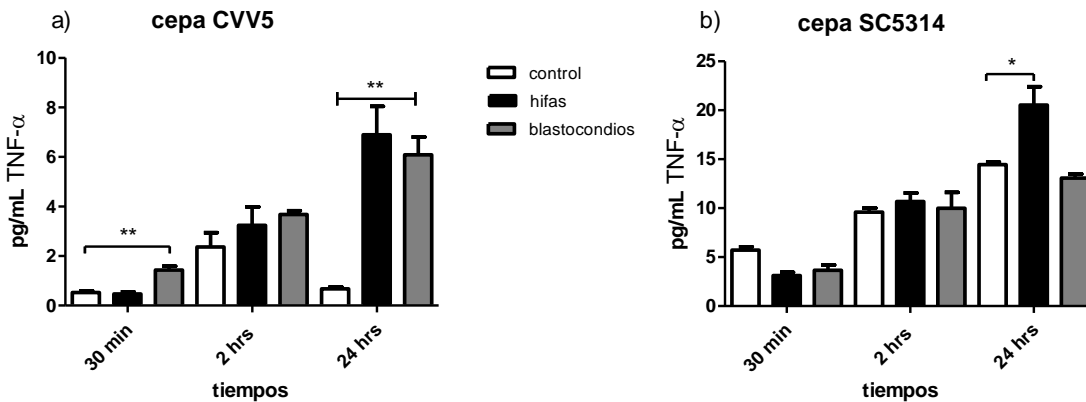


Figura n°14. Producción de TNF- α por queratinocitos estimulados con blastocondios o hifas de *C.albicans* a) cepa CVV5 y b) SC5314. Los queratinocitos fueron incubados por 30 min., 2 hrs. o 24 hrs. en medio sólo (controles) o con la MOI 1:0,1. Las significancias estadísticas (*p < 0,05; **p < 0,01) fueron calculadas de hifas o blastocondios v/s el control respectivo de cada tiempo. Los gráficos se muestran en diferentes escalas por presentar valores de distinta magnitud.

Como se observa en la Figura n°15, hubo un aumento en la producción de GM-CSF en queratinocitos estimulados con blastocondios a los 30 min. y blastocondios e hifas a las 24 hrs. con la cepa CVV5. Dichas significancias equivalen a un aumento de 2,5; 3,2 y 4,1 veces sobre el valor del control, respectivamente. En cuanto a la cepa SC5314, en esta sólo las hifas indujeron un aumento de la producción de esta citoquina a las 24 hrs de estimulación (aumento de 1,8 veces sobre el valor del control).

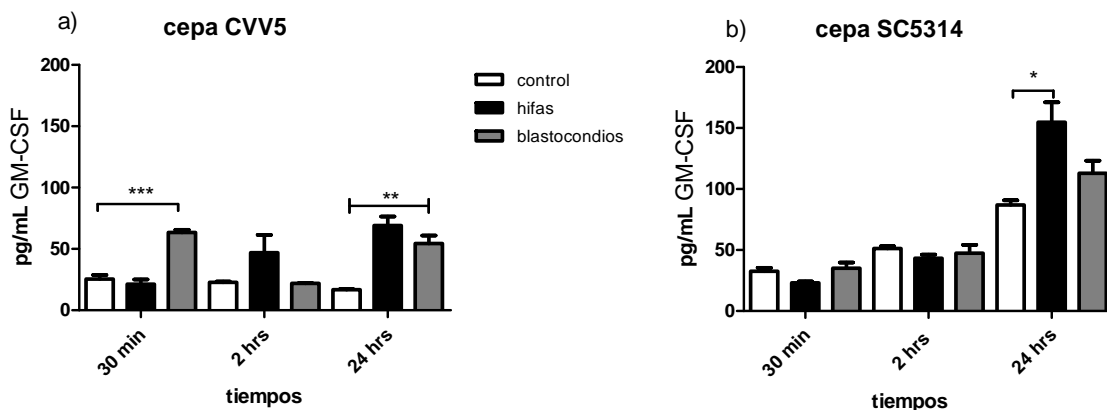


Figura n°15. Producción de GM-CSF por queratinocitos estimulados con blastoconidios o hifas de *C.albicans* a) cepa CVV5 y b) SC5314. Los queratinocitos fueron incubados por 30 min., 2 hrs. o 24 hrs. en medio sólo (controles) o con la MOI 1:0,1. Las significancias estadísticas (*p < 0,05; **p < 0,01, p<0,001) fueron calculadas de hifas o blastoconidios v/s el control respectivo de cada tiempo. Los gráficos se muestran en diferentes escalas por presentar valores de distinta magnitud.

A continuación se resumió en tablas comparativas la producción de citoquinas de los queratinocitos tras ser estimulados con ambas cepas (Tabla n°3 y 4).

Tabla n°3. Resumen de los niveles de citoquinas producidas por queratinocitos tras ser estimulados con la cepa CVV5.

Cepa CVV5	Blastoconidios			Hifas		
	30 min.	2 hrs.	24 hrs.	30 min.	2 hrs.	24 hrs.
IL-1β	↑*	-	↑*	-	-	↑*
IL-4	-	-	↑*	-	-	-
IL-8	↑**	-	-	-	-	-
IL-10	↑**	-	-	-	-	↑**
IL-17A	-	-	↑*	-	-	-
TNF-α	↑**	-	↑**	-	-	↑**
INF-γ	-	-	-	-	-	-
GM-CSF	↑***	-	↑**	-	-	↑**

* p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Tabla nº4. Resumen de los niveles de citoquinas producidas por queratinocitos tras ser estimulados con la cepa SC5314.

Cepa SC5314	Blastoconidios			Hifas		
	30 min.	2 hrs.	24 hrs.	30 min.	2 hrs.	24 hrs.
IL-1 β	-	-	↑*	-	-	-
IL-4	-	-	-	-	-	-
IL-8	-	-	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	-	-	-
IL-17A	-	-	-	-	-	-
TNF- α	-	-	-	-	-	↑*
INF- γ	-	-	-	-	-	-
GM-CSF	-	-	-	-	-	↑*

* p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Discusión

Tras la realización de este trabajo ha sido posible demostrar que queratinocitos humanos cutáneos normales, en un *screening* primario, son capaces de reconocer y responder diferencialmente frente a la estimulación de *C.albicans*, a través de la producción de IL-1 β e IL-10. Este resultado se contrasta con una amplia cantidad de investigaciones en las cuales se ha utilizado un modelo de infección en tejido o cultivos celulares en monocapa infectados con levaduras (2, 47-49). Además, aun cuando se observó un significativo aumento de la producción de citoquinas, este puede estar subvalorado debido a las limitaciones del cultivo celular en monocapa, ya que carece de un número significativo de contactos celulares y células diferenciadas (50). En este trabajo la estimulación se realizó en queratinocitos humanos cutáneos normales, un tipo celular que no ha sido estudiado previamente en cuanto a su respuesta inmune frente a blastoconidios e hifas de *C.albicans* y que además posee un rol importante pues son estas células las que interactúan con patógenos fúngicos superficiales en el medio ambiente y juegan un rol crítico en la inflamación y respuesta inmune a través de la secreción de citoquinas (17, 47, 49).

Como se comentó anteriormente, la estimulación de queratinocitos se realizó con levaduras de *C.albicans* previamente inactivadas por calor, lo que permitió estandarizar las condiciones de estimulación sin afectar el reconocimiento por parte de los queratinocitos y observándose un aumento significativo en la producción de citoquinas. Dichos resultados son similares a otras investigaciones que demuestran que blastoconidios inactivados por calor son reconocidos por las células epiteliales activando una cascada de transmisión de señales para la secreción de citoquinas (1, 27, 51).

Estudios previos han demostrado que la carga fúngica está relacionada directamente con la respuesta de las células epiteliales. En estado comensal *C.albicans* se encuentra en muy baja carga y a pesar de ser reconocida no desencadena una respuesta de citoquinas o simplemente su respuesta es escasa. Sin embargo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias estaría regulada por el inóculo de *C.albicans*, que en este estudio resultó ser el inóculo o la MOI (1:0,1) de menor concentración testada a la que mostró un aumento estadísticamente significativo en la producción de citoquinas (43, 52, 53). Si bien es cierto pudiese existir MOIs menores en las que se observen cambios significativos, estas no fueron estudiadas en este trabajo.

Con respecto a los tiempos ensayados se observó que existe en general una producción significativa de citoquinas a los 30 minutos y 24 horas. Por su parte en el tiempo de 2 horas a diferencia de otros estudios, en nuestro caso no se observaron aumentos estadísticamente significativos en la producción de citoquinas, aun cuando se sabe que generalmente el reconocimiento de las levaduras por parte de las células estimuladas comienza a los 30 minutos persistiendo hasta las 24 horas (1, 2, 43). Está descrito que PAMPs de *C.albicans* activan mecanismos defensivos y puede gatillar una respuesta inflamatoria protectora frente a la invasión de *C.albicans* en el tejido (21), sin embargo, a bajas dosis y a pesar de activar una respuesta inflamatoria inicial, ésta se apaga antes de las 2 horas de estimulación (54). Esto último permitiría explicar por qué a las 2 horas de estimulación no se observó una producción significativa de las citoquinas de *screening* (1). Otra explicación se asocia a la cinética de secreción de citoquinas que varía desde minutos hasta 24 o 48 hrs. dependiendo de la citoquina.

Aun cuando las citoquinas elegidas para realizar el *screening* han sido ampliamente descritas por la literatura como características y representativas de los estados pro-inflamatorio (IL 1 β) y anti-inflamatorio (IL 10), es necesario tener en consideración que

dichos estados son mucho más complejos que sólo el aumento o disminución de la secreción de una o más citoquinas y que además es necesario considerar no sólo la producción de la citoquina (concentración), sino también la potencia o umbral en la cual es capaz de inducir un proceso pro o anti-inflamatorio (55, 56).

En una segunda etapa del trabajo con la MOI ya elegida (1:0,1), se observó que en el cultivo de queratinocitos estimulado con blastoconidios de la cepa CVV5 la respuesta fue bifásica, pues aumentó significativamente la producción a los 30 minutos y 24 horas para las citoquinas IL-1 β , TNF- α y GM-CSF, lo que se correlaciona con la respuesta bifásica descrita por algunos grupos de investigadores (1, 2). Por otra parte, la respuesta de queratinocitos estimulados con hifas de la cepa CVV5 sólo fue tardía (24 horas), con un aumento estadísticamente significativo de IL-1 β , IL-10, TNF- α y GM-CSF.

Al analizar en detalle cada una de las citoquinas se observó que los queratinocitos produjeron un aumento sólo a las 24 horas de IL-4 al ser estimulados con blastoconidios de la cepa CVV5. Dicho aumento tardío puede ser atribuido a la cinética de secreción más lenta que poseen esta citoquina o a una respuesta Th2 retardada en este modelo particular de infección (5, 57). La producción de IL-8 se observó aumentada en queratinocitos estimulados con blastoconidios de la cepa CVV5 sólo a los 30 minutos. Este aumento se correlaciona con estudios donde se observa un rol importante de IL-8 frente a la infección con *C.albicans* tanto en esta línea celular como en melanocitos (51, 58, 59). A su vez, otro estudio realizado en un modelo de infección con *C.albicans* en epitelio oral reconstituido, demostró una inducción en la expresión de GM-CSF e IL-8 como un patrón de respuesta quimiotáctica (43).

El aumento significativo de la producción de IL-10 en los queratinocitos estimulados 24 horas con hifas de la cepa CVV5 sugiere un desvío de la respuesta Th1 a Th reg, lo que

podría constituir en este caso un mecanismo evasivo de la forma patógena de *C.albicans* (27).

IL-17A está descrita como una citoquina fundamental en la mediación de la defensa del hospedero frente a una infección fúngica, lo que haría esperar un aumento significativo en su producción al estimular queratinocitos con cualquiera de los tiempos y morfologías de la cepa CVV5, pero se observó solo un aumento de IL17A a las 24 horas de estimulación con blastoconidios, razón que sugiere una cinética de secreción más lenta en este modelo de infección, sumado a que está descrito que en piel son los linfocitos quienes secretan principalmente esta citoquina (60, 61).

En cuanto al aumento de la producción de TNF- α al estimular con blastoconidios o hifas de la cepa CVV5, este es coincidente con los efectos descritos sobre esta citoquina como un activador de los mecanismos de defensa del hospedero contra la infección por *C.albicans* (62).

Para INF- γ existe bibliografía que describe secreción de esta citoquina en cultivos queratinocitos, pero en este modelo de infección estudiado no fue posible evidenciar su comportamiento (49).

Con respecto a la estimulación de queratinocitos con la cepa SC5314, en este caso se observó una escasa producción de citoquinas en general. Solo en IL-1 β , TNF- α y GM-CSF fue observable un aumento significativo de producción a las 24 horas de estimulación. Dichos resultados pueden deberse a que los queratinocitos tengan una sensibilidad distinta frente a esta cepa particular de *C.albicans* de infección sistémica (1, 43, 63).

Por otra parte, un aumento de la producción de IL-10 e IL-8 sólo tempranamente (30 minutos), puede atribuirse a un comportamiento celular descrito como “apagamiento” de la cascada de señales (43).

Finalmente, las similitudes o discrepancias descritas en los niveles de producción de citoquinas pudiesen estar relacionadas a la línea celular utilizada (queratinocito) o al modelo de estudio (cultivo en monocapa) o al tratamiento con calor de las cepas de *C.albicans*, entre otros temas. Todas estas condiciones permiten dejar varias aristas para continuar con el trabajo pero basado en un modelo de infección de epitelio artificial con estimulación con levaduras mutantes.

Conclusiones

- Los queratinocitos humanos cutáneos normales reconocen la forma de blastoconidio e hifa de *C.albicans*, constituyendo un modelo estudio de infecciones superficiales que merece seguir siendo estudiado.
- El reconocimiento de blastoconidios e hifas de *C.albicans* se realiza de manera diferencial en cuanto a la secreción de citoquinas.
- Los blastoconidios de *C.albicans* son significativamente más estimuladores que las hifas.
- Los tiempos 30 minutos y 24 horas de estimulación es donde se observan valores significativos de secreción de citoquinas, al contrario, a las 2 horas de estimulación los niveles de secreción de citoquinas no son significativos en ninguno de los experimentos.
- La estimulación significativa de queratinocitos con hifas de *C.albicans* se observa sólo monofásica (24 horas), comparada con la estimulación con blastoconidios que fue bifásica (30 minutos y 24 horas).
- Los queratinocitos cutáneos reconocen mejor a la cepa de origen superficial que aquella de origen sistémico, ya que en este modelo de infección y en estas condiciones de experimentación la cepa CVV5 es más estimuladora de queratinocitos, respecto de la cepa SC5314.
- Finalmente, se debe señalar que todos los estudios que cuantifican perfiles serológicos, ya sea de citoquinas o anticuerpos circulantes, deben ser interpretados con cautela, puesto que no necesariamente una alteración periférica detectada a nivel plasmático pueda tener un correlato fisiológico exacto con lo que sucede en forma particular en el entorno de la célula.

Bibliografía

1. Moyes DL, Runglall M, Murciano C, Shen C, Nayar D, Thavaraj S, et al. A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell Host Microbe* Sep 16;8(3):225-35.
2. Moyes DL, Murciano C, Runglall M, Kohli A, Islam A, Naglik JR. Activation of MAPK/c-Fos induced responses in oral epithelial cells is specific to *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* hyphae. *Med Microbiol Immunol* 2012 Feb;201(1):93-101.
3. Blackwell M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot Mar*;98(3):426-38.
4. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* Feb 15;4(2):119-28.
5. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2011 Apr;11(4):275-88.
6. Bouza E, Munoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2008 Nov;32 Suppl 2:S87-91.
7. Concia E, Azzini AM, Conti M. Epidemiology, incidence and risk factors for invasive candidiasis in high-risk patients. *Drugs* 2009;69 Suppl 1:5-14.
8. Naglik JR, Moyes DL, Wachtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* Nov;13(12-13):963-76.
9. Jacobsen ID, Wilson D, Wachtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* Jan;10(1):85-93.
10. Liu H. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2001 Dec;4(6):728-35.
11. Williams DW, Jordan RP, Wei XQ, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J Oral Microbiol* 2013;5.
12. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 2011 Feb;10(2):112-22.
13. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 2012 Feb;10(2):112-22.
14. Maidan MM, De Rop L, Serneels J, Exler S, Rupp S, Tournu H, et al. The G protein-coupled receptor Gpr1 and the G α protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 2005 Apr;16(4):1971-86.
15. Baek YU, Martin SJ, Davis DA. Evidence for novel pH-dependent regulation of *Candida albicans* Rim101, a direct transcriptional repressor of the cell wall beta-glycosidase Phr2. *Eukaryot Cell* 2006 Sep;5(9):1550-9.
16. Stichternoth C, Ernst JF. Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* 2009 Jun;75(11):3663-72.
17. Jouault T, Sarazin A, Martinez-Esparza M, Fradin C, Sendid B, Poulain D. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 2009 Jul;11(7):1007-15.
18. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 2006 Jan;6(1):33-43.
19. Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, et al. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* 2009 Aug 31;206(9):2037-51.
20. Jawhara S, Thuru X, Standaert-Vitse A, Jouault T, Mordon S, Sendid B, et al. Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis* 2008 Apr 1;197(7):972-80.

21. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 2008 Jan;6(1):67-78.
22. Joly S, Ma N, Sadler JJ, Soll DR, Cassel SL, Sutterwala FS. Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol* 2009 Sep 15;183(6):3578-81.
23. Netea MG, Marodi L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol Sep*;31(9):346-53.
24. Wells CA, Salvage-Jones JA, Li X, Hitchens K, Butcher S, Murray RZ, et al. The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol* 2008 Jun 1;180(11):7404-13.
25. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013 Feb 15;4(2):119-28.
26. Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* May 19;9(5):355-61.
27. Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun* 2012 Apr;80(4):1304-13.
28. Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* 2004 Mar 1;172(5):3059-69.
29. Netea MG, Stuyt RJ, Kim SH, Van der Meer JW, Kullberg BJ, Dinarello CA. The role of endogenous interleukin (IL)-18, IL-12, IL-1beta, and tumor necrosis factor-alpha in the production of interferon-gamma induced by *Candida albicans* in human whole-blood cultures. *J Infect Dis* 2002 Apr 1;185(7):963-70.
30. Kaposzta R, Tree P, Marodi L, Gordon S. Characteristics of invasive candidiasis in gamma interferon- and interleukin-4-deficient mice: role of macrophages in host defense against *Candida albicans*. *Infect Immun* 1998 Apr;66(4):1708-17.
31. de Bernardis F, Santoni G, Boccanera M, Spreghini E, Adriani D, Morelli L, et al. Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infect Immun* 2000 Jun;68(6):3297-304.
32. Romani L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. *J Leukoc Biol* 2000 Aug;68(2):175-9.
33. Schaller M, Mailhammer R, Korting HC. Cytokine expression induced by *Candida albicans* in a model of cutaneous candidosis based on reconstituted human epidermis. *J Med Microbiol* 2002 Aug;51(8):672-6.
34. Hernandez-Santos N, Huppler AR, Peterson AC, Khader SA, McKenna KC, Gaffen SL. Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. *Mucosal Immunol* 2012 Sep;6(5):900-10.
35. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009 Aug 27;361(9):888-98.
36. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 2004 Aug 1;190(3):624-31.
37. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009 Feb 16;206(2):299-311.
38. van de Veerdonk FL, Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW, Kullberg BJ. Novel strategies for the prevention and treatment of *Candida* infections: the potential of immunotherapy. *FEMS Microbiol Rev* Nov;34(6):1063-75.

39. Pande K, Chen C, Noble SM. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat Genet*2013 Sep;45(9):1088-91.
40. Dalle F, Wachtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol* Feb;12(2):248-71.
41. Moyes DL, Runglall M, Murciano C, Shen C, Nayar D, Thavaraj S, et al. A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell Host Microbe*2010 Sep 16;8(3):225-35.
42. Wang X, Liu Y. Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1. *Cell Signal*2007 Jul;19(7):1372-82.
43. Netea MG, Kullberg BJ. Epithelial sensing of fungal invasion. *Cell Host Microbe*2010 Sep 16;8(3):219-20.
44. Perez R. Caracterización fenotípica y genética de la filamentación de cepas clínicas de *C. albicans*. Tesis de Magister en ciencias biológicas con mención en microbiología Universidad de Chile2011.
45. Maccallum DM. Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence. *Int J Microbiol*;2012:363764.
46. Lee KL, Buckley HR, Campbell CC. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida Albicans*. *Sabouraudia*1975 Jul;13(2):148-53.
47. Hau CS, Tada Y, Shibata S, Uratsuji H, Asano Y, Sugaya M, et al. High calcium, ATP, and poly(I:C) augment the immune response to beta-glucan in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2011 Nov;131(11):2255-62.
48. de Koning HD, Rodijk-Olthuis D, van Vlijmen-Willems IM, Joosten LA, Netea MG, Schalkwijk J, et al. A comprehensive analysis of pattern recognition receptors in normal and inflamed human epidermis: upregulation of dectin-1 in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010 Nov;130(11):2611-20.
49. Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A, Ikeda S. *Candida albicans* abrogates the expression of interferon-gamma-inducible protein-10 in human keratinocytes. *FEMS Immunol Med Microbiol*2008 Oct;54(1):122-8.
50. Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. Development of a novel three-dimensional in vitro model of oral *Candida* infection. *Microb Pathog*2006 Jun;40(6):271-8.
51. Schaller M, Mailhammer R, Grassl G, Sander CA, Hube B, Korting HC. Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J Invest Dermatol*2002 Apr;118(4):652-7.
52. Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP. Transcriptome profiling of endothelial cells during infections with high and low densities of *C. albicans* cells. *Int J Med Microbiol* Aug;301(6):536-46.
53. Yuan X, Hua X, Wilhelmus KR. Proinflammatory chemokines during *Candida albicans* keratitis. *Exp Eye Res* Mar;90(3):413-9.
54. Moyes DL, Murciano C, Runglall M, Kohli A, Islam A, Naglik JR. Activation of MAPK/c-Fos induced responses in oral epithelial cells is specific to *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* hyphae. *Med Microbiol Immunol* Feb;201(1):93-101.
55. Joly S, Sutterwala FS. Fungal pathogen recognition by the NLRP3 inflammasome. *Virulence*2010 Jul-Aug;1(4):276-80.
56. Djeu JY. Role of tumor necrosis factor and colony-stimulating factors in phagocyte function against *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis*1990 Sep-Oct;13(5):383-6.
57. Lopez-Bravo M, Minguito de la Escalera M, Dominguez PM, Gonzalez-Cintado L, del Fresno C, Martin P, et al. IL-4 blocks TH1-polarizing/inflammatory cytokine gene expression during monocyte-derived dendritic cell differentiation through histone hypoacetylation. *J Allergy Clin Immunol* Dec;132(6):1409-19.

58. Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. Candida albicans triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells. *Microb Pathog*2003 Apr;34(4):169-77.
59. Tapia CV, Falconer M, Tempio F, Falcon F, Lopez M, Fuentes M, et al. Melanocytes and melanin represent a first line of innate immunity against Candida albicans. *Med Mycol*2014 Jul;52(5):445-54.
60. Gladiator A, Wangler N, Trautwein-Weidner K, LeibundGut-Landmann S. Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *J Immunol*2012 Jan 15;190(2):521-5.
61. Gaffen SL, Hernandez-Santos N, Peterson AC. IL-17 signaling in host defense against Candida albicans. *Immunol Res* Aug;50(2-3):181-7.
62. Ohta H, Tanimoto T, Taniai M, Taniguchi M, Ariyasu T, Arai S, et al. Regulation of Candida albicans morphogenesis by tumor necrosis factor-alpha and potential for treatment of oral candidiasis. *In Vivo*2007 Jan-Feb;21(1):25-32.
63. Xiong J, Kang K, Liu L, Yoshida Y, Cooper KD, Ghannoum MA. Candida albicans and Candida krusei differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect Immun*2000 May;68(5):2464-9.